

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À
CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

Eduardo Paulino Júnior

**CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA REATIVO DO CÂNCER DE PRÓSTATA
EM FUNÇÃO DA MORFOLOGIA ACINAR E DA ASSINATURA DO COLÁGENO
POR IMUNO-HISTOQUÍMICA E À MICROSCOPIA POR GERAÇÃO DE SEGUNDO
HARMÔNICO (SHG): A BUSCA DE NOVOS MARCADORES PROGNÓSTICOS.**

BELO HORIZONTE

2022

Eduardo Paulino Júnior

**CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA REATIVO DO CÂNCER DE PRÓSTATA
EM FUNÇÃO DA MORFOLOGIA ACINAR E DA ASSINATURA DO COLÁGENO
POR IMUNO-HISTOQUÍMICA E À MICROSCOPIA POR GERAÇÃO DE SEGUNDO
HARMÔNICO (SHG): A BUSCA DE NOVOS MARCADORES PROGNÓSTICOS.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Marcelo Henrique Mamede Lewer



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO / TESE

Às **18:00** horas do dia vinte e um de julho de dois mil e vinte e dois, na Plataforma TEAMS, pela Universidade Federal de Minas Gerais, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **EDUARDO PAULINO JÚNIOR**. A presidência da sessão coube ao **PROF. Marcelo Henrique Mamede Lewer**, orientador. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: **PROF.^a Cristiana Buzelin Nunes, UFMG; PROF.^a Ana Maria de Paula, UFMG; PROF. William Carlos Nahas, USP; PROF. Athanase Billis, UNICAMP; PROF. Marcelo Henrique Mamede Lewer, UFMG - orientador**. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Tese de Doutorado**, intitulada: **"CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA REATIVO DO CÂNCER DE PRÓSTATA EM FUNÇÃO DA MORFOLOGIA ACINAR E DA ASSINATURA DO COLÁGENO POR IMUNO- HISTOQUÍMICA E À MICROSCOPIA POR GERAÇÃO DE SEGUNDO HARMÔNICO (SHG): A BUSCA DE**

NOVOS MARCADORES PROGNÓSTICOS." Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **APROVADA a Tese de Doutorado**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 21 de julho de 2022.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Ana Maria de Paula, Professora do Magistério Superior**, em 22/07/2022, às 10:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Henrique Mamede Lewer, Professor do Magistério Superior**, em 26/07/2022, às 07:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cristiana Buzelin Nunes, Professora do Magistério Superior**, em 27/07/2022, às 14:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Paulino Junior, Membro**, em 05/08/2022, às 11:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **William Carlos Nahas, Usuário Externo**, em 11/08/2022, às 11:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Resende, Coordenador(a) de curso de pós- graduação**, em 22/12/2022, às 10:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1579576** e o código CRC **8177A5AA**.

Dedico esta tese à Regina, minha mãe, minha maior incentivadora.

À minha esposa, Jussara Paulino, minha filha Gabriela Paulino (razão da minha vida).

Às minhas irmãs, Riva e Rúbia Paulino.

In memoriam de Dilce Cordeiro e Maria Rosa Paes (duas “mães” que partiram), do meu

querido e eterno Pai, Eduardo Paulino e de meus mentores espirituais,

Maria Ophélia, Ana Margarida e Pêrsio Godoy.

AGRADECIMENTOS

O destino fez com que este trabalho fosse concluído em momento crítico da história mundial, a pandemia da COVID-19. E foi sobrevivendo à infecção, sustentado por uma estrutura familiar sólida, com o apoio dos familiares e amigos queridos e o incentivo dos meus colegas de trabalho, que a ideia pôde ser transformada em um laborioso projeto de pesquisa.

Em especial, agradeço ao meu orientador, Prof. Marcelo Mamede, e à coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia, Profa. Vivian Resende. Sou grato de coração por toda a amizade, carinho e respeito por mim. Agradeço por me proporcionarem crescimento profissional, amparo nos momentos difíceis e por enxergarem em mim um potencial que eu mesmo não conhecia. Ao meu orientador, grande e eterno incentivador, só tenho a agradecer por acreditar que eu seria capaz. Hoje tenho a sensação do dever cumprido.

Tenho muito a agradecer ao Marco Aurélio de Jesus, Pâmela e Nivaldo Toppa, da diretoria do Laboratório Análys Patologia, por todo o apoio na execução do Projeto. Ao pessoal do setor de digitação, especialmente à minha querida Cláudia de Jesus, pelas noites de trabalho. Ao Marcos Souza, Rejane Miranda, Samuel Rubem e à Maria de Lourdes Gomes que atuaram nos bastidores. Em especial, agradeço ao Mário Lima pela parceria e à Lúcia Porto pelo patrocínio, incentivo e pelo apoio científico, com menção igualmente especial à Margaret Gomes pela execução técnica que me permitiu analisar material de alta qualidade.

Ao Departamento de Anatomia Patológica, especialmente às amadas professoras Mônica Demas, Paula Vidigal e Cristiana Buzelin, agradeço por todo o incentivo ao longo da minha carreira e pelo companheirismo, além de reforçado carinho ao Prof. Marcelo Pascoal que, além de estimulador, participou ativamente no desenvolvimento metodológico e na análise estatística do estudo. Agradeço também à Maria Célia Graveli, que além de nossa eterna secretária, foi minha grande parceira.

Aos meus ilustres discentes da iniciação científica João Vitor Simões, Matheus Lavigne, Yuri Vieria, Jéssica Simões e Eduardo Torres, que participaram mais que ativamente em todas as etapas do Projeto, trabalhando comigo diuturnamente, sem poupar feriados ou finais de semana. Ao Egleidson e à Professora Ana Maria pela colaboração e possibilidade de utilizar o laboratório de Biofotônica e ao Frank Longford (University of Southampton) pela implementação do software de análise de imagens SHG.

“Sutil, caprichosa e não raro contraintuitiva,
a natureza não cede com facilidade seus segredos”.

Prof. Luiz Otávio Savassi Rocha

RESUMO

INTRODUÇÃO: O carcinoma de próstata (CaP) é tumor heterogêneo de alta incidência e evolução lenta. O prognóstico baseia-se no grau histológico dado pelo Sistema Gleason, mas nem sempre é possível identificar no conjunto dos casos os agressivos. O estroma reativo (ER) do tumor, por sinais químicos e físicos, induz crescimento e disseminação e vem sendo avaliado como possível fator prognóstico. **OBJETIVO:** Avaliar a intensidade do ER tumoral em função da morfologia dos ácinos neoplásicos, deposição e organização do colágeno e tipos celulares do estroma. **METODOLOGIA:** Foram examinadas 120 biópsias sextantes de próstata, selecionando-se uma lâmina por caso, a com maior representação tumoral e de maior grau histológico, concomitantemente, distribuídas em 4 grupos de 30: 1- Gleason 3+3; 2- Gleason 3+4; 3- Gleason 4+3; 4- somatória ≥ 8 . Uma ou mais regiões foram mapeadas pelo grau de ER e a morfologia dos ácinos neoplásicos em correspondência registrada. Os tipos celulares do ER foram estudados por marcação imuno-histoquímica para actina (ACT), desmina (DES), vimentina (VIM) e CD34 e ácinos neoplásicos classificados em 4 padrões morfológicos (A, B, C e D). Quantificação e organização do colágeno foram avaliadas por meio de microscopia por geração de segundo harmônico. **RESULTADOS:** Das 327 áreas analisadas, 21,1%, 23,5%, 26,0% e 29,4% pertenciam aos grupos 1, 2, 3 e 4, respectivamente, predominando padrões acinares A (41,6%) e B (38,3%), compostos por ácinos bem formados (A) e microácinos rudimentares geralmente localizados na interface do tumor com o estroma (B). Padrão cribriforme (C) foi visto em 7,3% das áreas e D (células isoladas e ninhos) definiu o grupo 4. ER foi visto em 70% das áreas e tumores estromogênicos (percentual de estroma \geq massa tumoral) em 8,0% delas. Os de menor intensidade de ER eram do G3. Estratificando-se pelo padrão acinar, tumores de padrões B e D produziram maior ER, com infiltração perineural mais frequente e maior deposição de colágeno. O perfil celular levantou a suspeita da presença de telócitos no ER. **CONCLUSÃO:** Diferentes padrões de ER vistos no mesmo tumor e com mesmo escore de Gleason podem ser determinados por interação epitélio-estromal bidirecional, resultando em padrões acinares específicos, não necessariamente relacionados ao Sistema Gleason. Como exemplo, microácinos rudimentares vistos na periferia da massa tumoral, associados a desmoplasia, poderiam estar diretamente ligados à evolução desfavorável do tumor.

Palavras-chave: Próstata; carcinoma; estroma reativo; imuno-histoquímica; SHG; colágeno; telócitos.

ABSTRACT

Background: Prostate carcinoma (PCa) is the second most commonly diagnosed cancer and one of the leading causes of cancer among men worldwide. Prognosis is based on the Gleason System. As it is not always possible to identify aggressive PCa among indolent ones, more accurate methods are required. Reactive stroma (RS), known to induce tumor growth and dissemination through chemical and physical signs, has been evaluated as a possible prognostic factor. **Objective:** the aim of this study is to evaluate the intensity of the RS regarding neoplastic acini morphology, collagen deposition and organization and stromal cell phenotypes. **Materials and Methods:** 120 sextant prostate biopsies were examined, selecting one slide per case with greater tumor extent and harboring the highest Gleason score. Four groups of 30 were formed: 1- Gleason 3+3; 2- Gleason 3+4; 3- Gleason 4+3; 4- sum ≥ 8 . One or more regions were mapped by RS grade and the neoplastic acini morphology at the vicinity recorded. RS cell types were immunohistochemistry analyzed using antibodies against actin (ACT), desmin (DES), vimentin (VIM) and CD34. Neoplastic acini were classified into 4 morphological patterns (A, B, C and D). Collagen quantification and organization were evaluated by second harmonic generation microscopy. **Results:** 327 areas were analyzed: 21.1%, 23.5%, 26.0% and 29.4% fit into groups 1, 2, 3 and 4, respectively. A (41.6%) and B (38.3%) patterns prevailed, composed of well-formed acini (A) and rudimentary microacini usually seen at tumor interface with the neighborhood stroma (B). Cribriform pattern (C) was seen in 7.3% of the areas and D (isolated cells and nests) defined group 4. RS was seen in 70% of all areas and stromogenic tumors (stroma mass \geq tumor mass) in 8.0%. Group 3 had the lowest RS intensity. Stratified by acinar patterns, tumors with B and D acini had higher RS, frequent perineural infiltration and greater collagen deposition. The stroma cell profile suggested that telocytes were present. **Conclusion:** Different RS patterns were seen in the same tumor and coexisted in a single Gleason score. RS pattern may be due to a two-way specific epithelial-stroma interaction resulting in a peculiar acinar morphology. This suggests that the prognostic value of RS may not be directly related to the Gleason System. Specific acini patterns such as the presence of rudimentary microacini at the periphery of the tumor mass, which trigger a desmoplastic reaction and increase invasiveness, may be a more significant indication of unfavourable evolution.

Keywords: prostate; carcinoma; reactive stroma; immunohistochemistry; SHG; collagen; telocytes.

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	PÁGINA
FIGURA 1 - PERFIS ARQUITETURAIS DO CAP SEGUNDO EPSTEIN.	23
FIGURA 2 - MAPEAMENTO DE ÁREAS PARA ANÁLISE DE UMA DAS AMOSTRAS DO GRUPO 4.	44
FIGURA 3 - PADRÕES HISTOLÓGICOS ARQUITETURAIS OBSERVADOS NO CARCINOMA ACINAR PROSTÁTICO E SUA CORRELAÇÃO COM OS ESCORES DE GLEASON.	44
FIGURA 4 - ARRANJOS HISTOLÓGICOS ARQUITETURAIS ÚNICOS DO CARCINOMA ACINAR PROSTÁTICO.	46
FIGURA 5A - ARRANJOS HISTOLÓGICOS ARQUITETURAIS MISTOS DO CARCINOMA ACINAR PROSTÁTICO.	47
FIGURA 5B - ARRANJOS HISTOLÓGICOS ARQUITETURAIS MISTOS DO CARCINOMA ACINAR PROSTÁTICO.	48
FIGURA 6 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE MICROÁCINOS NEOPLÁSICOS.	51
FIGURA 7 - CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS PARA DEFINIÇÃO DE MICROÁCINOS PADRÃO B.	52
FIGURA 8 - PADRÕES DO ESTROMA PROSTÁTICO.	54
FIGURA 9 - SISTEMA DE LENTES E LASER UTILIZADOS PARA A OBTENÇÃO DE IMAGENS POR SHG - LABORATÓRIO DE FOTÔNICA, FÍSICA - UFMG.	57
FIGURA 10 - AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS SUBEPITELIAIS EM ÁREAS DE PARÊNQUIMA NORMAL.	68
FIGURA 11 - AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS SUBEPITELIAIS EM CORTES HISTOLÓGICOS CONSECUTIVOS DE AMOSTRA DE TUMOR.	69
FIGURA 12 - MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA VIM EM CÉLULAS EPITELIAIS.	70

FIGURA 13 - AVALIAÇÃO DA DENSIDADE VASCULAR OBTIDA PELO VESSEL ANALYSIS (IMAGEJ).	74
FIGURA 14 - ORGANIZAÇÃO DE FIBRAS DE COLÁGENO EM AMOSTRAS DE PRÓSTATA NORMAL E DE TUMORES (SHG), SUPERPOSTAS ÀS IMAGENS DE PL, COM AS RESPECTIVAS REGIÕES EM HE.	78

LISTA DE TABELAS

TABELAS	PÁGINA
TABELA 1 - ARRANJOS ARQUITETURAIS DOS ÁCINOS NEOPLÁSICOS.	45
TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS GRAUS DE GLEASON POR GRUPO, NÚMERO DE ÁREAS EXAMINADAS, IDADE E DOSAGEM SÉRICA DE PSA TOTAL.	60
TABELA 3 - MÉDIA DE ÁREA TUMORAL PELOS GRUPOS.	61
TABELA 4 - FREQUÊNCIA DOS PADRÕES ACINARES PELOS GRUPOS.	61
TABELA 5 - FREQUÊNCIA DE INFILTRAÇÃO PERINEURAL PELOS GRUPOS E PADRÕES ACINARES.	62
TABELA 6 - FREQUÊNCIA GLOBAL DOS PADRÕES ACINARES ÚNICOS PELOS GRUPOS (N=107).	63
TABELA 7 - FREQUÊNCIA GLOBAL DE INFILTRAÇÃO PERINEURAL PELOS GRUPOS E PADRÕES ACINARES NAS AMOSTRAS DE TUMOR.	64
TABELA 8 - INTENSIDADE DO ER EM FUNÇÃO DOS GRUPOS E DOS PADRÕES ACINARES.	65
TABELA 9 - INTENSIDADE GLOBAL DO ER EM FUNÇÃO DOS GRUPOS E DOS PADRÕES ACINARES NAS AMOSTRAS DE TUMOR.	66
TABELA 10 - MARCAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS DOS PERFIS MIOFIBROBLÁSTICOS 1 E 2 E TELOCÍTICO EM FUNÇÃO DOS GRUPOS.	71
TABELA 11 - MARCAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS DOS PERFIS MIOFIBROBLÁSTICOS 1 E 2 E DO PERFIL TELOCÍTICO EM FUNÇÃO DOS PADRÕES ACINARES.	72
TABELA 12 - MÉDIAS DA DENSIDADE VASCULAR POR GRUPO E PADRÕES ACINARES AVALIADAS PELA MARCAÇÃO COM CD34 (N=327).	73

TABELA 13 - MÉDIAS DOS NÚMEROS DE FIBRAS DE COLÁGENO EM FUNÇÃO DOS GRUPOS E PADRÕES ACINARES.	76
TABELA 14 - MÉDIAS DO NÚMERO DE FIBRAS DE COLÁGENO EM FUNÇÃO DA INTENSIDADE DO ESTROMA REATIVO.	77
TABELA 15 - MÉDIAS DO NÚMERO DE FIBRAS DE COLÁGENO EM FUNÇÃO DE INFILTRAÇÃO PERINEURAL.	77
TABELA 16 - MÉDIAS DA ANISOTROPIA LOCAL EM FUNÇÃO DA INTENSIDADE DO ESTROMA REATIVO.	77

LISTA DE SIGLAS

ACT	Actina
AD	Adesões focais
CAF	Cancer-associated fibroblasts
CMF	Células fusiformes com características mioides
CAL	- Calponina
CaP	Carcinoma da próstata
DES	Desmina
ER	Estroma reativo
HE	Hematoxilina & Eosina
HNP	Hiperplasia nodular da próstata
ICLC	Células intersticiais semelhantes às células de Cajal
ISUP	Sociedade Internacional de Patologia Urológica
IPN	Infiltração perineural
MAP	Proteína quinase ativada por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
MMP	Metalonoproteinases
PC	Prostate cancer
PKA	Proteína quinase A
PL	Fluorescência
PSA	Antígeno prostático específico
SHG	Second harmonic generation
TAC	Colágeno associado a tumor
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
TGF- β	Transforming growth factor- β
Tp	Telópodos
VIM	Vimentina

SUMÁRIO

ITEM	PÁGINA
1- INTRODUÇÃO	17
2- OBJETIVOS	19
3- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1- O CARCINOMA DA PRÓSTATA	20
3.2- MARCADORES PROGNÓSTICOS DO CÂNCER DE PRÓSTATA	21
3.3- O ESTROMA REATIVO ASSOCIADO A TUMOR	24
3.4 CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA REATIVO DO CARCINOMA DE PRÓSTATA	27
3.5 QUANTIFICAÇÃO DO ESTROMA REATIVO	31
3.6- COLÁGENO, MÚSCULO LISO E ESTROMA CARCINOMA DE PRÓSTATA	31
3.7- ANGIOGÊNESE	35
3.8- BIOFÍSICA DO MICROAMBIENTE TUMORAL	36
3.9- MODELO DE ESTUDO BASEADO NA MORFOLOGIA DO ÁCINO NEOPLÁSICO, ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DE ESTROMA E PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DO COLÁGENO	40
4- MÉTODOS	44
4.1- ANÁLISE HISTOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E DA DISTRIBUIÇÃO DO COLÁGENO NO ESTROMA REATIVO	45
A- CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA REATIVO AO EXAME HISTOLÓGICO DE ROTINA	45
B- CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA REATIVO AO EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO	53
C- CARACTERIZAÇÃO DA NEOANGIOGÊNESE AO EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO	54
D- CARACTERIZAÇÃO DA PRESENÇA, DISTRIBUIÇÃO E ARQUITETURA DAS FIBRAS DE COLÁGENO	55
4.2- ANÁLISE ESTATÍSTICA	59
4.3- ASPECTOS ÉTICOS	59
5- RESULTADOS	60

5.1- ANÁLISES DESCRITIVAS E AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA GERAL	60
5.2- CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA REATIVO AO EXAME HISTOLÓGICO DE ROTINA	64
5.3- CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA REATIVO AO EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO	66
5.4- CARACTERIZAÇÃO DA NEOANGIOGÊNESE AO EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO	73
5.5- ASSINATURA DO COLÁGENO PELA MICROSCOPIA COM SHG	75
6- DISCUSSÃO	79
6.1- DO MÉTODO PROPOSTO PARA A AVALIAÇÃO DO ER NO CaP	79
6.2- DAS ANÁLISES DESCRITIVAS	81
6.3- DO PADRÃO DO ER NO CaP AO EXAME HISTOLÓGICO CONVENCIONAL	84
6.4- DO MODELO PROPOSTO PARA AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DO ER NO CaP AO EXAME HISTOLÓGICO CONVENCIONAL	86
6.5- DA CARACTERIZAÇÃO DO ER AO EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO	88
6.6- DA CARACTERIZAÇÃO DA NEOANGIOGÊNESE AO EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO	92
6.7- DA ASSINATURA DO COLÁGENO PELA MICROSCOPIA COM SHG	95
7- CONCLUSÃO	97
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
9- ANEXOS	106

1- INTRODUÇÃO

A modificação no microambiente do estroma em resposta ao câncer é comum em muitos tumores. Tais modificações decorreriam da necessidade de se manter a homeostase do tecido frente a danos celulares surgidos na intimidade da neoplasia, como acontece no processo de reparação de feridas. Por essa analogia, o estroma modificado do tumor recebeu o nome de estroma reativo (ER). Na próstata, ER pode ser observado em inflamações crônicas, atrofia e hiperplasia nodular, sendo diferente do ER do carcinoma da próstata (CaP), que parece ter um controle ativo no desenvolvimento e progressão tumoral. A tumorigênese envolveria sinalização de via dupla entre a célula epitelial maligna e o estroma, por meio da secreção de fatores solúveis no microambiente, tais como *Transforming growth factor- β* (TGF- β 1), Interferon gama (INF δ), Interleucina 2 (IL2) e Interleucina 6 (IL6). Essa interação facilitaria o crescimento tumoral e a invasão tecidual, promovendo a disseminação.

No CaP, idade, o nível sérico do PSA ao diagnóstico e o grau histológico obtido pelo Sistema de Classificação de Gleason representam os principais marcadores prognósticos. Embora vários outros sistemas de classificação tenham sido propostos nas últimas décadas, nenhum outro foi superior ao de Gleason. Ao longo dos 40 anos subsequentes, o diagnóstico clínico e o tratamento do CaP evoluíram, levando a revisões e atualizações desse sistema, visando maior precisão diagnóstica e maior acuidade prognóstica, reprodutibilidade e redução das indicações de prostatectomia radical. Entretanto, prever o comportamento biológico do tumor é difícil, dada sua alta heterogeneidade, servindo de estímulo para a busca de biomarcadores mais acurados. Predizer o comportamento biológico do CaP significa, basicamente, separar os de comportamento indolente usual daqueles mais agressivos, com risco de morte para o paciente. Recentemente, estudos baseados na detecção e quantificação do ER do CaP evidenciaram maior risco de recidiva bioquímica nos tumores com reação estromal intensa. Muitos cânceres humanos, como os de cólon e mama, podem induzir reação estromal (desmoplasia) como componente da progressão tumoral.

Na prática clínica, a avaliação do câncer de próstata por exames de imagem ainda é um desafio. São aplicáveis no diagnóstico topográfico, avaliação de extensão na próstata e extraprostática, detecção do padrão de crescimento, acometimento de estruturas vizinhas e avaliação de possíveis metástases linfonodais. Podem ser úteis no planejamento de radioterapia e na avaliação da resposta terapêutica, ou na decisão em se

iniciar acompanhamento vigiado (*active surveillance*) dos pacientes com tumores localizados e de baixo grau. Nos pacientes operados, podem ser úteis na detecção de sítio neoplásico naqueles com recidiva bioquímica.

Testes moleculares e genéticos, inclusive analisados em biópsias para diagnóstico do tumor por meio de análise imuno-histoquímica, também têm sido usados tanto como auxílio ao diagnóstico, quanto no prognóstico. Outras ferramentas diagnósticas emergem da vasta gama de possibilidades surgidas com a evolução tecnológica, destacando-se, nas últimas décadas, a microscopia por geração de segundo harmônico (SHG), poderosa ferramenta de imagem óptica não-linear.

2- OBJETIVOS

2.1- GERAIS

Caracterizar morfológicamente o estroma reativo do CaP por meio de análise histológica, imuno-histoquímica e microscopia por geração de segundo harmônico.

2.2- ESPECÍFICOS

Desenvolver sistema de análise do estroma tumoral em função de seu arranjo arquitetural, padrões de organização das células tumorais e angiogênese.

Estabelecer parâmetros de intensidade e organização do colágeno no estroma tumoral.

Avaliar os componentes celulares do estroma tumoral por meio de análise imuno-histoquímica.

Correlacionar os dados obtidos das análises de padrão e classificação do estroma com os dos grupos prognósticos baseados no Sistema de classificação de Gleason.

3- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1- O CARCINOMA DA PRÓSTATA

O câncer de próstata (CaP) é particularmente comum em países desenvolvidos, representando a quinta maior causa de morte por neoplasia maligna em homens, com notável variação geográfica nas taxas de incidência e mortalidade (1). No Brasil, estima-se que, para o biênio 2020-2022, 65.840 novos casos sejam diagnosticados, representando o tumor mais comum no homem (excluindo tumores de pele não-melanoma), correspondendo a 29,2% dos tumores em geral (2).

Em humanos, o CaP tem uma história natural prolongada, que pode ser conceitualmente dividida em três estágios. O primeiro e mais prolongado estágio envolve o início e o desenvolvimento de doença confinada à próstata, com duração estimada de mais de 15 anos. O segundo estágio envolve a disseminação para os linfonodos regionais e o terceiro estágio envolve a disseminação metastática por via linfática para linfonodos e sanguínea, especialmente para o esqueleto (3).

Histologicamente, o ácino prostático é revestido por células epiteliais luminais secretoras (geralmente cuboidais a colunares) e uma camada descontínua de células basais (responsáveis pela renovação e manutenção do epitélio). Está imerso em um estroma fibromuscular (4). As células epiteliais secretam seus produtos no lúmen acinar e estão situadas junto à lâmina basal da membrana basal, havendo células basais entre estes dois componentes. Existem também células neuroendócrinas intercaladas que regulam a secreção da próstata. Fora dos ácinos encontra-se o compartimento do estroma, constituído por vasos sanguíneos, matriz extracelular (MEC) e vários outros elementos celulares, incluindo-se células musculares lisas, fibroblastos, terminações de nervos do sistema nervoso autônomo, células do sistema imunológico etc. Os tumores surgem das células epiteliais secretoras (perfil secretor) e na grande maioria das vezes representam adenocarcinomas de padrão acinar.

Desde o final dos anos 1980, a biópsia transretal da próstata guiada por ultrassonografia vem sendo empregada como procedimento padrão para o diagnóstico de CaP. Atualmente, envolve a coleta sistemática de 12 amostras de biópsia por agulha da zona periférica, sítio preferencial das neoplasias, 6 de cada lado da glândula, duas em cada região anatômica (ápice, terço médio e base), eventualmente colhendo-se amostras complementares de nódulos suspeitos ou da zona de transição (5).

A indicação de tratamentos radicais para tumores de baixo risco vem diminuindo, com a redução da porcentagem de homens submetidos ao chamado *overtreatment*, embora muitos pacientes ainda recebam tratamento considerado desnecessário. Os danos derivados do *overdiagnosis* levaram à recomendação, especialmente nos Estados Unidos, de não se indicar a triagem baseada em dosagens de antígeno prostático específico (PSA) para todos os homens, independentemente da idade (5). Desta forma, o número de homens com CaP de baixo risco submetidos à vigilância ativa naquele país mudou de ~ 10% em 2005-2009 para ~ 40% em 2010-2013. O Instituto Nacional do Câncer (INCA), aqui no Brasil, segue na mesma linha.

Por outro lado, à medida que se desaconselha a triagem como um todo, acendem-se sinais de alerta sobre a necessidade de melhoria substancial na qualidade e confiabilidade do diagnóstico inicial. O sistema de classificação de Gleason (ver adiante) é o método mais importante de avaliação prognóstica. Porém, dentre outros aspectos, mesmo entre patologistas especialistas, está sujeito a considerável variabilidade interobservador (5). Com a indicação crescente de *active surveillance*, torna-se imperativo fornecer aos pacientes diagnóstico mais preciso e mais assertivo do risco individual de evolução para o CaP clinicamente significativo.

3.2- MARCADORES PROGNÓSTICOS DO CÂNCER DE PRÓSTATA

Existem poucos biomarcadores úteis na distinção entre tumores de próstata com alto potencial de recorrência ou com tendência à disseminação mais precoce, daqueles insidiosos, de crescimento lento, restritos à glândula. Marcadores de sobrevida e preditivos são de grande importância na prática, não apenas em função da mortalidade associada ao CaP, mas também devido à morbidade frente às formas atuais de terapia (6, 7). As tentativas de se encontrar combinações de parâmetros clínicos e patológicos, bem como marcadores séricos, trouxeram resultados positivos, porém limitados em seu escopo e fortemente dependentes do grau de diferenciação tumoral, como proposto pelo Sistema de Classificação de Gleason (6-9). A dificuldade em se prever o comportamento biológico do tumor é especialmente importante nos pacientes com tumores Gleason 7 e um número significativamente alto de pacientes se enquadra nesta categoria (7). Com o advento do *active surveillance*, diversos estudos vêm sendo desenvolvidos na busca de marcadores mais acurados que possam discriminar dentre os pacientes com CaP, aqueles que

realmente requeiram intervenção terapêutica imediata. Uma destas linhas de pesquisa aborda o estroma associado ao tumor.

Yanagisawa et alii lembram da importância das biópsias da próstata na avaliação do tumor antes que qualquer intervenção terapêutica seja tomada, seja por prostatectomia radical, radioterapia ou qualquer forma de terapia neoadjuvante (8). Por outro lado, reforçam também a dificuldade em se avaliar os biomarcadores corretamente nessas biópsias, tendo em vista uma série de limitações: (1) a amostra de biópsia por agulha é pequena (estimada como aproximadamente 1/10.000 do tamanho de uma próstata); (2) amostragem de apenas uma parte dos tumores; (3) a amostragem nem sempre é da região que contém a representação de tumor de mais alto grau; (4) a amostragem de tumor analisada nem sempre se correlaciona com o grau histológico final obtido com a análise da peça de prostatectomia radical.

O sistema de classificação de Gleason tem sido o preditor mais poderoso de prognóstico no CaP (10). Criado em 1966 por Donald F. Gleason, este sistema é baseado unicamente no padrão arquitetural do tumor (11), avaliado nos cortes histológicos corados em Hematoxilina & Eosina (HE) (12). São definidos cinco padrões histológicos de crescimento (graus), sendo o grau 1 (Gleason ou G1) o de melhor grau de diferenciação tumoral, de prognóstico mais favorável, enquanto o grau 5 (G5), o menos diferenciado, de pior prognóstico. Como muitos adenocarcinomas de próstata apresentam mais de um padrão histológico, desenvolveu-se sistema de pontuação (1 a 5). Houve melhor correlação com o prognóstico quando duas notas eram somadas para determinada área do tumor. Assim, a soma dos escores do padrão primário (o componente mais frequente) com o secundário (segundo mais frequente) resulta na pontuação ou escore final de Gleason (por exemplo, 3+4 = 7). Naqueles casos com tumores exibindo apenas um padrão (padrões primário e secundário iguais) dobra-se o escore (exemplo, 3+3 = 6) (12). A pontuação de Gleason de 2 a 4 praticamente não é observada em material de biópsia.

Embora as pontuações de Gleason variem de 2 a 10, existem 25 possíveis combinações de pontuações (por exemplo, 1 + 1, 1 + 2, 1 + 3, 1 + 4, 1 + 5, 2 + 1, etc.). No entanto, para fins terapêuticos, várias pontuações foram agrupadas por supostamente determinarem prognósticos semelhantes (10). Em 2013, baseando-se em dados do Hospital Johns Hopkins, estudo liderado por Epstein, J. I., et al. produziu um novo sistema de classificação (10), denominado grupos prognósticos, referendado pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP) e pela OMS em 2016 (10, 13, 14). Neste novo sistema temos: grupo prognóstico 1 (pontuação de Gleason ≤ 6), grupo prognóstico

2 (pontuação de Gleason 3 + 4 = 7), grupo prognóstico 3 (pontuação de Gleason 4 + 3 = 7), grupo prognóstico 4 (somatório da pontuação de Gleason = 8) e grupo prognóstico 5 (soma das pontuações = 9–10) (10). É importante reforçar que os critérios para a diferenciação entre os tumores Gleason 3 e 4 foram revistos e modificados nos últimos anos. Ainda, o escore terciário passou a ser considerado em algumas circunstâncias e a porcentagem do componente G4 passou a ser valorizada especialmente na indicação de *active surveillance* (14). A Figura 1 apresenta os diferentes padrões de ácinos neoplásicos observados nos tumores de próstata (11).

