

SEBASTIÃO ROBERTO TABOGA



ESTUDO CITOQUÍMICO E MORFOMÉTRICO EM NÚCLEOS E DISTRIBUIÇÃO DAS FIBRAS NO ESTROMA EM LESÕES DA PRÓSTATA HUMANA

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida (o) candidato a) Sebastião Roberto Taboga e aprovada pela Comissão Julgadora [assinatura] 19/09/97

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Luiza Silveira Mello †

Co-orientador: Prof. Dr. Benedicto de Campos Vidal †

Campinas - SP.

1997



9322.509

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T114e
T114e	
V.	Ex.
TC VBC BC/	32277
PROC.	281/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	27/11/97
N.º CPD	

CM-00103241-9

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

Taboga, Sebastião Roberto

T114e Estudo citoquímico e morfométrico em núcleos e
distribuição das fibras no estroma em lesões da pró-
tata humana/Sebastião Roberto Taboga.-- Campinas,SP:
[s.n.], 1997.
103f: ilus.

Orientadora: Maria Luiza Silveira Mello
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de bilologia.

1. Cromatina. 2. Matriz extracelular. 3. Cancer. 4. Próstata.
I. Mello, Maria Luiza Silveira. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Titulo.

LOCAL E DATA: Campinas, 19 de setembro de 1997.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof^a Dr^a MARIA LUIZA SILVEIRA MELLO

(orientadora)



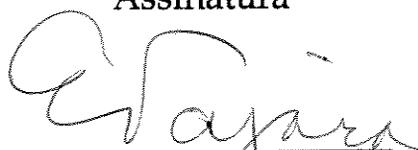
Assinatura

Prof^a Dr^a TELMA M. TENÓRIO ZORN



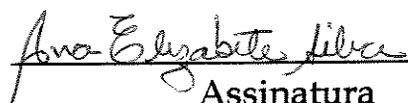
Assinatura

Prof^a Dr^a ELOIZA H. TAJARA DA SILVA



Assinatura

Prof^a Dr^a ANA ELIZABETE SILVA



Assinatura

Prof. Dr^a CRHISTINE HACKEL



Assinatura

SUPLENTES:

Prof^a Dr^a SHIRLEI M. RECCO-PIMENTEL

Assinatura

Prof. Dr^a IARA M. SILVA DE LUCA

Assinatura

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. Aspectos morfológicos da próstata	1
2. Alterações morfológicas na próstata	4
2.1. Lesões benignas da próstata: hiperplasias nodulares	6
2.2. Lesões malignas da próstata: adenocarcinomas	7
2.3. Lesões pré-malignas da próstata: neoplasias intra-epiteliais	9
3. Análises celulares nas lesões da próstata	10
4. Conteúdo de DNA e análises morfométricas em lesões da próstata	13
5. Considerações sobre apoptose	16
OBJETIVOS	19
1. Justificativa e relevância do tema	19
2. Objetivos específicos	19
MATERIAL E MÉTODOS	20
1. Material	20
2. Métodos	22
2.1. Obtenção dos cortes histológicos	
2.1.1. Coloração pela hematoxilina-eosina para análise geral das células e do estroma prostático	22
2.1.2. Coloração pelo azul de toluidina a pH 4,0 para estudo de ácidos nucléicos	23
2.1.3. Variante da concentração crítica de eletrólitos para a discriminação de RNA e apoptose	23
2.1.4. Controles para as reações descritas em 2.1.2. e 2.1.3.	23
2.1.5. Reação de Feulgen para DNA	24
2.1.6. Reação imunocitoquímica para detecção <i>in situ</i> de núcleos apoptóticos	24

2.1.7. Impregnação pela prata para reticulina para análise de fibras colágenas e reticulares do estroma prostático	25
2.2. Análise e documentação fotográfica	26
2.3. Análises morfométricas	26
2.4. Análise estatística	28
RESULTADOS	29
1. Basofilia, forma nuclear e distribuição cromatínica na próstata	29
1.1. Células epiteliais prostáticas normais	30
1.2. Células epiteliais da hiperplasia nodular da próstata	31
1.3. Células epiteliais dos adenocarcinomas da próstata	31
2. Apoptose nas lesões da próstata	43
3. Parâmetros cariométricos em células acinares da próstata	47
3.1. Área nuclear	47
3.2. Perímetro nuclear	52
3.3. Fator forma nuclear	56
3.4. Correlação entre áreas e perímetros nucleares	60
4. Componentes fibrilares do estroma nas lesões da próstata	64
DISCUSSÃO	69
1. Distribuição cromatínica e dados de morfometria nas lesões prostáticas	69
2. Apoptose nas lesões prostáticas	73
3. Organização das fibras da matriz extracelular no estroma das lesões prostáticas	76
4. Considerações finais	80
CONCLUSÕES	82
RESUMO	84
ABSTRACT	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer as pessoas e as Instituições que colaboraram sobremaneira para a execução deste trabalho.

Aos meus orientadores, Professora Doutora Maria Luiza Silveira Mello e Professor Doutor Benedicto de Campos Vidal, pela seriedade e competência com que conduziram este trabalho e pela dedicada vida à Biologia Celular.

Aos Professores Doutores Geraldo C. Freire, Telma M. T. Zorn e Benedicto de Campos Vidal pela leitura cuidadosa e sugestões quando da análise prévia da tese.

Às professoras Doutoras Telma M.T.Zorn, Eloiza H. Tajara da Silva, Ana Elizabete Silva, Christine Hackel, Shirlei M. Recco-Pimentel e Iara M. Silva de Luca por aceitarem ser membros da banca examinadora deste trabalho.

À Senhorita. Adriana Rocha, médica patologista, pela leitura cuidadosa das lâminas e pela classificação das lesões utilizadas neste trabalho.

À Professora Adriana Barbosa dos Santos do Departamento de Ciência da Computação e Estatística (IBILCE/UNESP), pela assessoria estatística a este trabalho.

Aos Técnicos de laboratório, Rosana Silistino de Souza (Departamento de Biologia - IBILCE/UNESP), Domingos Zanchetta Netto (Laboratório de Histotecnologia - FAMERP/S.J.R.P), Mário Bianchi (Departamento de Biologia Celular - UNICAMP), pelo inestimável auxílio durante a execução dos experimentos.

Aos colegas de Laboratório Luiz Fernando, Simone, Cris, Estela, José Ricardo, pela ajuda e convivência.

À Dona Maria pelo sorriso sincero e revitalizante...

Aos professores do Departamento de Biologia - IBILCE/UNESP, que não mediram esforços para que eu me afastasse das atividades docentes para realização deste trabalho; em especial à Professora Doutora Mary Massumi Ytoyama, por ter assumido as minhas atividades didáticas durante este período.

Aos secretários, Simone e Olga (Departamento de Biologia - IBILCE/UNESP), Cidinha, LÍlian e Sidney (Departamento de Biologia Celular - UNICAMP), pelo inestimável auxílio.

Aos professores do Departamento de Biologia Celular - UNICAMP, pela colaboração e pelo convívio agradável durante a minha estadia em Campinas; em especial, ao Professor Doutor Hernandes Faustino de Carvalho, pelas sugestões e pela amizade.

Aos colegas do curso de pós-graduação, pela força e encorajamento diário de que a gente precisa...

Aos meus alunos e ex-alunos (acho que eles são a razão de tudo isto!).

Aos meus amigos pessoais, que sempre, de uma forma ou de outra, me olharam com olhos de compreensão (nesta fase a gente precisa muito ser compreendido...).

Ao professor e amigo Sebastião Carlos Leite Gonçalves (IBILCE/UNESP), pelo constante auxílio na leitura dos manuscritos e pela convivência diária em Campinas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pela bolsa a mim concedida durante o curso de doutoramento.

Ao Laboratório de Patologia do Hospital de Base da Faculdade Regional de Medicina, pela concessão dos blocos e das lâminas dos seus arquivos.

A todos os pacientes que aqui foram apenas mencionados por um código... sem eles, nada disto teria acontecido...

Aos amigos de todas as horas, Daniela, Sérgio, Silvyva Stuchi, Patty Parise, Marquinho, Márcio, Dri, Lu, Trolha, Hernandes, Maurício, Júlio César, Ana Cláudia, Rejane, Ana Silvia, Chopes, Cláudia, Luciana, Rogério, tio Carlinhos, por tudo...

Às sempre queridas mestras, Professoras Doutoras Adelina Buzini da Costa Silva, Sonia Maria Oliani, Maria Astride Saad Corradi e Maria Tercília Vilela de Azeredo Oliveira, por todos os ensinamentos, por todas as dicas, por toda a alegria que ainda existe...

Aos meus pais, Sebastião e Maria Ivone; meus irmãos, Carlos, Gilberto, Silvia e Elaine, e a todos os meus familiares, pela resistência, pelo imenso amor e pela compreensão das minhas ausências na família.

Ao meu grande amor Patrícia Simone, a quem procuro me entregar por inteiro, mas às vezes, nem sempre possível...

Ao Pai Maior, que, por acréscimo de sua infinita bondade e misericórdia, me deu inteligência, saúde e permitiu que eu chegasse até aqui e pudesse encontrar tantas pessoas lindas para iluminar minha estrada.

“...todo amor que houver nesta vida...”

Sebaka

*Aos meus pais
Sebastião e Maria Ivone*

*Às minhas avós
Tereza e Rosa*

*Aos meus irmãos
Carlos, Gil, Sil e Elaine*

*Aos meus cunhados
Luzia, Mário e Waldemar*

*Aos meus sobrinhos
Luiz Fernando, Rodrigo, Luiz Ricardo e João Pedro.*

Aos meus alunos e ex-alunos

A todos aqueles que acreditam no meu trabalho.

À minha namorada Patrícia

Dedico.

"Vida devotada à atividade criadora em ciência é vida feliz. Nenhum outro modo de vida é igual ou superior em felicidade... Eu creio que o trabalho científico, juntamente com outras formas de trabalho criador, é o principal propulsor da evolução do espírito humano. A evolução do espírito humano dá significado à evolução humana e à evolução universal."

Theodosius Dobzhansky (1970)

INTRODUÇÃO

1. Aspectos morfológicos da próstata

As estruturas acessórias do aparelho reprodutor masculino são bilateralmente simétricas e constituídas por um par de vesículas seminais e um conjunto de glândulas periuretrais, das quais a próstata é a mais volumosa e com maior expressividade funcional (NETTER, 1965).

A próstata madura consiste de uma estrutura firme e compacta de aproximadamente 20 gramas de massa, no formato aproximado de uma castanha (HAM & CORMACK, 1991). Localizada abaixo da bexiga urinária, envolve a uretra quando esta emerge da bexiga (HOPSON & WESSELLS, 1990).

A glândula prostática humana é um órgão de natureza morfológica complexa, constituído de diversas estruturas glandulares e não glandulares que se encontram estreitamente agrupadas no interior de uma cápsula comum (McNEAL, 1992). É durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal da próstata que o epitélio e o mesênquima, sob o controle de andrógenos testiculares, interagem para formar um órgão com características secretoras, que se mantém pela influência hormonal (HAYWARD *et al.*, 1997).

Os tecidos não glandulares da próstata estão principalmente concentrados anteromedianamente e são os maiores responsáveis pela convexidade anterior, característica da próstata. Estes tecidos são individualizados anatômica e microscopicamente como: esfíncteres pré-prostático e estriado, estroma fibromuscular e cápsula prostática (McNEAL, 1992).

Além do tecido não glandular, a próstata é constituída por um grande número de unidades glandulares, as quais se abrem através de ductos separados na uretra prostática.

Os ductos e ácinos prostáticos são morfológicamente idênticos, exceto pela sua geometria, e ambos podem ter função de reservatório secretor disponível. Este fato pode ser demonstrado por colorações imunohistoquímicas para

antígenos prostáticos específicos (PSA) e por técnicas citoquímicas para a fosfatase ácida prostática (PAP). Esta evidência leva também a não distinção funcional entre ductos e ácinos (McNEAL, 1992).

Todo este volume glandular está imerso em um estroma rico em tecido conjuntivo denso altamente irrigado e entremeado por fibras musculares lisas esparsas (HAM & CORMACK, 1991).

A organização do estroma prostático permite diferenciar regiões na próstata denominadas lobos prostáticos que são em número de 5 (MOSTOFI & PRICE, 1973). Estes lóbulos são classificados pela anatomia clássica como: lobo anterior ou ventral, constituído de 8 a 10 glândulas alveolares localizadas na porção anterior da uretra prostática; lobo posterior que, embriologicamente, surge como uma estrutura definitiva e independente, e é constituído por 4 a 9 túbulos que se posicionam na porção mais distal da uretra prostática; dois lobos laterais, simétricos e pares, constituídos por 37 a 40 glândulas túbulo-alveolares que emergem lateralmente à uretra prostática; e lobo mediano, que apresenta de 7 a 12 grupos túbulo-glandulares localizados entre o assoalho da uretra prostática proximal e o lobo posterior (NETTER, 1965).

Uma classificação mais moderna define a próstata em regiões ou zonas (Mc NEAL, 1981). Por esta definição, o componente glandular, na sua maioria, encontra-se nas zonas periférica e transicional e os componentes fibromusculares na zona central ou periuretral.

Do volume glandular total, 25% corresponde à zona central, 5% à zona transicional e 70% à zona periférica (DROLLER, 1997).

Um corte histológico transversal da próstata, na sua porção mediana, revela que a uretra prostática apresenta-se ampla e em forma de V, com o ápice do V apontado anteriormente (McNEAL, 1968 e HAM & CORMACK, 1991).

As glândulas túbulo-alveolares ou túbulo-acinares da próstata, compostas de três diferentes ordens, são distribuídas concentricamente ao V uretral. Histologicamente, são classificadas em glândulas mucosas, localizadas no tecido periuretral; glândulas submucosas, dispostas no anel tecidual que circunda o tecido periuretral; e, glândulas prostáticas principais, que fornecem a maior parte da secreção prostática e estão situadas na porção mais externa e maior da glândula (ROSS *et al.*, 1993).

O epitélio glandular da próstata produz e armazena a secreção prostática, fato que confere a este epitélio um caráter pregueado peculiar. Esta disposição característica, juntamente com a presença do estroma fibromuscular, confere à próstata um aspecto microscópico característico (HAM & CORMACK, 1991). O epitélio das unidades secretoras e de seus ductos é simples, geralmente cilíndrico e alto, podendo apresentar também células mais achatadas cubóides e outras conhecidas como células basais. As células epiteliais apoiam-se sobre uma membrana basal extremamente acidófila, fina e homogênea (MOSTOFI & PRICE, 1973). Além disso, a membrana mucosa da próstata é ricamente suprida por capilares (WEISS & GREEP, 1981).

Os tipos celulares presentes nos epitélios glandulares da próstata são bem caracterizados e uniformes, não diferentes de outras células secretoras. A cromatina pode variar no grau de compactação e os nucléolos são infreqüentes; quando presentes, são pouco desenvolvidos (MOSTOFI & PRICE, 1973).

Da população celular do epitélio glandular prostático, as células que se distinguem morfológicamente das demais são as células basais e as células isoladas do sistema APUD (*Amine Precursor Uptake and Descarboxilation*, células que metabolizam e armazenam aminas biogênicas).

As células basais estão em contacto com a membrana basal dos ácinos prostáticos (MAO & ANGRIST, 1966) e são inconspícuas nos preparados histológicos de rotina. Dentre as muitas funções atribuídas a este tipo celular, é provável que elas sejam os principais componentes do compartimento proliferativo do epitélio prostático, envolvido com a divisão celular e maturação do epitélio secretor (DERMER, 1978).

As células do sistema APUD, que se encontram em populações isoladas, estão distribuídas ao acaso no epitélio glandular. Elas são produtoras de secreções endócrino-parácrinas, como somatostatina, calcitonina, entre outros (Di SANT'AGNESE *et al.*, 1985 e Di SANT'AGNESE, 1986).

As células secretoras propriamente ditas, cuja estrutura é cúbico-prismática, são as mais abundantes do epitélio glandular. Produzem os principais componentes do plasma seminal, antígenos prostáticos PSA e PAP, pepsinogênio II e ativadores do plasminogênio (REESE *et al.*, 1986 e 1988).

A importância da identificação morfo-fisiológica destes tipos celulares, ou mesmo da biologia básica do epitélio prostático, reside no fato de todas estas células serem sujeitas a transformações que poderão gerar tumores benignos ou malignos da próstata (PARTIN & COFFEY, 1994).

2. Alterações morfológicas na próstata

As alterações morfológicas dos tecidos da próstata envolvem desde a resposta à recuperação de traumas no órgão, geralmente devido à fraturas de ossos da pelve, até os carcinomas altamente indiferenciados e invasivos (NETTER, 1965; COTRAN *et al.*, 1994). Estas alterações podem ser classificadas e identificadas observando-se as características das células e pela disposição das fibras no estroma prostático (MOSTOFI & PRICE, 1973).

O envelhecimento do indivíduo pode acarretar uma atrofia ducto-acinar que pode ser focal, restrita a determinadas áreas, ou difusa, disposta generalizadamente no órgão. Em ambos os casos, atribui-se esta resposta à diminuição do nível de andrógenos (McNEAL, 1992).

As principais e mais comuns alterações no tecido prostático se referem às prostatites, que são caracterizadas histologicamente por um acúmulo de leucócitos na glândula. As prostatites de maneira geral são ditas agudas quando, no local da lesão, detecta-se exsudação e até mesmo a congestão. As lesões agudas são raramente vistas em espécimens cirúrgicos (ROSAI, 1996). As prostatites são caracterizadas como crônicas quando se detecta caráter proliferativo no local da lesão, seja da porção celular, de vasos ou fibras. A natureza e o tempo de persistência do agente infeccioso ou irritante é que determinarão se a prostatite será aguda ou crônica. Há de se citar ainda que, quanto à classificação das prostatites, estas podem ser bacterianas ou abacterianas (BILLIS, 1995).

Mais recentemente, tem-se dado maior importância para patologias como as inflamações ou até mesmo os cálculos prostáticos, pois estas afecções também podem elevar o nível do PSA sérico, atingindo padrões semelhantes aos

encontrados nos tumores. Até então, o PSA era tido como alterado para padrões elevados somente nos tumores malignos (NADLER *et al.*, 1995).

Outras alterações na próstata são aquelas classificadas como hiperplasias e adenocarcinomas, que também promovem o aumento da massa glandular. Entretanto, nestes tipos de lesões não se detecta, na maioria das vezes, infiltrado leucocitário e, geralmente, as células do estroma ou da porção glandular aumentam em número e massa (MOSTOFI & PRICE, 1973).

As lesões e tumores da próstata constituem, atualmente, as neoplasias mais freqüentes em homens, representando em 1994, no Brasil, 8,4% do total de casos (REBELO & ABREU, 1994). Entretanto, o comportamento biológico destas neoplasias, com crescimento por vezes lento e pouco agressivo, faz com que a proporção de óbitos pela doença seja inferior à dos casos de câncer de pulmão e de cólon (SILVERBERG & LUBERA, 1989 apud SROUGI & SIMON, 1990).

O câncer de próstata é bastante raro antes dos 50 anos e sua incidência aumenta progressivamente com a idade. Cerca de 80% dos homens acima dos 80 anos apresentam neoplasia primária da próstata, entretanto, quando a glândula é estudada em cortes histológicos seriados, apenas 5% destes casos manifestam-se clinicamente. A descoberta acidental destes tumores mostra que estes têm uma evolução mais benigna e lenta (GARNICK, 1994 e PARTIN & COFFEY, 1994).

A origem dos adenocarcinomas da próstata é ainda desconhecida, embora, algumas idéias apresentadas para justificar o desenvolvimento desta doença sejam consideráveis e muito importantes para o entendimento da biologia tumoral destes cânceres (SROUGI & SIMON, 1990). A origem dos tumores da próstata pode estar relacionada a fatores genéticos (KRAIN, 1974 apud SROUGI & SIMON, 1990; EKMAN *et al.*, 1997), agentes infecciosos (SCHULMAN *et al.*, 1971), descontrolo hormonal (PARTIN & COFFEY, 1994) e até mesmo fatores nutricionais (CHOPRA & WILKOFF, 1981 apud SROUGI & SIMON, 1990) e vasectomia (PARTIN & COFFEY, 1994), embora ainda haja controvérsias sobre este último fator.

Todos os fatores que levam ao desenvolvimento de lesões neoplásicas na próstata podem ser considerados, em linhas gerais, fatores ambientais (de origem exógena) e fatores genéticos (de origem endógena), estes últimos parecem ser os de maior importância epidemiológica (EKMAN *et al.*, 1997).

A classificação das lesões benignas e malignas e pré-malignas da próstata, embora bastante discutível, é feita principalmente pela análise do órgão por toque ou pelo estadiamento histológico (SROUGI & SIMON, 1990).

Citologicamente, os fatores utilizados para caracterizar as lesões prostáticas envolvem principalmente os padrões da textura cromatínica ou forma nuclear. Entretanto as análises apresentadas envolvem aspectos qualitativos e não quantitativos (PARTIN & COFFEY, 1994).

Muitas lesões da próstata são semelhantes a tumores (“tumor-like”) e podem causar certa confusão na interpretação de laudos das biópsias. Dentre estas lesões pode-se citar a atrofia, adenose atípica e esclerosante, hiperplasia cribriforme, hiperplasias e adenomas mesonéfricos, metaplasia escamosa, malacoplaquia, xantoma entre outras. Entretanto, muitos trabalhos têm sido realizados na tentativa de padronizar a classificação destas lesões, pois muitas se encontram em sinonímia (YOUNG, 1995).

A estrutura celular é, sem dúvida, o principal e mais comum parâmetro utilizado na diagnose histológica das lesões prostáticas; e somente patologistas com grande experiência podem confirmar esta diagnose. O pleiomorfismo nas lesões da próstata inclui principalmente as variações nucleares e no padrão da arquitetura tecidual (GARCIA-SCHURMANN & COFFEY, 1997). Assim, em linhas gerais, as lesões prostáticas podem ser classificadas como benignas, malignas e pré-malignas.

Embora existam, com certa frequência na literatura, relatos de análises microscópicas e morfométricas de tumores da próstata, os trabalhos não abordam especificamente traços histológicos e histométricos e sim a resposta das células ao tratamento ou à intervenção cirúrgica (PARTIN & COFFEY, 1994).

2.1. Lesões benignas da próstata: Hiperplasias nodulares

A hiperplasia nodular da próstata, ainda chamada pelo termo redundante de hiperplasia prostática benigna, é uma afecção muito comum em homens com mais de 50 anos de idade. Descrita por MOORE (1943), caracteriza-se pela formação de grandes nódulos, relativamente discretos, na região periuretral da

próstata. Quando grandes o suficiente, os nódulos comprimem e estreitam o canal da uretra prostática, dando origem a uma obstrução parcial ou até completa da mesma (COTRAN *et al.*, 1994).

O desenvolvimento da hiperplasia nodular prostática é resultante da proliferação do estroma e epitélio glandular, entretanto, a hiperplasia do estroma parece ser predominante (DROLLER, 1997).

Morfologicamente, a hiperplasia nodular da próstata caracteriza-se pelo acúmulo de agregados nodulares, principalmente na região periuretral (McNEAL, 1981). A análise microscópica do tumor revela que a nodularidade pode ser principalmente decorrente da proliferação ou dilatação glandular, ou até mesmo fibrosa e muscular no estroma. Os três elementos podem estar envolvidos em quase todos os casos (COTRAN *et al.*, 1994). Assim, se a razão volumétrica estroma/epitélio na próstata normal é 2 a 3:1, na hiperplasia esta razão aumenta para 5 a 6:1 (DROLLER, 1997).

A incidência dos tumores hiperplásicos da próstata é de até 20% dos homens com 40 anos e o percentual chega a 70% nos homens com 60 anos, podendo alcançar 90% em homens na oitava década de vida. Estes estudos foram feitos por BERRY e colaboradores (1984) em uma série não selecionada de necrópsias nos Estados Unidos.

Sendo alta a frequência da hiperplasia nodular prostática nas necrópsias, parece não haver relação entre a hiperplasia nodular histologicamente detectada com o prostatismo, enquanto sintomatologia nos pacientes urológicos (GARRAWAY & ALEXANDER, 1997).

Embora ainda incerta, a etiologia da hiperplasia nodular da próstata parece ter grande influência hormonal na sua gênese (WILSON, 1980).

2.2. Lesões malignas da próstata: Adenocarcinomas

Quase todas as lesões ou tumores malignos da próstata são carcinomas originados da transformação celular da porção acinar ou de ductos das glândulas. Quando o termo carcinoma é usado sem especificação, ele se refere tão somente a lesões glandulares. Entretanto, outras neoplasias malignas, como

carcinomas celulares transicionais e escamosos e vários sarcomas, ou até mesmo o extremamente raro carcinossarcoma, podem ser detectados e caracterizados na próstata (MOSTOFI & PRICE, 1973).

O câncer da próstata, assim como a hiperplasia nodular, é uma doença que acomete homens com mais de 50 anos de idade. Estudos da incidência da doença correlacionada à idade nos Estados Unidos revela uma taxa de 69 por 100.000 indivíduos. Muito mais reveladores, contudo, são os índices específicos da idade, 4,8 em 100.000 na faixa etária entre 45 e 49 anos, aumentando para 513 em 100.000 entre 70 e 75 anos de idade (HUTCHINSON, 1981 apud COTRAN *et al.*, 1994).

A prevalência do câncer prostático varia na dependência da raça e nacionalidade, sendo raro nos orientais e muito prevalente em negros. Acredita-se que tais diferenças sejam decorrentes de influências ambientais, visto que japoneses que migram para os Estados Unidos apresentam o índice de prevalência próximo ao dos americanos (DUNN, 1975).

Pouco se sabe sobre a etiologia do câncer prostático. Por convenção, fala-se em três fatores principais: idade, raça e sistema endócrino (COTRAN *et al.*, 1994).

Muitos problemas e questões são levantados com base na classificação dos carcinomas da próstata (MOSTOFI, 1976). Estes carcinomas, mais especificamente os adenocarcinomas, apresentam um amplo espectro de padrões histológicos, indo desde um pequeno foco de glândulas, bem diferenciado porém anormal, até o padrão tumoral anaplásico, altamente indiferenciado. Vários são os autores que procuram demonstrar a correlação entre o grau de diferenciação histológica e o comportamento biológico do tumor (WHITMORE-Jr, 1973; GITTES & CHU, 1976; MOSTOFI, 1976; HENSON, 1988 e SVANHOLM *et al.*, 1990).

As questões levantadas a respeito do desenvolvimento e biologia tumoral na próstata têm permitido, sobremaneira, estudos nas mais variadas áreas da histopatologia, citoquímica e citogenética.

2.3. Lesões pré-malignas da próstata: Neoplasias intra-epiteliais

As neoplasias intra-epiteliais (PIN) ou displasias intraductais da próstata são consideradas lesões pré-malignas pois assumem características citológicas e arquiteturais dos adenocarcinomas diferenciados (BOSTWICK, 1988). Frequentemente estas lesões são encontradas em associação com os mesmos (Mc NEAL & BOSTWICK, 1986).

Os critérios morfológicos para diagnóstico destas lesões têm sido bem estabelecidos (MOSTOFI *et al.*, 1995) e existem sugestões que estas alterações precedem os tumores malignos, pois a maioria dos tumores malignos indiferenciados e invasores apresentam, em associação a eles, focos de células displásicas, com integridade de membrana basal que caracteriza a não invasividade tumoral e conseqüente transitoriedade da lesão (BOSTWICK & BRAWER, 1987).

Os núcleos destas lesões também apresentam uma certa transitoriedade fenotípica, entre tumores malignos e benignos, pois a área nuclear e a textura cromatínica compartilham características comuns a ambos (MOSTOFI *et al.*, 1995).

Três graus de estadiamento são definidos para diferenciar as neoplasias intra-epiteliais: grau I, II e III. Os critérios para estadiamento destas neoplasias envolvem principalmente particularidades nucleares, nucleolares e composição química das mucinas na luz dos ductos (ROSAI, 1996). Estes três graus frequentemente são agrupados em duas categorias: neoplasias intra-epiteliais de baixo grau, que comportam os graus I e II e as neoplasias intra-epiteliais de alto grau, que comportam o grau III.

Dados citofotométricos de DNA destas lesões demonstram que as células displásicas intra-epiteliais estão numa posição intermediária, em relação às aneuploidias e poliploidias, quando comparadas com as hiperplasias nodulares e adenocarcinomas (MONTIRONI *et al.*, 1990a). A maioria das neoplasias intra-epiteliais de baixo grau segundo ROSAI (1996) são de natureza diplóide,

enquanto as de alto grau segundo ROSAI (1996) são aneuplóides (CRISSMAN *et al.*, 1993).

Outra lesão pré-maligna freqüente na próstata é a conhecida hiperplasia adenomatosa atípica, ou também conhecida como adenose. Pelas suas características histológicas de baixa invasividade e também pelas características celulares, estas neoplasias têm sido confundidas com os tumores bem diferenciados. Os padrões de distribuição nucleolar e organização da cromatina têm possibilitado as diferenciações destas lesões (ROSAI, 1996).

3. Análises celulares nas lesões da próstata

As análises dos cortes histológicos de lesões da próstata humana têm gerado, desde há muitos anos, dúvidas e discussões a respeito da evolução da doença (WHITMORE-Jr, 1973 e MOSTOFI, 1976).

Parece ser consensual na literatura a necessidade de uma graduação ou estabelecimento de níveis citológicos para o desenvolvimento tumoral da próstata (WHITMORE-Jr, 1973; MOSTOFI, 1976 e HENSON, 1988).

A classificação histopatológica e a tentativa de se estabelecer critérios sistemáticos para a classificação dos tumores da próstata ocorreram a partir de estudos feitos por BRODERS (1926) o qual chamou a atenção, pela primeira vez, para a necessidade da sistematização dos tumores, colocando-a como indispensável para o diagnóstico patológico.

Em seu trabalho clássico, BRODERS (1926) estadiou tumores em 4 graus, tendo os tumores de grau 1 75% das células bem diferenciadas e 25% indiferenciadas; nos tumores de grau 2 os elementos diferenciados e indiferenciados estariam na mesma proporção; nos de grau 3 inverter-se-ia a proporção e nos de grau 4 nenhum tipo de diferenciação celular estabelecido morfológicamente seria observado.

Mesmo não trabalhando especificamente com tumores da próstata, a proposta deste autor foi de grande importância e impacto para o estudo da graduação histológica de neoplasmas, inclusive os da próstata (HENSON, 1988).

Variações na classificação descrita por BRODERS (1926) foram propostas, tais como: análise somente da porção acinar da glândula (YOUNG & DAVIS, 1926); análise, além dos ácinos, também das formações tubulares e da frequência de mitoses (MUIR, 1934).

MOSTOFI (1976) revisou comparativamente os diversos sistemas de classificação até então propostos, com especial enfoque na diversidade dos sistemas de classificação dos tumores prostáticos.

No final dos anos 70, vários seminários foram feitos nos Estados Unidos para a discussão e estabelecimento de um padrão homogêneo na classificação destes tumores (MURPHY & WHITMORE-Jr, 1979). Estas reuniões levaram a algumas conclusões substanciais na classificação histológica destes tumores. O consenso se deu em cima da proposta de GLEASON (1966), entretanto incorporou-se àquela proposição, características nucleares e citológicas das células transformadas. Este sistema baseia-se no grau de diferenciação glandular e no padrão de crescimento do tumor em relação ao estroma.

O Sistema de Gleason (GLEASON, 1977) utilizando os critérios supra citados, classificou o adenocarcinoma da próstata em cinco graus: GRAU 1 - tumor muito bem diferenciado; o diagnóstico é feito apenas pelo desarranjo arquitetural, o tecido neoplásico é muito bem delimitado do tecido não neoplásico, não existindo o caráter infiltrativo. GRAU 2 - tumor bem diferenciado; o diagnóstico é também feito pelo desarranjo arquitetural, porém a delimitação do tecido não neoplásico não é tão precisa quanto nos graus 1 e 2, e, há maior distância entre os ácinos neoplásicos. GRAU 3 - tumor moderadamente diferenciado; corresponde ao grau mais frequente do tecido neoplásico sendo fracamente infiltrativo. Apresenta-se sob dois aspectos: 1 - ácinos bem diferenciados como nos graus 1 e 2, porém com fraca infiltração e 2 - arranjos cribriformes ou projeções papilíferas. GRAU 4 - tumor pouco diferenciado. A neoplasia é fracamente infiltrativa, podendo formar ácinos e mostrar arranjo cribriforme, porém o caráter é predominantemente medular, isto é, sem estroma entre os ácinos. GRAU 5 - tumor muito pouco diferenciado. Neste caso o arranjo é indiferenciado ou sólido ou incluindo-se aqui o comedocarcinoma (PALMA, 1987).

Pode haver mais de um padrão histológico em um mesmo tumor. Gleason considera, neste caso, dois padrões para graduação tumoral a saber: **PADRÃO PRIMÁRIO** - corresponde ao grau tumoral predominantemente em área. **PADRÃO SECUNDÁRIO** - corresponde ao grau tumoral minoritário em área.

Desta maneira a graduação final de um tumor prostático pelo Sistema Gleason é feita com dois dígitos, separados por um ponto. O primeiro corresponde ao padrão primário e o segundo ao secundário. Quando um tumor apresenta apenas um padrão histológico, utiliza-se o mesmo grau tanto no dígito correspondente ao padrão primário como naquele correspondente ao secundário. Nos casos em que há equivalência em área de dois padrões histológicos, considera-se o mais indiferenciado como padrão primário (primeiro dígito). Assim sendo a soma dos dois dígitos (padrão primário e secundário) poderá variar entre 2 e 10.

De acordo com o Sistema combinado de Gleason, os tumores prostáticos podem ser classificados em linhas gerais como: **bem diferenciados** (soma dos dígitos entre 2 e 4), **moderadamente diferenciados** (soma dos dígitos entre 5 e 7) e **indiferenciados** (soma dos dígitos entre 8 e 10) (GARNETT *et al.*, 1984 apud PALMA, 1987).

Para que um sistema de classificação tumoral seja válido é imprescindível que ele apresente como características a objetividade e reprodutibilidade, além da firme relação entre o grau histopatológico do tumor e o câncer, enquanto doença (MURPHY & WHITMORE-Jr, 1979 e SVANHOLM *et al.*, 1990).

Outro sistema proposto para o estadiamento e graduação dos tumores da próstata é o Sistema Gaeta, proposto por GAETA (1981). Este sistema baseia-se no grau de diferenciação glandular e na citologia nuclear.

A graduação tumoral tem importância especial no câncer prostático porque existe, em geral, uma correlação excelente entre o prognóstico e o grau de diferenciação tumoral (COTRAN *et al.*, 1994).

A análise celular dos tumores de próstata tem tomado um importante lugar dentro das pesquisas em tumorigênese, principalmente aquelas que levam a enfoques citométricos (LUNDERBERG *et al.*, 1987 e JONES *et al.*, 1990); citofotométricos (AL-ABADI & NAGEL, 1990); imunocitoquímicos (BOSTWICK & BRAWER, 1987; FRAUENHOFFER *et al.*, 1991 e SAHIN *et al.*, 1991);

morfométricos (MONTIRONI *et al.*, 1990 a,b; WANG *et al.*, 1992 e PARTIN & COFFEY, 1994); ultra-estruturais (SAHIN *et al.*, 1991), moleculares (THOMPSON, 1990 e DAVIES & EATON, 1991) e citogenéticos (SALLES, 1994).