Além do Grau de Gleason, os níveis séricos de antígeno prostático específico (PSA) ao diagnóstico e o estadiamento patológico são também fatores indicativos de prognóstico (15). A caracterização dos perfis arquiteturais do carcinoma de próstata segue critérios específicos (11, 16), por vezes subjetivos e com variáveis níveis de concordância interobservadores.

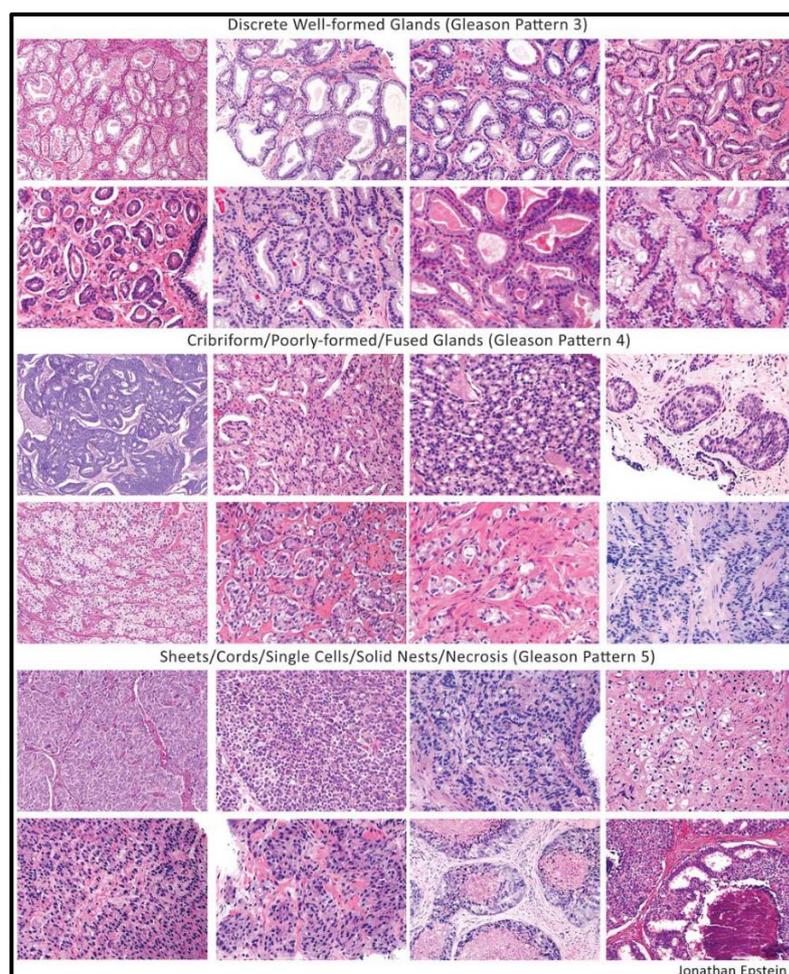


FIGURA 1: PERFIS ARQUITETURAIS DO CAP SEGUNDO EPSTEIN.

Fonte: Epstein, JI. (11)

3.3- O ESTROMA REATIVO ASSOCIADO A TUMOR

Transição epitélio-mesenquimal (TEM) consiste em processo de transdiferenciação de células epiteliais maduras, que adquirem fenótipo fibroblasto-símile, ou seja, a célula perde seus marcadores epiteliais e passa a expressar marcadores mesenquimais (3). Tal fenômeno ocorre durante a embriogênese e em processos fisiológicos, como na reparação de feridas, mas também pode ocorrer em processos inflamatórios crônicos e neoplasias. Nas neoplasias, TEM auxilia na transformação de ninhos epiteliais multicelulares imóveis em células altamente móveis e independentes, com capacidade de invasão e originar metástases, autorrenovação e iniciação tumoral, além de favorecer o aparecimento de quimiorresistência (3).

O estroma associado ao tumor foi descrito como "estroma reativo" (ER) por apresentar alterações semelhantes às observadas no reparo de feridas. O ER ou o compartimento estromal tumoral é assim caracterizado: 1- alterações fenotípicas nas células do estroma; 2- aumento da angiogênese; 3- influxo de macrófagos associados ao tumor; 4- remodelação da matriz extracelular (MEC); 5- maior disponibilidade de fatores parácrinos e proteases (3). Representa ambiente dinâmico que influencia diretamente o comportamento das células epiteliais e realiza o reparo do tecido em resposta a agressões (17).

Interações entre o estroma e as células epiteliais são bem estabelecidas no desenvolvimento embrionário, mediadas por sinais parácrinos solúveis e por componentes da MEC secretados do mesênquima em desenvolvimento, que induzem o epitélio adjacente a se proliferar rapidamente. As células epiteliais se diferenciam, assim como as células estromais adjacentes, que passam a secretar menores quantidades de fatores de crescimento. Em contrapartida, o epitélio diferenciado produz citocinas que estimulam a diferenciação estromal. Cria-se assim um novo equilíbrio de interferência mesenquimal-epitelial (18). Na próstata, o mesênquima embrionário urogenital tem propriedade de induzir proliferação epitelial glandular. Brotamentos do epitélio da uretra em formação penetram em meio ao estroma em diferenciação e formam rede de túbulos e alvéolos que constituirão o componente epitelial glandular (19).

Cada vez se torna mais claro que a progressão do câncer não seria regulada exclusivamente pela inativação de genes supressores de tumor ou por ativação de oncogenes nas células cancerosas. Muitas evidências sugerem a codependência do compartimento estromal para criar um microambiente mais favorável à formação e

manutenção do tumor (17). No adenocarcinoma da próstata, a ativação do microambiente estromal parece ser etapa crítica para seu crescimento e progressão (20).

É dito que fibroblastos e células musculares lisas representam os principais tipos de células estromais da próstata humana. A função primária destas células é sintetizar as estruturas e proteínas regulatórias que compõem a MEC. A MEC é uma rede de proteínas fibrilares, glicoproteínas adesivas e proteoglicanos. Além disso, é um reservatório de fatores de crescimento ativos e latentes. Componentes estruturais como o colágeno e fibras elásticas fornecem força e flexibilidade ao tecido. Estes componentes também servem de substrato para fixação e migração de células, que são mediadas por glicoproteínas adesivas, como a fibronectina e laminina (17).

Juntas, as células do estroma e a MEC criam um microambiente que regula o crescimento e a diferenciação de células adjacentes. Está bem definido que as células musculares lisas da próstata medeiam interações entre o estroma e as células epiteliais, que são importantes para o desenvolvimento e a manutenção da diferenciação dos tecidos (7, 17). O armazenamento de fatores de crescimento latentes, proteases e os inibidores de protease na MEC permite mobilização imediata desses fatores para remodelamento da mesma e do tecido. Portanto, o estroma se comporta de modo a manter a homeostase (17).

Fibroblastos e células musculares lisas podem regular reversivelmente sua taxa de proliferação e o fenótipo em resposta ao estado de homeostase do tecido. Sob condições normais, estas células têm baixo índice proliferativo e provavelmente secretam apenas os fatores necessários para manter a função normal do tecido. No entanto, em resposta a condições patológicas, as células do estroma se modificam rapidamente para um fenótipo reativo, proliferando-se e passando a sintetizar MEC, fatores de crescimento e enzimas de remodelamento necessários para a reparação do tecido. Parece que os fibroblastos e as células musculares lisas da parede vascular se transformam em um fenótipo comum de miofibroblastos durante o processo de reparação (17).

O miofibroblasto é descrito como um intermediário entre fibroblastos e células musculares lisas com base na expressão de proteínas do citoesqueleto e características ultraestruturais. O fenótipo é identificado pela expressão de vimentina (VIM) e α -actina de músculo liso (ACT). Estas células também são caracterizadas pela formação de filamentos contráteis, retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi bem desenvolvidos, aderências à matriz extracelular e junções comunicantes. Células com fenótipo de miofibroblastos exibem expressão aumentada de VIM, com diminuição da

expressão de marcadores que identificam diferenciação terminal em células musculares lisas, como calponina e a cadeia pesada de miosina (17).

A proliferação de células do carcinoma e a invasão através da membrana basal para o estroma circundante podem ser considerados como uma interrupção na homeostase do tecido normal. Espera-se que o estroma responda em um esforço para reparar o dano. Modificações no fenótipo celular do estroma e na composição da MEC têm sido relatadas em muitos tipos de câncer humano, particularmente nos de mama e cólon (17).

Demonstrou-se que vários tumores são capazes de induzir reação estromal ou desmoplasia como um componente de progressão (7, 21). Entretanto, os mecanismos específicos responsáveis pela ativação das células estromais que promovem a modificação e até que ponto o estroma teria participação na tumorigênese ainda não é totalmente compreendido. Mas, naqueles tumores em que a reação estromal é observada, o padrão é semelhante, se não idêntico, à resposta tecidual no reparo de feridas (7, 21). Neste, as células do estroma aumentam a produção de componentes da MEC, fatores de crescimento e enzimas de remodelamento da matriz, criando ambiente propício à proliferação. Da mesma forma, acredita-se que o ER no câncer favoreça a progressão do tumor por estimular a angiogênese, manter a sobrevivência das células neoplásicas e propiciar proliferação e invasão. Caracterizar o ER, determinando-se os mecanismos reguladores de sua formação e aqueles que estariam envolvidos na progressão, seria de extrema importância para o entendimento da carcinogênese (17, 20, 22, 23).

Qual seria o fenótipo do ER? Nos carcinomas do cólon e da mama, nos quais os componentes do ER vêm sendo amplamente estudados, é composto por fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais e células inflamatórias. Destacaram entre estes os miofibroblastos. No reparo de feridas, os miofibroblastos surgem a partir de modificações dos fibroblastos presentes no tecido de granulação e têm por função a síntese de MEC e o estímulo à migração celular, importantes no processo de inflamação e remodelamento tecidual. Além disso, secretam fatores de crescimento que promovem a angiogênese. Por esta razão, especula-se que estas células representem elementos chave na formação do ER tumoral (7, 17, 20).

Em relação à próstata, é reconhecida a importância da interação estroma-epitélio tanto no desenvolvimento da glândula quanto na manutenção tecidual. O ER do adenocarcinoma, segundo a maioria das descrições, é composto de miofibroblastos e fibroblastos, em substituição ao tecido muscular liso, componente mais importante do estroma normal da próstata, havendo ainda alterações fundamentais na MEC, como a

expressão de marcadores comumente presentes no processo de reparo de feridas (7, 20, 22, 24).

3.4- CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA REATIVO DO CARCINOMA DE PRÓSTATA

O TGF- β é um fator de crescimento multifuncional que regula vários processos biológicos, incluindo a cicatrização de feridas e tumorigênese. É liberado com a degranulação de plaquetas que inicia a resposta do estroma durante a reparação da ferida. Além disso, o TGF- β 1 é o único fator de crescimento conhecido por induzir a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos (17).

Há evidências da participação do TGF- β 1 na formação do ER de tumores. Experimentos “in vitro” mostraram reação estromal caracterizada pela diferenciação de células estromais em miofibroblastos, com produção aumentada de colágeno e estímulo para angiogênese, quando TGF- β 1 era acrescentado ao meio. Ainda, níveis elevados de TGF- β 1 nos tumores também se correlacionaram com o crescimento tumoral “in vivo”. E sendo superexpresso em muitos cânceres humanos, inclusive no de próstata, parece realmente provável que o TGF- β 1 tenha relação com a formação do ER (20).

Produzido pela própria célula neoplásica, TGF- β 1 tem atuação direta no estroma circunvizinho, cujas células expressam receptores para este fator de crescimento. De forma antagônica, a célula neoplásica é capaz de regular negativamente a sua própria expressão destes receptores (20), esquivando-se dos mecanismos regulatórios.

Estudo pioneiro promoveu análises do estroma dos tumores de próstata de grau histológico 3+3 em várias frentes (7, 20). Na análise histoquímica (tricroômico de Gomori), comparou-se o estroma do tumor com o da próstata normal, mostrando predomínio de fibras colágenas em meio a células com padrão de fibroblastos no tumor.

Por meio de análise imuno-histoquímica, foram caracterizados os tipos celulares presentes. Foram utilizados os seguintes marcadores: 1- VIM - filamento intermediário marcador de células mesenquimais; 2- ACT - marcador intermediário de diferenciação em músculo liso; 3- calponina (CAL) e desmina (DES) - marcadores terminais de diferenciação em músculo liso. O fenótipo miofibroblástico foi considerado na presença de marcação para ACT, mas não para CAL, com coexpressão de VIM. Demonstrou-se alta a expressão de ACT e CAL no estroma muscular liso da próstata normal, com marcação de VIM em fibroblastos e músculo liso de paredes vasculares, mas não no

músculo liso do estroma prostático. Fibroblastos foram encontrados de permeio a grupos de células musculares lisas, destacando-se ainda única camada de fibroblastos com disposição periacinar, imediatamente adjacente às células epiteliais. O estroma do CaP exibiu aumento significativo na marcação para VIM e redução ou marcação negativa para CAL, com diferenças estatisticamente significativas entre os índices de marcação imuno-histoquímica (15).

A análise foi complementada por meio de imuno-histoquímica com dupla marcação para ACT e VIM. Na próstata normal, descreveram população de células VIM (+) periacinares e intersticiais, com células ACT (+) à volta, e colocalização para estes marcadores exclusivamente na parede muscular lisa de vasos sanguíneos. No tumor, observaram colocalização dos marcadores na maioria das células do estroma, o que foi atribuído a fenótipo de miofibroblastos. Ademais, análises semiquantitativas demonstraram aumento significativamente maior de células com esta dupla marcação em tumores de mais alto grau, sugerindo progressão do processo com a diminuição da diferenciação celular (15).

Considerando a evolução clínica dos pacientes, análises das marcações imuno-histoquímicas e a quantificação do ER quanto ao tempo livre de doença, caracterizado pela recorrência bioquímica (aumento do PSA após tratamento) foram realizadas. O aumento no volume do ER no CaP e modificações na expressão de DES e ACT representaram preditores independentes e significativos de recorrência no câncer de próstata (7). Tomas, D. e col. demonstraram marcação imuno-histoquímica para VIM na maioria das células do estroma neoplásico do CaP, com marcação para DES em um menor número de células do estroma em comparação com a VIM (25).

Há algum tempo, descreveu-se também um novo tipo de célula do estroma que apresentava algumas características semelhantes às células intersticiais de Cajal (26). As células de Cajal, originalmente observadas na camada muscular do intestino e denominadas "neurônios intersticiais", descritas por S. Ramon y Cajal há mais de 100 anos, apresentavam as seguintes características: (1) semelhança morfológica com células nervosas; (2) identificáveis por meio de técnicas de coloração que marcavam especificamente neurônios (por exemplo, impregnação com azul de metileno ou prata); (3) estavam localizadas no interstício entre as terminações nervosas e as células musculares lisas (27). Desde então, uma série de publicações foi dedicada à presença de células intersticiais semelhantes às células de Cajal (ICLC) em múltiplos sítios anatômicos, como o miométrio, tuba uterina, mama, vesícula biliar, miocárdio, além de

vários outros. Muitos autores também descreveram células ICLC no trato urinário superior e inferior e no sistema reprodutor masculino (26, 27). Desde então, as pesquisas para se identificar estas células e descobrir sua função aumentaram exponencialmente, trazendo informações relevantes.

Mais recentemente, ICLCs passaram a ser denominadas telócitos (26, 27). O telócito tem corpo celular pequeno e oval, contendo núcleo rodeado por pequena quantidade de citoplasma. O núcleo ocupa cerca de 25% do volume celular e contém aglomerados de heterocromatina junto à membrana nuclear. O citoplasma perinuclear é rico em mitocôndrias (que ocupam cerca de 5% do corpo celular), contém pequeno complexo de Golgi, bem como elementos de retículo endoplasmático rugoso e liso e do citoesquelético (filamentos finos e intermediários). A periferia da célula é representada por plasmalema usual, sem lâmina basal (ou é fina e descontínua) (27). Exibem número variável de prolongamentos celulares longos e finos designados telópodos (Tp) (26, 27). Esses Tps são caracterizados por seu comprimento, espessura, presença de processos moniliformes e pelo padrão de rede de ramificação, características identificáveis por meio de análise ultraestrutural. Com maior magnificação, os processos moniliformes são caracterizados por segmentos finos semelhantes a fibrilas (podômeros) alternados com regiões dilatadas semelhantes a cisternas (podons) e pela presença de caveolas, retículo endoplasmático e mitocôndrias (26).

Várias técnicas de cultura *in vitro* (cultura de células isoladas) e *in vivo* (espécimes fixados), com análise à microscopia óptica convencional, fluorescência e microscopia eletrônica por transmissão e varredura, têm sido usadas para caracterizar morfológicamente essas células. Além disso, a imuno-histoquímica é de fundamental importância para determinar o(s) fenótipo(s) dos telócitos, além de avaliar suas alterações patológicas. Marcação positiva para c-kit (CD 117), CD 34 e VIM pela análise imuno-histoquímica são possíveis, mas podem ser diferentes em função do órgão estudado (26, 28). Nos estudos mais recentes, a positividade, com colocalização para CD34 / PDGFR α e CD34 / VIM (telópodos), é considerada compatível com o fenótipo telocítico (28).

Muitos acreditam que os telócitos estejam envolvidos na sinalização intercelular, levando-se em consideração sua rede 3D de telópodos e sua posição estratégica entre as células-alvo, capilares sanguíneos e terminações nervosas. Pelo menos dois mecanismos podem ser considerados: (a) secreção parácrina e/ou justácrina de pequenas moléculas de sinal; (b) microvesículas desprendidas que desempenham papéis únicos na transferência horizontal de macromoléculas importantes entre células vizinhas (por exemplo, proteínas

ou RNAs/microRNA), que poderia induzir a rápido ajuste do fenótipo das células alvo frente a uma variedade de condições (26-29).

Seguindo nesta linha, estudo pioneiro mais recente desenvolvido por Gevaert et alii, baseado em microscopia eletrônica, mostrou que a região subepitelial da próstata humana abriga diferentes tipos de células estromais, com fenótipos distintos (30). Os autores argumentam que, muitas vezes negligenciada, a microscopia eletrônica ainda é decisiva na classificação dos elementos celulares do estroma, que é amplamente baseada em características ultraestruturais. E, na prática, é pouco utilizada na grande maioria dos artigos que abordam este tema, que requer extensa caracterização morfológica e imuno-histoquímica associada à topografia.

Os mesmos autores estudaram a região do estroma subepitelial, definida como o espaço estromal entre as células epiteliais e os feixes de músculo liso subjacentes. Além de microscopia confocal e imunofluorescência, associaram análises de microscopia eletrônica e imuno-histoquímica com dupla marcação, utilizando os seguintes marcadores: VIM, DES, ACT, caveolina-1 (marcador de caveolas), além de CD34 e CD117 presentes em células de Cajal. Assim, descreveram 2 a 4 camadas descontínuas de células intersticiais subepiteliais, representadas por fibroblastos, ICLC e células fusiformes com características mioides (CFM), com a seguinte distribuição: a- fibroblastos vistos junto das células musculares lisas; b- ICLC, preferencialmente junto das células epiteliais; c- CFM encontradas abaixo da camada de ICLC, mais próximas das células musculares lisas, havendo membrana basal descontínua. Pequenas junções aderentes foram encontradas entre as ICLC e CFM. Curiosamente, não observaram fibronexus nestas células, elemento ultraestrutural marcador de miofibroblastos clássicos, contrapondo à maioria das descrições que consideram ser miofibroblástico o fenótipo do ER. Ao contrário, apresentaram marcação de diferenciação mioide (ACT, DES e para caveolina-1) (30).

Em relação à MEC, o estudo imuno-histoquímico com marcação para procolágeno do tipo I demonstrou intensa reatividade no ER do tumor, sendo negativo no estroma normal da próstata (20). No entanto, tem sido relatada uma "rede estromal de fibras de colágeno frouxas, de textura fina e lisa", no estroma normal da glândula, enquanto em tumores Gleason 3+4, as fibras de colágeno "parecem aumentadas em diâmetro, sem haver regularidade na relação espacial das fibras". Esses dados apoiam o conceito de que o remodelamento da MEC é uma característica importante do ER no câncer de próstata (7, 17).

3.5- QUANTIFICAÇÃO DO ESTROMA REATIVO

No estudo pioneiro em que se propôs pela primeira vez a análise semiquantitativa do ER como parâmetro de prognóstico, os tumores com até 5% de estroma em relação à área total do tumor foram classificados como de índice de intensidade de reação estromal de grau 0. Naqueles com estroma variando de 5% a 15% da área do tumor, grau 1. Tumores com estroma de 15% a 50 % foram definidos como de grau 2, enquanto aqueles com estroma > 50% da área do tumor, grau 3. Nesta última categoria, o estroma teria, no mínimo, proporção de 1:1 em relação ao componente epitelial neoplásico (7). Ressaltam-se as dificuldades na reprodutibilidade desta classificação baseando-se apenas em critérios visuais subjetivos, semiquantitativos. A análise foi feita em conjunto com a graduação histológica, baseada no Sistema de Classificação de Gleason.

Nesse estudo, identificaram ampla heterogeneidade de graus de ER dentro de focos de um mesmo tumor, razão pela qual desenvolveram método de análise voltado para avaliar regiões com maior proporção de ER dentro das áreas tumorais examinadas e não quantificar o ER presente no tumor como um todo. Aqueles com ER mais intenso (grau 3) foram denominados tumores estromogênicos (31). Apesar de demonstrarem que pacientes com baixa intensidade de estroma reativo tiveram sobrevida livre de recorrência bem maior que naqueles com ER de graus 3 ou 0, a graduação não se mostrou superior que o PSA ou o grau histológico em prever o comportamento biológico do tumor (7).

Os mesmos autores aplicaram esta metodologia na avaliação da extensão do componente estromogênico nos CaP em peças de prostatectomia, mapeando as áreas tumorais quanto à porcentagem de ER de grau 3 nas regiões de tumor (31). Novamente, demonstraram sua relevância como fator preditivo independente de recorrência bioquímica. Ao final, apontaram a necessidade de validação externa do método, especialmente em outras populações.

3.6- COLÁGENO, MÚSCULO LISO E ESTROMA REATIVO DO TUMOR DE PRÓSTATA

O colágeno produzido especialmente pelos fibroblastos constitui até 30% da massa total de proteínas do corpo humano. Apesar de sua função principal no suporte tecidual, estão envolvidos na regulação da expressão de genes associados à sinalização celular, metabolismo e transcrição/tradução gênica (3).

Cada fibra de colágeno é composta de subunidades semelhantes a fios chamadas fibrilas. Cada fibrila, por sua vez, é composta de moléculas de colágeno alinhadas cabeça com cauda em fileiras sobrepostas. Ligações covalentes entre as moléculas de colágeno de fileiras adjacentes conferem resistência da fibrila. A molécula de colágeno, denominada tropocolágeno, é composta de três cadeias polipeptídicas entrelaçadas, ou cadeias alfa, que formam uma hélice tripla virada para a direita. As cadeias alfa, associadas a elastina e glicoproteínas, não são todas iguais e, com base nas diferenças dentro das cadeias, muitos tipos de colágeno foram identificados, registrados com algarismos romanos com base na cronologia em que foram originalmente descritos (32, 33).

Até o momento, 28 tipos de colágeno foram identificados, configurando composição única da MEC a diferentes tecidos. São divididos entre aqueles que formam fibras e os formam rede ou trama. O mais prevalente é o colágeno do tipo I, que representa cerca de 90% do colágeno no corpo humano. Agrega-se para formar feixes espessos de 2–10 μm de diâmetro, configurando alta resistência à tração. Já os tipos IV e VIII, principais componentes da membrana basal, são os colágenos formadores de rede (32, 33).

O colágeno é rotineiramente visualizado usando microscopia de luz transmitida, em cortes histológicos corados em HE, porém são mais bem observados em colorações histológicas como o tricrômio de Masson ou *picrosirius red*, ou em microscopia de fluorescência após reação do tipo antígeno-anticorpo. Mais recentemente, a microscopia por SHG tem sido usada para analisar o colágeno em tecidos não corados, em combinação com a fluorescência de cromóforos celulares endógenos excitada por dois fótons (34). Há especificidade para demonstrar colágeno do tipo I, correspondendo com as áreas demonstráveis por imuno-histoquímica. A especificidade é maior que a obtida pelo tricrômico de Masson e assemelha-se à do *picrosirius* (34). A principal vantagem da microscopia por SHG é sua capacidade única de fornecer imagens 3D da organização das fibras de colágeno, com resolução micrométrica. Outra grande vantagem desta técnica é sua versatilidade em relação à preparação do tecido: os sinais de SHG de fibras de colágeno em tecidos intactos frescos, tecidos fixados (dentre eles álcool, paraformaldeído ou formalina) e em cortes de congelação são semelhantes.

Na próstata, em condições normais, o estroma contém fibras colágenas de diferentes espessuras e orientados em diferentes direções, dispostas formando uma rede tridimensional (3, 35, 36). Vários estudos sugeriram colágeno do tipo I clivado como

componente integrante do estroma neoplásico, tanto com função estrutural quanto de sinalização. A proteólise das fibras está relacionada à formação de peptídeos de colágeno I biologicamente ativos, que favoreceriam a proliferação celular e angiogênese (3). Descrevem-se também o aumento da variabilidade na distribuição das fibras de colágeno e sua anisotropia nos adenocarcinomas, com perfis variáveis conforme o grau histológico (escore de Gleason). Observaram-se áreas com redes de colágeno bem definidas delimitando a periferia dos ninhos neoplásicos na transição com o tecido normal (fibrose peritumoral), com fibras colágenas desorganizadas na intimidade tumoral, sem estabelecer limites entre as estruturas epiteliais e o estroma. Outro padrão é o de fibras colágenas finas, dendríticas, dispostas a formar arcabouço que envolve as células tumorais, e frequentemente acompanhado de modificação no arranjo e compactação fibrilar no restante do estroma do tumor. No carcinoma de alto grau, fibras colágenas finas e ramificadas, fortemente argirófilas (afinidade por sais de prata) e birrefringentes, são detectadas em regiões de proliferação celular, com formação de “placas hialinas” no estroma adjacente, indicativas de degradação ou remodelamento da MEC (35).

Estudo prévio de nosso grupo que avaliou as fibras de colágeno entre ácinos neoplásicos utilizando microscopia por SHG, relatou maior alinhamento das fibras proporcionalmente ao grau histológico segundo a classificação de Gleason (37). A análise comparativa entre amostras de próstata com adenocarcinoma, parênquima não neoplásico adjacente ao tumor e casos controle (com diagnóstico de hiperplasia nodular da próstata, sem tumor), obtidos por ressecção transuretral, demonstrou que, quando a soma dos escores de Gleason era ≥ 5 , a quantidade de colágeno no grupo neoplásico era sempre menor que a das amostras de próstata adjacentes sem tumor, no geral com diferença estatisticamente significativa. Ainda, o conteúdo de colágeno dessas áreas não neoplásicas era maior que nas do grupo controle, com diferenças que não foram estatisticamente significativas até a soma dos escores de Gleason ≥ 8 . No entanto, a intensidade da deposição de colágeno na periferia do tumor demonstrou melhor correlação com a sobrevida quando comparada ao grau histológico ou estadiamento (38).

Tomando por base os níveis aumentados de metalonoproteases (MMPs), pró-peptídeos de colágeno do tipo I e ligações cruzadas intermediárias de colágeno da matriz, sugeriu-se haver síntese e degradação aumentada do colágeno no tumor. Ou seja, apesar de haver estímulo à sua síntese por toda a próstata com tumor, o evento mais importante parecia ser a sua degradação nas áreas neoplásicas. O fato de terem encontrado maior deposição de colágeno nas zonas de transição tumor-tecido normal levantou a seguinte

questão: seria alteração própria do processo de infiltração tumoral ou teria por função exatamente o contrário, evitar que ela aconteça (38).

Em outro estudo realizado no Brasil, a análise imuno-histoquímica mostrou redução significativa da expressão de colágeno dos tipos I e III no câncer de próstata em comparação com as áreas benignas, porém sem correlação com o grau histológico. No entanto, houve aumento significativo da expressão de MMPs e correlação positiva com o escore de Gleason 4. Os autores não encontraram diferença estatística entre a expressão gênica e proteica do colágeno dos tipos I e III, ou na expressão de MMPs em amostras de próstatas normais ou em amostras de parênquima prostático normal adjacente ao CaP. Tais resultados sugerem a redução do colágeno na área tumoral decorrente de atividade aumentada de MMPs, descrita em vários outros estudos (36). Entretanto, esse estudo não foi capaz de explicar os achados contraditórios entre a expressão gênica e proteica do colágeno.

Interessante também observar o comportamento das células musculares lisas com a evolução do tumor. Destacamos aqui estudo que promoveu a análise do estroma muscular de próstatas normais, mostrando camada de cinco a sete células musculares lisas por entre o compartimento epitelial. Praticamente todos os ácinos são circundados por longas células musculares lisas que se interconectam lateralmente. Nos tumores, surge desorganização dos feixes de células musculares, com dissociação celular e aumento dos espaços intercelulares. Em tumores Gleason 3, os feixes de músculo liso são dispersos, pequena parte deles ainda conectados uns com os outros. Nos tumores Gleason 4 e 5, os espaços entre as células musculares lisas são maiores, havendo apenas ilhas de tecido muscular entre os ninhos epiteliais infiltrativos (39).

A marcação da membrana basal da célula muscular lisa foi avaliada usando anticorpo contra o colágeno do tipo IV e antilaminina, estando preservada nas áreas normais e em tumores de baixo grau, com perda da uniformidade e focos de descontinuidade nos tumores Gleason 3. Algumas células musculares começam a serem vistas isoladas. Nos tumores Gleason 4, a marcação foi muito menos conspícua, mesmo nas áreas com maior densidade de fibras musculares, ao passo que nos tumores Gleason 5, apesar da identificação de alguns grupos de células musculares, a marcação foi quase que completamente perdida, exceto em algumas células isoladas (39).

À microscopia eletrônica, células musculares lisas de áreas não afetadas estão em contato próximo e formam feixes. Células musculares lisas grandes, fusiformes, compartilham uma mesma membrana basal, tanto lateralmente quanto nas extremidades.