Em nível celular também tem sido estudada a razão núcleo-nucléolo, principalmente com a utilização de impregnações metálicas como a técnica da coloração pela prata (HELPAP, 1988 e GHAZIZADEH *et al.*, 1991). Entretanto esta metodologia apresenta sérios problemas artefatuais, dificultando a caracterização e padronização das medidas dos nucléolos (THIEBAUT *et al.*, 1984 e VIDAL *et al.*, 1994).

4. Conteúdo de DNA e análises morfométricas em lesões da próstata

As análises morfométricas das lesões prostáticas são consideradas sob diferentes aspectos: desde aquelas que envolvem medidas anatômicas (Mc NEAL, 1968) e histológicas dos lóbulos e ácinos alterados (KEETCH *et al.*, 1995), até aquelas que envolvem medidas nucleares e nucleolares (HELPAP, 1988).

Sabe-se que, ao longo do desenvolvimento morfogenético dos órgãos, ou mesmo do envelhecimento dos órgãos e tecidos, pode haver uma variação na quantidade de DNA expressa pelas aneuploidias e poliploidias (ALBERTS *et al.*, 1994) ou até mesmo hipodiploidia (VIDAL, 1994).

Estas variações nas quantidades de DNA são quantitativamente expressas principalmente nas medidas citofotométricas dos valores Feulgen/DNA pela conhecida citofotometria de varredura (VIDAL, 1984) ou pela citofotometria de fluxo (CAREY, 1994).

Alguns órgãos apresentam a poliploidia como um evento natural da maturação e do envelhecimento morfogenético: como por exemplo, o fígado (VIDAL & MELLO, 1987) e as glândulas salivares (VIDAL, 1984). Entretanto não se têm relatos de que na próstata humana normal ocorra tal fenômeno ao longo do tempo.

Os relatos apresentados por WANG e colaboradores (1992) demonstram apenas a existência de uma uniformidade de valores de área para os núcleos das células epiteliais da próstata normal. Estes mesmos autores comparam as áreas normais (benignas) com outras ditas malignas e ainda outras de identificação confusa, e verificam variação nos valores das áreas nos três casos, principalmente quando correlacionam as áreas obtidas com as medidas de DNA. Eles ressaltam que as áreas dos tumores malignos apresentam-se quase duplicadas independentemente da ploidia dos núcleos.

JONES e colaboradores (1990), estudando o conteúdo de DNA por citometria de fluxo em cortes histológicos grossos (30-50 μ m) de adenocarcinomas da próstata, concluem que a aneuploidia é um evento tardio ligado à progressão do tumor; pois a perda do material genético gera instabilidade cromatínica levando à progressão maligna. Também pela análise do conteúdo de DNA em lesões da próstata AL-ABADI & NAGEL (1990) verificam que a heterogeneidade na ploidia de células tumorais de graus avançados é alta e, num mesmo tumor, podem ser encontradas células com conteúdos de DNA variando entre 2c e 24c, com pico em 12c.

Em linhas gerais, as lesões benignas, pré-malignas e malignas da próstata podem estar agrupadas de acordo com a ploidia. O quadro apresentado a seguir (QUADRO 1) foi elaborado na tentativa de facilitar a visualização dos casos descritos e, desta forma, sistematizar os dados da literatura.

Estudo sobre aneuploidias em tumores da próstata relacionado aos resultados comparativos entre citometria de fluxo e hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi desenvolvido por PERSONS e colaboradores (1994). Neste trabalho, utilizando sondas centroméricas, os autores encontraram 88% de concordância entre os dados da citometria de fluxo (classificação da ploidia) com os dados das hibridações, em que foram detectadas principalmente perdas dos cromossomos 8 e 12.

Com o advento da microscopia de varredura confocal a laser, foram desenvolvidos trabalhos na tentativa de comparar as lesões prostáticas (BEIL *et al.*, 1996). Em análise tridimensional e do volume celular de lesões benignas e malignas, estes autores estabeleceram parâmetros matemáticos para a

QUADRO 1. Quadro demonstrativo das principais alterações na ploidia, área e volume nuclear das lesões celulares na próstata humana.

TIPOS DE LESÕES	PLOIDIA OU QUANTIDADE DE DNA	ÁREA OU VOLUME	AUTORES
Adenocarcinomas Gleason 5-6 Gleason 7-8 Gleason 9-10	36% aneuplóide 45,5% aneuplóide 71,4% aneuplóide	não analisado	FRANKFURT et al, 1985
Adenocarcinomas Gleason 3-8 Gleason 9-10	26% diplóide 53% tetraplóide 21% aneuplóide 43% diplóide 22% tetraplóide 35% aneuplóide	não analisado	LUNDBERG et al., 1987
Adenocarcinomas Gleason 4-5	40% aneuplóide	>12cc	JONES et al., 1990
Adenocarcinomas Gleason 1 Gleason 2 Gleason 3	15,2% aneuplóide 51,0% aneuplóide 72,9% aneuplóide	não analisado	AL-ABADI & NAGEL, 1990
Hiperplasia Nodular Neoplasia intra-epitelial Grupo 1 Grupo 2 Adenocarcinoma	não analisado	31,85 ± 2,88µm ² 38,28 ± 4,41µm ² 43,18 ± 6,38µm ² 50,18 ± 10,37µm ²	MONTIRONI et al., 1990a,b
Hiperplasia Nodular Adenocarcinomas bem diferenciados moderad. diferenciados pouco diferenciados	100% diplóide 75% diplóide 17,8% tetraplóide 7,2% aneuplóide 34,6% diplóide 53,8% tetraplóide 11,6% aneuplóide 12,5% diplóide 31,25% tetraplóide 56,25% aneuplóide	54,2 ± 3,1µm ² diplóide 75,6 ± 5,3 µm ² tertaplóide 96,7 ± 17,8µm ² aneuplóide 95,0 ± 12,2µm ²	WANG et al., 1992
Adenocarcinomas Gleason 1 Gleason 2 Gleason 3	não analisado	50,8 ± 3,4 µm ² 46,8 ± 0,9 µm ² 52,5 ± 1,2 µm ²	VESALAINEN et al., 1995

comparação dos resultados e concluíram haver diferenças significativas no padrão textural da cromatina e no volume celular.

Todas essas informações direcionam para um questionamento fundamental: existe relação direta entre ploidia e área nuclear nas lesões prostáticas benignas, pré-malignas e malignas? Esta relação, se existente, pode ser aplicada aos casos de tumores com núcleos pleiomórficos?

Embora alguns trabalhos abordem estas questões e sugiram especulações, os dados obtidos pelos autores são de médias de dos parâmetros morfométricos, que no caso de tumores pleiomórficos como os da próstata, a amostragem não é representativa pelas médias, as quais mascaram as variações internas dos parâmetros nas lesões.

5. Considerações sobre apoptose

Assim como a proliferação, a morte celular é um evento essencial no desenvolvimento e função dos organismos multicelulares. Os fenômenos relacionados com a morte celular podem ser observados durante todo o desenvolvimento dos organismos, desde a sua embriogênese até sua senescência (UMANSKY, 1996), ou até mesmo no estabelecimento e recuperação de patologias e estresses fisiológicos (LINDEN, 1997).

Nas últimas décadas, muitos termos surgiram para caracterizar tipos diferentes de morte celular. Em linhas gerais, a morte celular foi morfológica e bioquimicamente estudada nos processos de necrose e apoptose. Estes dois fenômenos são bem distintos pelas características morfológicas e ultra-estruturais, além de outros métodos bioquímicos e imunohistoquímicos (COTRAN *et al.*, 1994).

O reconhecimento e diferenciação de células necróticas e apoptóticas envolve principalmente fatores morfológicos. Assim, a apoptose tipicamente ocorre em células isoladas nos tecidos, é um fenômeno isolado. Já a necrose sempre ocorre em grupos de células. Nos processos necróticos frequentemente ocorre respostas inflamatórias agudas, como a exudação de neutrófilos e monócitos, o que não ocorre nos processos apoptóticos (KERR *et al.*, 1995). Desta

forma, morte celular por apoptose, ao contrário da morte por necrose, proporciona um mecanismo protetor pelo qual células com danos no DNA ou com alterações patológicas, que poderiam interferir na homeostasia tecidual ou levar à transformação neoplásica, seriam eliminadas (WILLIAMS, 1990).

Apoptose inicialmente foi referida para designar processos de mortes celulares programadas, originalmente descritas nos processos de eliminação celular durante a embriogênese (GLUKSMAN, 1950). Mais recentemente alguns autores admitem que existem muitas situações fisiológicas pelas quais a morte celular programada ocorre, por mecanismos morfológicos e bioquímicos distintos aos da apoptose (MAJNO & JORIS, 1995). Considera-se, entretanto, que a apoptose constitua um importante mecanismo de manutenção da homeostase nos tecidos normais e neoplásticos (KERR *et al.*, 1972).

É importante deixar claro que apoptose e morte programada de células são termos distintos e não sinônimos. O termo “morte celular programada” surgiu no final da década de 50 e apoptose na década seguinte. O primeiro termo se refere à mudanças fenotípicas durante a morte celular, entretanto, geneticamente programada. Este tipo de morte é visto exclusivamente durante a embriogênese e histogênese dos organismos (ZAKERI *et al.*, 1995).

Morfológicamente, a célula apoptótica apresenta uma contração citoplasmática e conseqüente diminuição da coloração. Em contrapartida a cromatina marginaliza-se, aproximando-se do envoltório nuclear e apresenta seu comportamento cromático mais intenso. A progressão da condensação nuclear na apoptose pode chegar a um alto grau de fragmentação acompanhada pela invaginação das membranas celular e nuclear, seguido por quebra do núcleo (cariorrhex). Isto origina formação de corpos apoptóticos (HOCKENBERY, 1995; MAJNO & JORIS, 1995).

Bioquimicamente a apoptose é caracterizada pela fragmentação do DNA em nível nucleossomal, que pode ser facilmente reconhecida pelo aspecto em escada do DNA de células apoptóticas nas eletroforeses em gel de agarose (BURSCH *et al.*, 1990).

Durante algum tempo alimentou-se a expectativa da descoberta de um mecanismo único, generalizado, para o processo de apoptose. No entanto, os

estudos mais recentes indicam que os mecanismos de apoptose variam em tipos diversos de células ou em condições distintas (LINDEM, 1997).

Vários genes estão relacionados com os mecanismos de apoptose. Nos vertebrados o proto-oncogene bcl-2 está fortemente implicado no controle da degeneração celular (COLOMBEL *et al.*, 1993). Também associados à regulação do ciclo celular e regulando positivamente a apoptose estão os genes p53 (SHIMAMURA & FISHER, 1996 e EFFERT *et al.*, 1993) e c-myc (LINDEN, 1997). A modulação genética da apoptose é complexa, como demonstrado pelo fato de certos genes poderem agir como indutores ou bloqueadores da morte programada, na dependência do tipo celular ou do sinal que dispara a apoptose (HARMON & ALLAN, 1997).

Outros fatores extracelulares também estão envolvidos no controle da apoptose, e incluem-se os hormônios, os fatores de crescimento, as citocinas e outras moléculas mediadoras de sinais químicos. Inclusive, na próstata, existem evidências de que a testosterona seja um potente controlador da apoptose (RAUCH *et al.*, 1997).

Todos os dados acumulados na literatura, que nesta última década se somam sobremaneira, indicam que a apoptose, bem como outras formas de mortes celulares programadas, são processos controlados por mecanismos múltiplos e interativos (LINDEN, 1997).

Os principais métodos histológicos de identificação de células apoptóticas podem ser, em linhas gerais, feitos a partir da marcação *in situ* de extremidades 3'-OH de DNA fragmentado, através de kits imunohistoquímicos (GAVRIELI *et al.*, 1992); a partir de características morfológicas e ultra-estruturais (WYLE, 1980; KERR *et al.*, 1997) ou então citoquimicamente pelo método variante da concentração crítica de eletrólitos (CEC, do inglês, *critical electrolyte concentration*) descrito recentemente por VIDAL e colaboradores (1996).

Na próstata, muitas são as pesquisas que envolvem a apoptose. Desde o desenvolvimento embrionário até o estabelecimento de neoplasias ou regressão deste órgão após a castração (TENNISWOOD, 1997; KERR, *et al.*, 1997). Entretanto, muita controvérsia ainda perdura, pois existem casos onde a taxa de apoptose parece não obedecer a lógica do estadiamento clínico da doença (BROWN *et al.*, 1996).

OBJETIVOS

1. Justificativa e relevância do tema

Devido à escassez de informações morfológicas e mesmo citoquímicas associadas à evolução na diferenciação dos tumores de próstata, o presente trabalho objetiva estabelecer padrões morfológicos e citoquímicos das células e da matriz extracelular do estroma em tumores de próstatas humanas, sendo os tumores previamente classificados por médicos patologistas.

Este tipo de estudo é de fundamental importância para o conhecimento da biologia das células e tecidos tumorais da próstata, pois histopatologicamente pode-se até vislumbrar novas oportunidades de diagnóstico para estes tumores. A análise mais pormenorizada dos tipos celulares poderá revelar padrões de distribuição das massas cromáticas e corpos nucleolares, ou até mesmo modificações relevantes na matriz extracelular do estroma, informações estas pouco abordadas na literatura.

2. Objetivos específicos

A partir dos casos levantados e já histopatologicamente diagnosticados por especialistas, no presente estudo pretende-se estabelecer os seguintes parâmetros:

- 2.1. Dados da morfologia, citoquímica e morfometria nuclear, bem como análise microscópica da textura cromática das células dos ácinos prostáticos.
- 2.2. Avaliação da morte celular programada nas hiperplasias e adenocarcinomas dos ácinos prostáticos através da análise morfológica, citoquímica e imunohistoquímica de núcleos apoptóticos destas células.
- 2.3. Dados sobre a disposição, comportamento e caracterização do componente fibroso do estroma prostático, a partir de técnicas histoquímicas.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material

Foram estudados hiperplasias nodulares e adenocarcinomas de próstatas humanas, previamente classificados e diagnosticados por patologistas do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - Autarquia Estadual (FAMERP), São José do Rio Preto, SP.

Para o presente trabalho foram levantados, ao acaso, nos arquivos de 1993 a 1995, 26 hiperplasias nodulares da próstata (*HNP*) (*B93-5936; B93-5979; B93-5994; B93-6141; B93-6187; B94-363; B94-357; B94-390; B94-433; B94-459; B94-503; B94-715; B94-742; B94-786; B94-5882; B94-5891; B94-5921; B94-5926; B94-5987; B95-26; B95-32; B95-60; B95-120; B95-160; B95-163; B95-229*) e 25 adenocarcinomas (*ACP*) em graus de diferenciação tumoral variáveis (*B93-6312; B93-6364-A; B93-6458; B93-6476; B94-228; B94-710; B94-1378; B94-1602; B94-2397; B94-2410; B94-2502; B94-2880; B94-2930AeB; B94-5889; B94-5923; B94-6198; B94-6272; B94-7610; B94-7542; B95-46; B95-219; B95-469; B95-488; B95-693; B95-706*). Todo esse material havia sido obtido de biópsias oriundas de punções por agulhas finas (PAF) ou ressecções trans-uretrais. A leitura e graduação tumoral combinada, segundo GLEASON (1977), foi procedida pela patologista Dra. Adriana Rocha, do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UNICAMP. A classificação dos tumores é descrita no quadro a seguir (QUADRO 2).

Foram considerados controles (12 casos), áreas do material anteriormente descrito, livres de comprometimento neoplásico (*NOR*) (*B93-5936-A e B; B93-6141; B94-5921; B94-6272-C; B94-715; B94-390; B94-5987; B94-459; B94-503; B95-120; B95-229; B95-60*).

QUADRO 2: Apresentação dos códigos dos pacientes, com os adenocarcinomas classificados segundo a graduação combinada de Gleason (1977).

Graduação Tumoral	Casos
Gleason 3.3 (11 casos)	B93-6312, B94-710, B94-2397, B94-2880, B94-2502, B94-5889, B94-6198, B94-7610, B94-6272, B95-469, B95-706
Gleason 3.4 (4 casos)	B94-2410, B95-046, B94-7542, B95-488
Gleason 3.5 (1 caso)	B93-6364
Gleason 4.4 (4 casos)	B93-6476, B94-1602, B95-219, B95-693
Gleason 4.5 (3 casos)	B93-6458, B94-228, B94-5923
Gleason 5.5 (2 casos)	B94-1378, B94-2930

2. Métodos

2.1. Obtenção dos cortes histológicos

Os fragmentos dos tumores obtidos haviam sido previamente fixados em formaldeído a 10%, desidratados e emblocados em parafina em ponto de fusão a 57°C.

Dos blocos cedidos pelo Laboratório, foram feitos cortes histológicos de 6 e 8µm de espessura em micrótomo rotativo manual Reichert-Jung e colhidos em lâminas histológicas com auxílio de banho-maria histológico. Depois de devidamente desparafinizados e reidratados, os cortes sofreram os seguintes procedimentos de rotina e histoquímicos:

2.1.1. Coloração pela Hematoxilina-Eosina (BEHMER *et al.*, 1976), método de rotina para a análise geral das células e do estroma prostático.

Os cortes de 6µm foram corados pela Hematoxilina de Harris por cinco minutos, diferenciados rapidamente em solução de álcool ácido (nove partes de álcool 70% e uma parte de ácido clorídrico 1N) e lavados em água corrente por dez minutos. Posteriormente, passaram por um rápido banho em álcool 80% e foram contra-corados em solução de Eosina-floxina (10:1-V/V) por dois minutos, então foram desidratados, clarificados em xilol e montados em bálsamo do Canadá.

É importante ressaltar que estas lâminas é que foram submetidas à leitura pelo patologista, para a emissão do diagnóstico histopatológico, juntamente com o bloco de parafina, também as lâminas foram cedidas pelo serviço de Arquivo do Hospital de Base para análise.

Alguns cortes corados pela Hematoxilina passaram por um banho rápido em solução saturada de carbonato de lítio, com a finalidade de remover o excesso

de corante e promover uma melhor observação da textura cromatínica (BEÇAK & PAULETE,1970). Estes cortes não foram contra-corados, e então foram desidratados, diafanizados em xilol e montados em bálsamo do Canadá.

2.1.2. Coloração pelo Azul de Toluidina a pH 4,0 segundo Vidal (MELLO & VIDAL, 1980), para estudo de ácidos nucléicos.

Os cortes histológicos de 8 μ m, depois de desparafinizados e hidratados, foram corados pelo Azul de Toluidina a 0,025% em tampão Mc Ilvaine pH 4,0 por 15 minutos em temperatura ambiente, lavados suavemente em água destilada, secados ao ar, diafanizados em xilol (Merck) e montados em resina sintética Eukitt.

2.1.3. Variante da Concentração Crítica de Eletrólitos (CEC) para discriminação de RNA (MELLO *et al.*, 1993) e apoptose (VIDAL *et al.*, 1996).

Depois de corados pelo Azul de Toluidina segundo o item anterior e lavados suavemente em água destilada, os cortes foram mergulhados em solução de cloreto de magnésio (MgCl₂) a 0,05M, por 15 minutos, sendo a seguir lavados em água destilada, secados ao ar, diafanizados em xilol (Merck) e montados em resina sintética Eukitt.

2.1.4. Controles para as reações descritas em 2.1.2 e 2.1.3.

Os cortes desparafinizados e hidratados foram submetidos a hidrólise por HCl, 1N por 6-10 minutos a 60° C, com a finalidade de se promover a extração de RNA (LISON, 1960). Também promoveu-se o tratamento dos cortes pela

condroitinase ABC (Sigma) 0,02U em tampão tris HCl pH 8,0 por 18 horas em câmara umidecida com o tampão, a 37° C (modificado de DIETRICH *et al.*, 1976). Da mesma forma, promoveu-se o tratamento dos cortes por RNase III (Sigma) a 0,1% em estufa a 37° C por 2 horas (MELLO *et al.*, 1993).

2.1.5. Reação de Feulgen para DNA (MELLO & VIDAL, 1978).

Os cortes depois de desparafinizados e hidratados foram hidrolisados pelo HCl 4N, em tempos variáveis entre 30 minutos e 2 horas e 30 minutos, a 25° C. Depois de lavados em água destilada, foram imersos no Reativo de Schiff segundo Lillie (MELLO & VIDAL, 1980) por 40 minutos à temperatura ambiente, estando os cortes protegidos da luz. Os cortes foram então lavados em água sulfurosa (metabissulfito de sódio a 10% - HCl 1N - água destilada [1:1:18 - v/v/v/]), 3 banhos de 5 minutos cada. Depois de lavagem em água destilada, os cortes foram desidratados em série alcoólica, diafanizados em xilol e montados em bálsamo do Canadá.

2.1.6. Reação imunohistoquímica para detecção *in situ* de núcleos apoptóticos. (ApopTag™ *in situ* apoptosis detection kit, de fabricação ONCOR).

Cortes histológicos de adenocarcinoma e de hiperplasias nodulares de 8 µm de espessura foram desparafinizados e reidratados. Então procedeu-se o tratamento dos cortes pela proteinase K (20µg/ml) por 15 minutos em temperatura ambiente, com cobertura dos cortes por lamínulas de plástico. Depois de lavagem abundante em PBS (solução salina tamponada), foram desenvolvidos os procedimentos do kit. As principais etapas foram: 1. Bloqueio de peroxidases endógenas pelo tratamento dos cortes com peróxido de hidrogênio a 2,0% em PBS, por 10 minutos em temperatura ambiente e posterior lavagem em PBS (três banhos de cinco minutos cada); 2. Aplicação do tampão de equilíbrio, por 25 minutos à temperatura ambiente; 3. Aplicação da enzima

TdT (terminal desoxinucleotidil transferase) e do tampão de reação na proporção 2:1 sobre os cortes e incubação em câmara úmida a 37°C, por 2 horas² ; 4. Bloqueio da atividade enzimática pelo tampão de lavagem ("stop/wash buffer"), por 10 minutos em temperatura ambiente; 5. Aplicação do anticorpo (Anti-digoxigenina/peroxidase), por 1 hora em temperatura ambiente; 6. Lavagem em PBS (três lavagens de 5 minutos cada); 7. Revelação da peroxidase com a Diaminobenzidina (DAB); 8. Contracoloração com fast green ácido por 2 segundos; 9. Desidratação em série alcoólica, clarificação em xilol e montagem em bálsamo do Canadá. O método seguiu as especificações do fabricante.

2.1.7. Impregnação pela prata para reticulina (GÖMÖRI, 1937), para análise das fibras colágenas e reticulares do estroma prostático.

Os cortes de 8µm, depois de desparafinizados e hidratados, foram oxidados em solução de permanganato de potássio a 2% por dois minutos. Depois de lavados em água destilada, os cortes foram tratados pela solução de ácido oxálico a 1% por um minuto e lavados em água destilada. Então, foram tratados pelo alumem de ferro a 2% por um minuto, lavados em água destilada e submetidos à impregnação pela prata amoniacal por dois minutos. Depois de cuidadosa lavagem em água destilada por dois minutos, os cortes foram lavados em formalina a 10% por dois minutos, e então tratados por solução de cloreto de ouro a 2% por um minuto e posteriormente lavados em água destilada. Depois de tratados por solução de hipossulfito de sódio, por três minutos e lavados em água destilada, os cortes foram desidratados, clarificados em xilol e montados em bálsamo do Canadá.

² No tampão estão contidas a digoxigenina-dUTP, que será incorporada ao DNA fragmentado pela ação da enzima TdT. Assim formando um heteropolímero de digoxigenina-11dUTP, que será reconhecido pelo anticorpo anti-digoxigenina.

2.2. Análise e documentação fotográfica

As lâminas foram analisadas e fotomicrografadas em fotomicroscópio Zeiss-Jenaval em objetivas planacromáticas de 25x, 40x e imersão; em luz policromática convencional e polarizada, usando-se filmes Kodakcolor, 135mm, ASA 100 revelados pelo sistema automático dos laboratórios Jetcolor da cidade de São José do Rio Preto (SP) e Campinas (SP). As fotomicrografias utilizadas para as análises morfométricas foram feitas em filme preto e branco Kodak TRI-X pan (100ASA) em objetiva planapocromática de imersão, com optovar 1,25x.

2.3. Análises morfométricas

Foram determinados valores de áreas, perímetros e fator forma para os núcleos celulares das lesões da próstata a partir de ampliações dos negativos dos cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina. A amostra foi constituída de 200 núcleos por caso analisado, escolhidos ao acaso.

Os contornos nucleares obtidos com lápis preto de ponta fina, sob ampliador fotográfico, com a altura da aplicação previamente padronizada, foram reproduzidos em papel milimetrado, os quais foram levados para o analisador de imagem MOP-VIDEOPLAN (Kontron). Deste aparelho foram obtidos valores das áreas e perímetros nucleares em "pixels".

A calibração do aparelho para μm^2 (no caso de áreas nucleares) e μm (no caso de perímetros nucleares) se deu da seguinte maneira:

Fêz-se medidas de quadrados com área conhecida de $100 \mu\text{m}^2$ e conseqüentemente perímetro igual a $40 \mu\text{m}$, das quais foram obtidos valores em "pixels" (média das áreas = $2136,262 \text{ "pixels}^2$ " e média dos perímetros = $185,926 \text{ "pixels"}$).

A partir destes dados obtiveram-se duas constantes: para área = $0,0468$ e para perímetro = $0,2164$. Estas constantes multiplicadas aos valores em "pixels" obtidos para área nuclear e perímetro nuclear, respectivamente, promoveram a transformação dos valores para μm^2 (de áreas nucleares) e para μm (de

perímetros nucleares). Desta forma pôde-se simplificar o descrito acima nas seguintes fórmulas matemáticas:

$$\text{Área Nuclear } (\mu\text{m}^2) = \text{áreas nucleares em "pixels"} \times 0,0468$$

$$\text{Perímetro Nuclear } (\mu\text{m}) = \text{perímetros nucleares em "pixels"} \times 0,2164$$

O fator forma, por ser um índice adimensional, não necessitou transformações matemáticas. Os valores dados pelo MOP-VIDEOPLAN, foram portanto absolutos.

O fator forma do perímetro utilizado pelo programa do MOP-VIDEOPLAN é dado pela seguinte fórmula matemática:

$$\frac{4 \pi \times \text{Área}}{(\text{Perímetro})^2}$$

Onde para um círculo perfeito tem-se:

$$\frac{4 \pi \times \pi R^2}{(2 \pi R)^2} = 1$$

e, para as formas que se afastam do círculo, os valores são menores que 1.

2.4. Análise Estatística

Para a análise dos dados de área, perímetro e fator forma nuclear procedeu-se a uma análise estatística constituída de estatísticas descritivas, testes de hipóteses e ajustes de curvas.

As ferramentas estatísticas empregadas foram:

2.4.1. Estatística descritiva: medianas, quartis e valores extremos.

2.4.2. Testes de hipóteses: Teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, para comparação entre 2 ou mais grupos (HOLLANDER & WOLFE, 1973) e Teste não-paramétrico da mediana para comparação de 2 amostras (NOETHER, 1976). Para os testes de hipóteses foi adotado um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$).

2.4.3. Gráficos: desenhos esquemáticos em “*box-plot*” e gráficos de dispersão.

2.4.5. Ajuste de curvas: coeficiente de correlação de Pearson e ajuste da reta de regressão de mínimos quadrados (NOETHER, 1976).

O pacote estatístico utilizado para obtenção dos resultados, bem como a construção dos gráficos e esquemas foi o STATISTICA (Copyright©1990-1995. Microsoft Corp. StatSoft, Inc. 1992).

RESULTADOS

Os dados de morfologia e citoquímica acham-se documentados em 17 pranchas de micrografias, as quais serão descritas de acordo com quatro itens considerados importantes para o estudo das lesões prostáticas: basofilia e distribuição cromatínica, apoptose, cariometria e disposição dos componentes fibrilares do estroma.

Os resultados da análise estatística estão apresentados em 3 gráficos, 6 tabelas e 3 figuras de “*box-plot*” e, sequencialmente, os valores de área, perímetro e fator forma.

1. Basofilia, forma nuclear e distribuição cromatínica na próstata

1.1. Células epiteliais prostáticas normais

As células epiteliais prostáticas normais apresentam seus núcleos posicionados para-basalmente nas células acinares (FIGURA 1a) com respostas de coloração não muito variáveis. A condensação e a distribuição das massas cromatínicas são uniformes. Pode-se observar, de maneira geral que nos núcleos normais, há uma condensação cromatínica periféricamente ao contorno nuclear (FIGURA 2).

Mesmo quando submetidos à reação de Feulgen, os núcleos apresentam formas e padrões cromatínicos semelhantes entre si, à semelhança da resposta cromática obtida após hematoxilina-eosina (FIGURAS 7a,b).

Quando da análise do material corado pelo azul de toluidina (FIGURA 8), a resposta basofílica difere consideravelmente dos padrões cromáticos e texturais anteriormente descritos. A uniformidade da coloração e a homogeneidade da resposta indicam uma alta disponibilidade de grupamentos aniônicos nestes tipos celulares. A digestão com RNase foi satisfatória, removendo eficientemente

o RNA do citoplasma (FIGURAS 8b,d) mesmo estando o material fixado em formalina a 10%. Para as células normais, a variante de CEC para discriminação de RNA do DNA, não foi informativa para os nucléolos (FIGURA 8c).

Nestes tipos celulares os nucléolos são inconspícuos e conseqüentemente de difícil observação.

1.2. Células epiteliais da hiperplasia nodular da próstata

Nas regiões de hiperplasia, a distribuição cromatínica nos núcleos dos ácinos hiperplásicos (FIGURA 1b) é aparentemente mais homogênea. Entretanto, a forma nuclear pode variar desde arredondada (FIGURA 3) até aquelas mais alongadas (FIGURAS 1c,d), ou até mesmo com contornos levemente irregulares (FIGURAS 3g ; 4d).

Em relação ao padrão de coloração da cromatina (FIGURAS 3 e 4), este aproxima-se muito do padrão descrito para as células normais, com algumas pequenas variações quanto à uniformidade de coloração nuclear (FIGURA 3), ausência de granulações (FIGURAS 3b,e,i) e maior facilidade de visualização de nucléolos (FIGURAS 4a, b, d, e, f,g).

Assim como nas células normais, a resposta à reação de Feulgen apresentou padrões semelhantes àqueles obtidos após coloração por hematoxilina-eosina (FIGURA 7c-e). Algumas células do epitélio hiperplásico, quando coradas pela reação de Feulgen, apresentaram fenótipos nucleares hipercromáticos suspeitamente apoptóticos (FIGURA 7e).

As respostas de coloração ao azul de toluidina nas regiões hiperplásicas também são equivalentes àquelas obtidas nas células normais (FIGURA 9a), o mesmo ocorrendo com os tratamentos enzimáticos por RNase (FIGURAS 9b, d). Entretanto, o tratamento pela variante de CEC pôde identificar e discriminar corpos metacromáticos no citoplasma (FIGURAS 9c, 11c, 12c); adjacentes aos núcleos (FIGURAS 12a, b) e até no espaço luminal (FIGURAS 11a, b).

Estes corpos metacromáticos evidenciados pelo método proposto por MELLO e colaboradores (1993), para discriminar DNA de RNA, foram digeridos quase que na totalidade pela RNase (FIGURA 12d). Admite-se que a digestão

não tenha sido total pelo fato deste material estar fixado em formalina a 10%, o que é um fator limitante para a digestão enzimática (LISON, 1960). Por outro lado, os mesmos não sofreram a ação da condroitinase ABC (FIGURA 12e), fato que elimina a possibilidade de os corpos conterem glicosaminoglicanos ácidos, confirmando a sua constituição ribonucleoprotéica.

1.3. Células epiteliais dos adenocarcinomas da próstata

Em linhas gerais os núcleos dos adenocarcinomas da próstata são maiores e a cromatina mais fracamente corável e menos compacta do que os núcleos normais e hiperplásicos (FIGURA 1e). Dependendo do grau do tumor, existem dificuldades de identificação de padrões acinares nestas lesões.

Em relação à distribuição da cromatina nos núcleos tumorais dos diversos casos estudados (FIGURAS 5, 6 e 7) pôde-se identificar padrões desde aqueles próximos aos normais (FIGURA 5f) e hiperplásico (FIGURAS 6b, f) até padrões altamente descompactados (FIGURA 5b, j), reticulados (FIGURA 5e) e vacuolizados (FIGURAS 7f-h). Nos casos de maior invasividade tumoral foram detectadas figuras de mitose (FIGURAS 6c, f) e núcleos com pleiomorfismo acentuado (FIGURA 5g).

Devido ao fato da distribuição cromatínica ser frouxa e até mesmo com ausência de granulações, os nucléolos são mais conspícuos (FIGURA 5k).

Os núcleos dos tumores, quando corados pelo azul de toluidina, apresentaram um fenótipo de frouxidão cromatínica em comparação com os casos normais e hiperplásicos (FIGURA 10). Quando tratados pela Rnase, passaram a exibir espaços com imagem negativa possivelmente representando nucléolos (FIGURAS 10b, c). Imagens semelhantes podem ser observadas após reação de Feulgen (FIGURA 7).

A variante de CEC não discriminou satisfatoriamente os nucléolos (FIGURAS 10 d, e). Isto se deve provavelmente pela preservação de proteínas associadas ao DNA e compactação do complexo DNA-proteína, fazendo com que os valores de CEC do DNA sejam atingidos em molaridades de Mg^{2+} mais elevadas do que a proposta por MELLO *et al.* (1993) e, portanto, não

diferenciando adequadamente RNA de DNA nessas células (MONTEIRO, 1993; FALCO & MELLO, 1996).

Os corpos metacromáticos de constituição ribonucleoprotéica não foram detectados nas regiões de crescimento tumoral, entretanto, nas regiões de hiperplasia que comumente acompanham os adenocarcinomas, tais corpos metacromáticos foram vistos.