Algumas células não mantêm contato entre si. Em áreas adjacentes a lesões proliferativas, porém não invasivas, as células musculares lisas são dissociadas pelo acúmulo progressivo de fibrilas de colágeno e de outros componentes da MEC. Nas áreas de infiltração, identificam-se principalmente células musculares lisas atroficas, com diminuição na relação núcleo-citoplasma e redução no volume ocupado pelo citoesqueleto. A atrofia aparentemente ocorre após o isolamento da célula muscular, em função da deposição de MEC ou da invasão das células neoplásicas. Destaca-se ainda a grande proximidade entre as células musculares e as células neoplásicas, em alguns casos intimamente associadas. Esses achados sugerem haver degradação progressiva da membrana basal das células musculares lisas por enzimas proteolíticas provavelmente produzidas pelas próprias células neoplásicas, além do desequilíbrio na interferência parácrina entre os compartimentos epitelial e estromal (39).

3.7- ANGIOGÊNESE

O colágeno do tipo I é o principal constituinte da MEC ao qual as células endoteliais em proliferação são expostas em um tecido lesado. A interação do colágeno do tipo I com integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha v\beta 3$ e $\alpha v\beta 5$ induz a ativação da via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAP), que mantém a sobrevivência da célula endotelial. Além disso, a ligação do colágeno do tipo I às integrinas $\alpha 1\beta 1$ e $\alpha 2\beta 1$, suprime a produção da proteína quinase A (PKA) dependente de Monofosfato de Adenosina cíclico (cAMP), resultando na reorganização das fibras de actina e em mudanças na forma celular. O colágeno do tipo I também é importante para a formação do lúmen vascular durante a neoformação vascular, sendo necessário para a coalescência de vacúolos intracelulares pinocíticos. Conclui-se assim que o colágeno é fundamental nos primeiros estágios do processo de angiogênese (40).

Estudos envolvendo modelos *in vitro* de angiogênese mostraram que incrementos na densidade da matriz por aumento na concentração de colágeno do tipo I no meio limitaram significativamente a neoformação vascular, com a diminuição do número de ramificações por unidade de vaso e o aumento do número de terminações livres. Este último pode significar que anastomoses ocorram menos frequentemente, conseqüentemente criando dificuldades para a formação de redes vasculares. Nestes estudos, à medida que se aumentava a concentração de monômeros de colágeno, matrizes com maior densidade de fibrila se formavam, com mais ligações cruzadas entre elas,

determinando maior rigidez mecânica. Verificou-se então que o aumento na rigidez da matriz dificulta a deformação, degradação e remodelamento das células endoteliais no meio (41).

Atualmente, não há marcadores diretos para avaliar a atividade angiogênica no câncer de próstata. Mas a densidade vascular é um indicador de atividade angiogênica intratumoral e tem se mostrado de valor prognóstico em vários tumores, incluindo-se o câncer de mama, cólon e melanoma maligno. Pode ser avaliada por exame histológico, analisando-se áreas mais vascularizadas do tumor (*hot spot*) ou região aleatória representativa. Dados preliminares sugerem correlação com grau histológico do tumor e estadiamento, com maiores índices nos tumores de alto grau e pior desfecho do CaP (39). Mas existem dados conflitantes possivelmente determinados pelos diferentes métodos de contagem, diferenças nos anticorpos usados, diferentes tamanhos das populações estudadas, experiência pessoal do examinador e os diferentes aspectos patológicos dos tumores. Outro fator limitante é a estrutura geométrica complexa do sistema vascular neoformado, de difícil análise em um corte histológico bidimensional. As análises por geometria fractal (que estimam a dimensão da superfície), imagem computadorizada, modelos 3D ou imagens de ressonância magnética podem ser usados como métodos de avaliação (39).

3.8- BIOFÍSICA DO MICROAMBIENTE TUMORAL

Outra equação a ser integrada ao processo que envolve a transformação celular, infiltração e formação de metástases é a interação entre as propriedades biofísicas das células epiteliais e a MEC, que estabelece ação de reciprocidade dinâmica. Forças mecânicas atuam nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular, tanto quanto sinais bioquímicos ou modulados por fatores inflamatórios que, muito provavelmente, devem funcionar em conjunto.

A rigidez da MEC, tamanho de poros ou fenestrações, viscoelasticidade, densidade, formação de tramas ou redes de proteínas e a configuração de redes de fibras, além da rigidez oferecida pela proliferação de células neoplásicas são propriedades físicas capazes de interferir nas interações celulares. As células detectam, processam e respondem a estímulos mecânicos da MEC usando um sistema mecânico-químico coordenado composto de receptores de moléculas de adesão, redes citoesqueléticas e promotores moleculares de movimento (42). Um exemplo bem conhecido do significado

clínico da rigidez tumoral produzida pela deposição de colágeno do tipo I e expressão de lisil oxidase é a desmoplasia observada nos estágios mais avançados ou de maior invasividade dos carcinomas colorretal e da mama, em que se verifica maior potencial de formação de metástases (42).

Não apenas a rigidez em si, mas outros dados como os limites entre a neoplasia e o estroma, as características das fibras de colágeno (comprimento, largura e ondulação) e padrões denominados assinaturas de colágeno associadas ao tumor (TACs), que envolvem densas fibras de colágeno relaxadas adjacentes ao tumor - TAC-1; retificação das fibras de colágeno ao redor do tumor (fibras retas alinhadas paralelamente às bordas do tumor) - TAC-2; remodelamento do estroma de modo que as fibras de colágeno sejam agrupadas e alinhadas perpendicularmente às bordas do tumor - TAC-3, têm sido pesquisados como possíveis marcadores de prognóstico (42). Uma característica fascinante é que a rigidez é significativamente maior na área de infiltração do estroma do que no núcleo do tumor ou no tecido normal adjacente. E outro dado igualmente intrigante observado em tumores TAC-3 é que feixes de colágeno rígido na periferia dos ninhos neoplásicos podem abrir caminho como "estradas" de invasão, para que as células neoplásicas escapem e metastatizem-se (42).

As células dos carcinomas de qualquer sítio anatômico são geralmente mais leves do que as originais normais, o que talvez represente característica que favoreça a disseminação. A evasão pode ocorrer de várias formas: movimentação ameboide (de célula única, relativamente independente da degradação da MEC, em que a célula força sua passagem por lacunas e trilhas existentes no tecido por modificação de sua forma), migração mesenquimal e invasão coletiva (42). Movimentos celulares ameboides são mais difíceis em ambientes de maior resistência, sendo facilitados em ambientes em que a matriz possua poros ou espaços maiores (43).

Sobre este último dado, a geometria celular e sua dimensionalidade influenciam a anisotropia e a amplitude das flutuações de tensão intracelular. Embora as tensões celulares globais permitam que as células apliquem forças em seu substrato, por exemplo, na MEC, e migrem, as flutuações de estresse intracelular podem facilitar a redistribuição de organelas e componentes moleculares dentro do espaço citoplasmático já saturado (44)

Em muitos tumores sólidos, células neoplásicas estão incorporadas a uma matriz fibrilar densa. As forças do citoesqueleto celular são transmitidas para a MEC e geram remodelamento por meio de moléculas de adesão, que ainda podem propagar os sinais mecânicos para outras células vizinhas (44). As adesões focais (AD), organelas

multifuncionais subcelulares capazes de detectar sinais reguladores transmitidos pela MEC em resposta à adesão, servem como pontos primários de detecção da rigidez e da geometria da MEC pelas células. No coração das ADs estão as integrinas ligadas à membrana. Na medida em que as células interagem com a matriz, por exemplo, por meio de saliências geradas pela polimerização de actina na borda de ataque, a ligação de moléculas de integrina individuais ao estroma se inicia (44).

Modelos matemáticos também têm sido utilizados para se avaliar a mecânica da invasão neoplásica. Um deles calcula as probabilidades de movimento celular considerando primeiro as interações célula-matriz capazes de produzir motilidade, levando-se em consideração a influência de outros parâmetros celulares cruciais, como adesão célula-célula e proliferação (45).

Para incluir estes parâmetros, cada célula recebe um fluxograma de ciclo de vida individual que leva em consideração o fenótipo celular e a influência do microambiente. Seus componentes incluem processos metabólicos básicos, como taxas de proliferação e consumo de oxigênio, dentre outros. Além disso, as interações com o microambiente são governadas por três variáveis principais contínuas: a concentração de macromoléculas da MEC, a concentração da enzima degradante da matriz secretada pelas células e a concentração de oxigênio, este último representando no modelo de análise qualquer outro nutriente necessário para a sobrevivência das células tumorais. O constituinte da MEC deve ser um ambiente macromolecular que tenha a composição e estrutura específicas compatíveis com as observadas no sítio primário do tumor (por exemplo, pulmão, mama, próstata, osso etc.) (45).

A estrutura espacial da MEC pode ser controlada por variações de densidade e a morfologia do tumor no modelo é progressivamente modificada por proliferação simulada. Tal proliferação é baseada em esquema de mutação linear por 200 gerações, de aproximadamente 4,5 meses. De forma resumida, duas morfologias tumorais distintas surgem nas simulações, dependendo da estrutura da matriz: 1- massa tumoral com margens regulares em matriz homogênea; 2- massa tumoral formando prolongamentos digitiformes na matriz heterogênea. Curiosamente, existe semelhança nítida entre a morfologia do tumor nas simulações com matriz heterogênea e espécimes patológicos de carcinomas localmente invasivos (45).

O fato mais curioso observado nestas simulações é que, embora a morfologia do tumor seja distinta, a separação dos fenótipos de células tumorais, independente do estímulo, é a mesma: necrose celular no centro dos ninhos e o fenótipo mais agressivo na

periferia. À medida que a simulação avança no tempo, assim que as células sofrem mutação para o fenótipo IV, o mais agressivo, elas tendem a predominar na massa tumoral, tal como acontece nos tumores em progressão. Ainda, a morfologia dos tumores independe do padrão de mutação aplicado, randomizada ou linear (45).

Uma das conclusões mais interessantes destes modelos é que a presença de MEC mais heterogênea poderia configurar um ambiente "hostil" que atue selecionando dentre os vários fenótipos neoplásicos gerados aleatoriamente aqueles mais bem adaptados. E reforçam a noção de que as condições do microambiente podem interferir na invasividade de um tumor, sendo a invasão uma propriedade emergente desse processo de seleção.

Por fim, é importante também mencionar o efeito do aumento na rigidez da matriz e o estresse sólido no interior do tumor, que é a força por unidade de área capaz de produzir compressão ou expansão. Uma vez que as células tumorais, células do estroma e constituintes da matriz se proliferam em uma determinada região restrita do tecido hospedeiro, surge um estresse mecânico (46). Parte dele é produzido pelo próprio crescimento tumoral (estresse induzido pelo crescimento), que comprime o centro da lesão. Outra parte é exercida no estroma circunvizinho (estresse compressivo). O estroma, por sua vez, responde com uma força contrária para resistir à expansão (estresse aplicado externamente). Sendo assim, a tensão sólida total acumulada no interior do tumor representa a soma do estresse compressivo aplicado externamente e o induzido pelo próprio crescimento tumoral. Modelos matemáticos calculam que a força necessária para que o tumor consiga deslocar o tecido à volta e crescer teria de ser cerca de 1,5 vezes maior que a do estroma circunvizinho (46).

Como consequência, a rigidez do estroma ativaria vias de sinalização que regulam o comportamento celular por mecanossensores, com modificações na composição e capacidade de contratilidade do citoesqueleto, mobilização de moléculas de adesão e a regulação da expressão de genes responsáveis por mudanças na conformação celular, sobrevivência, migração e invasão (46). Ademais, o aumento do estresse compressivo poderia causar inibição de crescimento tumoral, com indução de apoptose. Mas um efeito oposto seria permitir proliferação em áreas de menor compressão.

O confinamento progressivo das células neoplásicas pelo aumento da concentração de colágeno tem demonstrado relação com o padrão de migração celular de células isoladas para grupos celulares. E as forças compressivas podem ainda induzir à formação de grupos celulares denominados "*leader cells*", capazes de formar filopodia

independente de interação actina-miosina, mas com deposição aumentada de fibronectina (47).

3.9- MODELO DE ESTUDO BASEADO NA MORFOLOGIA DO ÁCINO NEOPLÁSICO, ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA DE ESTROMA E PADRÃO DE DISTRIBUIÇÃO DO COLÁGENO

Como apresentado nesta breve revisão da literatura, existem várias frentes de análise que avaliam a participação do estroma na carcinogênese da próstata. Visam principalmente estabelecer prognóstico e detectar possíveis biomarcadores alvos para novas opções terapêuticas, mas podem também trazer informações importantes que auxiliem no diagnóstico mais acurado.

Parece não haver dúvidas que o ER do tumor seja elemento crucial tanto na diferenciação quanto na mobilidade celular e, conseqüentemente, na possibilidade de disseminação de neoplasias epiteliais. O ER surge em função do tumor, mas os fenótipos tumorais, pelo menos em parte, surgem pela interação da célula transformada com o estroma. Tais interações envolvem estados de rigidez da MEC, diferentes tipos de células do estroma, equilíbrio entre formação e degradação do colágeno e sua forma de organização, angiogênese e padrões de proliferação do tumor.

Quando avaliamos os presentes métodos morfológicos de se estabelecer o prognóstico do CaP, tomamos por base apenas o grau histológico com a utilização do Sistema de Classificação de Gleason, que contempla padrões arquiteturais dos ácinos neoplásicos, desconsiderando as características estromais. Outros estudos complementares se baseiam na análise da presença e quantificação do ER tumoral, tipos celulares do estroma, distribuição do colágeno e sinais bioquímicos da MEC, sem incorporar aspectos biofísicos ou características morfológicas epiteliais. De Vivar et alii (23) publicaram trabalho na literatura em que descrevem as diferentes morfologias dos ácinos neoplásicos nas áreas de maior intensidade de reação estromal, sem, no entanto, considerar a interação entre ambos como mecanismo bidirecional. Talvez este represente o ponto norteador do presente estudo, considerando que, aparentemente, um compartimento não funciona independente do outro. Partindo-se dessa premissa, acreditamos que um método que se proponha a estabelecer comportamento tumoral tenha que incorporar características tanto do estroma quanto da organização das células do tumor em conjunto.

Desta forma, pensou-se em se desenvolver um método sistematizado de análise do CaP que contenha aspectos já estabelecidos pelos diferentes métodos de avaliação dos dois compartimentos específicos existentes até o momento: estromal e epitelial. Do sistema de classificação de Gleason, propõem-se a utilização dos padrões arquiteturais básicos individuais dos ácinos neoplásicos e que determinam o escore final. No caso da avaliação do estroma, alguns aspectos deverão ser abordados por exame histológico convencional (1- presença ou não de ER; 2- análise semiquantitativa de sua intensidade). Outros serão avaliados por análise imuno-histoquímica (fenótipos celulares do estroma e angiogênese).

Existem várias pesquisas sobre aspectos mecânicos e de organização estrutural do colágeno que envolvem sua participação nos processos patológicos associados à carcinogênese. Grande parte da base destes trabalhos é estabelecida por meio de estudos de imagem em tecidos humanos. A cada dia, o papel da organização do colágeno fibrilar no câncer é mais bem compreendido e várias técnicas de imagem e ferramentas de quantificação permitem análises mais detalhadas (48). E existe muito interesse em métodos de imagem que não requeiram coloração especializada. Destaca-se a microscopia por SHG, que representa método óptico poderoso, não invasivo, de se detectar alterações no arranjo fibrilar do colágeno em tecidos íntegros, que não podem ser prontamente abordadas por metodologias bioquímicas ou de imagem convencionais.

SHG é uma técnica de microscopia de varredura a laser na qual dois fótons de energia mais baixa são convertidos para exatamente o dobro da frequência incidente. Para que este fenômeno ocorra, é necessária uma estrutura não centrossimétrica. O colágeno fibrilar e outras moléculas biológicas, como microtúbulos e miosina muscular, satisfazem esse requisito estrutural. A microscopia por SHG tem uma vantagem distinta sobre as abordagens tradicionais baseadas em coloração histológica, porque não há necessidade de processar ou corar o tecido. Além disso, é possível obter imagens tridimensionais do tecido, permitindo a análise de amostras mais espessas (centenas de microns ou mais), produzindo imagens de alta resolução (submicrônica), com visualizações de estruturas de colágeno de até ~300 nm (48).

Pelos motivos citados acima, optamos por promover a quantificação do colágeno e a análise de sua organização espacial por meio de microscopia com SHG. Na sequência, pretende-se correlacionar todos estes dados, aliados a aspectos clínicos gerais (idade, dosagem do PSA e outros parâmetros histológicos). Todo o processo de análise envolve

o exame de biópsias de próstata por agulha (biópsias sextantes) obtidas para confirmação diagnóstica.

4- MÉTODOS

Foram examinadas biópsias sextantes consecutivas na rotina diagnóstica de CaP em laboratório de Anatomia Patológica de Belo Horizonte, no período de 2017 a 2019. As amostras foram fixadas em formol tamponado e processadas conforme técnica histológica convencional até a inclusão em blocos de parafina. Na sequência, foram feitos cortes histológicos sequenciais de 3-5 µm de espessura, corados em HE. Foram selecionadas 120 amostras, uma por paciente, correspondendo à lâmina que concomitantemente continha a maior representação tumoral e o maior grau histológico dentre as 6, distribuídas em 4 grupos de 30 amostras, de modo a contemplar os seguintes requisitos: Grupo 1- tumores com escore máximo Gleason 3+3; Grupo 2- tumores com escore máximo Gleason 3+4; Grupo 3- tumores com escore máximo Gleason 4+3; Grupo 4- tumores cuja somatória máxima dos escores de Gleason fosse ≥ 8 . Ressalta-se que esta distribuição e os critérios diagnósticos morfológicos seguem as recomendações propostas pela OMS - 2016, ISUP - 2019 e pela Sociedade de Patologia Genitourinária (GUPS) - 2021 (9, 11, 14, 49), exceto que os grupos prognósticos 4 e 5 (tumores de alto grau) foram aqui agrupados. A junção visa facilitar a análise dos resultados. Em uma das 120 amostras, houve coleta de região de zona de transição (lâmina 7), sem representação de tumor, que foi excluída para efeitos de análise.

Foram considerados critérios de inclusão no estudo: ausência de qualquer tratamento prévio para o CaP e representatividade suficiente de neoplasia no *core* de modo a garantir sua presença em cortes aprofundados consecutivos. As lâminas foram analisadas por dois patologistas com experiência em uropatologia, de forma independente, tendo sido utilizado o diagnóstico de consenso nas situações de divergência.

As porcentagens de padrão G4 e G5 de cada amostra e a presença de infiltração perineural foram registradas, assim como os valores das dosagens séricas de PSA total e as idades dos pacientes. Cada lâmina selecionada foi escaneada usando o PANNORAMIC Midi ® system (3DHISTECH Ltda, Hungary). Duas ou mais regiões do tumor com maior representação de estroma foram mapeadas (Figura 2), perfazendo um total de 327 áreas analisadas, para as quais foram registrados o padrão histológico do ER e a arquitetura dos ácinos neoplásicos. Os tipos celulares do estroma foram caracterizados por meio de marcação imuno-histoquímica.

A distribuição dos padrões observados em função dos escores de Gleason que cada padrão recebeu pode ser visualizada na Figura 3.

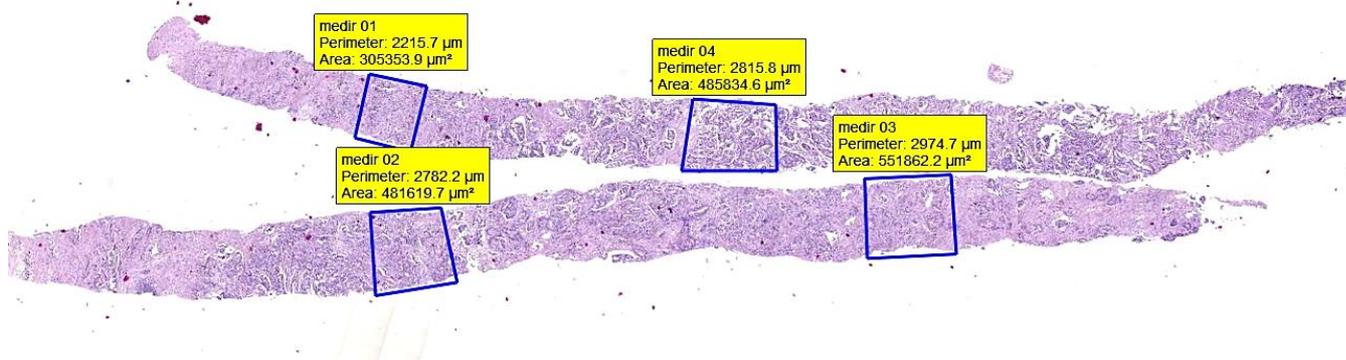


FIGURA 2: MAPEAMENTO DE ÁREAS PARA ANÁLISE DE UMA DAS AMOSTRAS DO GRUPO 4.

Nota: foram selecionadas 4 áreas em função dos diferentes padrões arquiteturais acinares e estromáticos e pela maior representação de tumor. Notar medida de cada área tumoral nas caixas amarelas.

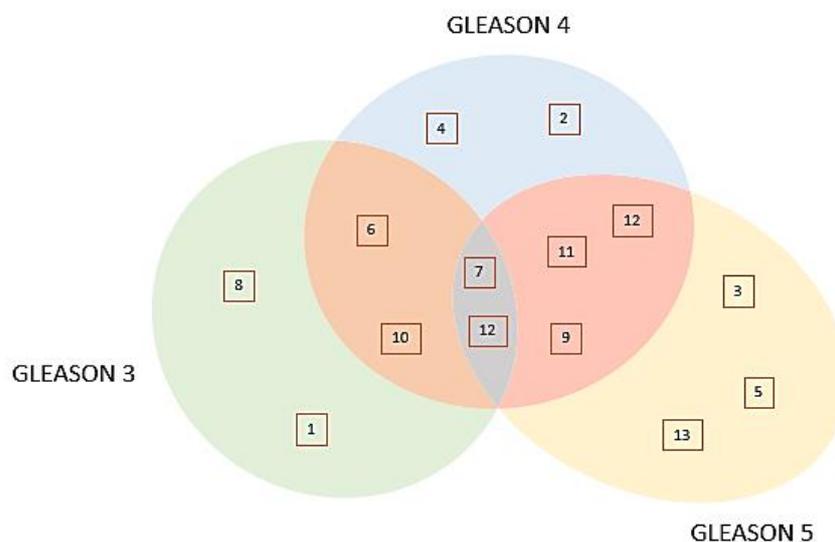


FIGURA 3: PADRÕES HISTOLÓGICOS ARQUITETURAIS OBSERVADOS NO CARCINOMA ACINAR PROSTÁTICO E SUA CORRELAÇÃO COM OS ESCORES DE GLEASON.

4.1- ANÁLISE HISTOLÓGICA, IMUNO-HISTOQUÍMICA E DA DISTRIBUIÇÃO DO COLÁGENO NO ESTROMA REATIVO

A- CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA REATIVO AO EXAME HISTOLÓGICO DE ROTINA

Mediu-se a extensão linear das amostras em milímetros (mm) e a área do tumor mapeada em milímetros quadrados (mm²). Todos os diferentes arranjos arquiteturais observados nas áreas de maior formação de estroma nas amostras foram registrados e catalogados. Assim, 13 arranjos arquiteturais de ácinos neoplásicos foram ao todo reconhecidos (Tabela 1), destacados nas Figuras 4 e 5 A e B.

TABELA 1 - ARRANJOS ARQUITETURAIS DOS ÁCINOS NEOPLÁSICOS.

ARRANJOS		CARACTERÍSTICAS
PAD RÕE S ÚNI COS	1	Ácinos neoplásicos bem diferenciados, pequenos, médios ou grandes, sem fusão, arredondados ou alongados
	2	Ácinos rudimentares, de lúmens virtuais, com ou sem fusão, isolados ou agrupados, separados por estroma
	3	Tumores constituídos de células isoladas ou dispostas em fileiras ou traves, sem ácinos desenvolvidos.
	4	Arranjos cribriformes puros
	5	Arranjos compactos/sólidos puros
PAD RÕE S MIS TOS	6	Ácinos neoplásicos bem diferenciados e rudimentares, com ou sem fusão
	7	Ácinos neoplásicos bem diferenciados e rudimentares, com arranjos cribriformes
	8	Estruturas tubulares e traves ramificadas
	9	Ácinos neoplásicos rudimentares e arranjos cribriformes
	10	Ácinos neoplásicos bem diferenciados e arranjos cribriformes
	11	Ácinos neoplásicos rudimentares e arranjos cribriformes, com células isoladas
	12	Ácinos neoplásicos rudimentares e células isoladas
	13	Células isoladas e arranjos sólidos

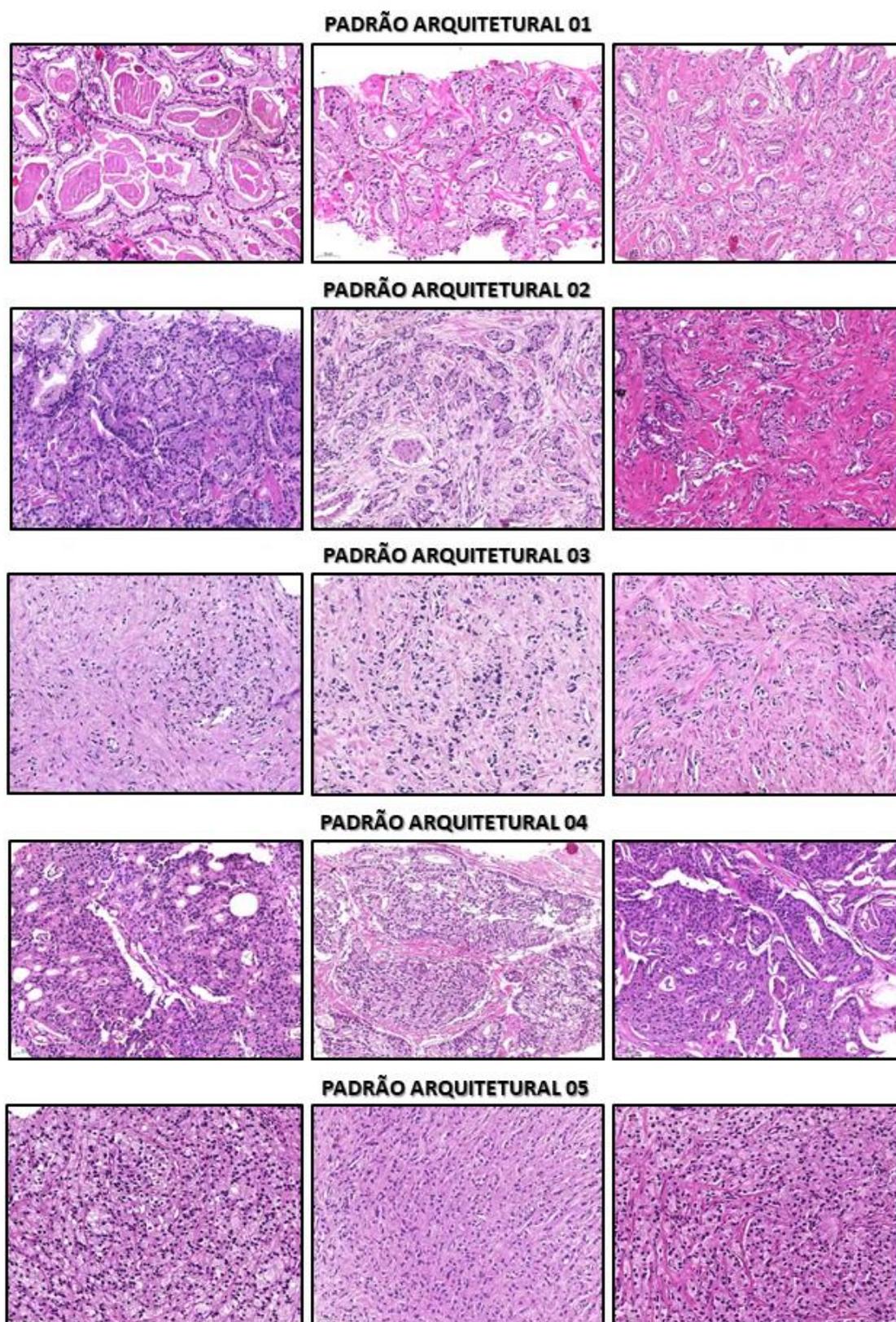
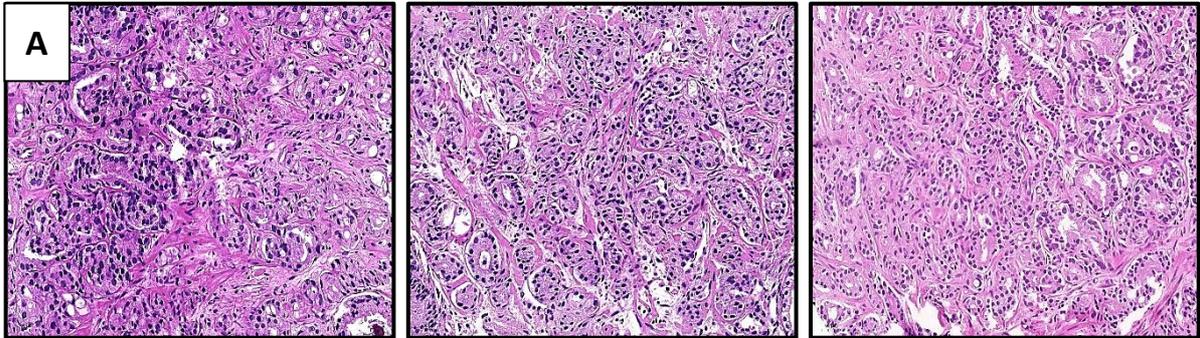


FIGURA 4 - ARRANJOS HISTOLÓGICOS ARQUITETURAIS ÚNICOS DO CARCINOMA ACINAR PROSTÁTICO.

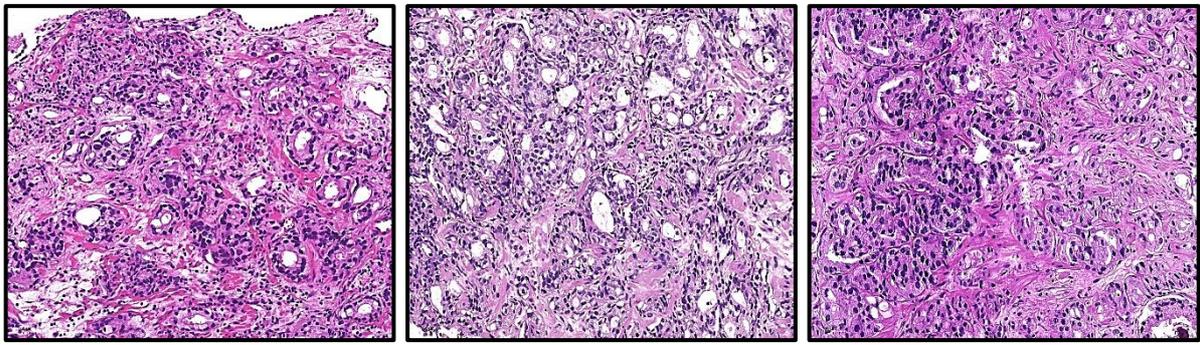
Nota: cortes histológicos das amostras de próstata coradas em HE.