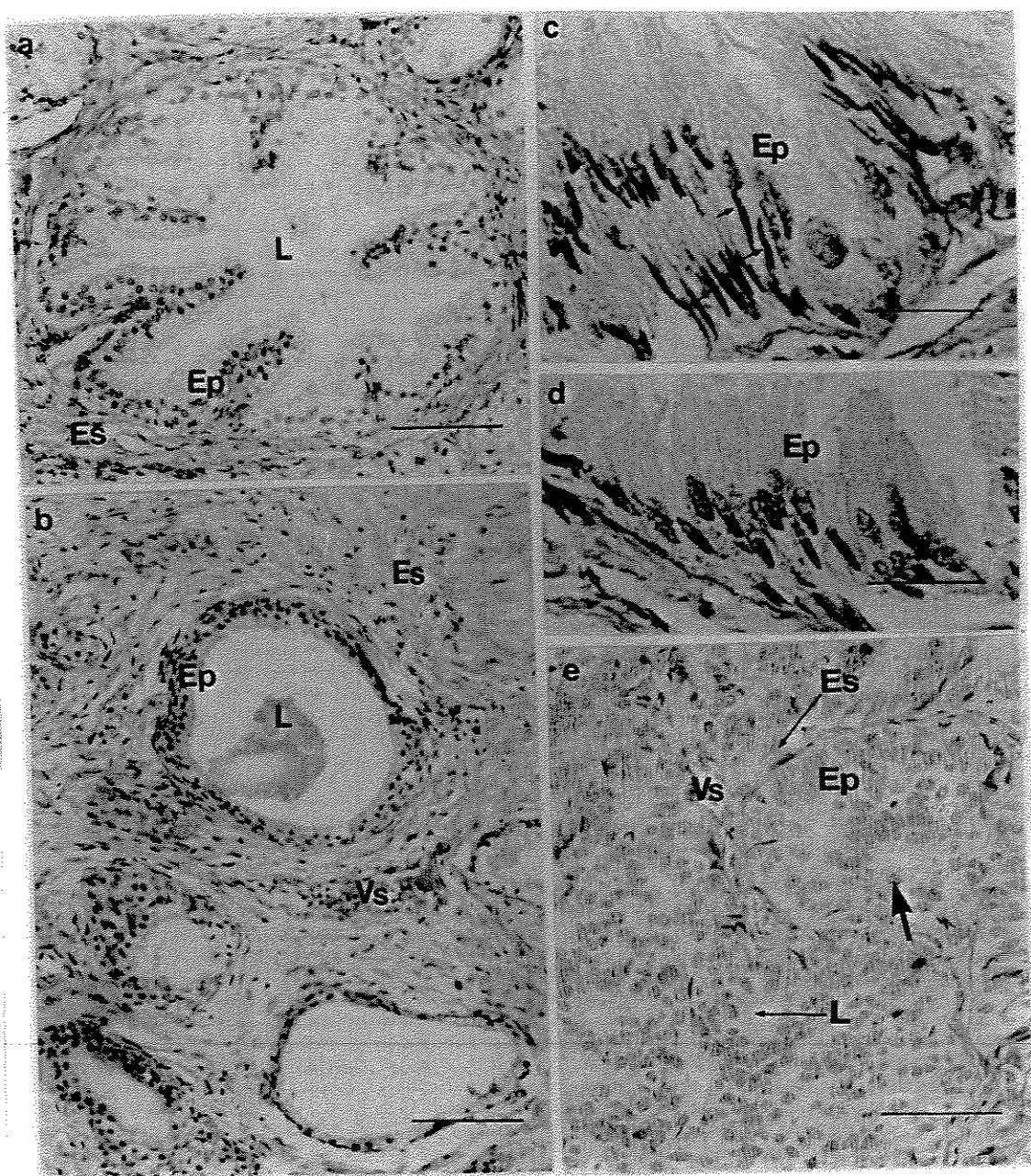


FIGURA 1. Cortes histológicos de próstatas humanas corados pela hematoxilina-eosina. a) Vista geral de um ácino prostático normal. O epitélio (Ep) simples com pregas epiteliais voltadas para o lúme (L) é característico da ausência de comprometimento neoplásico. O estroma (Es) apresenta seus constituintes celulares e fibrilares organizados concentricamente à porção glandular. Barra= 25 μ m. b) Vista geral de uma porção epitelial hiperplásica. O epitélio (Ep) apresenta aumento nas camadas celulares. Por vezes o estroma (Es) pode estar envolvido na lesão hiperplásica. Vasos sanguíneos (Vs), Lúme (L). Barra=25 μ m. c-d) Regiões de hiperplasia nodular na próstata onde observa-se uma modificação na forma nuclear das células epiteliais (Ep). Estas células assumem uma forma fusiforme, com a cromatina mais densamente corável (setas). Barra=50 μ m. e) Região de adenocarcinoma prostático mostrando uma celularidade acentuada, dificultando a delimitação das porções epiteliais (Ep) e uma diminuição dos componentes do estroma (Es). Lúme (L), vaso sanguíneo (Vs). Mitose (seta). Barra=50 μ m.

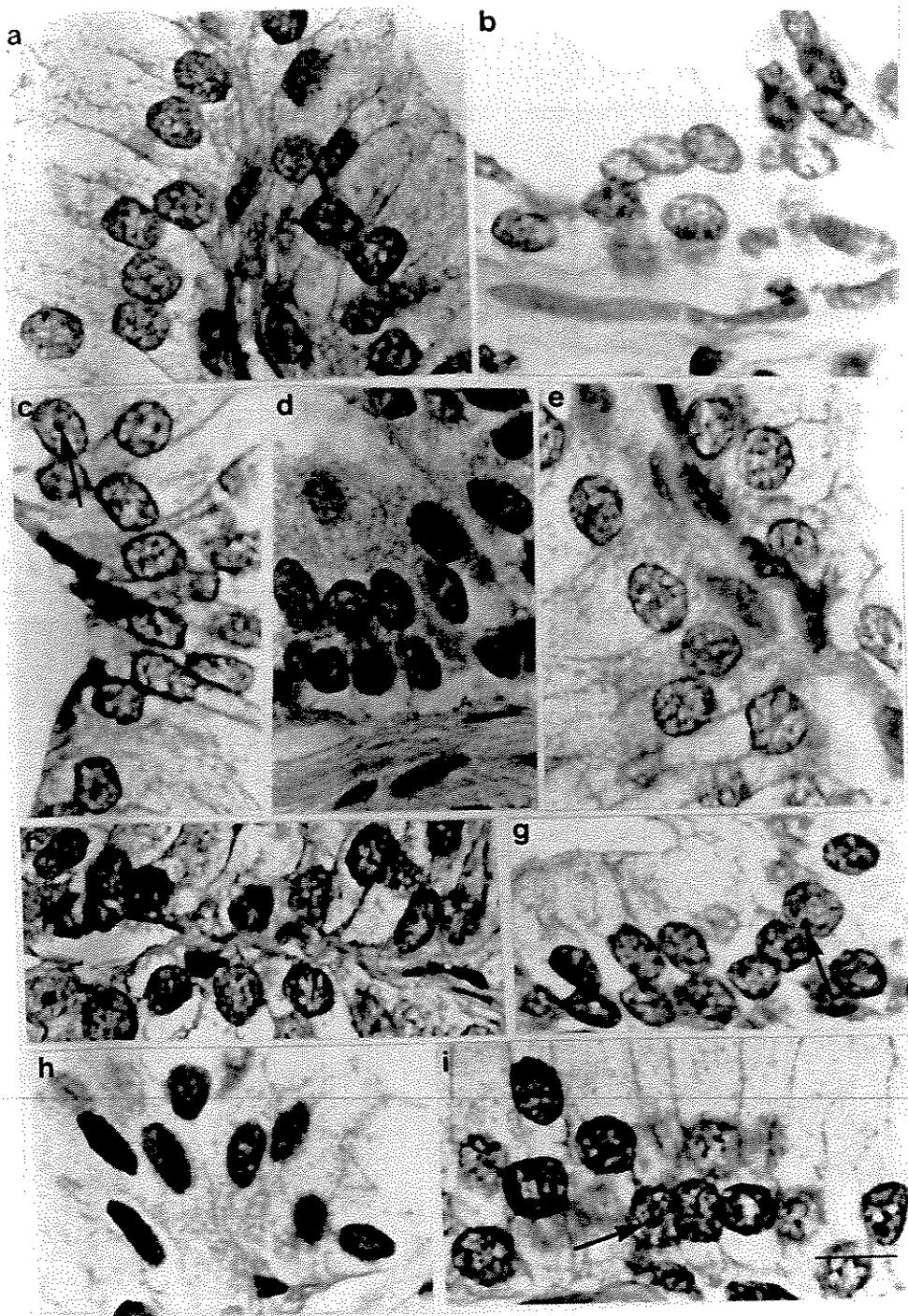


FIGURA 2. Cortes histológicos de regiões livres de comprometimento neoplásico (normais) na próstata humana submetidos à coloração pela hematoxilina-eosina. Os núcleos mostrados em todas as figuras apresentam pequenas variações no padrão textural da cromatina. Nestes núcleos podem ser observados pequenos e quase inconspícuos nucléolos (setas). Barra = 10 μ m.

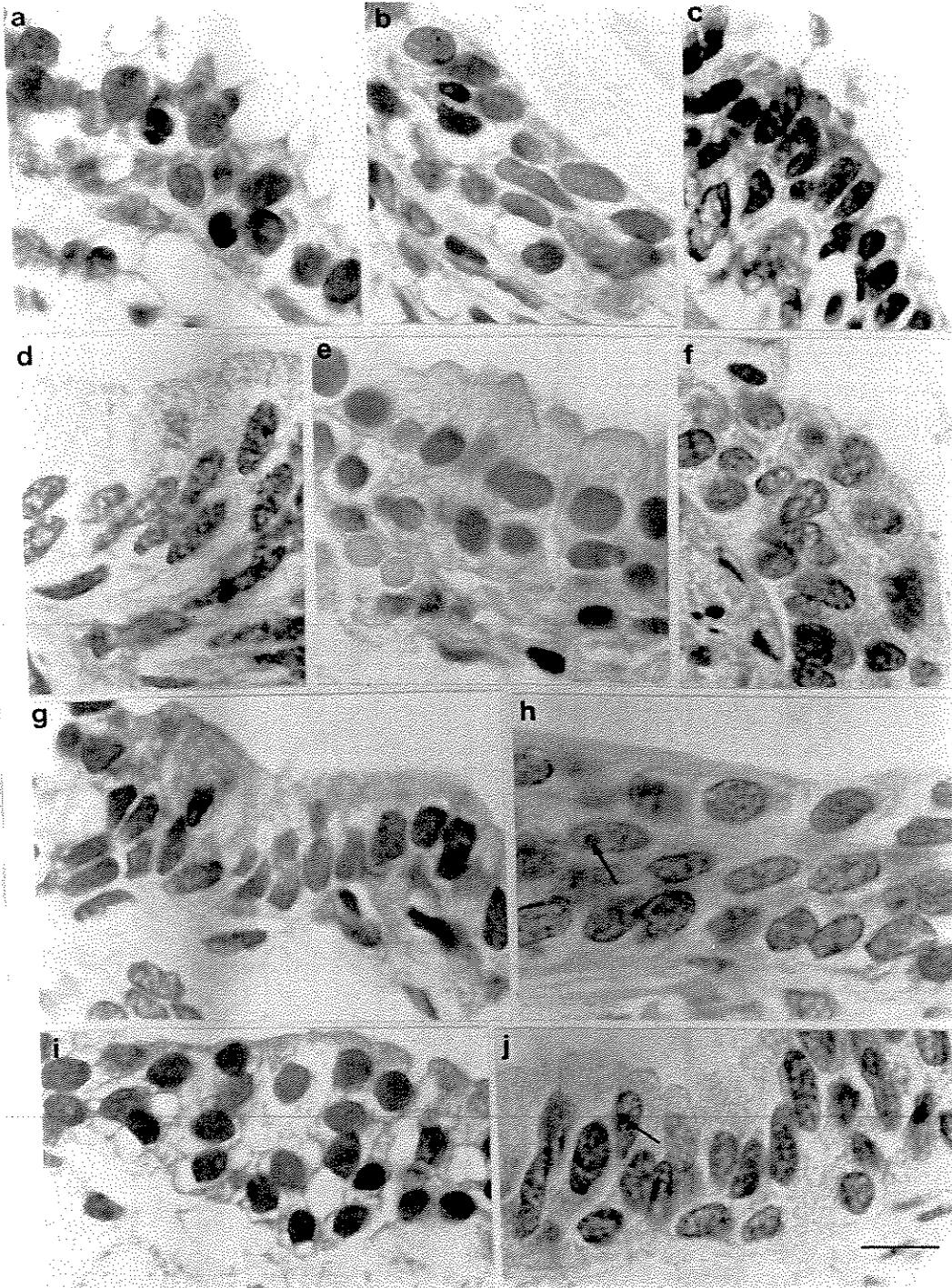


FIGURA 3. Cortes histológicos de hiperplasias nodulares da próstata humana corados pela hematoxilina-eosina. Os núcleos dos ácinos hiperplásicas, assim como nas áreas de controle, apresentam uma homogeneidade no padrão de distribuição cromatínica, entretanto com nucléolos mais raramente observáveis (seta). Nestas lesões pôde-se observar um alongamento dos núcleos em determinadas regiões (d,j) e contornos nucleares levemente irregulares (g). Barra = 10 μ m.

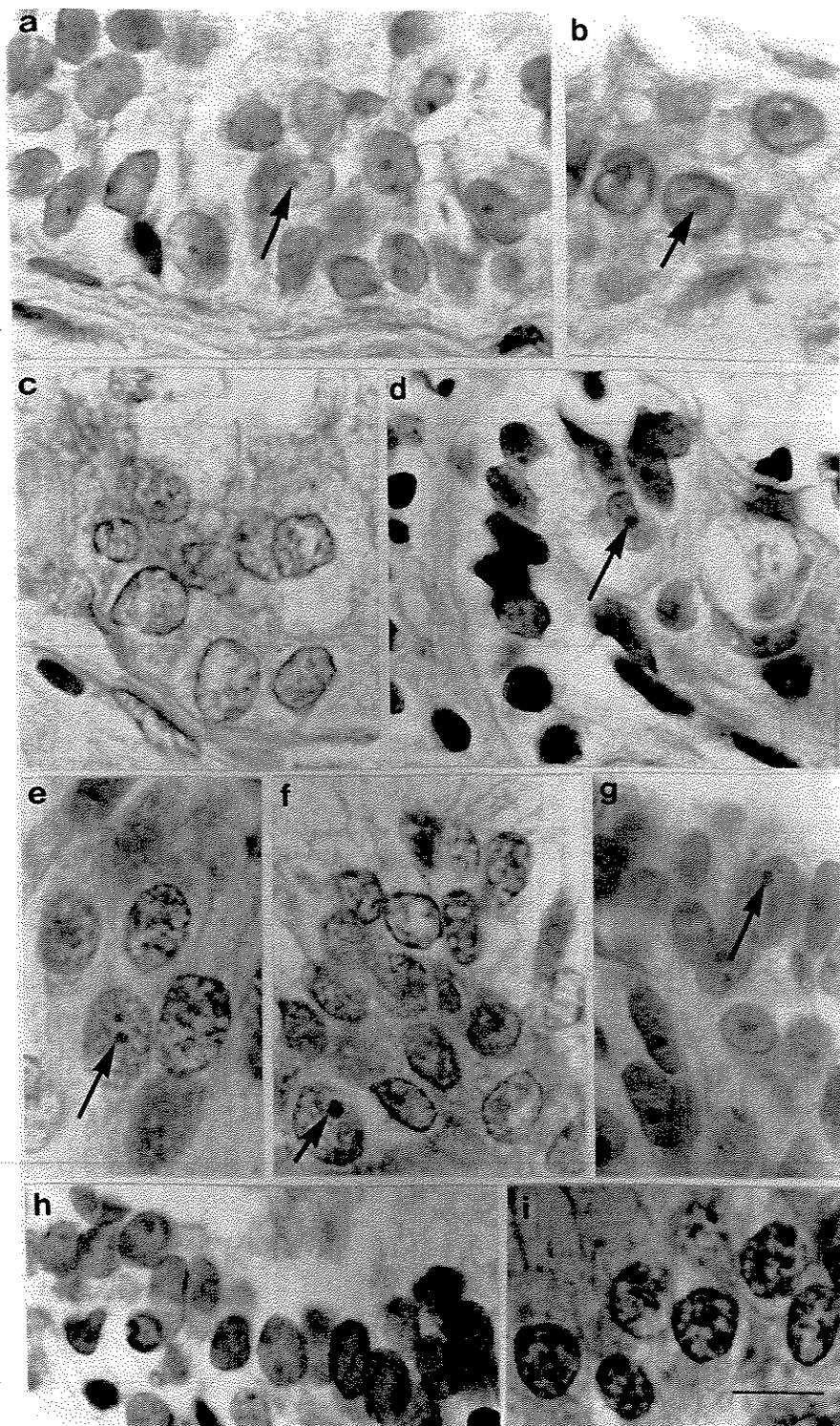


FIGURA 4. Cortes histológicos de hiperplasias nodulares da próstata humana corados pela hematoxilina-eosina. Os núcleos dos ácinos hiperplásicos nestas regiões selecionadas apresentam uma menor compactação da cromatina, permitindo a visualização dos nucléolos (setas). Nestas regiões a cromatina distribui-se em padrão textural liso (a,b,d,g,h) ou então levemente granular, à semelhança das regiões normais (c,e,f,i), a figura g mostra irregularidade nos contornos nucleares. Barra = 10 μ m.

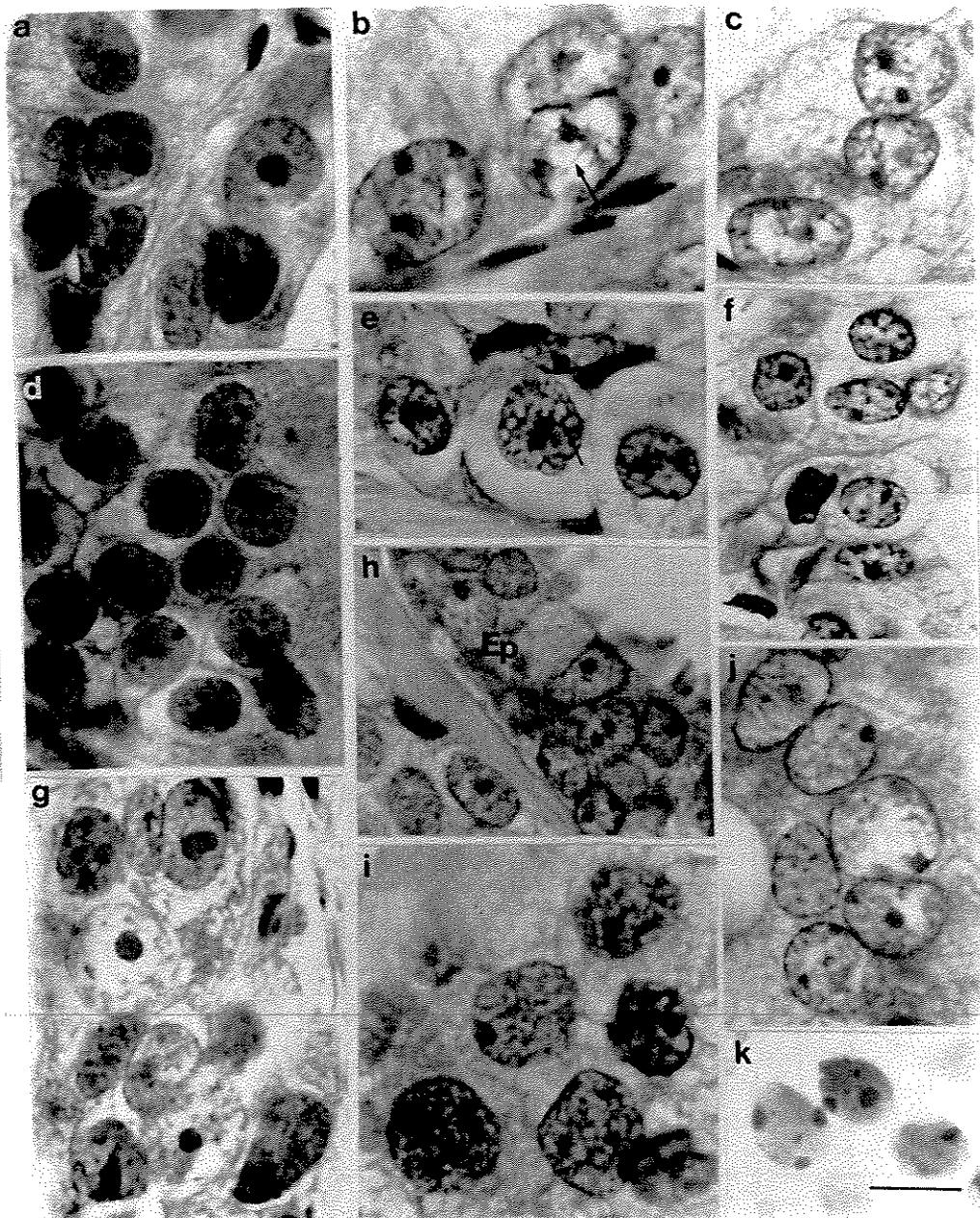


FIGURA 5. Cortes histológicos de adenocarcinomas da próstata humana corados pela hematoxilina-eosina. Nesta lesão observa-se um pleiomorfismo nuclear e não homogeneidade na distribuição da cromatina, variando desde o padrão próximo ao fenótipo normal (f) até padrões em rede (e), núcleos com áreas descompactadas uniformemente distribuídas (i), núcleos com distribuição de finos filamentos cromatínicos (setas), núcleos com cromatina de distribuição granular (c,g) e textura lisa (a,d,k). A presença dos nucléolos é facilmente observável devido ao padrão frouxo de organização da cromatina. Epitélio (Ep). Barra = 10 μ m.

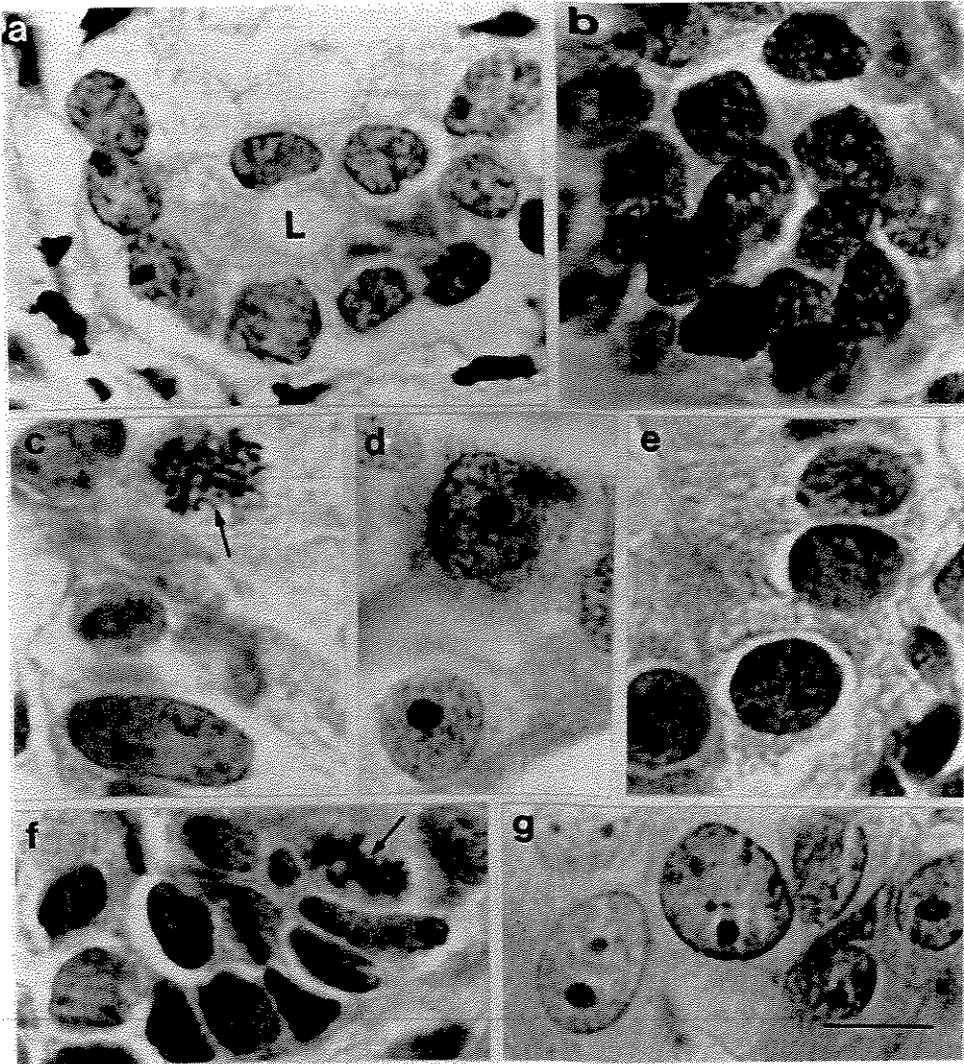


FIGURA 6. Cortes histológicos de adenocarcinomas da próstata humana corados pela hematoxilina-eosina. Os núcleos selecionados nesta figura mostram um pleiomorfismo e heterogeneidade na distribuição da cromatina, à semelhança da figura anterior. Lúme (L); mitoses (setas). Barra = 10 μ m.

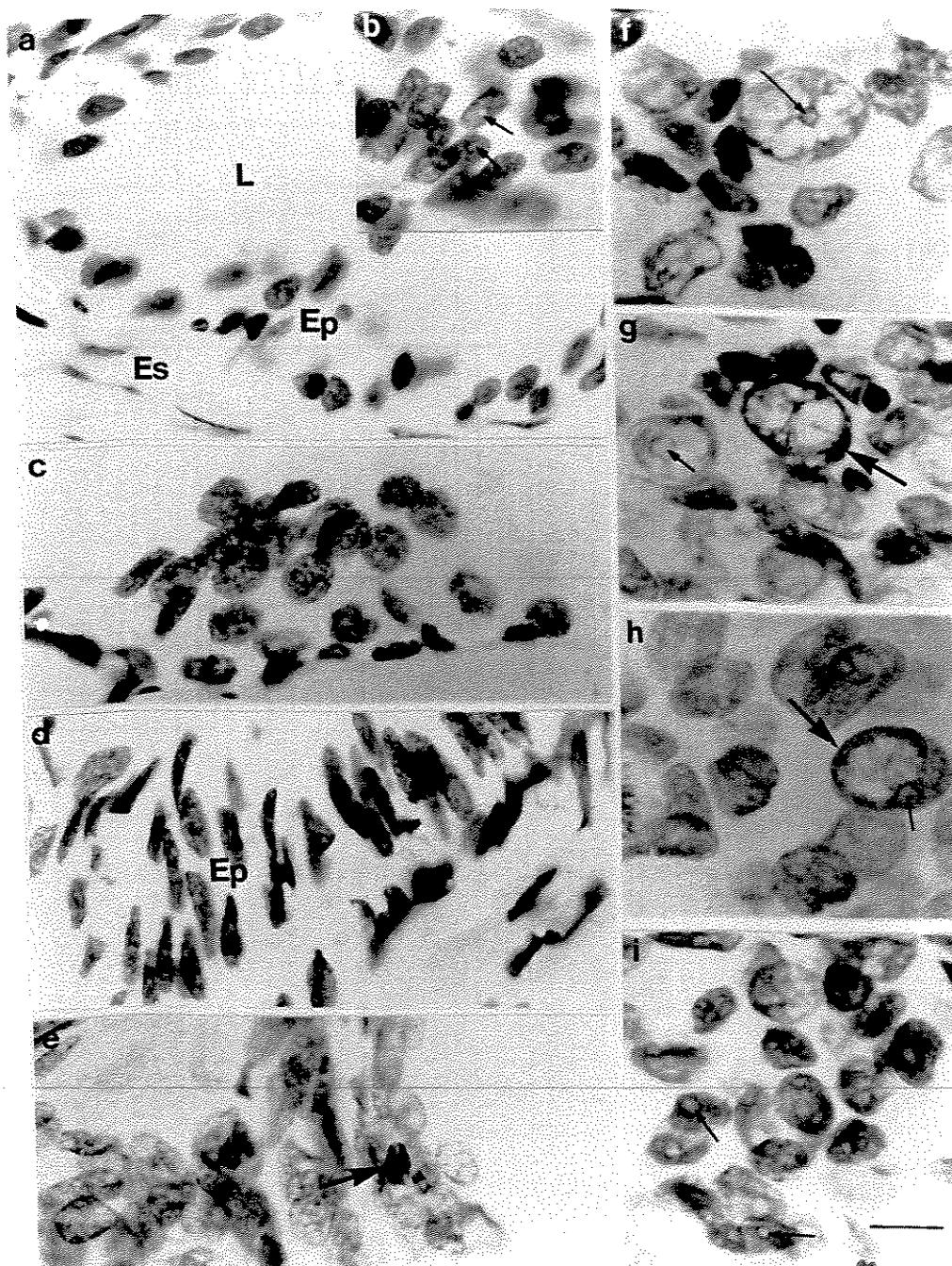


FIGURA 7. Cortes histológicos de próstatas humanas submetidos à reação de Feulgen. O padrão de distribuição cromatínica corresponde àquele obtido após coloração por hematoxilina-eosina. As regiões nucleolares estão em imagem negativa (setas menores). As áreas de condensação cromatínica estão apontadas pelas setas maiores. Núcleos de regiões livres de comprometimento neoplásico (a,b); núcleos de hiperplasias nodulares (c,d,e); núcleos de adenocarcinomas (f,g,h,i). Epitélio (Ep); Estroma (Es). Barra = 10 μ m.

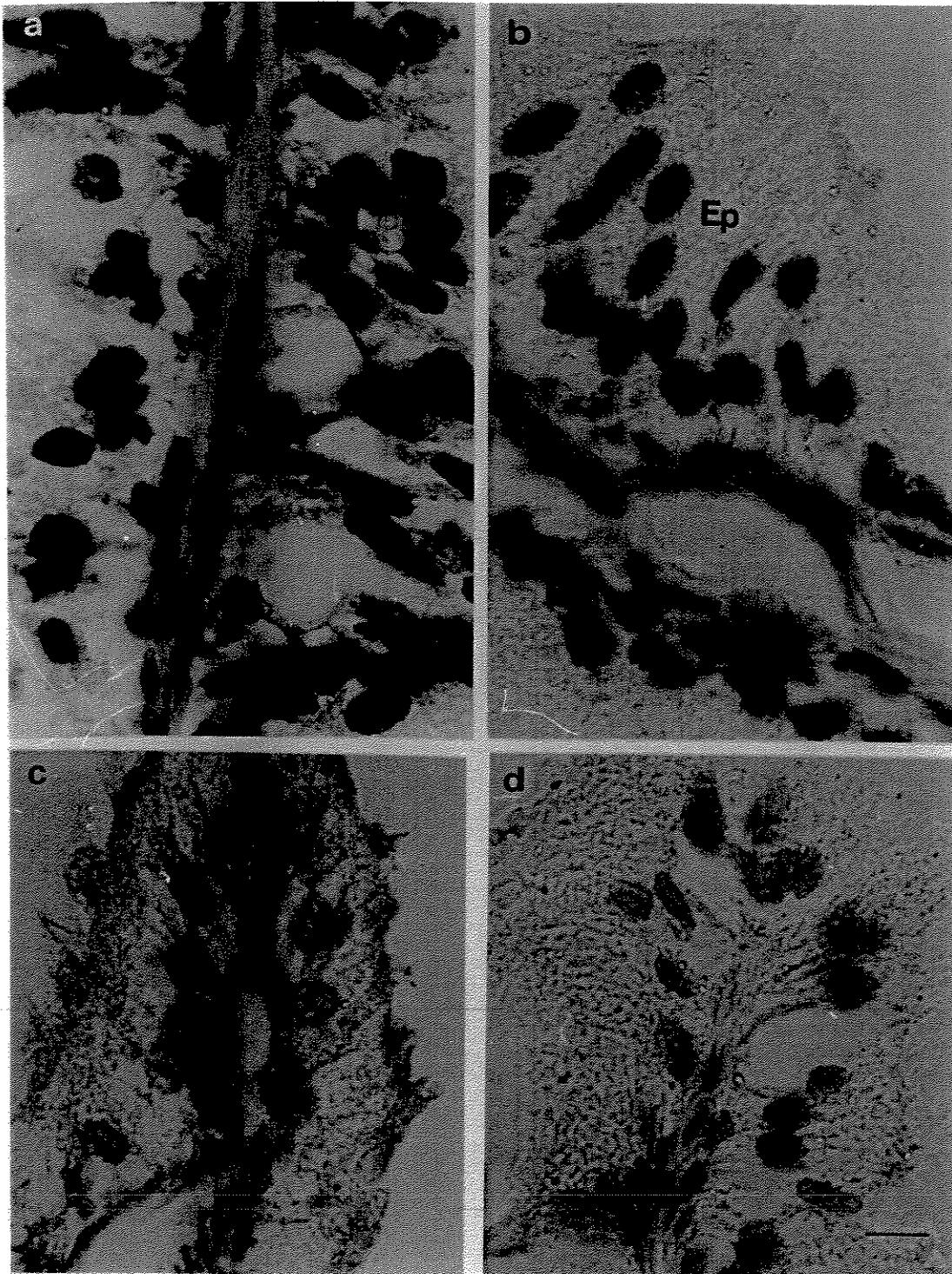


FIGURA 8. Cortes histológicos de regiões normais da próstata corados pelo azul de toluidina. Os núcleos coram-se uniformemente, não sendo possível a observação de nucléolos, nem grumos mais corados na cromatina. a) Coloração convencional. b) Coloração precedida por digestão enzimática pela RNase. c) Variante de CEC. d) Variante de CEC precedido por tratamento pela RNase. Barra = 10 μ m.

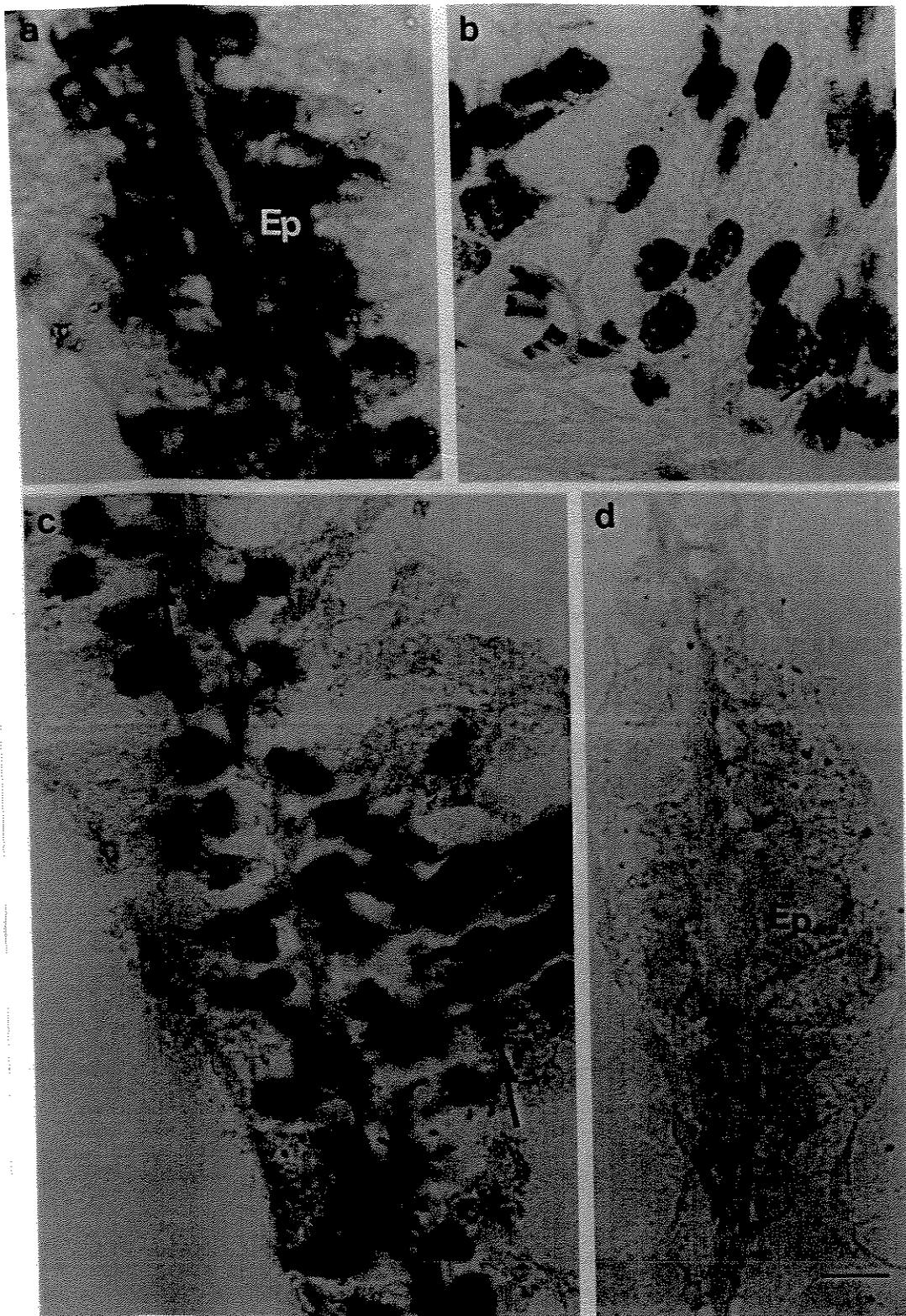


FIGURA 9. Cortes histológicos de hiperplasias nodulares prostáticas. a) Coloração pelo azul de toluidina. Os núcleos, à semelhança dos normais, coram-se uniformemente. Epitélio (Ep). b) O tratamento pela RNase revela nos núcleos hiperplásicos algumas regiões de nucléolo evidenciadas como imagem negativa (seta). c) A variante de CEC permite a observação de corpos metacromáticos (setas) no epitélio hiperplásico. d) Variante de CEC precedida por tratamento com RNase não evidencia corpúsculos metacromáticos. Barra = 10µm.