Fonte: Arquivo Pessoal do Autor

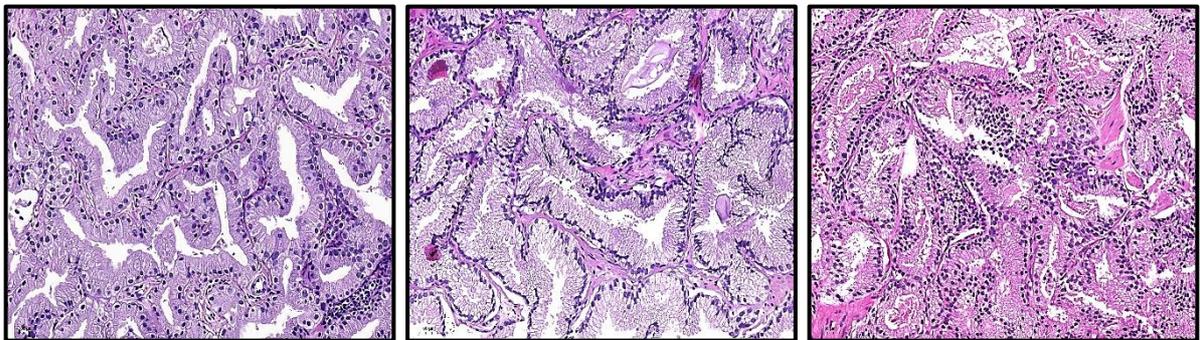
ARRANJO ARQUITETURAL 06



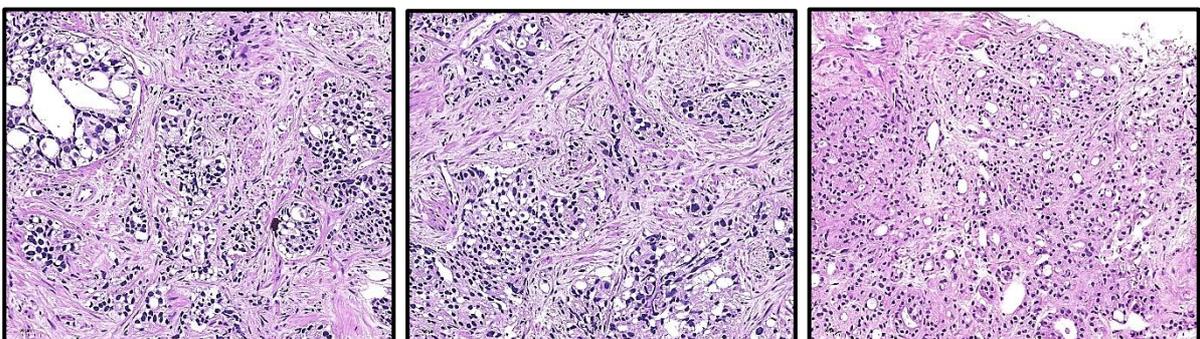
ARRANJO ARQUITETURAL 07



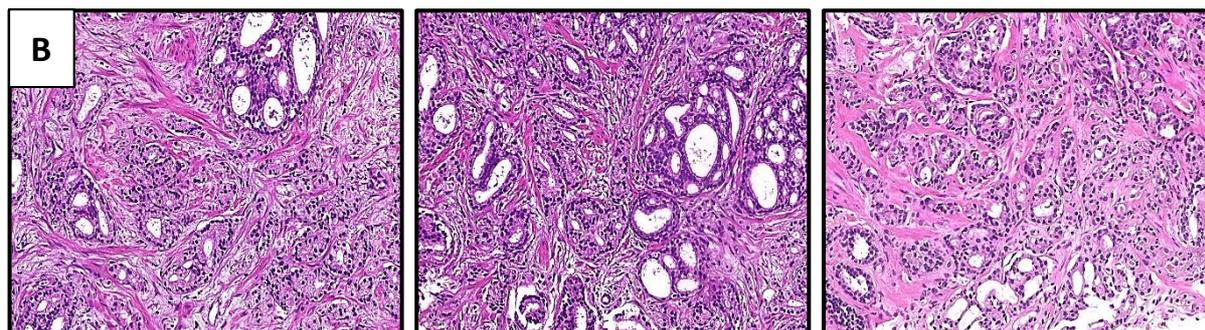
ARRANJO ARQUITETURAL 08



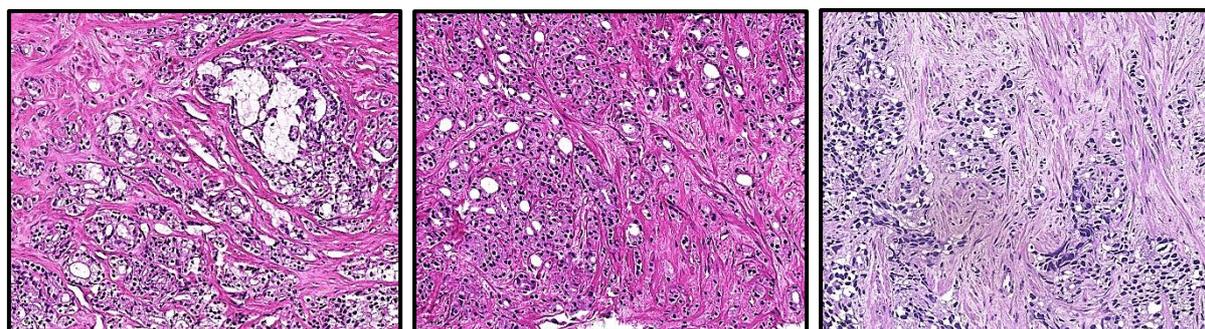
ARRANJO ARQUITETURAL 09



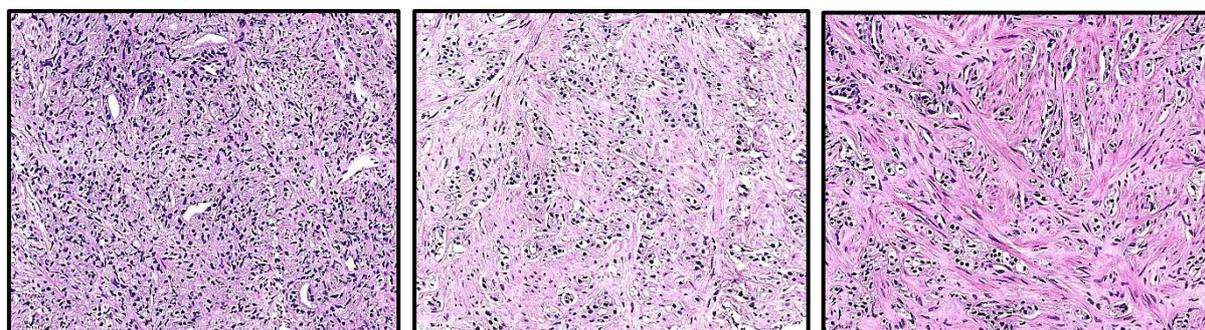
ARRANJO ARQUITETURAL 10



ARRANJO ARQUITETURAL 11



ARRANJO ARQUITETURAL 12



ARRANJO ARQUITETURAL 13

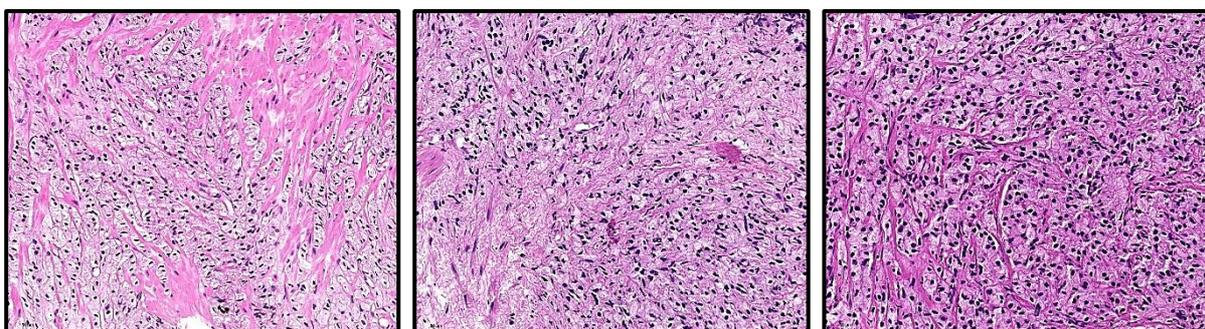


FIGURA 5A E B - ARRANJOS HISTOLÓGICOS ARQUITETURAIS MISTOS DO CARCINOMA ACINAR PROSTÁTICO.

Nota: cortes histológicos das amostras de próstata coradas em HE.

Fonte: Arquivo Pessoal do Autor

Do ponto de vista da análise dos dados, os arranjos com características semelhantes foram fundidos em 5 padrões arquiteturais, criando-se a variável **Padrão Acinar**. Quatro padrões exibem apenas uma característica básica. Quando mais de um desses padrões eram observados em uma mesma região de interesse, ela deveria ser classificada em outra categoria específica criada para padrões mistos. Os critérios para a classificação do **Padrão Acinar** são apresentados a seguir:

Padrão A - constituído exclusivamente de ácinos bem formados;

Padrão B - predomínio de ácinos pequenos e rudimentares > 80%;

Padrão C - padrão cribriforme típico puro;

Padrão D - presença de células isoladas ou arranjos celulares sólidos (tumores indiferenciados);

Padrão E - mais de um dos padrões acima observados em uma mesa área selecionada (padrão misto).

Os arranjos arquiteturais individuais que constituíram cada um dos Padrões Acinares são apresentados a seguir:

A = 1 e 8;

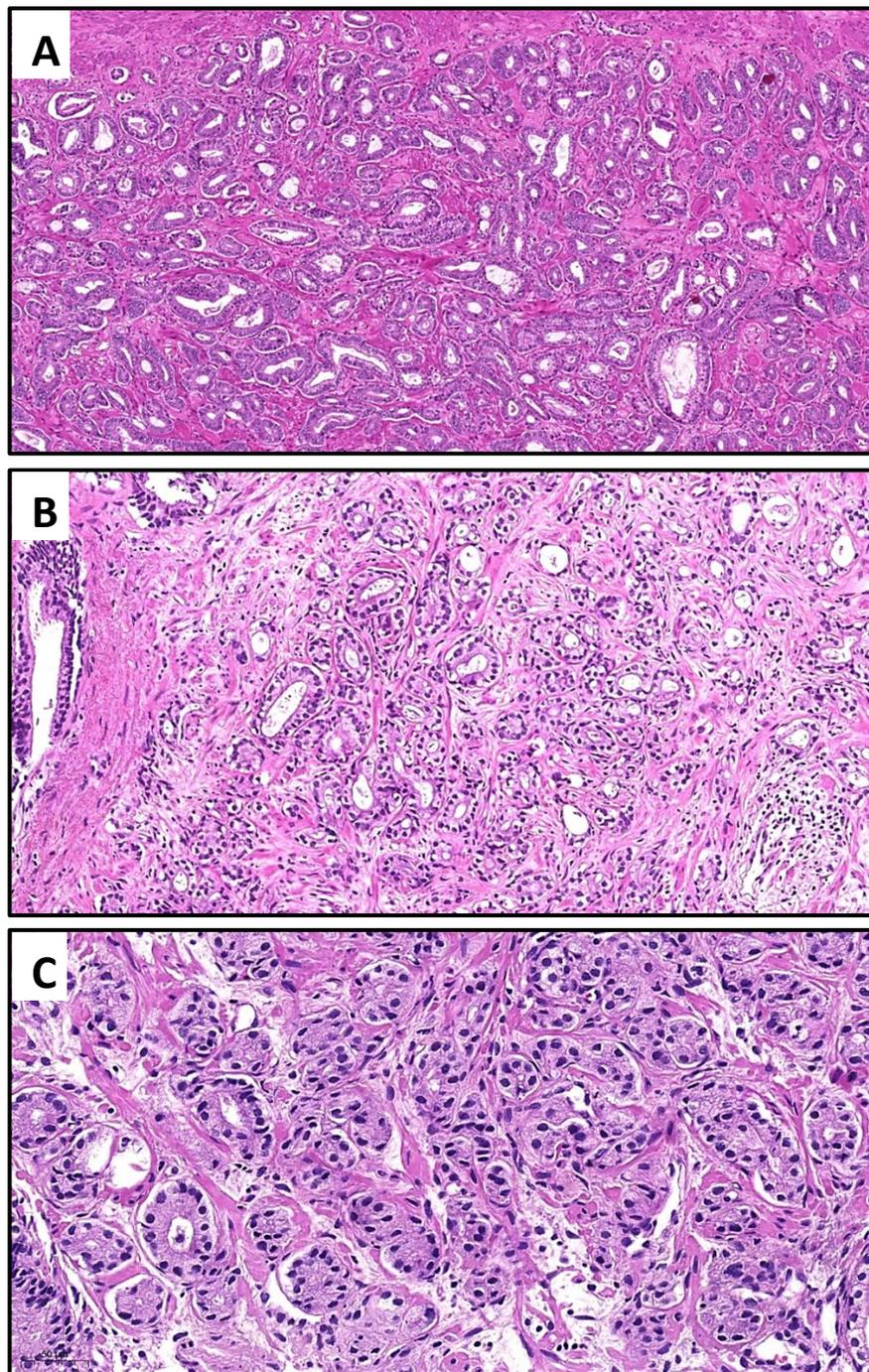
B = 2, 6 e 12;

C = 4;

D = 3, 5 e 13;

E = 7, 9, 10 e 11.

Um dado fundamental nesta análise é a definição do arranjo acinar rudimentar ou microácino, que suscitou maior destaque. Como separar os microácinos de padrão B com lumens nítidos dos ácinos pequenos de padrão A? Os microácinos de interesse, vistos preferencialmente na periferia dos ninhos neoplásicos, na interface com o estroma peritumoral e com muita frequência dissociados por fibrose, tinham revestimento de células cuboides baixas ou médias e variável lúmen, desde rudimentar a nítidos, porém com menor diâmetro médio se comparados com os ácinos neoplásicos pequenos (Figura 6).



**FIGURA 6 - ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE MICROÁCINOS
NEOPLÁSICOS.**

Nota: A- Microácinos na periferia dos ninhos neoplásicos com transição para o estroma peritumoral relativamente nítida; B- Microácinos na periferia dos ninhos neoplásicos com transição para o estroma indistinta, com fibrose periacinar; C- Detalhes dos microácinos.

Fonte: Arquivo Pessoal do Autor

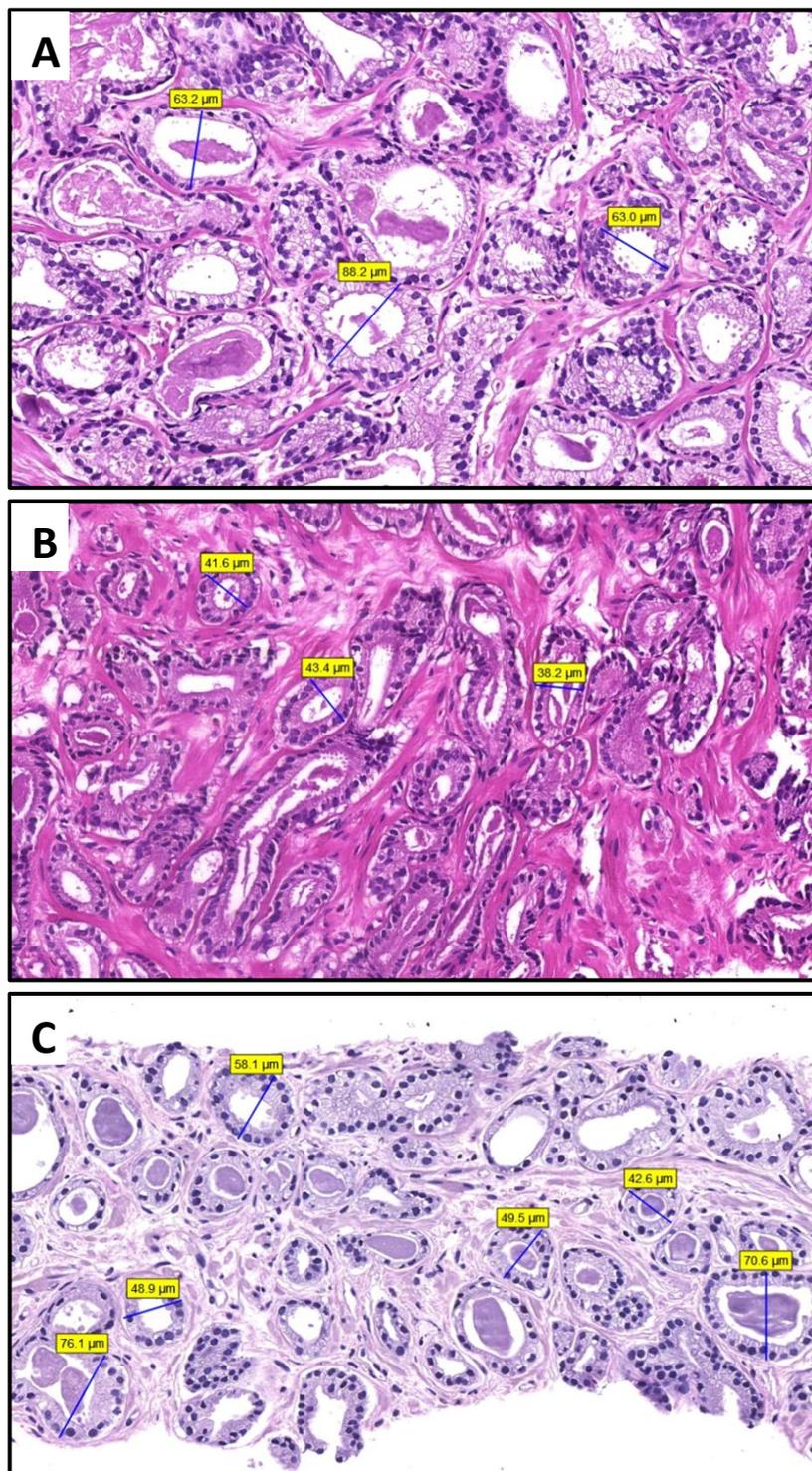


FIGURA 7 - CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS PARA DEFINIÇÃO DE MICROÁCINOS PADRÃO B.

Nota: medida do diâmetro máximo dos ácinos pequenos no corte mais bem orientado. A- Ácinos pequenos com diâmetro máximo $> 50 \mu\text{m}$ (Padrão A); B- Mesmo parâmetro, com diâmetro máximo $< 50 \mu\text{m}$ (Padrão B); C- Variável proporção de ácinos de Padrão A e B em uma mesma área (Padrão E).

Fonte: Arquivo Pessoal do Autor

Na padronização dos critérios, mediu-se o diâmetro médio de ácinos neoplásicos pequenos e de lúmens nítidos em 100 áreas de 18 dos 120 casos selecionados, escolhendo, dentre os cortes histológicos consecutivos, o ácino de contornos regulares e de maior diâmetro para realizar a medição. Toda a espessura do ácino foi considerada (parede + lúmen). As medidas variaram entre 22,6 μm a 87,1 μm , com média de 48,7 μm e mediana de 48,0 μm . Assim, empiricamente, foram designados microácinos com perfil B aqueles com diâmetro máximo de 50 μm (Figura 7).

Em relação à análise semiquantitativa do estroma tumoral, que representa a substituição ou modificação do perfil normal do estroma da próstata, com a deposição de colágeno (Figura 8), foram propostos os seguintes parâmetros baseados nos dados da literatura:

Intensidade do ER 1: estroma conjuntivo ausente ou escasso (<5% de estroma para quantidade de células neoplásicas);

Intensidade do ER 2: presença indubitável de estroma conjuntivo, de grau discreto a moderado ($\geq 5\%$ e <50% de estroma para quantidade de células neoplásicas);

Intensidade do ER 3: acentuado estroma conjuntivo ($\geq 50\%$ de estroma, ou seja, há pelo menos a mesma proporção de estroma para as células neoplásicas).

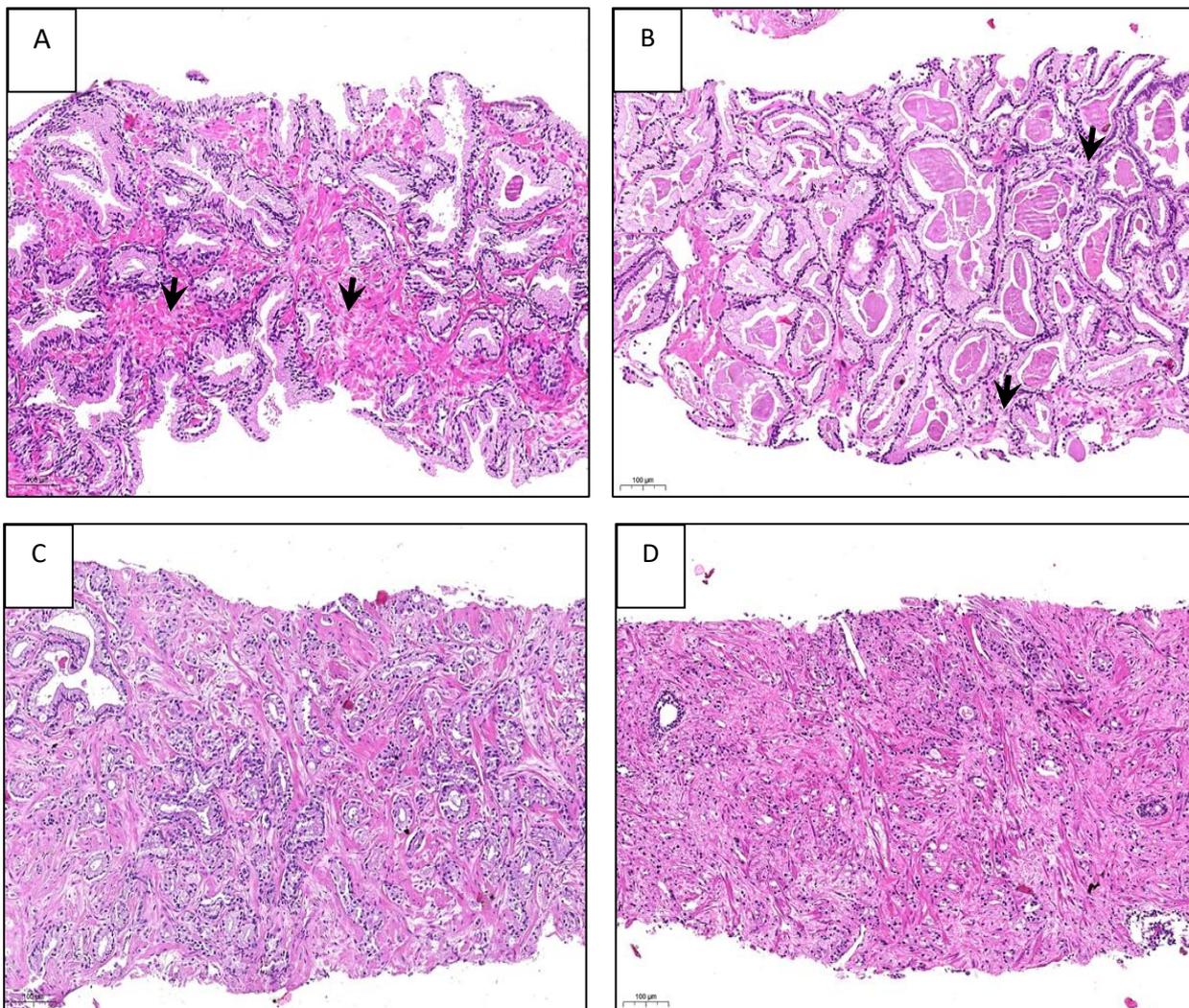


FIGURA 8: PADRÕES DO ESTROMA PROSTÁTICO.

Nota: Estroma prostático normal (A), com predomínio de músculo liso (fibras de coloração rósea mais escura, com algum colágeno de permeio (fibras mais claras - setas); B - tumor com reação estromal de grau 1 (colágeno <5% - setas), havendo rarefação de músculo liso; C - tumor de reação estromal moderada, com bastante colágeno (fibras claras) em meio a remanescentes de músculo liso; D - reação estromal acentuada, com ER >50% da massa tumoral.

Fonte: arquivo pessoal do autor.

B- CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA REATIVO AO EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO

Lâminas extras contendo cortes consecutivos das amostras selecionadas foram encaminhadas para reação imuno-histoquímica, com avaliação da expressão dos seguintes antígenos: α -actina de músculo liso (ACT), clone 14A, 1:70/DAKO; CD34, clone QBEnd-10, 1:100/DAKO; desmina (DES), clone D33, 1:100/DAKO; vimentina

(VIM), clone V9, 1:135/DAKO. As amostras foram processadas no sistema automatizado para preparação de amostras Bond-max (Leica Biosystems©). Em todas as análises, considerou-se a positividade de marcação citoplasmática nos diferentes tipos celulares do estroma examinados.

As lâminas de imuno-histoquímica foram digitalizadas no Panoramic MIDI - 3DHISTECH® (Hungary), selecionando-se uma ou mais áreas de interesse do ER (aquelas com maior quantidade de células positivas), sobrepostas às regiões selecionadas nas lâminas de HE. Estas áreas foram fotografadas na magnificação de 10 vezes e analisadas com o software ImageJ (Research Service Branch, NIH.gov), utilizando-se o Plug-in *IHC Profiler*(50). O software avalia a porcentagem de células positivas estratificada pela intensidade da marcação, resultando em um escore imuno-histoquímico final para determinada área com os seguintes valores: negativo - 1; positivo fraco - 2; positivo moderado - 3; fortemente positivo - 4. Em função da comparação com o padrão de marcação em regiões não neoplásicas, em que se detectou positividade frequente para VIM, ACT e DES nas células do estroma, considerou-se positividade no ER as marcações positivo moderado e positivo forte pelo ImageJ. Para as células CD34 positivas do estroma, bem menos frequentes no tecido normal, foi considerado como positividade marcações positivas fracas, moderadas e fortes, tendo como padrão a marcação do endotélio dos capilares periacinares.

Por fim, o fenótipo do ER foi assim considerado: **Perfil Telocítico** - positividade para CD34 e VIM; **Perfil Miofibroblástico 1** - positividade para ACT e VIM; **Perfil Miofibroblástico 2** - positividade para ACT e VIM, além de negatividade para DES.

C- CARACTERIZAÇÃO DA NEOANGIOGÊNESE AO EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO

Nas amostras com marcação para CD34, dependendo da extensão do tumor e da variação da distribuição vascular, uma ou mais áreas do ER foram fotografadas para a avaliação da neoangiogênese, expressa pela medida da densidade vascular (razão da área ocupada pelos vasos sanguíneos pela área de 0,30 mm², na magnificação de 20 vezes), obtida com a utilização do mesmo software, por meio do plug-in *Vessel Analysis*, disponível em https://imagej.net/Vessel_Analysis.

D- CARACTERIZAÇÃO DA PRESENÇA, DISTRIBUIÇÃO E ARQUITETURA DAS FIBRAS DE COLÁGENO

As regiões previamente selecionadas para a análise em HE foram também analisadas à microscopia por laser com excitação por 2 fótons para a obtenção de imagens por SHG. Foram obtidas também imagens de fotoluminescência (PL) da eosina e a imagem do laser transmitido. Importante frisar que a avaliação foi realizada na mesma lâmina de HE e exatamente na mesma área selecionada e devidamente marcada para a análise em HE. Utilizou-se sistema caseiro interligado a microscópio de varredura a laser Olympus FV300, com um laser com pulsos de 140 fs - Ti-Sapphire (modelo Chameleon, fabricante Coherent), na taxa de repetição de 80 MHz ajustado para um comprimento de onda de 800 nm. O feixe de laser, com polarização circular, passa pelos espelhos de varredura, por um espelho dicróico e é então focado na amostra com incidência normal por uma lente objetiva de 20× (N.A. 0,90). A potência média na amostra é 5 mW. O sinal retroespalhado de SHG e PL é coletado pela mesma objetiva e direcionado pelo espelho dicróico insensível à polarização (Semrock FF665-Di02) para o detector (um tubo de fotomultiplicadora). Um filtro de passa banda de largura fina (largura de banda de 20 nm) centrado no comprimento de onda SH (segundo harmônico) - 400 nm - é usado para remover completamente a luz espalhada do laser. Todas as polarizações de segundo harmônico foram coletadas, ou seja, não se utilizou analisador de polarização na frente do detector. São obtidas as imagens de autofluorescência (PL) e de SHG. Para a imagem PL foi utilizado um filtro passa banda de 560-600 nm, que coleta a emissão do corante eosina. Imagens do equipamento, que pertence ao laboratório de Biofotônica do Departamento de Física - Instituto de Ciências Exatas - e o processo de obtenção de imagem podem ser observados na Figura 9.

Para as análises das imagens, foi desenvolvido um programa em linguagem Python, o PyFibre (Python Fibrous Image Analysis Toolkit) por F. G. Longford, “Pyfibre: Python fibrous image analysis toolkit”, <https://github.com/franklongford/PyFibre>, Version 2, (2020). Este software, feito o mais automatizado possível, é capaz de analisar de forma rápida e eficiente um conjunto grande de imagens, gerando banco de dados que contém as métricas extraídas, permitindo a análise quantitativa das fibras e dos elementos celulares.

Inicialmente, o programa redimensiona a intensidade das imagens de modo a remover ruídos e realçar características importantes para a interpretação. São feitos

cálculos para as imagens de SHG, que permitem avaliar, por exemplo, o padrão de redes nas fibras de colágeno e separar segmentos de fibras e células. Para este último procedimento, o programa compara as imagens de SHG, PL e de transmissão. É possível calcular a ondulação e o número de fibras. Ao separar as regiões, conjunto determinado de métricas pode ser usado para avaliar exclusivamente os segmentos de interesse, sejam as fibras de colágeno ou as regiões celulares, permitindo assim analisar a interação entre os dois sistemas.



FIGURA 9 - SISTEMA EXPERIMENTAL UTILIZADOS PARA A OBTENÇÃO DE IMAGENS POR SHG E PL - LABORATÓRIO DE BIOFOTÔNICA, DEPARTAMENTO DE FÍSICA - UFMG.

Fonte: arquivo pessoal do autor.

O algoritmo PyFibre compara as imagens de SHG, PL e de transmissão utilizando o agrupamento de valores RGB em uma imagem colorida. Imagem composta de 3 canais é gerada a partir dos dados, correspondendo aos canais azul, vermelho e verde, respectivamente. Cada vetor de pixel RGB é então normalizado em um vetor unitário, a fim de reduzir a dependência da intensidade de iluminação para cada um dos tipos de imagem. As características das fibras aparecem como vetores unitários, com grandes componentes vermelhos, enquanto as características celulares devem resultar em vetores unitários contendo componentes verdes e azuis. Combinadas, é possível fazer a separação.

A seguir, apresentamos todas as métricas analisadas pelo Programa *PyFibre*:

1- *Anisotropy = Total Fibre Anisotropy*

A anisotropia mede o grau de alinhamento das fibras de colágeno e varia de 0 (maior desordem) a 1 (maior ordem). O cálculo, baseado na matriz do tensor estrutural, é feito apenas para os pixels do segmento de fibras da imagem inteira.

2- *Pixel Anisotropy = Local Anisotropy*

A anisotropia local mede o grau de alinhamento das fibras de colágeno para uma janela de 3x3 pixels nas regiões de segmento de fibras, utilizando-se a média destes valores. Assim como na anisotropia total, varia de 0 a 1.

3- *Average waviness (length/displacement) of each extracted fiber*

Mede a ondulação média (comprimento/deslocamento) de cada fibra extraída, variando de 0 (muito ondulada) a 1 (completamente estirada).

4- *Fibre Linearity = Fibre Segment Shape*

O cálculo de linearidade do segmento das fibras é feito considerando a linearidade dos aglomerados que foram identificados e separados pela segmentação da imagem. Para essas medidas de linearidade do segmento de fibras, caracterizamos que em 0 o aglomerado é completamente circular e em 1 o aglomerado é completamente linear.

5- *Cell segment shape*

Este parâmetro é uma medida simples de quão circular ou alongado é um segmento celular. É proporcional à razão entre a circunferência de um círculo com a mesma área do segmento e o perímetro do segmento, com valores que variam entre 0 (totalmente circular) e 1 (totalmente alongado). Portanto, representa uma média da "conformação ou os contornos" de todos os segmentos celulares extraídos em uma imagem.

6- *Fibre segment coverage*

A cobertura do segmento representa a proporção de pixels que contém o segmento de fibra na imagem. É calculada pela razão entre a área do segmento de fibra e a área total da caixa delimitadora do segmento.

7- *Cell segment coverage*

A Cobertura de Segmento de célula representa a proporção da imagem coberta pelos segmentos de célula. É calculada pela proporção da área do segmento de célula para a área total da caixa delimitadora do segmento.

8- *Fibre density*

A estimativa da densidade das fibras é obtida calculando-se a razão entre a intensidade do sinal SHG na região de fibras da imagem e a intensidade na área total da imagem.

9- *Number of fibres*

Número médio de fibras extraídas pelo algoritmo.

10- *Number of cells*

Número médio de regiões de células extraídas pelo algoritmo.

11- *Fibre length*

Outra característica de interesse é o comprimento médio das fibras extraídas, calculado a partir da distância do pixel euclidiano ao longo da fibra.

No presente estudo, que é parte de um projeto mais amplo, utilizaremos apenas algumas das métricas acima apresentadas, que nos apontam o número de fibras e o grau

de anisotropia. Muitos outros dados foram obtidos por meio do algoritmo nas amostras avaliadas. No entanto, serão discutidos em outro momento pelo nosso grupo.

4.2- ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística descritiva foi realizada para todas as variáveis estudadas. O Teste Chi-Quadrado foi aplicado a todas as variáveis qualitativas, empregando-se a simulação de Monte Carlo e de Pearson. O teste t-student (análises paramétricas) foi utilizado para verificar diferenças entre as variáveis quantitativas. A análise de variância ANOVA foi utilizada para comparar variâncias entre as médias, com a correção de Bonferroni. Outros testes de normalidade utilizados foram: Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk e Kruskal-Wallis, incluindo-se testes não-paramétricos, como Mann-Whitney U. Nas análises, utilizou-se o software IBM SPSS (Versão 20.00).

4.3- ASPECTOS ÉTICOS

O Projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da UFMG (COEP-UFMG) - CAAE 09288112.0.0000.5149.

5- RESULTADOS

5.1- ANÁLISES DESCRITIVAS E AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA GERAL

A Tabela 2 mostra a estratificação dos escores de Gleason que compõe cada Grupo, bem como o número de áreas examinadas e o valor da mediana das idades dos pacientes em cada um deles. Além disso, traz o registro das medianas das dosagens séricas do PSA total. Os valores tiveram distribuição normal, com medianas das idades semelhantes entre os grupos. Houve muita heterogeneidade nos valores de PSA e as medianas também tiveram variação, com valores de PSA significativamente mais elevados nos tumores menos diferenciados (Grupos 3 e 4). A correção pelo IIQ mostrou médias mais elevadas no Grupo 4. O número de áreas selecionadas para análise em cada Grupo também foi semelhante.

TABELA 2 - DISTRIBUIÇÃO DOS GRAUS DE GLEASON POR GRUPO, NÚMERO DE ÁREAS EXAMINADAS, IDADE E DOSAGEM SÉRICA DE PSA TOTAL.

GRAU DE GLEASON	%	GRUPO	ÁREAS N (%)	IDADE* (Anos) Mediana (IIQ)	PSA TOTAL** (ng/dL) Mediana (IIQ)
3+3	21,1	1	69 (21,1)	68 (11)	6,2 (3,8)
3+4	23,5	2	77 (23,5)	66 (6)	6,2 (4,5)
4+3	26,0	3	85 (26,0)	66 (10)	12,5 (12,4)
4+4	4,6	4	96 (29,4)	67 (13)	11,5 (34,9)
4+5	16,5				
5+4	6,1				
5+5	2,2				

Nota: IIQ - Intervalo Inter Quartil; *: p=0,164; **: p=0,001.

A Tabela 3 mostra a distribuição por Grupos das 327 áreas de tumor selecionadas das 120 amostras. O Grupo 1, correspondendo aos tumores de baixo grau, teve o menor número de áreas selecionadas, seguido dos Grupos 3 e 4, com 23,5% e 26,0%, respectivamente. Do Grupo 4, que corresponde aos tumores pouco diferenciados, de alto grau, foram selecionadas 96 áreas (29,4%). Dentre os tumores de alto grau, os de Gleason

4+4 corresponderam a 15 amostras (4,6%), enquanto os tumores 5+5 a apenas 7 (2,2%). Áreas com Gleason 5 estiveram representadas em 24,8% das amostras.

TABELA 3 - MÉDIA DE ÁREA TUMORAL PELOS GRUPOS.

Variável	GRUPOS*				
	Global Mediana (IIQ)	1 Mediana (IIQ)	2 Mediana (IIQ)	3 Mediana (IIQ)	4 Mediana (IIQ)
ÁREA TUMORAL (mm ²)	1,3 (1,5)	0,7 (0,5)	0,9 (0,9)	1,7 (2,2)	1,3 (1,1)

Nota: *: ANOVA (Grupos 1 a 4) - $p=0,001$.

Na análise dos Padrões Acinares, suprimiu-se o padrão E, levando-se em consideração sua heterogeneidade, lembrando que é caracterizado pela presença de mais de um arranjo acinar em uma única área. A presença desta categoria geraria dificuldades na análise comparativa e interpretação dos resultados. Desta forma, foram consideradas 274 áreas para o estudo, compostas por tipos acinares únicos, denominados, A, B, C e D. As distribuições são apresentadas na Tabela 4.

TABELA 4 - FREQUÊNCIA DOS PADRÕES ACINARES PELOS GRUPOS.

GRUPOS	PADRÕES*			
	A n (%)	B n (%)	C n (%)	D n (%)
1	69 (25,2)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
2	36 (13,1)	32 (11,7)	0 (0,0)	0 (0,0)
3	8 (2,9)	43 (15,7)	10 (3,65)	0 (0,0)
4	1 (0,4)	30 (10,9)	10 (3,65)	35 (12,8)
TOTAL	114 (41,6)	105 (38,3)	20 (7,3)	35 (12,8)

Nota: *: $p=0,001$ (simulação Monte Carlo)

O Grupo 1 é composto exclusivamente por ácinos neoplásicos de Padrão A, assim como o Padrão D só está presente no Grupo 4, o que está de acordo com o grau histológico original. O Padrão C, aquele contendo arranjos cribriformes, foi o menos frequente, representando 7,3% dos casos e presente exclusivamente nos tumores dos Grupos 3 e 4. A frequência de Padrão A reduziu significativamente nos tumores com menor grau de

diferenciação, especialmente nos do Grupo 4, como o esperado. Assim, os Padrões Acinares guardam as mesmas informações obtidas pelo Sistema Gleason.

A avaliação de infiltração perineural (IPN) entre os grupos é apresentada na Tabela 5. Entende-se por IPN o acometimento do perineuro pelos ácinos neoplásicos, que envolvem toda ou a maior parte do diâmetro do nervo, podendo até não ser completa, desde que determine mudança da trajetória do ácino. Esta via de disseminação foi muito menos observada nas áreas de tumores dos Grupos 1 e 2. A frequência de IPN foi maior no Grupo 3 e consideravelmente maior no Grupo 4, sendo estas diferenças significativas. Na mesma linha, foi significativamente mais baixa nos tumores com ácinos de Padrão A e destacadamente mais alta nos de Padrão B. Tumores com ácinos de padrão B e D demonstraram ser os mais associados à presença de IPN e, dentre os tumores de Padrão D, a chance de se observar IPN foi quase 3 vezes maior. Curiosamente, seu achado foi bem menos frequente nos tumores com ácinos de padrão C, mas com frequência superior à esperada. Ressalta-se que este Padrão teve amostragem inferior aos demais.

TABELA 5 - FREQUÊNCIA DE INFILTRAÇÃO PERINEURAL PELOS GRUPOS E PADRÕES ACINARES.

GRUPO	Infiltração Perineural		Valor <i>p</i>
	Ausente n (%)	Presente n (%)	
1	53 (16,2)	16 (4,9)	0,001
2	50 (15,3)	27 (8,3)	
3	48 (14,7)	37 (11,3)	
4	30 (9,2)	66 (20,2)	
TOTAL	181 (55,4)	146 (44,6)	
PADRÕES ACINARES	Infiltração Perineural		Valor <i>p</i>
	Ausente n (%)	Presente n (%)	
A	82 (30,0)	32 (11,7)	0,001
B	53 (19,3)	52 (19,0)	
C	9 (3,3)	11 (4,0)	
D	10 (3,6)	25 (9,1)	
TOTAL	154 (56,2)	120 (43,8)	

Todos os dados apresentados, que levam em consideração todas as áreas selecionadas de todas as amostras, foram também condensados e analisados em função das 120 amostras. Mas como a maioria delas continha mais de uma área analisada, foi

preciso desenvolver um modelo que avaliasse a amostra como um todo. Para tal, consideram-se os padrões mais frequentes e associados ao menor grau de diferenciação e maior intensidade de reação estromal, tomando-se por base o modelo utilizado na rotina diagnóstica para a avaliação da Classificação de Gleason em um determinado caso, que seleciona o padrão mais frequente.

A Tabela 6 mostra a distribuição dos Padrões Acinares nas 120 amostras em função dos Grupos. Novamente, foi preciso retirar da análise 13 casos em que o padrão E prevaleceu. Ao final, os achados foram percentualmente muito próximos aos observados na análise que considerava múltiplas áreas de tumores diferentes, com destaque apenas para o leve aumento no percentual do padrão acinar B nesta avaliação.

TABELA 6 - FREQUÊNCIA GLOBAL DOS PADRÕES ACINARES ÚNICOS PELOS GRUPOS (N=107).

GRUPOS	PADRÕES*			
	A n (%)	B n (%)	C n (%)	D n (%)
1	30 (28,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
2	12 (11,2)	17 (15,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
3	1 (0,9)	17 (15,9)	5 (4,7)	0 (0,0)
4	0 (0,0)	10 (9,3)	3 (2,8)	12 (11,2)
TOTAL	43 (40,2)	44 (41,1)	8 (7,5)	12 (11,2)

Nota: *: $p=0,001$ (simulação Monte Carlo)

Em relação à IPN, cujos dados são apresentados na tabela 7, a mesma tendência se repete, com aumento progressivo de sua observação à medida em que o grau de diferenciação tumoral se torna menor, com maior frequência nos tumores em que predominam os microácinos rudimentares (Padrão B).

TABELA 7 - FREQUÊNCIA GLOBAL DE INFILTRAÇÃO PERINEURAL PELOS GRUPOS E PADRÕES ACINARES NAS AMOSTRAS DE TUMOR.

GRUPO	Infiltração perineural		Valor <i>p</i>
	Ausente n (%)	Presente n (%)	
1	24 (20,0)	6 (5,0)	0,008
2	19 (15,8)	11 (9,2)	
3	17 (14,2)	13 (10,8)	
4	11 (9,2)	19 (15,8)	
TOTAL	71 (59,2)	49 (40,8)	

PADRÕES ACINARES	Infiltração perineural		Valor <i>p</i>
	Ausente n (%)	Presente n (%)	
A	32 (30,0)	11 (10,3)	0,070*
B	23 (21,5)	21 (19,6)	
C	4 (3,7)	4 (3,7)	
D	5 (4,7)	7 (6,5)	
TOTAL	64 (59,9)	43 (40,1)	

Nota: *: Qui-quadrado (simulação de Monte Carlo)

5.2- CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA REATIVO AO EXAME HISTOLÓGICO DE ROTINA

Entre as áreas selecionadas para análise, ER em quantidade significativa esteve presente em quase 70% dos casos. Tumores estromogênicos, aqueles em que a maioria da massa tumoral é composta por ER, corresponderam a apenas 8% deles (Figura 8D), geralmente tumores pouco diferenciados ou com Gleason 4+3. As áreas contendo ER discreto a moderado foram as mais frequentemente observadas no Grupo 2 (muito superior ao esperado). No Grupo 3, observou-se o oposto: a frequência foi relativamente mais baixa que a esperada, porém compensada pela presença de tumores estromogênicos, com predomínio de estroma ao componente epitelial neoplásico. Ademais, 44,7% e 20,8% dos tumores dos Grupos 3 e 4, respectivamente, não apresentaram ER em quantidades significativas. Ver Tabela 8.

Na análise em função do padrão acinar, apenas os tipos B e D correlacionaram-se significativamente com tumores estromogênicos. Chama a atenção que a maioria dos tumores de padrão cribriforme não apresentou reação estromal significativa. Nestes, o ER teve maior distribuição na periferia dos ninhos neoplásicos e não por entre os ácinos tumorais, como ocorreu nos demais padrões, formando traves espessas de fibrose

interconectadas. No padrão A, que se correlaciona preferencialmente com o Grupo 1, 70,2% dos tumores apresentam reação estromal significativa, enquanto no padrão D, de tumores indiferenciados, 34,6% não apresentaram formação de ER significativo. Dentre os padrões, o tipo B destacou-se por representar o que mais se correlacionou com a presença de ER.

TABELA 8 - INTENSIDADE DO ER EM FUNÇÃO DOS GRUPOS E DOS PADRÕES ACINARES.

GRUPO	INTENSIDADE			Valor <i>p</i>
	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)	
1	25 (7,6)	44 (13,5)	0 (0,0)	0,001*
2	16 (4,9)	61 (18,6)	0 (0,0)	
3	38 (11,6)	36 (11,0)	11 (3,4)	
4	20 (6,1)	61 (18,7)	15 (4,6)	
TOTAL	99 (30,2)	202 (61,8)	26 (8,0)	
PADRÕES ACINARES	INTENSIDADE			Valor <i>p</i>
	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)	
A	41 (15,0)	73 (26,6)	0 (0,0)	0,001*
B	24 (8,7)	66 (24,1)	15 (5,5)	
C	11 (4,0)	9 (3,3)	0 (0,0)	
D	9 (3,3)	18 (6,6)	8 (2,9)	
TOTAL	85 (31,0)	166 (60,6)	23 (8,4)	

Nota: *: Qui-quadrado (simulação de Monte Carlo)

A mesma análise realizada em função das 120 amostras torna mais nítida a impressão de que a frequência de ER no CaP é bastante alta (80% dos casos). Considerando-se a intensidade de reação estromal de grau 2 (presença de ER em quantidades significativas), não há grandes diferenças na distribuição entre os Grupos. No entanto, tumores estromogênicos somente foram observados nos Grupos 3 e 4, sendo poucos os casos de tumores sem ER no Grupo 4.

Na análise das frequências de ER entre os Padrões Acinares, cabem as mesmas considerações feitas quando todas as 327 áreas foram analisadas em conjunto. CaP sem quantidades significativas de ER é menos frequente nos tumores com ácinos de Padrões C e D e os estromogênicos somente associados aos Padrões B e D, especialmente nos primeiros.

TABELA 9 - INTENSIDADE GLOBAL DO ER EM FUNÇÃO DOS GRUPOS E DOS PADRÕES ACINARES NAS AMOSTRAS DE TUMOR.

GRUPO	INTENSIDADE			Valor <i>p</i>
	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)	
1	7 (5,8)	23 (19,2)	0 (0,0)	0,011*
2	5 (4,2)	25 (20,8)	0 (0,0)	
3	10 (8,3)	15 (12,5)	5 (4,2)	
4	3 (2,5)	24 (20,0)	3 (2,5)	
TOTAL	25 (20,8)	87 (72,5)	8 (6,7)	

PADRÕES ACINARES	INTENSIDADE			Valor <i>p</i>
	1 n (%)	2 n (%)	3 n (%)	
A	11 (10,3)	32 (30,0)	0 (0,0)	0,107*
B	7 (6,5)	31 (29,0)	6 (5,5)	
C	2 (1,9)	6 (5,6)	0 (0,0)	
D	3 (2,8)	7 (6,5)	2 (1,9)	
TOTAL	23 (21,5)	76 (71,1)	8 (7,4)	

Nota: *: Qui-quadrado (simulação de Monte Carlo)

5.3- CARACTERIZAÇÃO DO ESTROMA REATIVO AO EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO

A análise imuno-histoquímica revelou alta expressão de DES e ACT no estroma normal da próstata, com diferenças regionais em função da presença e da proporção de elementos do parênquima. A positividade para VIM foi variável e baixa para CD 34, com marcação notadamente no endotélio da rede vascular periacinar.

Ênfase foi dada na análise do ER do entorno do componente acinar (Figura 10). Nas áreas de ácinos normais, além da membrana basal epitelial, foram identificadas células fusiformes periacinares de núcleos alongados, por vezes conectadas por longos prolongamentos citoplasmáticos finos, ou dispostas de forma descontínua. Outras vezes, identificaram-se células alongadas mais calibrosas, de núcleos periféricos e citoplasma mais amplo que as anteriores, frequentemente em contato com as células epiteliais. Houve positividade para ACT, DES, VIM e CD34 nas células desta topografia. Não foi possível a análise por dupla marcação.

Correlacionando-se os aspectos histológicos e imuno-histoquímicos, as células fusiformes de prolongamentos finos nos pareceram marcadas para VIM e CD34 (Figuras

10A-D). O padrão de células fusiformes mais calibrosas e que apresentavam conexão com as células epiteliais, por sua vez, nos pareceram positivas preferencialmente para os marcadores musculares, com negatividade para CD34 (Figuras 10E e F). Grupos de fibras musculares lisas mais calibrosas, dispostas em camadas mais profundas, algumas vezes também alcançavam as regiões periacinares, inclusive em contato direto com as células epiteliais. Algumas células fusiformes de prolongamentos citoplasmáticos finos, CD34 positivas, também tiveram localização mais profunda (Figura 10C).

Nas áreas de ácinos neoplásicos (Figura 11), observou-se o aumento do número das células fusiformes periacinares, com destaque no aumento da positividade para VIM e CD34 (Figuras 11C e D, respectivamente) e redução da expressão de DES (Figura 11B), além de variável marcação em células fusocelulares mais espessas periacinares pela ACT (Figura 11A).

A expressão de VIM foi observada na maioria das células do estroma, mas também em células epiteliais (Figura 12). A positividade em células epiteliais foi demonstrada tanto em ácinos neoplásicos quanto nos do parênquima normal adjacente ao tumor (presente em 93% das áreas examinadas). Observou-se marcação citoplasmática forte na célula luminal, mais intensa na porção basal, seguida da região lateral, com reforço da membrana celular. A distribuição variou de difusa a poucas células descontínuas, tanto em ácinos normais quanto neoplásicos.

Havia geralmente menor representação de parênquima normal nas amostras dos Grupos 3 e 4 (maior extensão de acometimento pela neoplasia). Nas amostras do Grupo 1, ao contrário, com menor extensão de neoplasia, houve maior representação de parênquima. No entanto, a expressão de VIM nas células tumorais nos Grupos 3 e 4 foi progressivamente menor, enquanto a positividade nas células do ER foi significativamente maior.

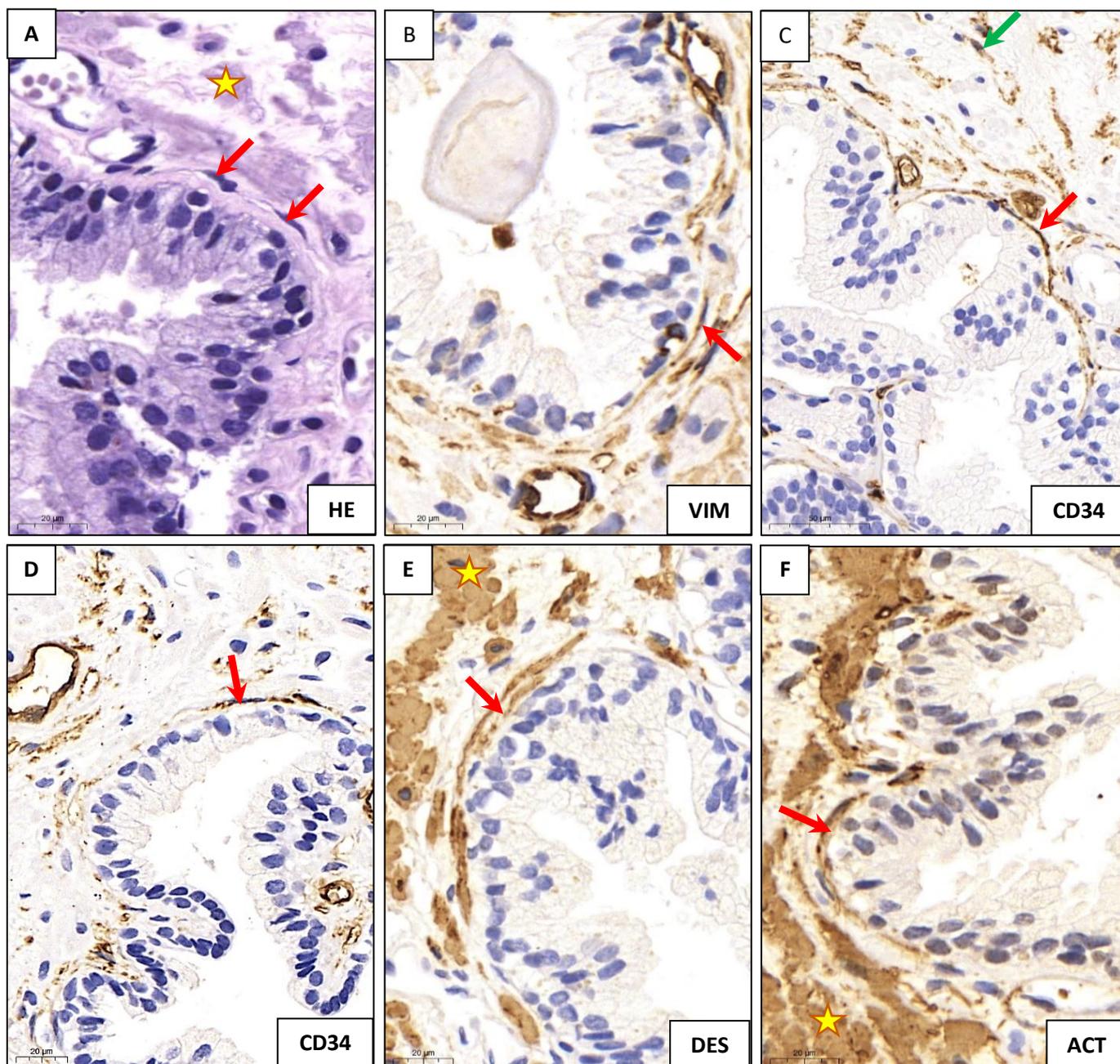


FIGURA 10: AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS SUBEPITELIAIS EM ÁREAS DE PARÊNQUIMA NORMAL.

Nota: notar células fusiformes de citoplasma bastante delgado e alongado, de núcleo saliente, localizadas logo abaixo da membrana basal, que se interconectam (A) e são positivas para VIM (B) e CD34 (C e D, setas vermelhas). Este tipo celular com marcação positiva para CD 34 também foi observado em regiões mais profundas (E, seta verde). Setas vermelhas (E e F) destacam células fusiformes mais largas, dispostas junto das células epiteliais e com marcação positiva para diferenciação muscular. Estrela amarela (A, E e F) indicam grupos de fibras musculares lisas do estroma mais profundo. Notar íntimo contato destes grupos celulares com as células epiteliais (F).

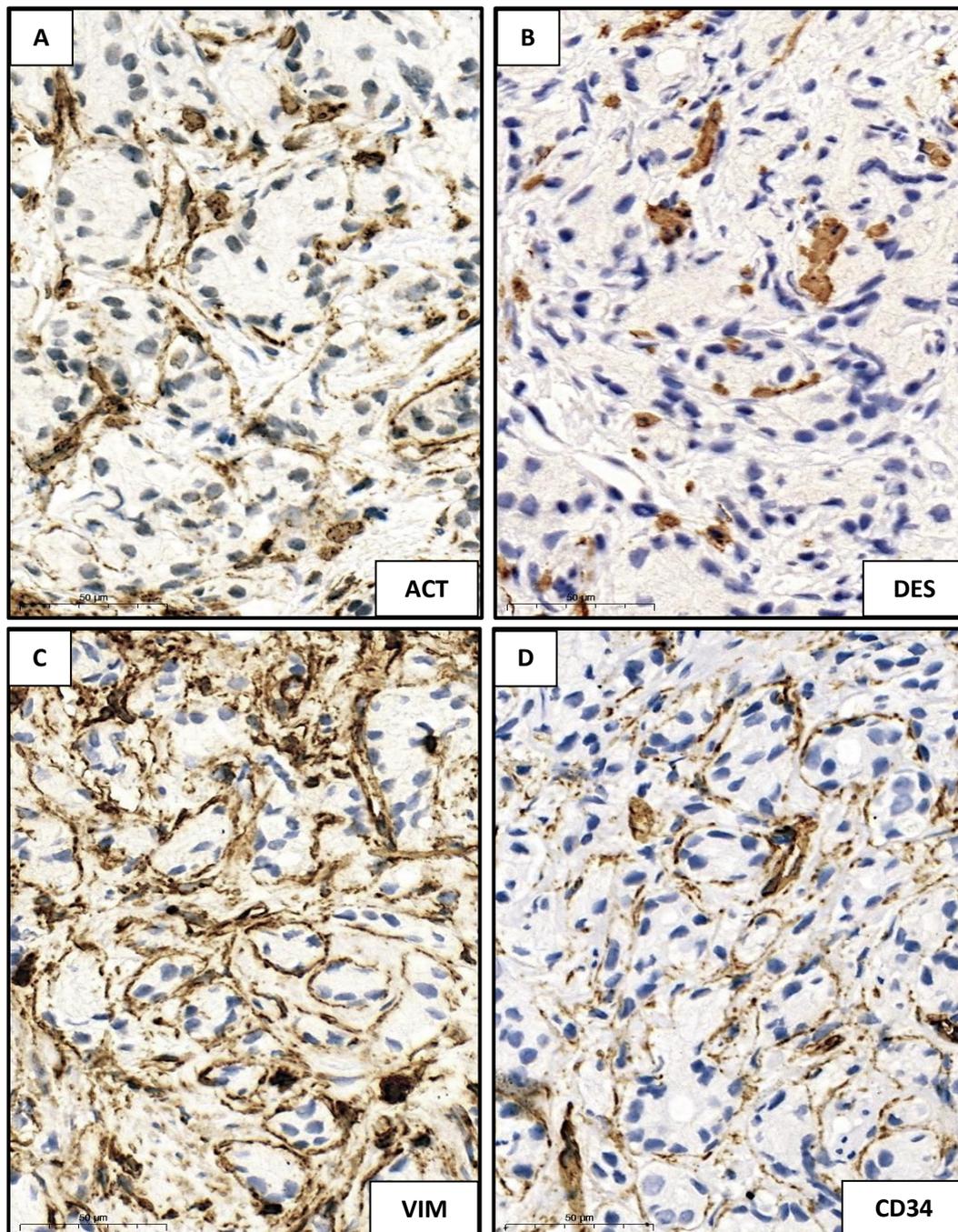


FIGURA 11: AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS SUBEPITELIAIS EM CORTES HISTOLÓGICOS CONSECUTIVOS DE AMOSTRA DE TUMOR.

Nota: A- Células fusiformes ACT positivas de distribuição periacinar e distribuição irregular, além de remanescentes das fibras musculares lisas; B- Redução expressiva do musculo liso do estroma prostático demonstrada à marcação para DES; C- Aumento na positividade para VIM nas células do estroma periacinar; D- Frequentes células fusiformes periacinares positivas para CD34, de citoplasma bastante delgado e alongado.

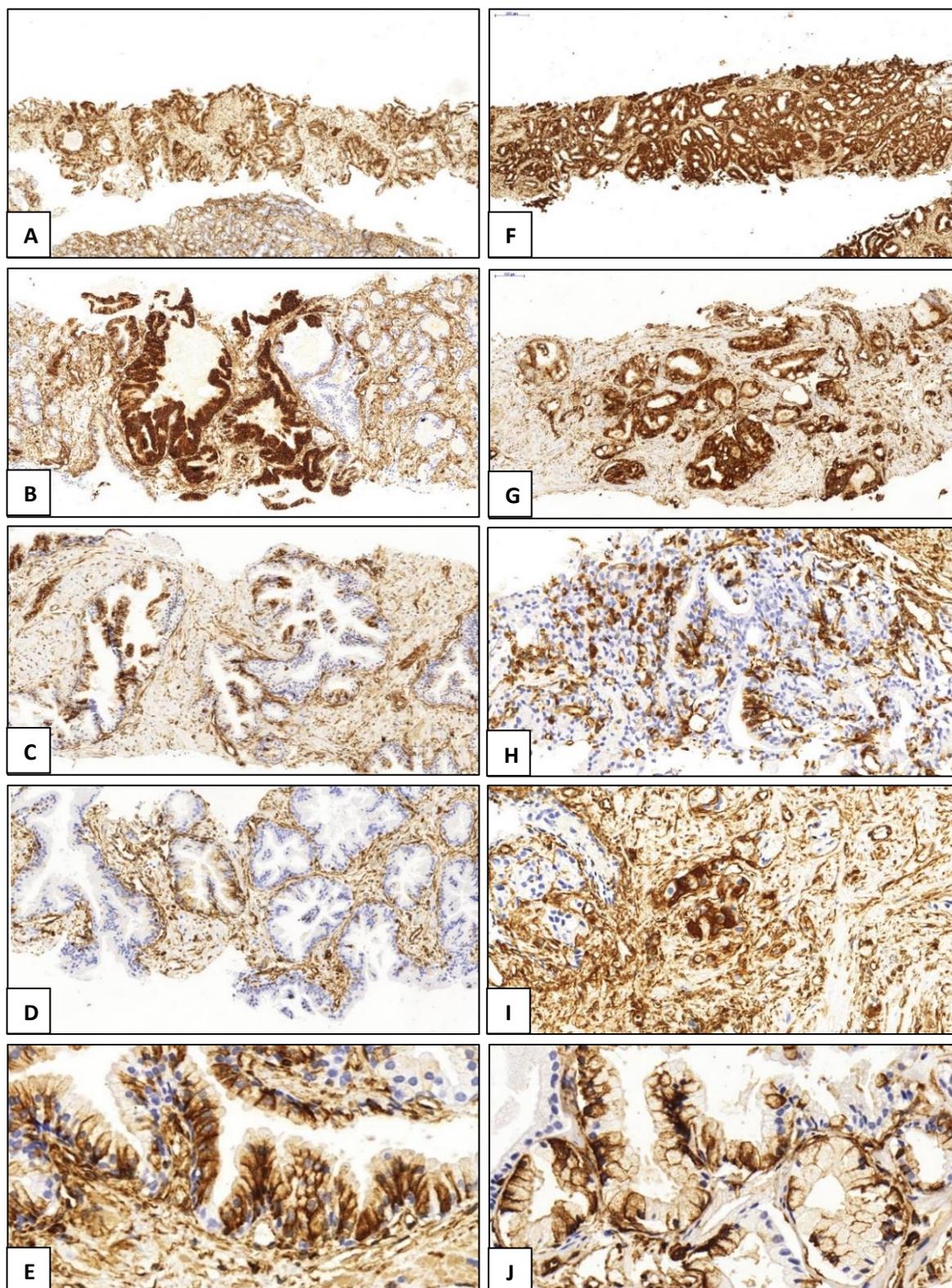


FIGURA 12: MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA VIM EM CÉLULAS EPITELIAIS.