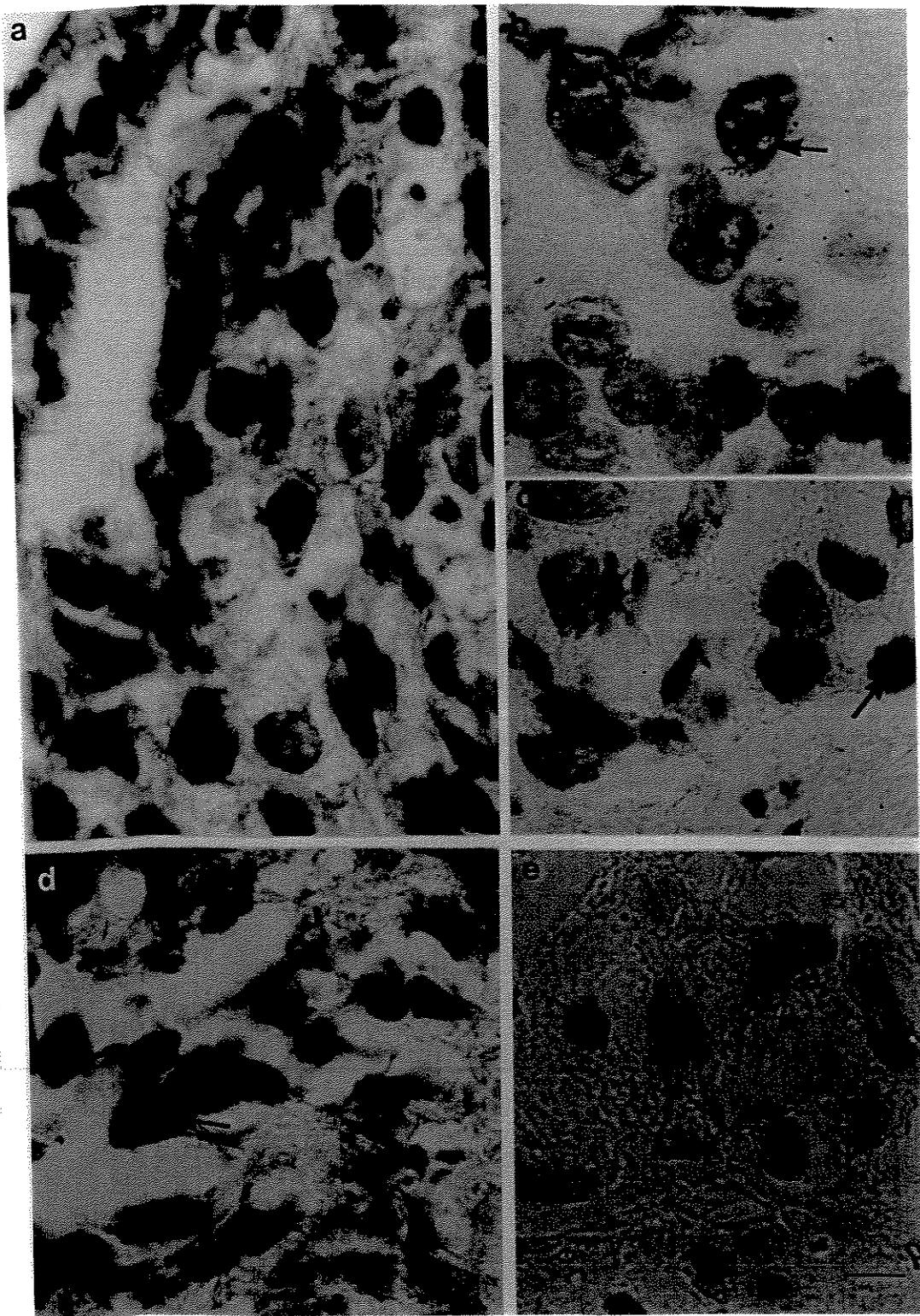


FIGURA 10. Cortes histológicos de adenocarcinomas de próstata corados pelo azul de toluidina. a) A coloração convencional revela uma intensa coloração dos núcleos adenocarcinomatosos. b-c) A digestão enzimática pela RNase mostra algumas imagens negativas correspondentes a áreas nucleolares (seta). d) Variante de CEC indicando nucléolos pouco diferenciados da coloração da cromatina (seta). e) Variante de CEC precedida por reação enzimática com RNase. Barra = 10 μ m.

2. Apoptose nas lesões da próstata

As análises das hiperplasias prostáticas coradas com a reação de Feulgen (FIGURA 7 e), azul de toluidina (FIGURAS 11a, b) e variante de CEC (FIGURAS 11c, 12, 13a) demonstraram imagens suspeitas de fenômenos apoptóticos, como os descritos por VIDAL e colaboradores (1996). Corpos apoptóticos não foram detectados nos tumores e nas regiões normais próximas a eles e também naquelas consideradas por nós como controle.

A análise dos cortes submetidos ao teste imunocitoquímico para detecção de células em apoptose (Apoptag) revelou uma concordância com os dados obtidos pela variante de CEC (FIGURA 13b-f).

Como mostram as micrografias, ambas as metodologias revelam eventos apoptóticos somente nas regiões de hiperplasias nodulares (FIGURAS 13b-e) e ausência de marcação nos adenocarcinomas (FIGURA 13f). Nas lâminas dos adenocarcinomas, foram encontrados corpos e células apoptóticas apenas nas regiões de hiperplasias associadas à periferia das áreas de tumor.



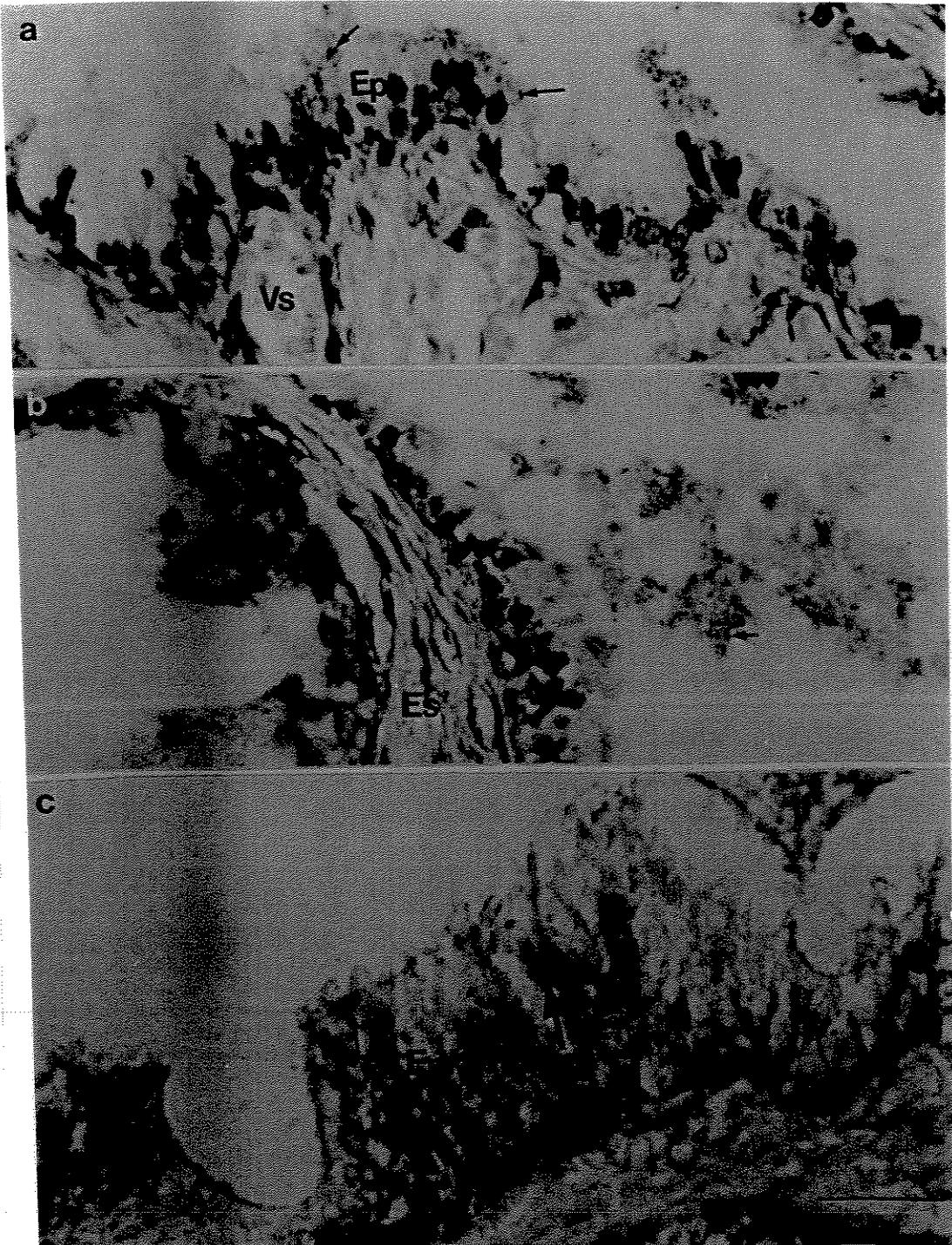


FIGURA 11. Visão geral dos epitélios acinares (Ep) com crescimento hiperplásico, submetidos à coloração pelo azul de toluidina (a,b) e pelo método da CEC para discriminar RNA de DNA (c). Corpos metacromáticos de complexos RNA-proteína podem ser observados nas células epiteliais (setas em a) e também no espaço luminal do ácino hiperplásico (seta em b). Na figura c o DNA está sendo observado em verde (seta menor), o qual está sendo discriminado do RNA que se cora metacromaticamente em púrpura (seta maior). Vaso sanguíneo (Vs), Estroma (Es). Barra = 50µm.

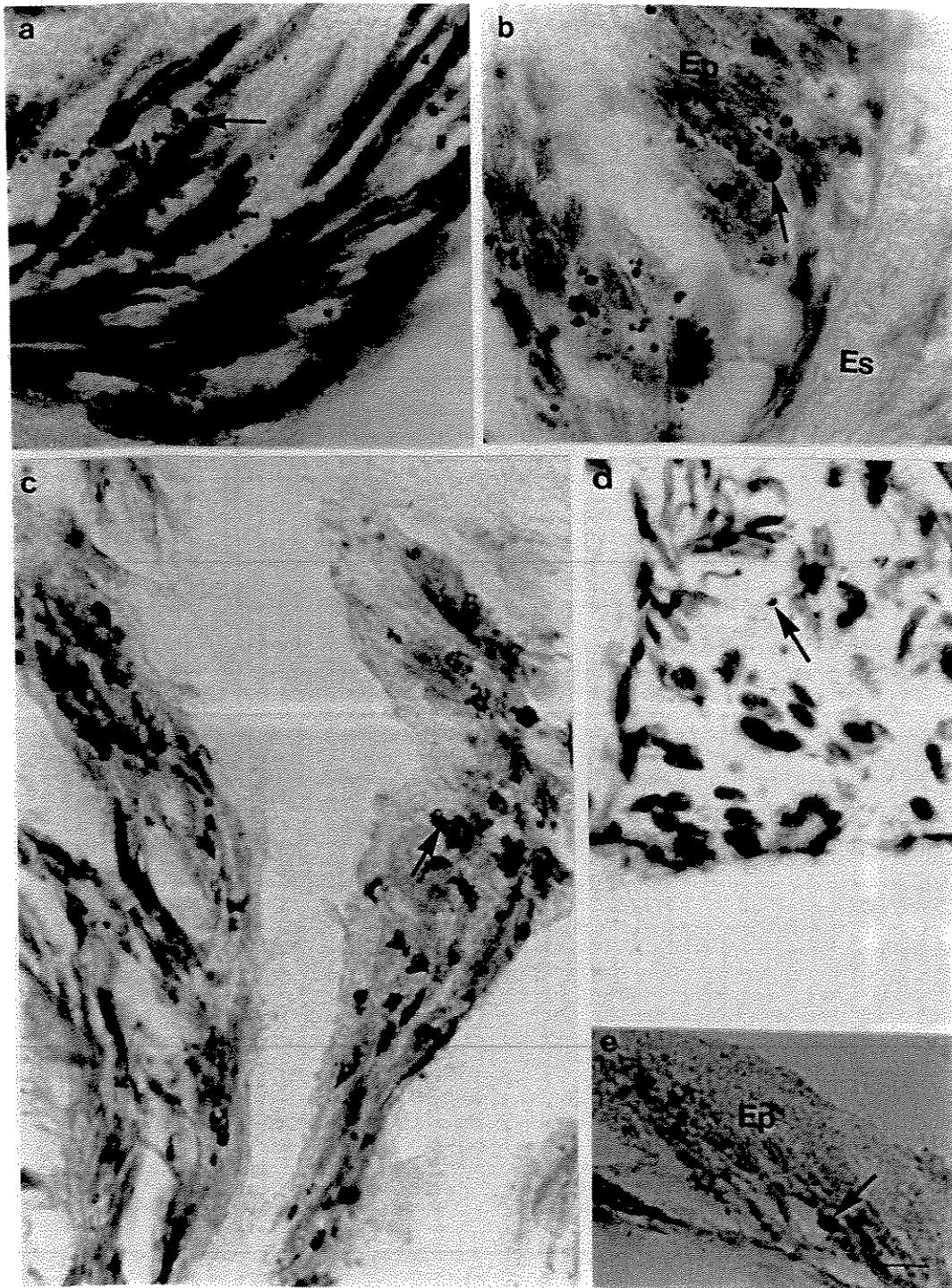


FIGURA 12. Detalhes das regiões hiperplásicas apresentando corpos apoptóticos metacromáticos (setas). (a) Coloração pelo azul toluidina. b-c) Método variante de CEC resalta os corpos metacromáticos de complexos RNA-proteína. d) Variante do método de CEC precedido por tratamento com RNase. A remoção do RNA não foi total devido ao fato dos fragmentos de tecido terem sido fixados em formalina. e) Variante de CEC precedido por tratamento com condroitinase ABC, com a finalidade de remover os glicosaminoglicanos, exibindo metacromasia não abolida dos corpos apoptóticos. Epitélio (Ep), Estroma (Es). Barra = 10 μ m.