Nota: marcação luminal em células epiteliais normais (A, B, C, D e E) e neoplásicas (F, G, H e I). Padrão difuso (A e F), multifocal contínuo (B e G), multifocal descontínuo (C e H) e focal (D e I). Marcação citoplasmática e perimembranar nas porções basal e lateral de células normais (E) e neoplásicas (J).

Com as análises imuno-histoquímicas, tentou-se avaliar o fenótipo do ER nos tumores, tanto em função dos Grupos quanto dos Padrões Acinares, por meio da combinação das marcações dos antígenos pesquisados. Visou-se a busca de possível assinatura de miofibroblastos, seja com maior positividade para VIM e ACT, com ou sem redução da expressão de DES, ou da assinatura de telócitos, com a expressão aumentada para CD34 e VIM.

TABELA 10 - MARCAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS DOS PERFIS MIOFIBROBLÁSTICOS 1 E 2 E TELOCÍTICO EM FUNÇÃO DOS GRUPOS.

GRUPO	Miofibroblástico 1		Valor <i>p</i>
	Negativa n (%)	Positiva n (%)	
1	45 (15,5)	16 (5,5)	0,264
2	48 (16,5)	17 (5,8)	
3	46 (15,8)	29 (10,0)	
4	58 (19,9)	32 (11,0)	
TOTAL	197 (67,7)	94 (32,3)	
GRUPO	Miofibroblástico 2		Valor <i>p</i>
	Negativa n (%)	Positiva n (%)	
1	53 (18,3)	8 (2,8)	0,209
2	54 (18,7)	10 (3,5)	
3	56 (19,4)	18 (6,2)	
4	68 (23,5)	22 (7,6)	
TOTAL	231 (79,9)	58 (20,1)	
GRUPO	Telocítico		Valor <i>p</i>
	Negativa n (%)	Positiva n (%)	
1	51 (11,5)	10 (3,4)	0,001*
2	31 (10,7)	34 (11,7)	
3	38 (13,1)	37 (12,7)	
4	37 (26,3)	53 (39,6)	
TOTAL	157 (54,0)	134 (46,0)	

Nota: *: Qui-quadrado (simulação de Monte Carlo)

TABELA 11 - MARCAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS DOS PERFIS MIOFIBROBLÁSTICOS 1 E 2 E DO PERFIL TELOCÍTICO EM FUNÇÃO DOS PADRÕES ACINARES.

Padrões	Miofibroblástico 1		Valor <i>p</i>
	Negativa n (%)	Positiva n (%)	
A	75 (30,6)	20 (8,2)	0,028*
B	57 (23,3)	39 (15,9)	
C	16 (6,5)	3 (1,2)	
D	23 (9,4)	12 (4,9)	
TOTAL	171 (69,8)	74 (30,2)	

Padrões	Miofibroblástico 2		Valor <i>p</i>
	Negativa n (%)	Positiva n (%)	
A	85 (34,0)	9 (3,7)	0,031*
B	71 (29,2)	25 (10,3)	
C	15 (6,2)	3 (1,2)	
D	29 (11,9)	6 (2,5)	
TOTAL	200 (81,3)	43 (17,7)	

Padrões	Telocítico		Valor <i>p</i>
	Negativa n (%)	Positiva n (%)	
A	70 (28,6)	25 (10,2)	0,001*
B	45 (18,4)	51 (20,8)	
C	13 (5,3)	6 (2,4)	
D	13 (5,3)	22 (9,0)	
TOTAL	141 (57,6)	104 (42,4)	

Nota: *: Qui-quadrado (simulação de Monte Carlo)

A Tabela 10 mostra os resultados obtidos em função dos Grupos. O perfil de marcação favorecendo a presença de miofibroblastos foi detectado em apenas 32% de 291 áreas analisadas, quando se considerou apenas alta expressão de ACT e VIM e 20,1% destas quando se associou a redução concomitante da expressão de DES. Em ambas as situações, a assinatura de miofibroblastos foi mais frequente em áreas tumorais nos Grupos 3 e 4. No entanto, as diferenças observadas entre as categorias não foram estatisticamente significativas. Positividade favorecendo Perfil Telocítico foi observada em 46% das áreas examinadas, também mais frequentes nos Grupos 3 e 4, ressaltando aqui a positividade significativamente maior no Grupo 4, predominando sobre as áreas com marcação negativa. Este fato só foi observado no Grupo 2.

Na análise realizada em função dos Padrões Acinares (Tabela 11), o perfil miofibroblástico foi também observado em 30,2% das áreas tumorais, notadamente com Padrão Acinar B. Esta predominância foi também observada no Perfil Miofibroblástico 2, em que a positividade global foi observada em apenas 17,7% das 243 áreas analisadas. No Perfil Telocítico, observou-se positividade em 42,4% das 245 áreas analisadas, com maior expressão associada aos tumores com ácinos de Padrão B, seguida dos Padrões A e D. O número de áreas positivas foi superior às negativas nos Grupos B e D. Cerca de 62,8% das áreas de padrão D e 72,9% das de Padrão B exibiram Perfil Telocítico, enquanto cerca de 73,7% das áreas de Padrão A foram negativas.

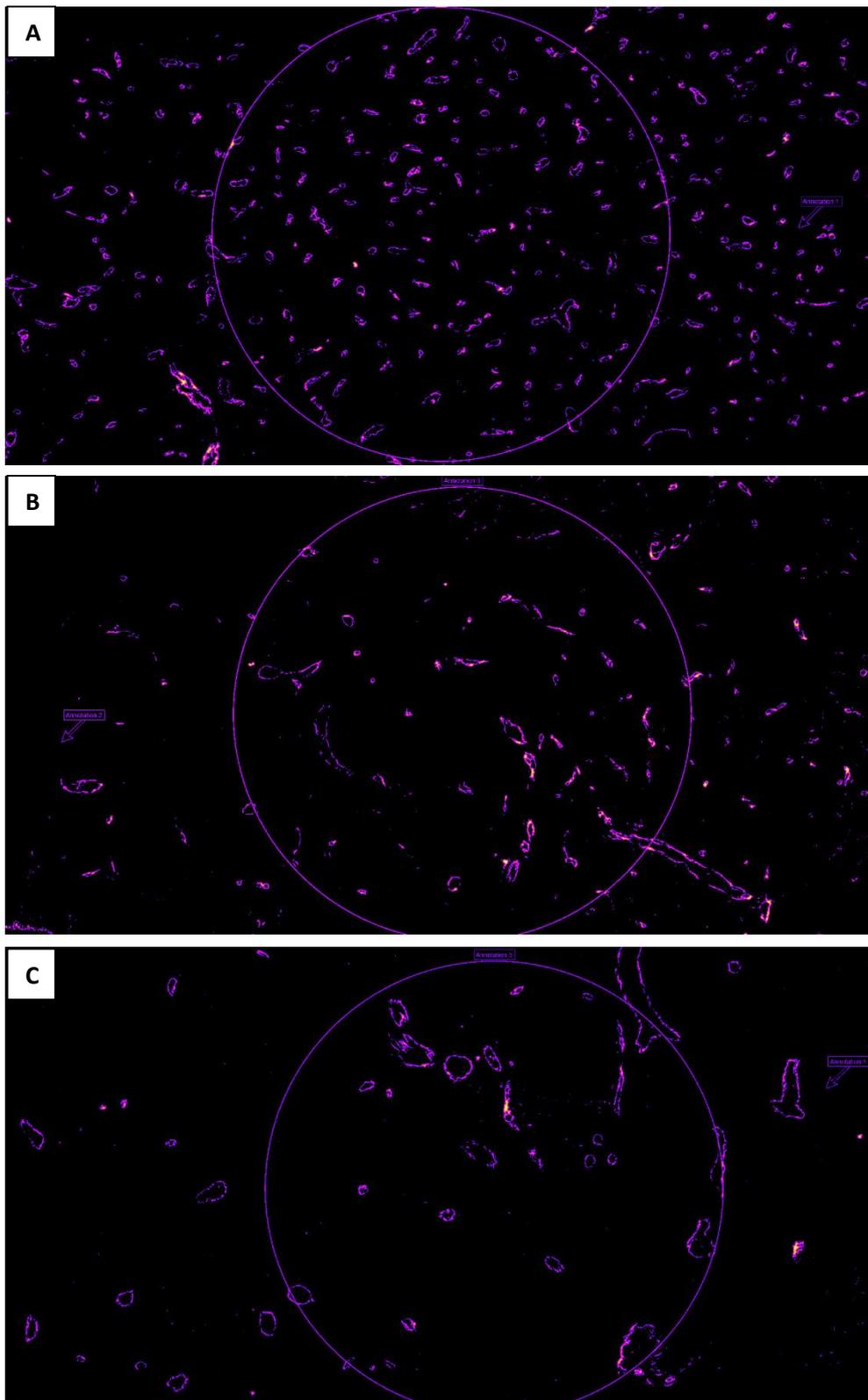
5.4- CARACTERIZAÇÃO DA NEOANGIOGÊNESE AO EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO

A Tabela 12 traz as medianas das densidades vasculares em função dos Grupos e dos Padrões Acinares. Para a avaliação, considerou-se unidade vascular o achado de estrutura arredondada ou imagem de linhas duplas contíguas/paralelas, captadas pelo ImageJ (Figura 13).

TABELA 12 - MÉDIAS DA DENSIDADE VASCULAR POR GRUPO E PADRÕES ACINARES AVALIADAS PELA MARCAÇÃO COM CD34 (N=327).

Grupos	Densidade Vascular	Valor <i>p</i>	Padrões Acinares	Densidade Vascular	Valor <i>p</i>
	Mediana (IIQ)			Mediana (IIQ)	
1	2,3 (1,7)	0,028	A	2,3 (1,6)	0,001
2	2,2 (1,3)		B	2,1 (1,1)	
3	2,3 (1,0)		C	2,8 (2,0)	
4	2,0 (1,3)		D	2,0 (1,1)	

Nota: IIQ - Intervalo Inter Quartil



**FIGURA 13 - AVALIAÇÃO DA DENSIDADE VASCULAR OBTIDA PELO
VESSEL ANALYSIS (IMAGEJ).**

Nota: exemplo de áreas com densidade vascular mais alta (A), média (B) e baixa (C) de tumores com padrões acinares A, B e D, respectivamente.

Na análise em função dos grupos, a variação das medianas foi pequena, não se observando diferenças significativas entre as categorias. Porém, corrigidas pelo IIQ, temos as maiores densidades vasculares no Grupo 1, com diferença significativa para os demais Grupos. Destaca-se a menor densidade vascular em tumores do Grupo 3. Em função dos Padrões Acinares, as maiores medianas foram observadas nas áreas com os Padrões A e C, o que se mantém quando corrigidas pelo IIQ. As maiores densidades vasculares foram observadas no Padrão C, sendo significativamente menores em áreas tumorais com Padrões B e D.

5.5- ASSINATURA DO COLÁGENO PELA MICROSCOPIA COM SHG

As imagens obtidas pela microscopia por SHG, analisadas com o *PyFibre*, trouxeram informações interessantes. Para este estudo, extraímos os dados referentes ao número médio de fibras obtido pelo algoritmo, além das análises de anisotropia local e global, sendo a anisotropia local a média dos valores de grau de alinhamento das fibras de colágeno para uma janela de 3x3 pixels nas regiões de segmento de fibras e a total o grau de alinhamento das fibras em toda a área selecionada. É importante destacar que, por esse método, a presença de colágeno no estroma normal, de disposição periacinar ou por entre as fibras musculares lisas, é vista em uma intensidade que não é percebida à histologia convencional. Nos tumores, fibras de colágeno finas ou espessas podem ser vistas circunscrevendo o ácino, de forma circular, formando malhas ou redes e até mesmo dispostas em grupos de fibras alongadas, retilíneas e paralelas, tangenciando ácinos ou ninhos de células neoplásicas.

A Figura 14 nos mostra alguns exemplos de intensidade e padrão de distribuição do colágeno. No normal (Figura 14A), a distribuição do colágeno se deu especialmente em regiões perivasculares, notando-se camada fina e descontínua no entorno do ácino, junto à membrana basal, delicadamente interpondo-se por entre as fibras musculares lisas. Nos tumores de baixo grau, de Padrão Acinar A, a intensidade das fibras nos pareceu maior, tendendo a circunscrever o ácino neoplásico (formato circular), em camada mais espessa (Figuras 14B e C). As fibras também se agregaram de permeio aos feixes musculares. À medida que os ácinos tornam-se menores, alongados e afilados, o estroma à volta, ainda mais espesso, tem fibras colágenas dispostas em arranjos mais lineares, quase em paralelo (Figura 14C), especialmente quando existem ácinos de Padrão B na

mesma topografia (Figura 14D). Os feixes de colágeno são mais calibrosos e existe redução da população de fibras musculares lisas.

Quando as fibras de Padrão B predominaram nas áreas neoplásicas, verdadeiras redes interconectadas de colágeno se formaram e os ácinos são comprimidos e dissociados pelo estroma (Figura 14E e F). Tumores com ácinos de Padrão C, contendo arranjos cribriformes de tamanhos variados, apresentaram escasso estroma interacinar (Figura 14G). O colágeno, ainda mais denso, foi visto na periferia da massa tumoral em grandes traves alinhadas espessas, ramificadas. Os tumores de Padrão D, em que predominaram células isoladas, formavam grandes malhas de colágeno orientadas em diferentes direções, muitas vezes com distribuição pericelular.

As médias dos números de fibras, apresentadas na Tabela 13, foram menores nos tumores do Grupo 1 e maiores nos do Grupo 4. As diferenças entre as médias do Grupo 4 para os demais grupos foram estatisticamente significativas. Em função dos Padrões Acinares, vimos que as menores médias de fibras foram observadas no Padrão C, seguida do Padrão A, sem diferenças significativas entre estas categorias.

TABELA 13 - MÉDIAS DOS NÚMEROS DE FIBRAS DE COLÁGENO EM FUNÇÃO DOS GRUPOS E PADRÕES ACINARES.

Grupos*	N	Número de fibras	Valor <i>p</i>	Padrões Acinares*	N	Número de fibras	Valor <i>p</i>
		Média (DP)				Média (DP)	
1	29	590,9 (74,2)	0,001[■]	A	42	590,1 (77,2)	0,001^{**}
2	30	625,5 (95,7)	0,001[■]	B	43	699,6 (107,6)	0,013^{***}
3	27	646,9 (123,2)	0,015[■]	C	8	578,5 (39,32)	0,003^{****}
4	28	733,2 (115,7)		D	11	745,61 (130,4)	

Nota: DP - Desvio Padrão; ANOVA* - $p=0,001$; Post HOC-correção de Bonferroni -[■]em relação ao Grupo 4, ^{**}em relação ao Padrão B, ^{***}em relação ao Padrão C, ^{****}em relação ao Padrão D.

As maiores médias foram observadas nas áreas tumorais de Padrões B e D, sem diferenças significativas entre elas, mas que as distinguem dos padrões A e C. Nos tumores pouco diferenciados, seja caracterizado por arranjos celulares sólidos ou de células isoladas, especialmente nestes últimos, a deposição de colágeno foi significativamente maior.

A determinação do número de fibras pelo algoritmo correlacionou-se com a intensidade do ER avaliada ao exame histológico convencional, como mostra a Tabela 14. As menores médias foram observadas na intensidade 1, com o aumento progressivo

nas categorias subsequentes, com maior número de fibras nos tumores estromogênicos. A diferença entre as médias foi estatisticamente significativa. Também a presença de IPN correlacionou-se mais o aumento do número de fibras, com diferenças estatisticamente significativas (ver Tabela 15). No entanto, mas não se observou correlação com o Perfil Telocítico ou Miofibroblástico.

TABELA 14 - MÉDIAS DO NÚMERO DE FIBRAS DE COLÁGENO EM FUNÇÃO DA INTENSIDADE DO ESTROMA REATIVO

INTENSIDADE*	NÚMERO DE FIBRAS	Valor <i>p</i>
	N (Média) - DP	
1	23 (569,3) - 73,2	0,002**
2	83 (652,7) - 107,0	
3	8 (828,9) - 60,4	

Nota: DP - Desvio Padrão; ANOVA* $p=0,001$ - correção de Bonferroni - **em relação à intensidade 1, ***em relação às intensidades 1 e 2.

TABELA 15 - MÉDIAS DO NÚMERO DE FIBRAS DE COLÁGENO EM FUNÇÃO DE INFILTRAÇÃO PERINEURAL

INFILTRAÇÃO PERINEURAL	NÚMERO DE FIBRAS	Valor <i>p</i>
	N (Média) - DP	
Ausente	67 (607,8) - 92,0	0,024*
Presente	47 (705,9) - 120,2	

Nota: DP - Desvio Padrão; *teste de igualdade de variância de Levene.

As análises de anisotropia global e local não mostraram diferenças significativas entre os Grupos, Padrões Acinares ou IPN. Mas a anisotropia local mostrou diferenças entre as intensidades de ER (Tabela 16).

TABELA 16 - MÉDIAS DA ANISOTROPIA LOCAL EM FUNÇÃO DA INTENSIDADE DO ESTROMA REATIVO.

INTENSIDADE*	ANISOTROPIA LOCAL	Valor <i>p</i>
	N (Média) - DP	
1	23 (0,55) - 0,02	0,002**
2	83 (0,57) - 0,02	
3	8 (0,59) - 0,02	

Nota: DP - Desvio Padrão; ANOVA* $p=0,001$ - correção de Bonferroni - **em relação à intensidade 1, ***em relação às intensidades 1.

Não se observou correlação de interesse entre os índices de anisotropia e as marcações imuno-histoquímicas ou perfis fenotípicos do ER, telocítico ou miofibroblástico.

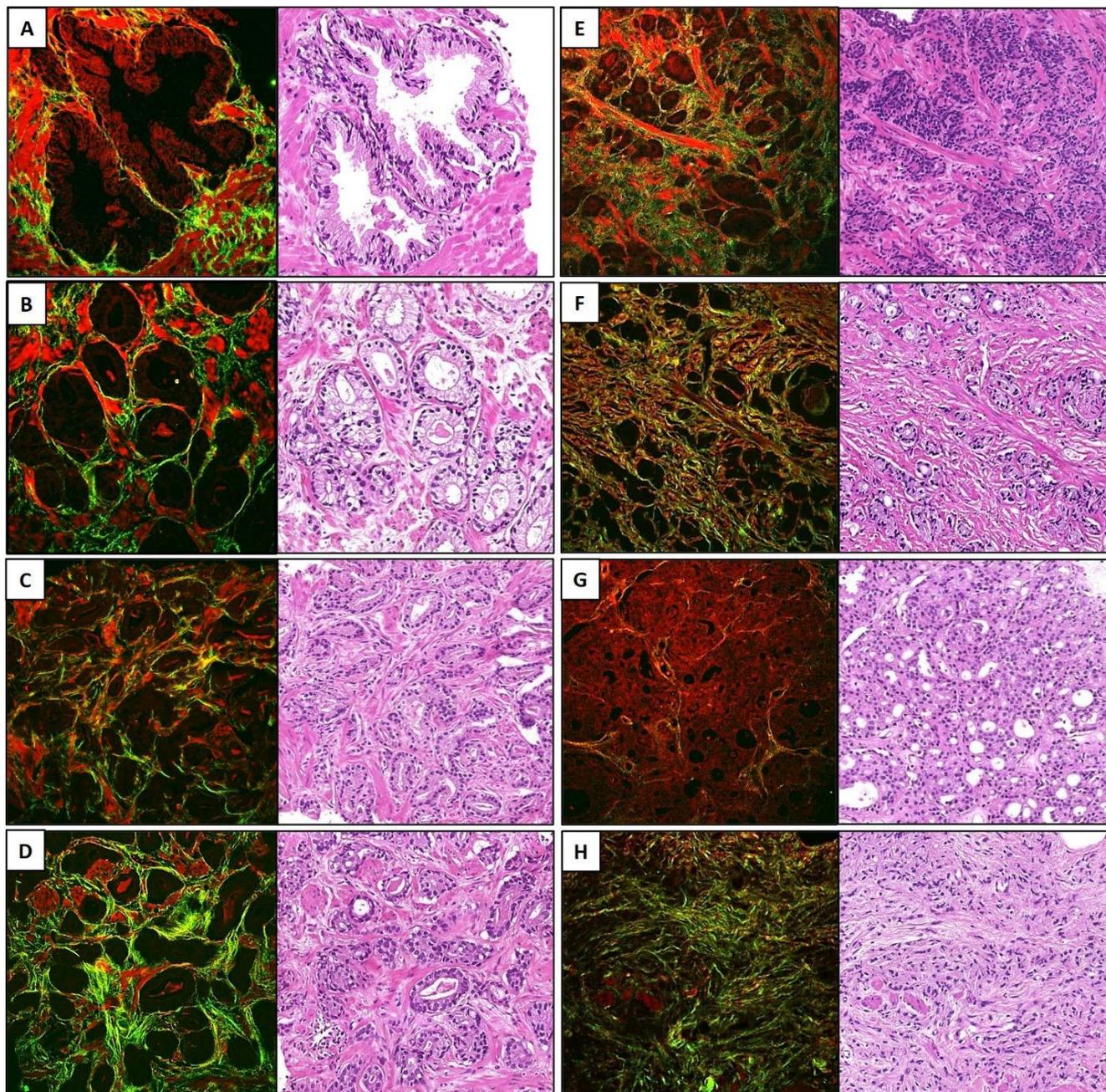


FIGURA 14: ORGANIZAÇÃO DE FIBRAS DE COLÁGENO EM AMOSTRAS DE PRÓSTATA NORMAL E DE TUMORES (SHG), SUPERPOSTAS ÀS IMAGENS DE PL, COM AS RESPECTIVAS REGIÕES EM HE.

Nota: fibras de colágeno colorizadas em verde e de músculo liso em vermelho. A - Estroma normal no entorno de ácinos benignos; B e C - Estroma no entorno de ácinos tumorais de Padrão A; D - Estroma no entorno de ácinos de Padrões A e B; E e F - Estroma no entorno de ácinos de Padrão B; G - Estroma no entorno ácinos de padrão C; H - Estroma no entorno células isoladas (padrão D).

6- DISCUSSÃO

O ER associado ao tumor parece ter implicações na proliferação e disseminação em uma série de neoplasias, tendo sido bastante explorado em tumores como os da mama e do cólon. Apesar de ter sua influência reconhecida, não há consenso sobre sua participação no CaP. No entanto, são relativamente poucos os trabalhos que abordam este tema, a maior parte deles baseados na análise de áreas específicas do tumor com maior quantidade de ER, correlacionando-as com o Sistema de Classificação de Gleason. As informações prognósticas obtidas com este tipo de análise não superaram as fornecidas pelo próprio Sistema de Classificação de Gleason, razão pela qual tem sido relativamente pouco explorada. No entanto, não há como negar a correlação existente entre tumores estromogênicos e comportamento biológico adverso do CaP, o que nos faz acreditar na importância de se investigar mais a fundo os mecanismos envolvidos na produção do ER, sua interação com as células neoplásicas e participação nos processos de disseminação, a fim de que se possa compreender melhor sua participação na carcinogênese na próstata.

6.1- DO MÉTODO PROPOSTO PARA A AVALIAÇÃO DO ER NO CaP

Os poucos estudos que enfocam o papel do ER na carcinogênese da próstata dão ênfase ao estudo da população celular estromal, alterações bioquímicas da MEC, expressões de fatores de crescimento e de moléculas pro-inflamatórias, além de avaliar angiogênese e alterações genômicas. Mas estudos englobando processos biofísicos praticamente não são explorados, apesar da importância destes processos nos mecanismos de interação celular e de organização espacial.

A MEC, aqui particularizada em sua organização topográfica, estado de rigidez, composição e concentração molecular, ou centrada nas interações celulares individuais, produzindo alterações no citoesqueleto, associa-se a modificações na motricidade e adesividade das células neoplásicas (44, 51). Um exemplo emblemático é a deposição de colágeno associada a modificações no alinhamento e/ou diâmetro das fibras, muitas vezes com a formação de redes de fibras pelo cruzamento entre elas, o que determina maior rigidez da MEC. Como consequência, os espaços existentes entre as fibras se modificam, tornam-se mais estreitos ou formam-se poros de diferentes diâmetros, afetando o comportamento das células ali imersas (52).

A produção e modificação do estroma são, por outro lado, moduladas por interações físicas e químicas com as células do CaP. Isto significa que o ER existe como resultado da interação entre as células neoplásicas em proliferação com os elementos do estroma no seu entorno, de modo que um não existe sem a presença do outro. Ou seja, um é modulado e reciprocamente modula o outro. Em um determinado momento, deverá haver equilíbrio físico entre estes dois sistemas em interação e transformações bioquímicas, ultraestruturais e até mesmo genéticas culminarão com a alteração da morfologia das células epiteliais neoplásicas, que iniciarão processo de migração.

Baseado nestes fatos, acreditamos que o desenvolvimento de uma metodologia que avalie padrões de resposta do estroma a tumores epiteliais deveria levar em consideração o binômio organização das células neoplásicas - organização do estroma, individualmente. Os estudos realizados até aqui analisam particularmente a intensidade do ER em função dos Grupos Prognósticos de Gleason que, sabemos, incorporam um conjunto de padrões arquiteturais diferentes sob uma mesma categoria. Por exemplo, várias características morfológicas dos ácinos neoplásicos configuram o padrão Gleason 4, tais como ácinos pequenos de lumens rudimentares, esparsados ou agrupados, com fusão e formação de arranjos cribriformes grandes e pequenos ou arranjos glomeruloides. Cada um destes arranjos neoplásicos teoricamente poderia estar relacionado a um determinando padrão de ER. Neste formato, a análise do padrão de reação estromal para o Grupo como um todo poderia não refletir a realidade das interações celulares e, conseqüentemente, limitar sua utilização na avaliação do comportamento biológico daquele Grupo.

A solução encontrada para se avaliar de forma mais precisa as interações tumor-estroma no CaP foi reduzir os escores finais de Gleason de cada amostra aos seus padrões fundamentais, criando-se a variável Padrão Acinar, com a possibilidade de comparar o comportamento de cada uma delas nos diferentes Grupos Prognósticos. Por exemplo, analisar o impacto do Padrão B em tumores Gleason 3+4 e 4+3, ou observar o comportamento diferente dos tumores cribriformes (Padrão C).

Em relação às características da MEC, nosso estudo destaca a deposição e organização de colágeno do tipo 1, que parecem ter implicações diretas no processo de transformação e disseminação do CaP. Este conceito é explorado em trabalhos que avaliam a biofísica do microambiente e a formação de metástases. Interessante revisão publicada em 2018 por Emon et alii (42) destaca a presença de fenótipos celulares mais agressivos em regiões de deposição de fibras colágenas mais espessas, alongadas e

retificadas, em que a transição entre o tumor e o estroma se torna pouco nítida. Outro dado importante é que a rigidez do estroma nas áreas infiltrativas é significativamente maior do que no centro da massa tumoral ou no tecido normal no entorno do tumor. Na periferia das massas de tumor, a presença de retificação e alinhamento das fibras de colágeno, que se dispõem em feixes orientados em determinada direção, funcionariam como “caminhos” para a passagem das células neoplásicas. A alta rigidez da MEC, por sua vez, ainda seria responsável por manter o fenótipo invasivo por meio da regulação positiva de um conjunto de genes conhecidos como “genes de assinatura de proliferação”.

O movimento celular é resultante da força gerada pelo citoesqueleto e por seu sistema motor baseado principalmente na ação da actina dentro da célula, que é transmitida através de adesões na membrana celular à matriz extracelular. Em muitos tipos de tumores sólidos, as células neoplásicas são incorporadas em uma matriz fibrilar densa. As forças do citoesqueleto são transmitidas para a MEC por meio de adesões célula-matriz, que podem levar à remodelação da própria MEC e propagar sinais mecânicos para as células vizinhas. Os tumores geralmente crescem como grandes massas multicelulares nas quais as interações célula-célula e tumor-MEC, bem como as propriedades do meio, podem ditar a progressão do câncer (44).

6.2- DAS ANÁLISES DESCRITIVAS

Em nosso estudo, a mediana da dosagem do PSA foi proporcionalmente maior nos tumores de mais alto grau, conforme estabelecido pela literatura, apesar da grande variação observada (a maior delas nos tumores do Grupo 4). Mas houve tumores de baixo grau com dosagem sérica de PSA total muito alta e tumores pouco diferenciados em que os valores estiveram abaixo dos de referência. Interessante notar que tumores com PSA total acima de 50 ng/mL não foram infrequentes, mesmo em tumores de baixo grau, havendo valores altamente discrepantes (acima de 2000). Ressalta-se que as dosagens não foram realizadas nos mesmos laboratórios e que não tínhamos as informações se os valores extremamente altos foram repetidos e confirmados.

Outro dado importante é que os tumores do Grupo 4 forneceram mais áreas para estudo do que os de baixo grau, tanto por haver normalmente maior volume de tumor nas amostras deste perfil, quanto pela presença de maior diversidade de padrões, propiciando maior amostragem.

Merece destaque o Padrão Acinar C que, mesmo sendo o menos frequente dentre as demais categorias, mostrou comportamento peculiar: o padrão de fibrose predominantemente na interface com o estroma peritumoral, com bandas espessas de fibras alinhadas e entrecruzadas e limites entre o tecido normal e o tumor relativamente nítido. Alguns destes tumores exibiam grupos de microácinos na periferia. No entanto, dada a baixa representatividade, os dados são limitados. Nos parece, no entanto, que este perfil de organização acinar correlacionado com evolução adversa do tumor, deva representar entidade distinta.

Na tabela 4, que correlaciona a frequência de Padrões Acinares pelos Grupos, vemos o quanto são heterogêneos os tumores com somatório final de Gleason ≥ 8 . Ademais, que o Padrão A, caracterizado por ácinos bem formados, represente o padrão mais comum nos CaP analisados, razão pela qual apresentem geralmente evolução insidiosa. Neste caso, a pergunta a ser feita seria: haveria alguma diferença na interação dos ácinos de Padrão A com o ER detectável em tumores dos Grupos 1, 2, 3 ou 4 que pudesse indicar evolução adversa? Não chegamos a uma conclusão sobre isso, razão pela qual outros estudos são necessários para maiores esclarecimentos.

Como já vimos, Gleason 4 engloba quatro padrões de crescimento principais. A relevância clínica da arquitetura cribriforme no CaP tem sido estabelecida nos últimos anos e está associada à recorrência bioquímica, maiores chances de metástases e morte específica pela doença (9, 53-59). O impacto adverso do carcinoma de padrão cribriforme tem sido estudado principalmente nos CaP Gleason 3+4, que repercute na tomada de decisão clínica nessa população de pacientes em particular. Outros estudos também indicam que a presença de carcinoma de padrão cribriforme teria valor preditivo independente em pacientes com tumores de somatório de Gleason ≥ 8 (53). Nossos achados reforçam a ideia de que tumores contendo áreas de Padrão C com componentes de padrão cribriforme exclusivo deveriam merecer mais atenção e serem considerados de forma individualizada nos estudos de prognóstico.

Há trabalhos que demonstram prognósticos semelhantes entre CaP Gleason 7 (3+4) na biópsia por agulha em que não se encontram carcinoma cribriforme invasivo, e tumores escore de Gleason 6. Naqueles com componente cribriforme, observaram menor resposta frequente à radioterapia ou recorrência bioquímica após prostatectomia radical (59). Nossos resultados mostraram que áreas de padrão cribriforme exclusivo (Padrão Acinar C) só foram observadas em tumores Gleason 4+3, associadas a padrão de ER específico, permitindo assim discriminar os tumores 3+4 e 4+3. Este achado está de

acordo com publicações da ISUP que, em conferência de consenso de 2019 sobre a classificação dos CaP, recomendou relatar a presença de carcinoma cribriforme, tanto em biópsias quanto em espécimes de prostatectomia radical, sempre que presentes, pela possibilidade de evolução adversa (59).

Em nossa casuística, alguns tumores classificados com Padrão C tiveram eventual representação de estruturas glomeruloides e grupos de microácinos complexos fundidos. Também não avaliamos a presença de células basais nestes tumores, o que seria interessante na expectativa de se confirmar se seriam realmente carcinomas invasivos de padrão cribriforme ou carcinomas cribriformes intraductais. Sabemos existir uma falta de uniformidade nas definições da morfologia microscópica dos subtipos acinares classificados como Gleason 4, o que torna difícil a correlação com o prognóstico (58, 59). No entanto, em relação às características do ER, este grupo de tumores se comportou da mesma maneira. Acreditamos que estudos complementares com maior casuística de tumores com este perfil e que levem em consideração os subtipos, seria importante para se compreender de fato a relação entre tumores cribriformes e estromogênese.

Nas biópsias sextantes de próstata, não é incomum o achado de diferentes escores de Gleason em um mesmo tumor ou em uma mesma lâmina. Tanto que normalmente são descritos nos laudos anatomopatológicos por lâmina, ou seja, por topografia da amostra. Há consenso de se utilizar o escore mais elevado dentre todos visando indicação de tratamento e prognóstico, na crença de que, como nas demais neoplasias do sistema genitourinário, o comportamento biológico seria determinado pelo maior grau de malignidade. Porém, no princípio fundamental do sistema de Gleason, o comportamento do CaP é baseado nas proporções relativas de vários padrões histológicos e não apenas no pior padrão (9).

Nesse contexto, os estudos realizados para avaliar a utilização dos escores de Gleason no diagnóstico e prognóstico dos tumores têm mostrado que a utilização do escore mais alto se correlaciona com o estadiamento à prostatectomia, enquanto a utilização da média dos escores com a recidiva bioquímica e morte específica por CaP (9). Estas observações nos moveram a propor um novo sistema de classificação baseado no Padrão Acinar e no tipo específico de reação estromal, na busca de novos elementos de prognóstico que apresentem maior acuidade. Temos a ideia de desenvolver estudo complementar com a finalidade de correlacionar o binômio ER-Padrão Acinar com a evolução clínica dos pacientes, investigando assim sua utilidade como ferramenta para estabelecer prognóstico.

6.3- DO PADRÃO DO ER NO CaP AO EXAME HISTOLÓGICO CONVENCIONAL

Nossos dados reforçam o entendimento de que o CaP é uma neoplasia indutora de reação desmoplásica significativa, colocando-o no patamar dos carcinomas de mama e do cólon, além dos derivados das vias biliares. A intensidade do ER parece ser proporcional à perda da diferenciação acinar, culminando com o surgimento de tumores estromogênicos reconhecidamente agressivos, em nosso estudo presentes nos tumores com escores de Gleason 4+3 e de somatório ≥ 8 .

O destaque é dado aos tumores que potencialmente induziram maior resposta estromal e de formação de tumores estromogênicos, constituídos por microácinos de padrão B. Tais estruturas, observadas geralmente na periferia da massa tumoral, sugerem o destacamento de ninhos celulares do *pool* de células tumorais no *front* de infiltração, provavelmente em consequência a modificações no equilíbrio da relação epitélio-estromal.

Estudos demonstram que, em um determinado momento, ocorrerá um equilíbrio físico sustentado capaz de induzir alterações na morfologia das células neoplásicas e até mesmo alterações genômicas, que culminarão com maior agressividade das células epiteliais neoplásicas e seleção de clones com capacidade de disseminação (42, 52). Situação semelhante é observada em tumores do trato digestivo, notadamente no cólon, nos quais se descreveram os chamados “*tumour buddings*”.

Descritos pela primeira vez por Ueno et alii (60, 61) como aglomerados de menos de quatro células tumorais ou células tumorais isoladas vistas no estroma peritumoral, *tumour budding* vem sendo observado em muitas outras neoplasias, como no carcinoma de endométrio, adenocarcinoma ductal pancreático, pulmão, carcinoma de células escamosas da cérvix, esôfago e língua e, mais recentemente, no carcinoma urotelial ureteral (62, 63). Este fenótipo especial é considerado marcador do processo de transição epitélio-mesenquimal, com maior diferenciação mesenquimal, determinando maior capacidade migratória, invasividade, resistência à apoptose e produção de moléculas da MEC pelo tumor (62).

Ueno et alii publicaram outro estudo em 2014 demonstrando a importância da presença de agrupamentos pouco diferenciados nos adenocarcinomas colônicos, constituídos por mais de 5 células agrupadas, sem formação de estruturas glandulares bem desenvolvidas, aos quais demonstraram haver maior associação com acometimento

linfonodal. Este novo critério foi mais reprodutível que os implicados na detecção dos *buddings*, com menor variação interobservadores (61).

Baseado em nossos achados, a detecção de áreas constituídas por microácinos tumorais rudimentares em tumores classificados com escore final 7 favoreceria um fenótipo mais agressivo, especialmente na existência de reação estromal significativa, mesmo se o padrão predominante for G3. Por outro lado, a mesma conotação seria válida para tumores com áreas estromogênicas, a exemplo do observado por Ayala et alii (31). Estes achados poderiam ser úteis na avaliação daqueles tumores de baixo grau, mas com potencial de progressão, e na detecção, entre os tumores de grau intermediário, Gleason 3+4 ou 4+3, daqueles que poderiam se comportar mais como tumores do Grupo 1 (lesões de baixo grau), ou como tumores de alto grau (Grupo 4). A confirmação destas observações em estudos que avaliem prognóstico seria de extrema importância, já que teriam implicações na indicação de acompanhamento vigiado em pacientes com tumores contendo áreas G4 à biópsia, além de trazer maior segurança àqueles pacientes em acompanhamento vigiado, com o diagnóstico de tumores exclusivamente G3.

Outro parâmetro interessante observado em nossos resultados engloba a IPN. Infiltração perineural e associação com a progressão do CaP é ainda motivo de debate (64). Há estudos que não demonstraram haver correlação com evolução desfavorável, ao lado de outros que apontam este fator como elemento indicativo de progressão e evolução desfavorável, especialmente a recidiva bioquímica, havendo ainda poucos estudos que relacionam IPN com a maior chance de morte específica por esta neoplasia (65, 66). Mesmo assim, sua presença não é rotineiramente reportada nos laudos anatomopatológicos e não há consenso se deveria ou não ser realizada.

É bem conhecida a propensão do CaP em infiltrar e crescer ao longo dos nervos, permitindo o acesso para além da próstata, de modo a alcançar as vesículas seminais e gânglios dos plexos periprostáticos e a alterar o estadiamento. Dentre os mecanismos envolvidos, o que engloba modificações do microambiente no espaço perineural, com a modulação de integrinas favorecendo o fenótipo infiltrativo, é o mais utilizado (66). Existe uma vasta gama de mecanismos interligados, até mesmo a modificação do estroma pelas células neurais agredidas pelo tumor, que iniciam processo de regeneração (67).

Conforme descrições da literatura (65, 66), os tumores bem diferenciados em nosso estudo (Gleason 3+3) tiveram baixa correlação com a presença de IPN, que foi expressivamente mais frequente nos tumores de alto grau (Grupo 4). Neste Grupo, destaca-se o Padrão Acinar D, o de fenótipo mais agressivo dentre todos os outros que,

apesar da frequência muito inferior à dos padrões A e B, proporcionalmente foi aquele que se correlacionou com a maior frequência de IPN. No entanto, em números absolutos, o padrão B foi o que mais se associou à presença deste tipo de disseminação. Deve ser reforçado que, especialmente nos tumores com alta densidade celular e de estroma, comprimindo estruturas vasculares e neurais, o achado de IPN ao exame histológico convencional pode ser difícil.

6.4- DO MODELO PROPOSTO PARA AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DO ER NO CaP AO EXAME HISTOLÓGICO CONVENCIONAL

A primeira normatização para quantificação de ER na próstata foi proposta por Ayala et alii (7). Esses autores selecionaram para análise áreas de tumores contendo a maior representatividade de neoplasia e que, ao mesmo tempo, correspondessem aos maiores escores de Gleason presentes na amostra, denominando essas áreas *index câncer (IC)*. O sistema de quantificação proposto foi baseado no percentual de estroma conjuntivo em relação ao componente epitelial em uma determinada região, sendo: grau 0, ausência ou até 5%; grau 1, 6-15%; grau 2, 16-50%; grau 3, 51-100% ou com relação estroma/epitélio $\geq 1:1$.

Na prática, a seleção das regiões de interesse para o estudo seguiu os mesmos princípios utilizados na obtenção do grau histológico do CaP pelo Sistema Gleason, que seleciona o padrão mais frequente e valoriza o pior grau de diferenciação. Apesar do achado de variáveis graus de ER em regiões de um mesmo tumor, para fins de análise, utilizar o maior grau observado dentre todas as áreas, nos pareceu o mais adequado, sendo assim incorporado em nosso estudo.

Curiosamente, Ayala et al. (7) e Yanagisawa et al. (8) descreveram CaP pouco diferenciados como tumores que menos frequentemente apresentam componente estromal significativo, a maior parte deles classificados com grau 0 ou 1, incluindo-se tumores G5. Ademais, Ayala et alii não demonstraram haver diferenças estatísticas entre o grau histológico e as demais categorias contendo quantidades significativas de ER (graus 1, 2 e 3). Estes achados são opostos aos nossos, já que demonstramos haver aumento progressivo e significativo na intensidade do ER nos tumores com Gleason 4+3 e com somatório ≥ 8 , além de representarem a categoria com maior número de tumores estromogênicos. A nosso ver, os achados apresentados por aqueles autores tornam difícil a tarefa de apresentar mecanismo fisiopatológico que justifique tal observação.

O sistema de graduação do ER proposto por Yanagisawa et alii também apresentou problemas de reprodutibilidade, em parte explicado por sua subjetividade. Billis, A. et al. (21), por exemplo, aplicando o mesmo método, encontraram valores bastante discrepantes de amostras com ER de grau “0”, atribuindo os achados à variabilidade interobservadores. O percentual de casos com estroma reativo de grau “0” encontrado no estudo de Yanagisawa foi de 6,24%, também muito discrepante do observado em nosso estudo, que foi de cerca de 21% e que foi também menor que o encontrado por Billis (53,8%). Considerando que todos os grupos obtiveram suas conclusões a partir do exame da lâmina de histologia corada em HE e que os critérios de análise foram os mesmos, outra possível explicação para tais discrepâncias seria a possível existência de características regionais dos tumores, mesmo que pouco provável.

Tumores com ER de grau 2 em nosso estudo representaram cerca de 71% dos casos, independentemente se analisada em função dos Grupos Prognósticos, como nos outros trabalhos, ou em função do Padrão Acinar, variável criada para esta pesquisa. Nos estudos de Yanagisawa e Billis, estes valores foram de 85,7% e 41,0%, com percentual de tumores estromogênicos de 8,7% e 5,3%, respectivamente. No presente estudo, tumores estromogênicos representaram 7% dos casos.

Yanagisawa et alii (8) mostraram que a presença de maior intensidade de ER nas biópsias, notadamente nas de grau 3, foi preditor independente de recorrência bioquímica em análise univariada, mas não na multivariada. E que as informações fornecidas por este índice não superariam as fornecidas pelo sistema de classificação de Gleason, devendo ambas ser consideradas de forma complementar. É importante citar que os estudos tiveram metodologias diferentes, com a análise de amostras de tumor de 2,0 mm de diâmetro para a construção de *tissue microarray*, áreas selecionadas a partir de peças de prostatectomia ou biópsias de próstata por agulha. Em todas, houve número significativamente maior de amostras de tumores Gleason ≤ 6 , seguido de tumores com Gleason 7, que representam os tumores mais prevalentes na prática. Desta forma, procuramos analisar número semelhantes de amostras de um mesmo Grupo Prognóstico.

A proposta de se estabelecer a classificação do grau do ER em 3 categorias visou reduzir o impacto da subjetividade no processo. Além disso, nos pareceu muito impreciso a ausência de algum grau de reação estromal em amostras de, já que nossos achados à microscopia com SHG demonstraram quantidades significativas de colágeno do tipo 1 em amostras de parênquima normal, muitas vezes não perceptível à coloração em HE. Assim, a exemplo da classificação original proposta por Ayala, ausência de estroma

reativo e a presença de até 5% de colágeno foram considerados em uma mesma categoria (intensidade 1), ou seja, o normal para a próstata. A partir desta definição, qualquer deposição a mais de colágeno seria significativa, culminando com os tumores com reação estromal de Grau 3, já comprovadamente relacionados a comportamento adverso.

6.5- DA CARACTERIZAÇÃO DO ER AO EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO

Um mesmo tumor apresenta mais de um grau histológico. Nosso estudo destacou que um mesmo grau de Gleason, excetuando-se os tumores 3+3, quando analisados em pequenas áreas, pode conter diferentes arranjos de células neoplásicas. Cada um destes arranjos associa-se a diferentes padrões de ER, tanto na sua distribuição quanto na intensidade. Ao que nos parece, para que um sistema de classificação de reatividade do estroma possa fornecer informações mais precisas sobre o comportamento biológico do CaP, ele deveria englobar esses dois parâmetros, a organização das células neoplásicas e as características do estroma.

A maioria dos trabalhos da literatura categoricamente descrevem o perfil do ER do CaP como miofibroblástico. Outros apresentam o papel de alguns marcadores imuno-histoquímicos como possíveis elementos de prognóstico. Tomas, D. e al. demonstraram marcação imuno-histoquímica para VIM na maioria das células do estroma neoplásico do CaP, com redução da marcação para DES (25). E a maior expressão de VIM esteve associada a um período livre de doença mais curto, tanto em análises univariadas quanto multivariadas. Além disso, a perda de células musculares lisas avaliada pela redução na expressão de DES, também esteve associada a comportamento desfavorável do tumor, mas apenas na análise univariada.

Ayala, G. et al. (7), observaram que a maior expressão de DES seria preditor de menor recorrência bioquímica, ao passo que a expressão de VIM, que se correlacionaria com o fenótipo fibroblástico e miofibroblástico, em substituição às fibras musculares lisas, justificaria a progressão estimulada pelo ER.

Em nosso estudo, focamos em avaliar o perfil do estroma reativo e sua organização estrutural, correlacionando-os com a morfologia acinar. Optamos pela análise computadorizada das lâminas de imuno-histoquímicas utilizando-se metodologia previamente validada, visando redução da subjetividade. A própria reação imuno-histoquímica, automatizada e com a utilização dos mesmos clones dos anticorpos da maioria dos estudos já publicados, reforçam a busca por padronização.

A menor positividade para VIM em regiões de parênquima não neoplásico, especialmente com marcação de algumas células periacinares e de vasos sanguíneos, além da forte expressão de DES, semelhante à descrita para a Calponina, foram aspectos gerais semelhantes aos descritos na literatura (20). Tuxhorn, J. A. et al. descreveram positividade para VIM em células fusiformes dispostas ao redor dos ácinos normais, que foram interpretadas como fibroblastos. As mesmas células, presentes junto ao epitélio de ácinos com lesões de neoplasia intraepitelial prostática, mostraram dupla marcação para VIM e ACT à imuno-histoquímica com fluorescência, razão pela qual foram interpretadas como sendo miofibroblastos. Aliás, miofibroblastos, até então, são considerados os principais elementos celulares do ER do CaP e a maioria dos trabalhos baseia-se neste princípio para suas análises.

No entanto, ao considerarmos o estudo baseado em microscopia eletrônica publicado por Gevaert et alii, que demonstrou a presença de diferentes tipos de células estromais na região subepitelial, com fenótipos distintos e cuja análise ultraestrutural demonstra a ausência de fibronexus nessas células, marcador característico da presença de miofibroblastos (30), a ideia de que o ER do CaP tenha perfil miofibroblástico deve ser posta em xeque. O estudo ainda destacou a presença de ICLC, CFM e fibroblastos, estes últimos vistos mais profundamente, junto das células musculares lisas. A maioria das células do estroma da região subepitelial apresentou positividade para VIM, sem colocalização com marcadores musculares. Houve maior interesse nas células vistas junto ao epitélio acinar, que apresentaram variável positividade para CD34, cabendo aqui a interpretação de que poderiam representar fibroblastos ou telócitos.

As informações acerca da marcação imuno-histoquímica das ICLC são confusas por haver diferentes padrões de marcação em células deste tipo em diferentes órgãos e tecidos (27). Porém, os dados da literatura apontam o antígeno CD34 como o principal marcador para este tipo celular. Além disso, estudo de amostras de próstata de gerbils adultos, nos quais a morfologia da glândula guarda características semelhantes às da próstata humana, demonstrou a presença de telócitos no estroma prostático por meio de microscopia eletrônica e marcação imuno-histoquímica positiva para CD34 (68). Este estudo demonstrou a presença destas células na região subepitelial e na periferia do músculo liso. Supõe-se que tenham função na manutenção da homeostase do compartimento estromal por compartimentalização dos microambientes. Os autores discutem ainda a participação dessas células na sinalização intercelular, servindo como suporte mecânico ou molde para os mecanismos de reparo tecidual.

As análises imuno-histoquímicas e por histologia convencional em nosso estudo obtiveram resultados que corroboraram as evidências apresentadas neste estudo, trazendo à tona eventual participação dos telócitos na produção do ER do CaP e, conseqüentemente, na sua manutenção e disseminação. Na tentativa de se identificar possível perfil miofibroblástico ou telocítico no ER, idealizamos uma análise imuno-histoquímica que considerasse as expressões de VIM e CD 34 (Perfil Telocítico) e de ACT e VIM para miofibroblastos, sem ou com a redução na expressão de DES (Perfis Miofibroblástico 1 e 2, respectivamente). Na análise por Grupos, o Perfil Miofibroblástico 1 foi o mais frequente, mas esteve presente em apenas 32% das áreas tumorais, notadamente nos tumores Gleason 4+3 e com somatório final ≥ 8 . No entanto, não houve diferenças estatisticamente significativas entre as demais variáveis.

Por outro lado, ao se proceder a mesma análise em função dos Padrões Acinares, observamos Perfil Telocítico em 42,4% das amostras, especialmente nas áreas com ácinos de padrões B e D, os de fenótipos mais agressivos. Aliás, nestas categorias, a positividade para este Perfil superou os resultados negativos. Houve diferenças estatisticamente significativas entre as frequências observadas nestas categorias comparadas com as demais. Lembramos que os padrões B e D são os mesmos relacionados com maior intensidade de ER e os que mais frequentemente se correlacionaram com a presença de IPN.

Vários estudos correlacionam a participação do TGF- β 1 na formação do ER no CaP. Sanches B. D. A., et al. demonstraram a produção de TGF- β 1 em cultura primária por telócitos, representando um fator parácrino antiproliferativo envolvido na diferenciação do músculo liso periductal e perialveolar em modelos experimentais animais (69). Poder correlacionar este tipo celular com a produção aumentada de TGF- β 1 no CaP nos parece um dado bastante promissor, por nos permitir associar o perfil telocítico a maior intensidade de ER, como observado em nosso modelo de análise.

Desta forma, o modelo proposto em nosso estudo e os dados por meio dele coletados, reforçam a ideia de que realmente o ER deva ter participação fundamental nos mecanismos de transformação, progressão e disseminação do CaP, além de apontar outros possíveis eventos associados à carcinogênese que envolvam a participação de telócitos. No entanto, outros estudos e metodologias complementares são necessários para maiores conclusões.

Outro dado envolvendo a marcação imuno-histoquímica nos chamou a atenção. A positividade em células epiteliais normais e neoplásicas para VIM. A VIM é uma proteína

citoplasmática pertencente à família dos filamentos intermediários (subtipo III), expressa especialmente em células mesenquimais, eventualmente também observadas em células epiteliais com transição para fenótipo mesenquimal, tendo sido descritas nos tumores de mama e próstata (70). No estroma da próstata humana normal, VIM é expressa de forma abundante, mas não homogênea, especialmente em fibroblastos e células endoteliais (71, 72). No parênquima normal e na HNP, sua expressão é variável de acordo com as referências consultadas. Há descrições de expressão focal na porção basal e perinuclear de células luminiais (71-73) e expressão de VIM no citoplasma de células epiteliais descamadas para dentro do lúmen acinar, correlacionadas com a perda de contatos intercelulares (71).

Em estudos *in vitro*, linhagens de células neoplásicas mostraram expressão citoplasmática de VIM ou perifericamente, correspondendo aos lamelipódios da membrana (74). Nas estruturas neoplásicas acinares e alveolares, VIM é expressa em tumores com menor grau de diferenciação, havendo aquisição de morfologia fusiforme e comportamento mais agressivo, destacando-se nos clones neoplásicos associados a metástases ósseas (71, 73-75). A positividade em células mesenquimais normais e nos tumores epiteliais prostáticos conferiria integridade, resistência contra estresse e invasividade. Desse modo, seria possível inferir que o comportamento agressivo associado à expressão de VIM dependeria inversamente da estimulação por proteínas reguladoras da interação célula-célula ou célula-MEC. Apesar de alguns acreditarem que sua expressão conferiria à célula neoplásica crescimento acelerado, invasividade e pior prognóstico (76), outros se opõem mostrando que, mesmo induzindo maior motilidade, isoladamente, sua expressão não foi capaz de prever a formação de metástases (73).

Kolijn, K., et al., estudando aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos da transição epitélio-mesenquimal no câncer de próstata, mostraram positividade na maioria dos ácinos benignos (96%), mesmo que focal, e expressão focal nos tumores em 39% dos casos. A expressão concomitante de E-caderina membranosa intacta indica que a expressão da VIM não necessariamente conferiria propriedades mesenquimais às células epiteliais da próstata humana (58). Outros estudos também demonstraram a expressão abundante de VIM no epitélio benigno da próstata e em outras células epiteliais, incluindo o fígado, rim e mama. Embora a N-caderina, VIM e fibronectina sejam geralmente considerados marcadores de transição epitélio-mesenquimal, o papel da VIM e da fibronectina parece ser menos direto no CaP nas análises “*in vivo*” que nos estudos “*in vitro*”.

Nossos resultados são semelhantes aos descritos por Kolijn, com a identificação de forte expressão de VIM nas células epiteliais normais da próstata. Esta característica parece ser perdida nas células tumorais, independentemente do grau histológico. Como não era foco do presente estudo, a análise da expressão de VIM estratificada pelos padrões acinares e sua correlação com outros parâmetros, deverá ser complementada posteriormente.

6.6- DA CARACTERIZAÇÃO DA NEOANGIOGÊNESE AO EXAME IMUNO-HISTOQUÍMICO

A angiogênese é o processo fisiológico de formação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes, regulado por múltiplas moléculas. Desempenha papel importante no crescimento, progressão e formação de metástases (77). Há estudos que apontam a densidade da microvasculatura tumoral como fator prognóstico independente e outros que não confirmam este achado. No entanto, a falta de um método objetivo e padronizado de análise e o uso de diferentes marcadores endoteliais dificultam a comparação dos resultados (78).

Miyata Y. & Sakai H. avaliaram o significado patológico e prognóstico da angiogênese em estudos usando o fator de Von Willebrand, CD31, CD34 e CD105 como marcadores, por diferentes métodos, apontando a medida da densidade dos microvasos como a ferramenta mais representativa e de maior praticidade (78). Destacaram as diferenças no tamanho da população de pacientes, aspectos patológicos, método de contagem, definição de microvasos utilizada para a contagem, experiência pessoal do examinador e seleção da área tumoral como as principais causas dos resultados conflitantes. Além disso, não há padronização dos critérios ideais para a análise, como a magnificação a ser utilizada, o tamanho da área medida e o nível de corte a ser considerado como alta densidade de microvasculatura. Destacaram a técnica proposta por Weidner et alii (79, 80), com a análise em um “*hot spot*”, a técnica de análise proposta por Chalkley, H.W. (81), de 1943, que utiliza uma lente com grade contendo 25 pontos aleatórios em que se procede a contagem do número de vasos que coincidem com o número de pontos, e as técnicas de análise automática ou semiautomatizada. Destaca ainda a utilização do CD34 e CD 105 como marcadores de preferência para o estudo dos vasos à imuno-histoquímica.

A métrica comumente usada para a quantificação da rede vascular é a densidade capilar, que na verdade compreende várias métricas diferentes. Uma delas é medição do número de vasos de determinada área em cortes transversais de tecido, com resultado dado em capilares/mm² (82), com alguns processos de análise baseados em imagens de lâminas escaneadas (microscopia digital) já validados (83). Taverna et alii (84) lembram que a avaliação da microdensidade vascular é substancialmente limitada pela geometria altamente irregular que o sistema microvascular assume, tendo em vista o caráter dinâmico da angiogênese e a grande diversidade estrutural dos vasos neoformados, com diferentes comprimentos, calibres, formas e padrões de conexão entre si. O método de análise histológica não permite a distinção destas particularidades espaciais numa análise bidimensional exclusiva.

Ainda segundo Taverna, “...a análise computadorizada com descritores objetivos da complexidade vascular pode ser abstraída da geometria fractal. O sistema vascular pode ser representado geometricamente como uma rede fractal de vasos que se ramificam irregularmente, com redução sistemática em seu comprimento e diâmetro. Os objetos fractais são caracterizados principalmente por quatro propriedades: (i) a irregularidade de sua forma; (ii) a “autossemelhança” de sua estrutura; (iii) sua dimensão fractal; e (iv) escala, o que significa que as propriedades medidas dependem da escala em que são medidas”. Ao introduzirem a dimensão fractal de superfície, D_s , como índice de complexidade geométrica bidimensional da rede vascular, demonstraram que as regiões das biópsias de próstata sem câncer eram significativamente mais vascularizadas do que nas áreas tumorais (84).

Em estudo de 75 prostatectomias desenvolvido por Bono et alii (85), demonstrou-se correlação significativa entre maior densidade microvascular, grau histológico e estadiamento mais avançado do CaP, apontando 90 como nível de corte para o número de vasos. A julgar pelas descrições e pelas imagens, em nosso entendimento, os critérios utilizados para a caracterização de estruturas vasculares marcadas foram diferentes dos aplicados em nosso estudo, em que foram considerados como elementos vasculares apenas aqueles em que se conseguia caracterizar lúmen, mesmo rudimentar. Células isoladas marcadas, especialmente em um ER mais denso, poderiam ser confundidas com elementos celulares estromais CD34 positivos. Gautamet et alii, avaliando a densidade vascular em tumores de próstata baseada em contagem manual de vasos marcados com CD34, mostrou correlação positiva com o PSA (86).

A densidade de microvasos é frequentemente considerada como um marcador de angiogênese em tumores. Os tumores angiogênicos apresentam áreas com alta concentração de vasos sanguíneos neoformados a partir de vasos pré-existentes, ramificados, finos e tortuosos, com arranjos glomeruloides (87). Muitas vezes, esta neofomação vascular é ineficiente. Observam áreas hipervascularizadas ("*hot spots*") intercaladas com regiões de baixa densidade vascular nos tumores angiogênicos e tumores não-angiogênicos que surgem em tecidos de alta vascularização, o que deve ser levado em conta quando se avalia a rede vascular como um todo.

Embora a angiogênese seja reconhecida como importante parte da biologia tumoral, há múltiplas observações de tumores primários e metastáticos que se desenvolvem e progridem na ausência de angiogênese. No entanto, o índice de proliferação vascular tem valor prognóstico em vários tumores, como é o caso do carcinoma da mama (87). O padrão morfológico de infiltração tumoral avaliado na interface do tumor, pode interferir no processo de neovascularização. Tumores desmoplásicos apresentam rima de fibrose separando-os do restante do tecido normal e a neovascularização tende a se fazer por mecanismo que envolve a proliferação por brotamento de múltiplos pequenos ramos dispostos em ninhos irregularmente distribuídos. Nos tumores em que as células neoplásicas substituem as do tecido normal, há de fato incorporação dos vasos sanguíneos da interface (87), mantendo-se de alguma forma o padrão de vasculatura.

Em nosso estudo, as densidades vasculares foram menores nos tumores dos Grupos 3 e 4 (neoplasias com menor grau de diferenciação), especificamente naqueles com Padrões Acinares dos tipos B e D, em que se observou maior intensidade de tumores estromogênicos. Nossos achados estão de acordo com descrição de Taverna et al., que demonstraram baixa densidade vascular nos tumores em geral, mas especialmente naqueles de alto grau, e falam contra os achados de Bono et al., em que maior densidade vascular foi observada nos tumores menos diferenciados. Neste caso, os critérios para contagem do número de vasos e os diferentes métodos utilizados poderiam justificar as variações observadas. Uma particularidade das neoplasias de maior intensidade estromal é a maior população de células CD34 positivas. A maior densidade da MEC, assim como a maior intensidade de deposição de colágeno (23), poderia ainda determinar colapso dos pequenos vasos neoformados ou mudanças na conformação dos mesmos, fazendo com que as células endoteliais marcadas sejam confundidas com elementos do estroma (telócitos ou fibroblastos CD34 positivos (88)). A perda de paralelismo ou a não

conformação arredondada do vaso não permitiria serem considerados para contagem, implicando em menor valor de densidade vascular. Outros estudos complementares, especialmente utilizando metodologias que envolvam análises em 3D, as quais têm sido consideradas mais eficazes para este tipo de análise recentemente, poderiam ser desenvolvidas para a validação dos nossos achados (89).

6.7- DA ASSINATURA DO COLÁGENO PELA MICROSCOPIA COM SHG

São poucos os trabalhos que analisam a disposição e quantificação do colágeno nos tumores de próstata. Segundo Burns-Cox et alii, a quantidade de colágeno presente em neoplasias com escores de Gleason ≥ 6 é menor que em amostras de próstata de áreas não-neoplásicas adjacentes ao tumor, que por sua vez é maior que no grupo controle (formado por amostras de próstata com alterações benignas provenientes de ressecção transuretral) (38). Osorio et alii, em análises de 132 amostras de peças de prostatectomia, descreveram, utilizando métodos histoquímicos, aumento do número de fibras colágenas em tumores Gleason 7 e redução discreta naqueles com somatória final ≥ 8 , porém com aumento progressivo das fibras elásticas e redução das fibras musculares lisas. Nesse estudo, o número de amostras de tumores 4+3 e ≥ 8 representou apenas a metade das amostras de tumores 3+3 e 3+4 (90). Zhang et alii, promovendo análise histoquímica com avaliação obtida por sistema analisador de imagem, demonstraram aumento da quantidade de colágeno em função do Grau histológico, porém com uma casuística muito pequena.

Em nosso estudo, as informações obtidas pelo algoritmo que analisou imagens por SHG demonstraram aumento do número de fibras colágenas em função do grau histológico do tumor, com percentual significativamente maior de fibras nos tumores do Grupo 4 que nos dos demais Grupos. Estratificando-se estes números pelos Padrões Acinares, novamente percebemos maior deposição de colágeno nos tumores com ácinos de Padrão B e D, cujas médias foram estatisticamente diferentes das demais categorias, mas não diferentes entre si. Ainda, houve correlação entre estas medidas e a intensidade do ER avaliada pela lâmina corada em HE, havendo maior número de fibras nos tumores classificados com reação estromal de grau 3 e menor naqueles de grau 1.

Estes achados corroboram as observações descritas anteriormente de que tumores com fenótipos mais agressivos estão associados a características estromogênicas à análise histológica convencional. Além disso, reforçam a ideia de que o sistema proposto de

análise semiquantitativa para graduação da intensidade do ER à coloração de rotina é factível e abre caminho para a aplicação de inteligência artificial na detecção de áreas tumorais de padrões mais agressivos, utilizando-se novas ferramentas diagnósticas como a microscopia por SHG. E até onde se sabe, este estudo é o primeiro a utilizar este método para avaliar quantitativamente o número de fibras de colágeno nos tumores de próstata e a correlacioná-los ao grau histológico e morfologia dos ácinos individuais.

As análises do grau de organização das fibras de colágeno nas áreas de tumores não demonstraram diferenças significativas entre os graus de anisotropia local e global, seja em função do grau histológico, ou em função dos Padrões Acinares. Porém notou-se maior organização das fibras nas áreas de tumores dos Grupos 3 e 4 medidas apenas pela anisotropia local. Estes dados repetem observações feitas anteriormente por nosso grupo, que demonstraram maior alinhamento das fibras de colágeno nos CaP de alto grau. Importante aqui mencionar que as áreas analisadas pela anisotropia local são muito pequenas e as interações estroma-epitélio observadas são muito mais específicas, podendo ser medidas interações em único ácino isolado ou em pequeno número de ácinos contíguos. O significado prático desta análise no contexto global da neoplasia, considerando-se a existência de grande heterogeneidade no tumor, está longe de ser compreendido. O aprimoramento dos algoritmos por treinamento, com o desenvolvimento de aprendizado de máquina, a exemplo do modelo de análise desenvolvido para o nosso trabalho, poderá ser de grande valia.

Muitos outros dados obtidos pelas diferentes métricas analisadas pelo algoritmo desenvolvido para a pesquisa, baseado em microscopia por SHG, foram analisados e trouxeram informações interessantes. No entanto, fogem aos objetivos deste estudo e deverão ser fruto de novas publicações a seguir.

7- CONCLUSÃO

- 1- Nossos dados confirmam ser o CaP uma neoplasia indutora de reação desmoplásica significativa.
- 2- A intensidade do ER é proporcional à perda da diferenciação acinar, culminando com o surgimento de tumores estromogênicos.
- 3- Os achados demonstram que os Padrões Acinares B e D representariam fenótipos específicos do CaP nos quais haveria maior frequência de IPN e maior deposição de colágeno, com modificações de sua organização e perda de entropia.
- 4- A presença de microócinos rudimentares (Padrão B), especialmente naqueles vistos na periferia da massa tumoral, na interface com o estroma não-neoplásico circunvizinho, associada a desmoplasia, poderia vir a ser marcador de evolução desfavorável nos tumores de baixo grau ou de grau intermediário.
- 5- O desenvolvimento de nova metodologia de análise do ER baseada no binômio padrão acinar-padrão estromal específico nos parece fundamental e sua aplicação em estudos de prognóstico poderá demonstrar se de fato os achados apontados neste estudo são relevantes.
- 6- As análises histológicas e imuno-histoquímicas levantaram dúvidas quanto ao perfil miofibroblástico do ER no CaP, trazendo à tona eventual participação de telócitos na sua formação, seja na compartimentalização da região do tumor ou na produção e/ou remodelamento do colágeno.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2018;8(12):18.
2. INCA. Estimativa - 2020; Incidência de Câncer no Brasil. Brasil2019. 122 p.
3. Goncalves BF, de Campos SGP, Costa CFP, Scarano WR, Goes RM, Taboga SR. Key participants of the tumor microenvironment of the prostate: An approach of the structural dynamic of cellular elements and extracellular matrix components during epithelial-stromal transition. *Acta Histochemica*. 2015;117(1):4-13.
4. Duarte AH, Colli S, Alves-Pereira JL, Martins MP, Sampaio FJB, Ramos CF. Collagen I and III and metalloproteinase gene and protein expression in prostate cancer in relation to Gleason score. *International Braz J Urol*. 2012;38(3):341-54.
5. Lomas DJ, Ahmed HU. All change in the prostate cancer diagnostic pathway. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 2020;17(6):372-81.
6. Ayala G, Frolov A, Ittman M, Mohammed S, LeBlanc M, Falcon S, et al. Biological Correlates of Biochemical Recurrence Free Survival Using Multiple Markers in a Large Tissue Microarray Cohort. *Annals of Clinical and Laboratory Science*. 2013;43(1):11-21.
7. Ayala G, Tuxhorn JA, Wheeler TM, Frolov A, Scardino PT, Ohori M, et al. Reactive stroma as a predictor of biochemical-free recurrence in prostate cancer. *Clinical Cancer Research*. 2003;9(13):4792-801.
8. Yanagisawa N, Li RT, Rowley D, Liu H, Kadmon D, Mites BJ, et al. Stromogenic prostatic carcinoma pattern (carcinomas with reactive stromal grade 3) in needle biopsies predicts biochemical recurrence-free survival in patients after radical prostatectomy (Reprinted from *Human Pathology*, vol 38, pg 1611-1620, 2007). *Human Pathology*. 2008;39(2):282-91.
9. Srigley JR, Delahunt B, Samaratunga H, Billis A, Cheng L, Clouston D, et al. Controversial issues in Gleason and International Society of Urological Pathology (ISUP) prostate cancer grading: proposed recommendations for international implementation. *Pathology*. 2019;51(5):463-73.
10. Epstein JI, Zelefsky MJ, Sjoberg DD, Nelson JB, Egevad L, Magi-Galluzzi C, et al. A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *European Urology*. 2016;69(3):428-35.

11. Epstein JI. Prostate cancer grading: a decade after the 2005 modified system. *Modern Pathology*. 2018;31:S47-S63.
12. Chen N, Zhou Q. The evolving Gleason grading system. *Chinese Journal of Cancer Research*. 2016;28(1):58-64.
13. Offermann A, Hupe MC, Sailer V, Merseburger AS, Perner S. The new ISUP 2014/WHO 2016 prostate cancer grade group system: first resume 5 years after introduction and systemic review of the literature. *World Journal of Urology*. 2020;38(3):657-62.
14. Epstein JI, Amin MB, Reuter VE, Humphrey PA. Contemporary Gleason Grading of Prostatic Carcinoma An Update With Discussion on Practical Issues to Implement the 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *American Journal of Surgical Pathology*. 2017;41(4):E1-E7.
15. Martin NE, Mucci LA, Loda M, DePinho RA. Prognostic Determinants in Prostate Cancer. *Cancer Journal*. 2011;17(6):429-37.
16. Magi-Galluzzi C. Prostate cancer: diagnostic criteria and role of immunohistochemistry. *Mod Pathol*. 2018;31(S1):S12-21.
17. Tuxhorn JA, Ayala GE, Rowley DR. Reactive stroma in prostate cancer progression. *Journal of Urology*. 2001;166(6):2472-83.
18. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 2004;432(7015):332-7.
19. Aaron L, Franco OE, Hayward SW. Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of Benign Prostatic Hyperplasia. *Urologic Clinics of North America*. 2016;43(3):279-+.
20. Tuxhorn JA, Ayala GE, Smith MJ, Smith VC, Dang TD, Rowley DR. Reactive stroma in human prostate cancer: Induction of myofibroblast phenotype and extracellular matrix remodeling. *Clinical Cancer Research*. 2002;8(9):2912-23.
21. Billis A, Meirelles L, Freitas LLL, Polidoro AS, Fernandes HA, Padilha MM, et al. Adenocarcinoma on needle prostatic biopsies: Does reactive stroma predicts biochemical recurrence in patients following radical prostatectomy? *International Braz J Urol*. 2013;39(3):320-7.
22. Condon MS. The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. *Seminars in Cancer Biology*. 2005;15(2):132-7.

23. De Vivar AD, Sayeeduddin M, Rowley D, Cubilla A, Miles B, Kadmon D, et al. Histologic features of stromogenic carcinoma of the prostate (carcinomas with reactive stroma grade 3). *Hum Pathol.* 2017;63:202-11.
24. Barron DA, Rowley DR. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer.* 2012;19(6):R187-204.
25. Tomas D, Spajic B, Milosevic M, Demirovic A, Marusic Z, Kruslin B. Intensity of stromal changes predicts biochemical recurrence-free survival in prostatic carcinoma. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology.* 2010;44(5):284-90.
26. Corradi LS, Jesus MM, Fochi RA, Vilamaior PSL, Justulin LA, Goes RM, et al. Structural and ultrastructural evidence for telocytes in prostate stroma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2013;17(3):398-406.
27. Popescu LM, Fausone-Pellegrini MS. TELOCYTES - a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *J Cell Mol Med.* 2010;14(4):729-40.
28. Cretoiu Sm Fau - Popescu LM, Popescu LM. Telocytes revisited. (1868-503X (Electronic)).
29. Popescu LM, Fausone-Pellegrini MS. TELOCYTES - a case of serendipity: the winding way from Interstitial Cells of Cajal (ICC), via Interstitial Cajal-Like Cells (ICLC) to TELOCYTES. *Journal of Cellular and Molecular Medicine.* 2010;14(4):729-40.
30. Gevaert T, Lerut E, Joniau S, Franken J, Roskams T, De Ridder D. Characterization of subepithelial interstitial cells in normal and pathological human prostate. *Histopathology.* 2014;65(3):418-28.
31. Ayala GE, Muezzinoglu B, Hammerich KH, Frolov A, Liu H, Scardino PT, et al. Determining Prostate Cancer-Specific Death through Quantification of Stromogenic Carcinoma Area in Prostatectomy Specimens. *American Journal of Pathology.* 2011;178(1):79-87.
32. Nissen NI, Karsdal M, Willumsen N. Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.* 2019;38:12.
33. Stecco C, Hammer W, Vleeming A, De Caro R. 1 - Connective Tissues. *Functional Atlas of the Human Fascial System: Churchill Livingstone;* 2015. p. 1-20.

34. Strupler M, Pena AM, Hernest M, Tharaux PL, Martin JL, Beaurepaire E, et al. Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues. *Optics Express*. 2007;15(7):4054-65.
35. Taboga SR, Vidal Bde C. Collagen fibers in human prostatic lesions: histochemistry and anisotropies. (1122-9497 (Print)).
36. Kruslin B, Ulamec M, Tomas D. Prostate cancer stroma: an important factor in cancer growth and progression. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 2015;15(2):1-8.
37. Garcia AM, Magalhes FL, Soares JS, Paulino E, de Lima MFR, Mamede M, et al. Second harmonic generation imaging of the collagen architecture in prostate cancer tissue. *Biomedical Physics & Engineering Express*. 2018;4(2):7.
38. Burns-Cox N, Avery NC, Gingell JC, Bailey AJ. Changes in collagen metabolism in prostate cancer: A host response that may alter progression. *Journal of Urology*. 2001;166(5):1698-701.
39. Meleghe Z, Oltean S. Targeting Angiogenesis in Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019;20(11):16.
40. Mongiat M, Andreuzzi E, Tarticchio G, Paulitti A. Extracellular Matrix, a Hard Player in Angiogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016;17(11):26.
41. Edgar LT, Underwood CJ, Guilkey JE, Hoying JB, Weiss JA. Extracellular Matrix Density Regulates the Rate of Neovessel Growth and Branching in Sprouting Angiogenesis. *Plos One*. 2014;9(1):10.
42. Emon B, Bauer J, Jain Y, Jung B, Saif T. Biophysics of Tumor Microenvironment and Cancer Metastasis - A Mini Review. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2018;16:279-87.
43. Zaman MH, Trapani LM, Siemeski A, MacKellar D, Gong H, Kamm RD, et al. Migration of tumor cells in 3D matrices is governed by matrix stiffness along with cell-matrix adhesion and proteolysis (vol 103, pg 10889, 2006). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(37):13897-.
44. Spill F, Bakal C, Mak M. Mechanical and Systems Biology of Cancer. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2018;16:237-45.
45. Anderson ARA, Weaver AM, Cummings PT, Quaranta V. Tumor morphology and phenotypic evolution driven by selective pressure from the microenvironment. *Cell*. 2006;127(5):905-15.

46. Kalli M, Stylianopoulos T. Defining the Role of Solid Stress and Matrix Stiffness in Cancer Cell Proliferation and Metastasis. *Frontiers in Oncology*. 2018;8:7.
47. Spill F, Reynolds DS, Kamm RD, Zaman MH. Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016;40:41-8.
48. Ouellette JN, Drifka CR, Pointer KB, Liu Y, Lieberthal TJ, Kao WJ, et al. Navigating the Collagen Jungle: The Biomedical Potential of Fiber Organization in Cancer. *Bioengineering (Basel)*. 2021;8(2).
49. Epstein JI, Amin MB, Fine SW, Algaba F, Aron M, Baydar DE, et al. The 2019 Genitourinary Pathology Society (GUPS) White Paper on Contemporary Grading of Prostate Cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2021;145(4):461-93.
50. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC Profiler: An Open Source Plugin for the Quantitative Evaluation and Automated Scoring of Immunohistochemistry Images of Human Tissue Samples. *Plos One*. 2014;9(5):11.
51. Baker EL, Bonneau RT, Zaman MH. Extracellular matrix stiffness and architecture govern intracellular rheology in cancer. *Biophys J*. 2009;97(4):1013-21.
52. Merino-Casallo F, Gomez-Benito MJ, Hervas-Raluy S, Garcia-Aznar JM. Unravelling cell migration: defining movement from the cell surface. *Cell Adh Migr*. 2022;16(1):25-64.
53. Hollemans E, Verhoef EI, Bangma CH, Rietbergen J, Osanto S, Pelger RCM, et al. Cribriform architecture in radical prostatectomies predicts oncological outcome in Gleason score 8 prostate cancer patients. *Mod Pathol*. 2021;34(1):184-93.
54. Seyrek N, Hollemans E, Osanto S, Pelger RCM, van der Poel HG, Bekers E, et al. Cribriform architecture outperforms Gleason pattern 4 percentage and tertiary Gleason pattern 5 in predicting the outcome of Grade Group 2 prostate cancer patients. *Histopathology*. 2022;80(3):558-65.
55. Comp rat E. Editorial for Cribriform architecture prostatic adenocarcinoma in needle biopsy is a strong independent predictor for lymph node metastases in radical prostatectomy (M. Downes et al.) and Ductal variant prostate carcinoma is associated with a significantly shorter metastasis-free survival (K. Chow et al.). *Eur J Cancer*. 2021;148:430-1.
56. Downes MR, Xu B, van der Kwast TH. Cribriform architecture prostatic adenocarcinoma in needle biopsies is a strong independent predictor for lymph node metastases in radical prostatectomy. *Eur J Cancer*. 2021;148:432-9.

57. Haffner MC, Salles DC, Gao G, Epstein JI. Gleason pattern 4 with cribriform morphology on biopsy is associated with adverse clinicopathological findings in a prospective radical prostatectomy cohort. *Hum Pathol.* 2020;98:74-80.
58. da Paz AR, Billis A, Freitas LLL, Costa LBE, Barreto IS, Magna LA, et al. Prognostic significance of architectural subtypes of Gleason grade 4 prostate cancer in radical prostatectomy: A semiquantitative method of evaluation. *Ann Diagn Pathol.* 2021;50:151678.
59. van der Kwast TH, van Leenders GJ, Berney DM, Delahunt B, Evans AJ, Iczkowski KA, et al. ISUP Consensus Definition of Cribriform Pattern Prostate Cancer. *Am J Surg Pathol.* 2021;45(8):1118-26.
60. Ueno H, Kajiwara Y, Shimazaki H, Shinto E, Hashiguchi Y, Nakanishi K, et al. New criteria for histologic grading of colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(2):193-201.
61. Ueno H, Hase K, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Yoshii S, Kudo SE, et al. Novel risk factors for lymph node metastasis in early invasive colorectal cancer: a multi-institution pathology review. *J Gastroenterol.* 2014;49(9):1314-23.
62. Lugli A, Karamitopoulou E, Zlobec I. Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2012;106(11):1713-7.
63. Li J, Li X, Yang J. A Novel Prognostic Stratified System Based on Tumor Budding and the Cell Nest Size in Ureter Urothelial Carcinoma. *Appl Bionics Biomech.* 2022;2022:6988237.
64. Grignon DJ. Prostate cancer reporting and staging: needle biopsy and radical prostatectomy specimens. *Mod Pathol.* 2018;31(S1):S96-109.
65. Zareba P, Flavin R, Isikbay M, Rider JR, Gerke TA, Finn S, et al. Perineural Invasion and Risk of Lethal Prostate Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2017;26(5):719-26.
66. Harryman WL, Warfel NA, Nagle RB, Cress AE. The Tumor Microenvironments of Lethal Prostate Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1210:149-70.
67. Amit M, Na'ara S, Gil Z. Mechanisms of cancer dissemination along nerves. *Nat Rev Cancer.* 2016;16(6):399-408.
68. Corradi LS, Jesus MM, Fochi RA, Vilamaior PS, Justulin LA, Góes RM, et al. Structural and ultrastructural evidence for telocytes in prostate stroma. *J Cell Mol Med.* 2013;17(3):398-406.

69. Sanches BDA, Maldarine JS, Zani BC, Tamarindo GH, Biancardi MF, Santos FCA, et al. Telocytes play a key role in prostate tissue organisation during the gland morphogenesis. *J Cell Mol Med.* 2017;21(12):3309-21.
70. Singh S, Sadacharan S, Su S, Beldegrun A, Persad S, Singh G. Overexpression of vimentin: Role in the invasive phenotype in an androgen-independent model of prostate cancer. *Cancer Research.* 2003;63(9):2306-11.
71. Grieco V, Patton V, Romussi S, Finazzi M. Cytokeratin and vimentin expression in normal and neoplastic canine prostate. *Journal of Comparative Pathology.* 2003;129(1):78-84.
72. Kolijn K, Verhoef EI, van Leenders G. Morphological and immunohistochemical identification of epithelial-to-mesenchymal transition in clinical prostate cancer. *Oncotarget.* 2015;6(27):24488-98.
73. Lang SH, Hyde C, Reid IN, Hitchcock IS, Hart CA, Bryden AAG, et al. Enhanced expression of vimentin in motile prostate cell lines and in poorly differentiated and metastatic prostate carcinoma. *Prostate.* 2002;52(4):253-63.
74. Harner-Foreman N, Vadakekolathu J, Laversin SA, Mathieu MG, Reeder S, Pockley AG, et al. A novel spontaneous model of epithelial-mesenchymal transition (EMT) using a primary prostate cancer derived cell line demonstrating distinct stem-like characteristics. *Scientific Reports.* 2017;7:18.
75. Zhao Y, Yan QM, Long X, Chen XM, Wang YI. Vimentin affects the mobility and invasiveness of prostate cancer cells. *Cell Biochemistry and Function.* 2008;26(5):571-7.
76. Satelli A, Li SL. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and Molecular Life Sciences.* 2011;68(18):3033-46.
77. Makrilia N, Lappa T, Xyla V, Nikolaidis I, Syrigos K. The role of angiogenesis in solid tumours: An overview. *European Journal of Internal Medicine.* 2009;20(7):663-71.
78. Miyata Y, Sakai H. Reconsideration of the clinical and histopathological significance of angiogenesis in prostate cancer: Usefulness and limitations of microvessel density measurement. *International Journal of Urology.* 2015;22(9):806-15.
79. Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor Angiogenesis Correlates with Metastasis in Invasive Prostate Carcinoma. *American Journal of Pathology.* 1993;143(2):401-9.

80. Weidner N. Measuring Intratumoral Microvessel Density. In: Cheresch DA, editor. *Angiogenesis: in Vivo Systems, Pt A. Methods in Enzymology*. 444. San Diego: Elsevier Academic Press Inc; 2008. p. 305-23.
81. CHALKLEY HW. Method for the Quantitative Morphologic Analysis of Tissues. *Journal Of The National Cancer Institute*; 1943. p. 47-53.
82. Morin KT, Carlson PD, Tranquillo RT. Automated image analysis programs for the quantification of microvascular network characteristics. *Methods*. 2015;84:76-83.
83. Marien KM, Croons V, Waumans Y, Sluydts E, De Schepper S, Andries L, et al. Development and Validation of a Histological Method to Measure Microvessel Density in Whole-Slide Images of Cancer Tissue. *PLoS One*. 2016;11(9):e0161496.
84. Taverna G, Grizzi F, Colombo P, Seveso M, Giusti G, Proietti S, et al. Two-dimensional neovascular complexity is significantly higher in nontumor prostate tissue than in low-risk prostate cancer. *Korean Journal of Urology*. 2015;56(6):435-42.
85. Bono AV, Celato N, Cova V, Salvatore M, Chinetti S, Novario R. Microvessel density in prostate carcinoma. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. 2002;5(2):123-7.
86. Gautam KA, Singh AN, Srivastav AN, Sankhwar SN. Angiogenesis in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia assessed by VEGF and CD-34 IHC: A comparative clinico-pathological study. *African Journal of Urology*. 2018;24(2):98-103.
87. Nowak-Sliwinska P, Alitalo K, Allen E, Anisimov A, Aplin AC, Auerbach R, et al. Consensus guidelines for the use and interpretation of angiogenesis assays. *Angiogenesis*. 2018;21(3):425-532.
88. Chauhan H, Abraham A, Phillips JR, Pringle JH, Walker RA, Jones JL. There is more than one kind of myofibroblast: analysis of CD34 expression in benign, in situ, and invasive breast lesions. *J Clin Pathol*. 2003;56(4):271-6.
89. Rauff A, LaBelle SA, Strobel HA, Hoying JB, Weiss JA. Imaging the Dynamic Interaction Between Sprouting Microvessels and the Extracellular Matrix. *Front Physiol*. 2019;10:1011.
90. Osorio CFEM, Costa WS, Gallo CBM, Sampaio FJB. Expression of stromal elements of prostatic adenocarcinoma in different gleason scores. *Acta Cir Bras*. 2019;34(10):e201901005.

9- ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Papel do PET/CT com 18F-FDG e 18F-colina nos pacientes com câncer de próstata

Pesquisador: Marcelo Henrique Mamede Lewer

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 09288112.0.0000.5149

Instituição Proponente: PRO REITORIA DE PESQUISA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.395.646

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo experimental a ser desenvolvido no Hospital das Clínicas da UFMG e na Faculdade de Medicina da UFMG. A amostra engloba 300 participantes adultos, atendidos pelo grupo de Urologia do HC-UFMG, divididos em três grupos de 100 pacientes cada: (1) pacientes com suspeita de câncer de próstata; (2) pacientes candidatos ao tratamento cirúrgico curativo para câncer próstata de alto risco e não metastático; e (3) pacientes com câncer de próstata submetidos à ressecção cirúrgica da próstata, que apresentarem aumento progressivo dos níveis séricos de PSA. Todos os pacientes serão avaliados quanto à extensão da doença através de exames clínico, laboratoriais e de imagem convencionais, rotineiramente solicitados no estadiamento pré-operatório ou no reestadiamento. Após assinatura de TCLE, os participantes serão encaminhados ao Centro de Imagem Molecular da FM-UFMG para a realização do estudo com tomografia por emissão de pósitrons (PET) utilizando os radiotraçadores 18F-FDG e

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 2.395.646

18F-colina.

Amostras tumorais serão coletadas e armazenadas durante o a ressecção cirúrgica do tumor. Estas amostras serão utilizadas para: (1) estudos moleculares de possíveis preditores de prognóstico oncológico, PTEN e PCA-3; (2) estudos genéticos; e (3) pesquisa de fatores patológicos com valor prognóstico, incluindo: tipo histológico da neoplasia, grau de diferenciação, extensão extraprostática, invasão da vesícula seminal, invasão perineural, invasão vascular e margens cirúrgicas, tamanho, localização, grau de invasão tumoral, número de tumores e metástases regionais linfonodais. Pelo exposto a metodologia é clara.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivos Primários:

- Verificar os achados do 18F-FDG e do 18F-colina PET/CT na determinação do foco neoplásico em pacientes com biópsia transretal guiada por US negativa para câncer, mas com suspeita de malignidade;
- Verificar os achados do 18F-FDG e do 18F-colina PET/CT em pacientes com câncer de próstata confirmado histopatologicamente em 2 cenários: no estadiamento de pacientes de alto risco e no reestadiamento de pacientes com recidiva bioquímica mínima.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto é claro quanto aos riscos e benefícios para os sujeitos. O compromisso do pesquisador quanto à publicação dos resultados, ao uso/destino do material e/ou dados coletados está bem explicitado. Os critérios para a interrupção/suspensão da pesquisa são claros. O projeto tem um orçamento de R\$ 10.000,00 e será custeado com financiamento próprio

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto visa basicamente investigar o potencial de novos métodos de imagem, em especial o PET/CT, no manejo de pacientes com Câncer de Próstata. O projeto está bem descrito, tem grande relevância para o

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.395.646

avanço científico na área de Ciências da Saúde e será desenvolvido por pesquisador com grande experiência na área.

Na presente emenda os autores informam e solicitam:

" O projeto intitulado "Papel do PET/CT com 18F-FDG e 18F-Colina nos pacientes com câncer de próstata", previamente aprovado pelo COEP-UFMG (CAAE 09288112.0.0000.5149), vem sendo realizado conforme cronograma de atividades apresentado. Entretanto, para que possamos validar a utilização de uma série de anticorpos monoclonais/policonais pelo exame de imuno-histoquímica direcionada ao câncer de próstata, necessitaremos de ampliar nossa amostragem.

Assim, solicitamos avaliação pelo COEP-UFMG para os seguintes aspectos:

- 1- Inclusão de um novo centro de captação de amostras, aqui representado pelo Laboratório de Anatomia Patológica ANALYS (carta de anuência em anexo);
- 2- Realização de um estudo retrospectivo com amostras teciduais mantidas nos arquivos biológicos dos laboratórios de anatomia patológica da FM-UFMG e do Laboratório ANALYS;
- 3- Dispensa da utilização de um TCLE para a realização do estudo retrospectivo das referidas amostras biológicas, uma vez que os dados coletados não irão impactar no diagnóstico já reportado, bem como na conduta clínica utilizada, além de mantermos o sigilo quanto aos dados pessoais que permitam a identificação dos pacientes selecionados para este fim."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequadamente apresentado conforme parecer emitido pelo Coep- UFMG número 200.406, datado de 31/01/2013.

Recomendações:

Não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos favoráveis pela aprovação de emenda ao projeto de pesquisa sob responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Marcelo Henrique Mamede Lewer, intitulado: Papel do PET/CT com 18F-FDG e 18F-colina nos pacientes com câncer de próstata.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.395.646

notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1019567_E1.pdf	07/11/2017 15:00:38		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Emenda_Ca_Prostata.pdf	07/11/2017 14:59:49	Marcelo Henrique Mamede Lewer	Aceito
Outros	Emenda_COEP_Ca_Prostata.pdf	07/11/2017 14:58:04	Marcelo Henrique Mamede Lewer	Aceito
Outros	Anuencia_Analys.pdf	07/11/2017 14:56:57	Marcelo Henrique Mamede Lewer	Aceito
Outros	Cancer Prostata_MP.pdf	21/01/2013 20:20:37		Aceito
Outros	Anuencia Uro.PDF	21/01/2013 20:20:08		Aceito
Outros	Anuencia CIMOL prostata.PDF	21/01/2013 20:19:50		Aceito
Outros	Projeto Ca Prostata_submissao (modificado).pdf	21/01/2013 20:18:55		Aceito
Outros	TCLE-33 (rebiopsia)(modificado).pdf	21/01/2013 20:18:18		Aceito
Outros	TCLE-22 (reestadiamento)(modificado).pdf	21/01/2013 20:17:56		Aceito
Outros	TCLE-11 (estadiamento)(modificado).pdf	21/01/2013 20:17:29		Aceito
Outros	Resposta COEP_Ca Prostata.pdf	21/01/2013 20:16:53		Aceito
Outros	Parecer IMA - carimbo.PDF	17/11/2012 13:23:00		Aceito
Outros	CEPE - Prostata.pdf	07/11/2012 13:04:23		Aceito
Outros	Projeto Ca Prostata_submissao (COEP).pdf	07/11/2012 13:04:05		Aceito
Outros	Parecer IMA - Prostata.pdf	07/11/2012 09:44:49		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE-3 (rebiopsia).pdf	07/11/2012 09:44:03		Aceito
TCLE / Termos de	TCLE-2 (reestadiamento).pdf	07/11/2012		Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.395.646

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE-2 (reestadiamento).pdf	09:43:42		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE-1 (estadiamento).pdf	07/11/2012 09:43:25		Aceito
Folha de Rosto	Folha rosto - Prostata.pdf	07/11/2012 09:43:00		Aceito
Outros	092881120pareceremassinado.pdf	23/11/2017 14:25:50	Vivian Resende	Aceito
Outros	092881120emendaassinada.pdf	23/11/2017 14:26:03	Vivian Resende	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 23 de Novembro de 2017

Assinado por:
Vivian Resende
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

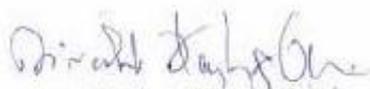
Belo Horizonte, 27 de outubro de 2017

CARTA DE ANUÊNCIA

O projeto intitulado "Papel do FET/CT com ^{18}F -FDG e ^{28}F -Colina nos pacientes com câncer de próstata", previamente aprovado pelo COEP-UFMG (CAAE 09288112.0.0000.5149), foi apresentado no Laboratório ANALYS Patologia pelo coordenador, Prof. Marcelo Mamede, e os procedimentos a serem realizados nas amostras teciduais de próstata existentes no arquivo biológico do Laboratório ANALYS Patologia estão de acordo com a rotina do serviço, sem quaisquer custos à instituição e/ou aos pacientes. Dessa forma, aprovamos a realização do referido estudo no Laboratório ANALYS Patologia

Coloco-me à disposição para qualquer esclarecimento que se fizer necessário.

Atenciosamente,



Dr. Nivaldo Hartung Toppa
Diretor Clínico do Laboratório ANALYS Patologia