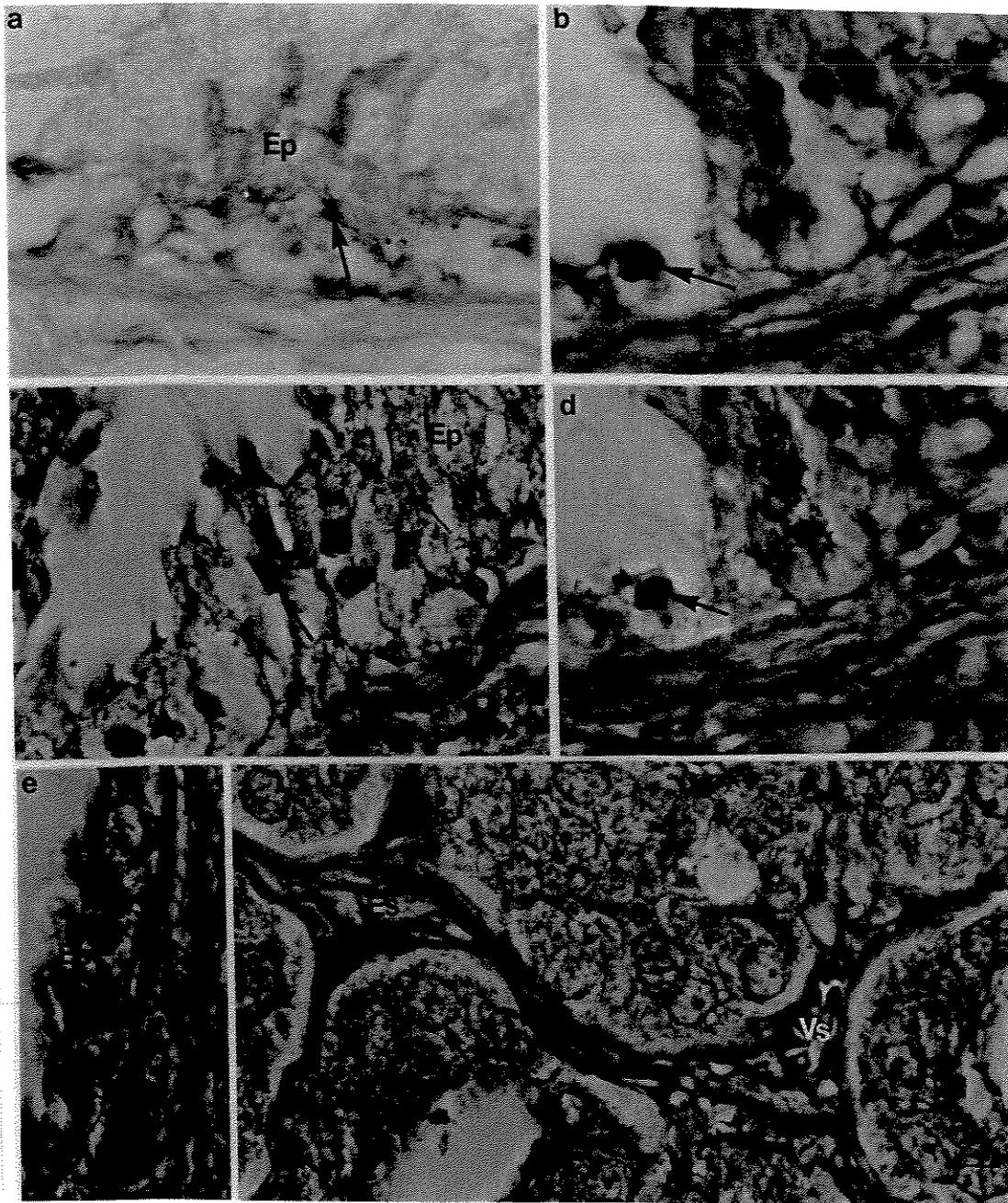


FIGURA 13. Cortes histológicos de próstata humana tratados pelo teste imunocitoquímico para detecção de apoptose (Apoptag-Oncor) e contra-corados pelo fast green ácido. As regiões evidenciadas pelo método da CEC (a) são correspondentes àquelas marcadas pelo Apoptag. As marcações acontecem somente nos ácinos hiperplásicos (b,c,d,e) e não nas áreas de adenocarcinomas (f). As setas maiores indicam os núcleos apoptóticos e as menores os núcleos íntegros. Vasos sanguíneos (Vs); Epitélio (Ep). Barra = 10 μ m.

3. Parâmetros cariométricos em células acinares da próstata

Os dados estatísticos referentes à cariometria foram plotados em figuras do tipo *Box plot* (FIGURAS 14, 15 e 16) e os resultados dos testes de Kruskal-Wallis em tabelas (TABELAS 1 a 6). Os coeficientes de correlação entre área e perímetro, bem como o traçado de suas retas de regressão foram plotados nos gráficos de dispersão respectivos (FIGURAS 17, 18 e 19).

Para maior facilidade e visualização dos resultados os dados das medidas de área, perímetro e fator forma estão apresentados sequencialmente.

Os valores utilizados para o teste de Kruskal-Wallis são as medianas, calculadas para os 200 núcleos de cada paciente. Assim, foram compostas amostras com 12 valores para núcleos normais, 26 para núcleos das hiperplasias e 25 para adenocarcinomas. Tal decisão surgiu por causa da variabilidade na distribuição dos valores em cada indivíduo, como se pode observar nas FIGURAS 14, 15 e 16.

A opção pela utilização do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis se prendeu principalmente à heterocedasticidade (heterogeneidade de variâncias) e pelo fato de não se poder supor distribuição normal para as observações. O referido teste pressupõe somente a independência e aleatoriedade das observações.

No presente trabalho, o teste de Kruskal-Wallis permitiu a comparação entre as amostras classificadas de acordo com o laudo patológico e, também a comparação de subamostras obtidas a partir de outros agrupamentos dos adenocarcinomas, na dependência do grau de diferenciação.

3.1. Área Nuclear

Os resultados plotados na FIGURA 14 e também apresentados nas TABELAS 1 e 2 revelam a existência de diferença significativa ($p=0,0001$) entre os grupos de pacientes normais, com hiperplasia e adenocarcinomas nos diversos graus de diferenciação para as medidas de área. Ressalta-se que não só os

núcleos com maior área mediana são encontrados nos adenocarcinomas como também as maiores variações dos valores de áreas.

Com a finalidade de agrupar ainda mais os valores de áreas para os adenocarcinomas (aumentar o número de pacientes por categoria), considerou-se apenas a forma mais predominante da invasividade tumoral, segundo Gleason (o primeiro dígito do laudo patológico). O teste de Kruskal-Wallis não mostrou diferença significativa ($p=0,838$) para comparações entre as subamostras de tumores (TABELA 2). Na tentativa de se obter novos parâmetros passíveis de discussão, os tumores foram agrupados então, em duas grandes categorias: os de médio-alto grau de indiferenciação tumoral (pacientes com Gleason 3.3 e 3.4) e os de alto grau de indiferenciação (pacientes com Gleason 3.5 a 5.5).

Para esse novo reagrupamento não se obteve evidência de que as diferenças entre as duas subamostras fossem significativas ($p=0,8475$).

Pôde-se também notar que a área nuclear é menor para os núcleos hiperplásicos e maior para os núcleos dos adenocarcinomas em comparação com as regiões livres de comprometimento neoplásico (normal).

Há de se ressaltar também que existe grande variabilidade nos valores de área nuclear para cada indivíduo nos adenocarcinomas quando comparados com os valores de núcleos normais e hiperplásicos, os quais apresentam baixa discrepância de valores e quartis relativamente próximos da mediana (FIGURA 14 e TABELA 1).

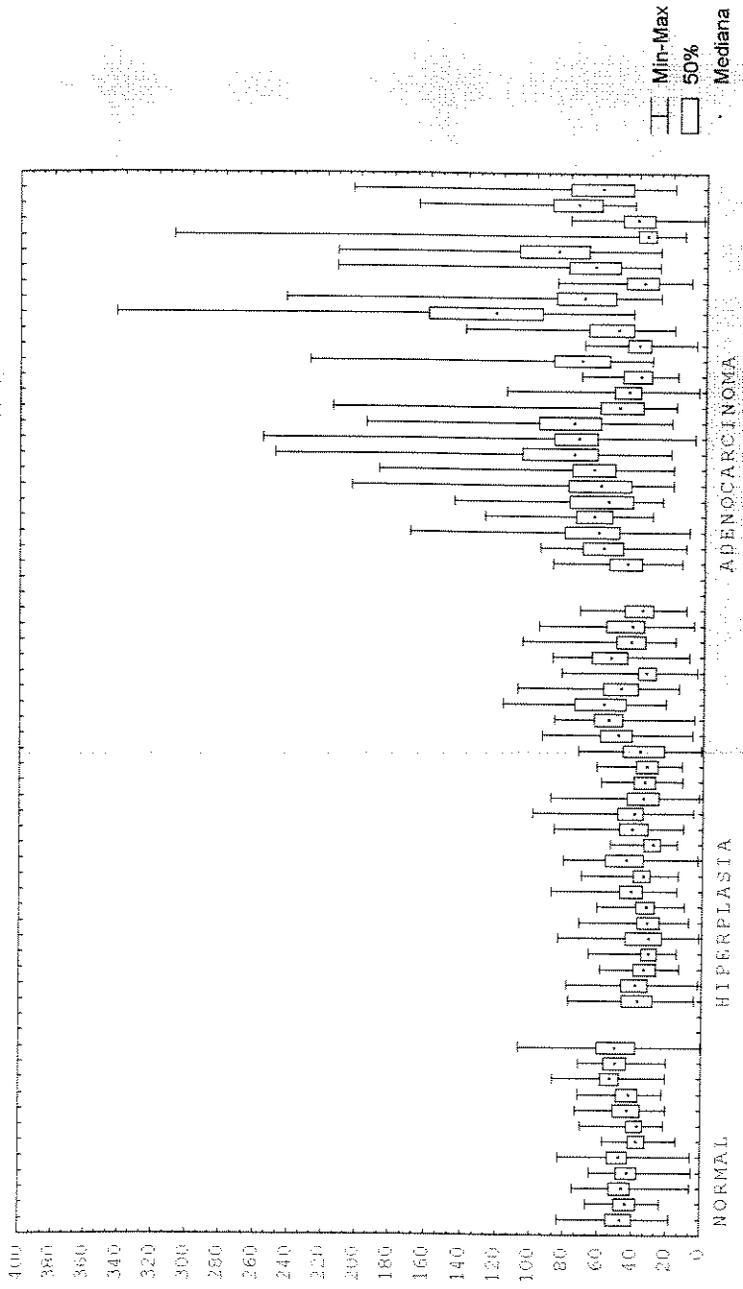


FIGURA 14: Representação gráfica em *Box-Plot* das medidas de área dos núcleos (μm^2) das lesões da próstata. Os núcleos das próstatas normais (12 casos), hiperplásicas (26 casos) e dos adenocarcinomas (25 casos) estão representados sequencialmente. As plotagens referem-se aos 200 valores medidos para cada paciente. Os *Box-Plots* dos adenocarcinomas estão em ordem crescente de classificação segundo o sistema combinado de Gleason (respectivamente onze casos Gleason 3.3; quatro casos Gleason 3.4; um caso Gleason 3.5; quatro casos Gleason 4.4; três casos Gleason 4.5 e dois casos Gleason 5.5).

TABELA 1: Dados de mediana, quartis, valores extremos e teste de Kruskal-Wallis para a área nuclear das lesões da próstata. O teste de Kruskal-Wallis foi efetuado considerando-se os dados apresentados no gráfico de *box-plot* da Figura 14.

Itens	Próstata Normal	Hiperplasia Nodular Prostática	Adenocarcinoma Prostático
Mediana	44,30	37,14	60,86
Quartil 1	42,37	32,60	44,62
Quartil 2	48,88	42,11	72,12
Mínimo	36,90	28,51	34,67
Máximo	53,21	58,25	123,65 ^d
valor p			0,0001*

(d) valor discrepante; *altamente significativo.

TABELA 2. Dados de mediana, quartis, valores extremos e teste de Kruskal-Wallis para a área nuclear dos adenocarcinomas da próstata. O referido cálculo se deu considerando-se os valores medianos apresentados no gráfico de *box-plot*. Os tumores foram agrupados de acordo com o grau predominante (primeiro dígito) da classificação combinada de Gleason.

Itens	Gleason 3	Gleason 4	Gleason 5
Mediana	60,02	64,94	68,07
Quartil 1	47,77	36,20	-
Quartil 3	68,88	86,87	-
Mínimo	38,02	34,67	60,86
Máximo	77,06	123,65 ^d	75,28
valor p	0,838(ns)		

(d) valor discrepante; (ns) não significativo; (-) não calculado devido ao tamanho reduzido da amostra, n=2.

3.2. Perímetro Nuclear

Na FIGURA 15 e TABELAS 3 e 4 estão expostos os dados utilizados também para o teste de Kruskal-Wallis visando a comparação entre os grupos em relação ao parâmetro perímetro nuclear.

Conforme ilustra a FIGURA 15 e TABELA 3 as maiores medianas de perímetros são encontradas nos adenocarcinomas, sendo este grupo o que apresenta maior variabilidade entre os valores obtidos, inclusive os maiores valores discrepantes. A diferença entre os grupos revela-se significativa ($p=0,0001$), permitindo afirmar que o perímetro naturalmente acompanha o comportamento apontado pela área. Quando agrupados de acordo com o primeiro dígito da classificação de Gleason, não se observa diferença significativa ($p=0,6076$) (TABELA 4) e quando agrupados em duas categorias, como no parâmetro anterior, o valor de p aumenta ($p=0,6773$).

Vale ressaltar que os núcleos das hiperplasias nodulares prostáticas apresentam os menores perímetros e uma variabilidade superior à dos normais (TABELA 3).

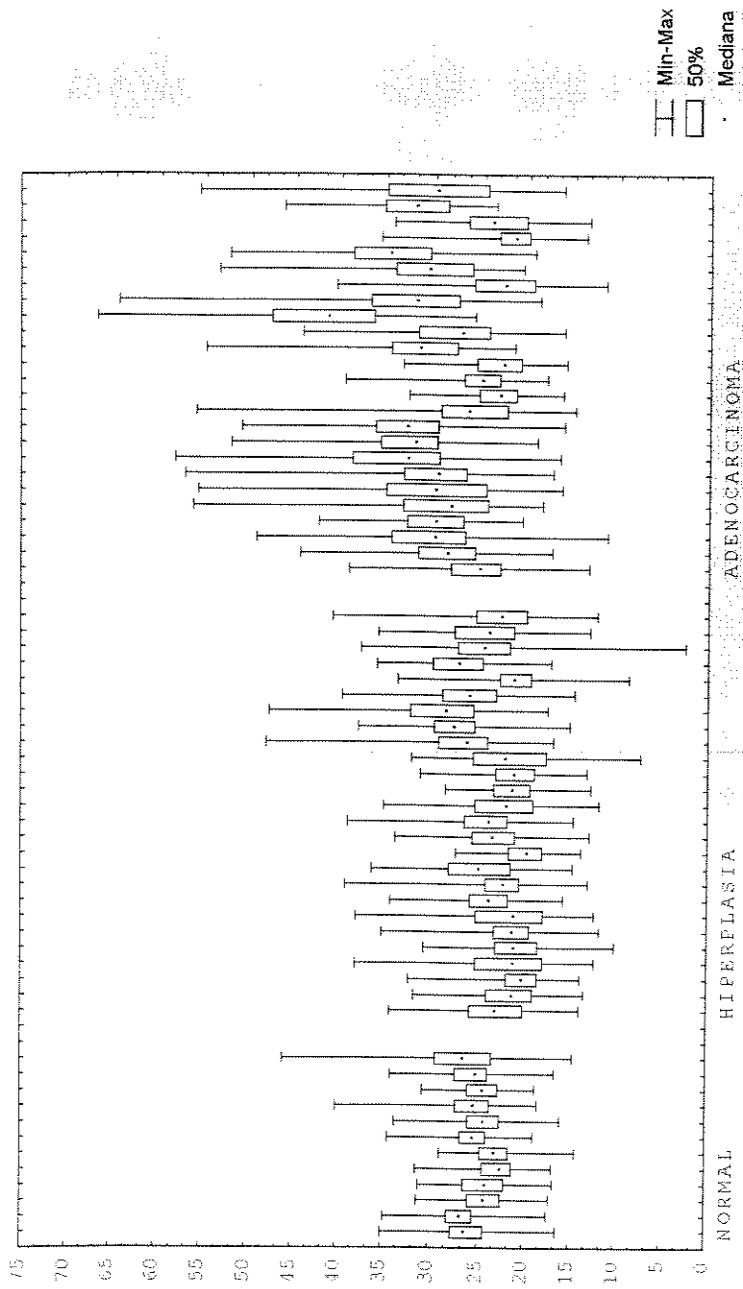


FIGURA 15: Representação gráfica em *Box-Plot* das medidas de perímetro dos núcleos das lesões da próstata (em μm). Os núcleos das próstatas normais (12 casos), hiperplásicas (26 casos) e dos adenocarcinomas (25 casos) estão representados sequencialmente. As plotagens referem-se aos 200 valores de perímetros medidos para cada paciente. Os *Box-Plots* dos adenocarcinomas estão em ordem crescente de classificação segundo o sistema combinado de Gleason (respectivamente onze casos Gleason 3.3; quatro casos Gleason 3.4; um caso Gleason 3.5; quatro casos Gleason 4.4; três casos Gleason 4.5 e dois casos Gleason 5.5).

TABELA 3: Dados de mediana, quartis, valores extremos e teste de Kruskal-Wallis para a perímetro nuclear das lesões da próstata. O referido teste foi efetuado considerando-se os dados apresentados no gráfico de *box-plot* (FIGURA 15).

Itens	Próstata Normal	Hiperplasia Nodular Prostática	Adenocarcinoma Prostático
Mediana	24,80	22,52	29,70
Quartil 1	24,10	21,24	25,02
Quartil 3	25,90	24,29	31,49
Mínimo	22,40	19,79	21,52
Máximo	26,72	28,53	41,30 ^d
valor p	0,0001*		

(d) valor discrepante; (*) altamente significativo.

TABELA 4. Dados de mediana, quartis, valores extremos e teste de Kruskal-Wallis para o perímetro nuclear dos adenocarcinomas da próstata. O referido cálculo se deu considerando-se os valores medianos apresentados no gráfico de *box-plot*. Os tumores foram agrupados de acordo com o grau predominante (primeiro dígito) da classificação combinada de Gleason.

Itens	Gleason 3	Gleason 4	Gleason 5
Mediana	29,01	30,43	30,72
Quartil 1	25,79	22,53	-
Quartil 3	30,52	34,44	-
Mínimo	22,69	21,52	29,75
Máximo	32,57	41,30 ^d	31,69
valor p	0,6076 (ns)		

(d) valor discrepante; (ns) não significativo; (-) não calculado devido ao tamanho reduzido da amostra, n=2.

3.3. Fator forma nuclear

Pelos resultados expostos nas TABELAS 5 e 6 e plotagens feitas na FIGURA 16, verifica-se que o fator forma não pode ser considerado isoladamente como bom parâmetro para indicar condição patológica das lesões prostáticas. O teste de Kruskal-Wallis revelou que os três grupos podem ser considerados equivalentes quanto a este parâmetro, visto que não foi apresentada diferença estatística ($p=0,0513$). Como o valor de p é extremamente próximo de 5%, aplicou-se o teste da mediana para comparação de duas amostras (NOETHER, 1976), e sendo o valor de $p=0,0617$, assumiu-se que a diferença não é significativa. Quando agrupados de acordo com o primeiro dígito da classificação de Gleason, o valor de p encontrado foi de 0,9202 (TABELA 6) e quando em 2 categorias, $p=0,7792$; à semelhança dos agrupamentos feitos para os dois parâmetros anteriormente analisados.

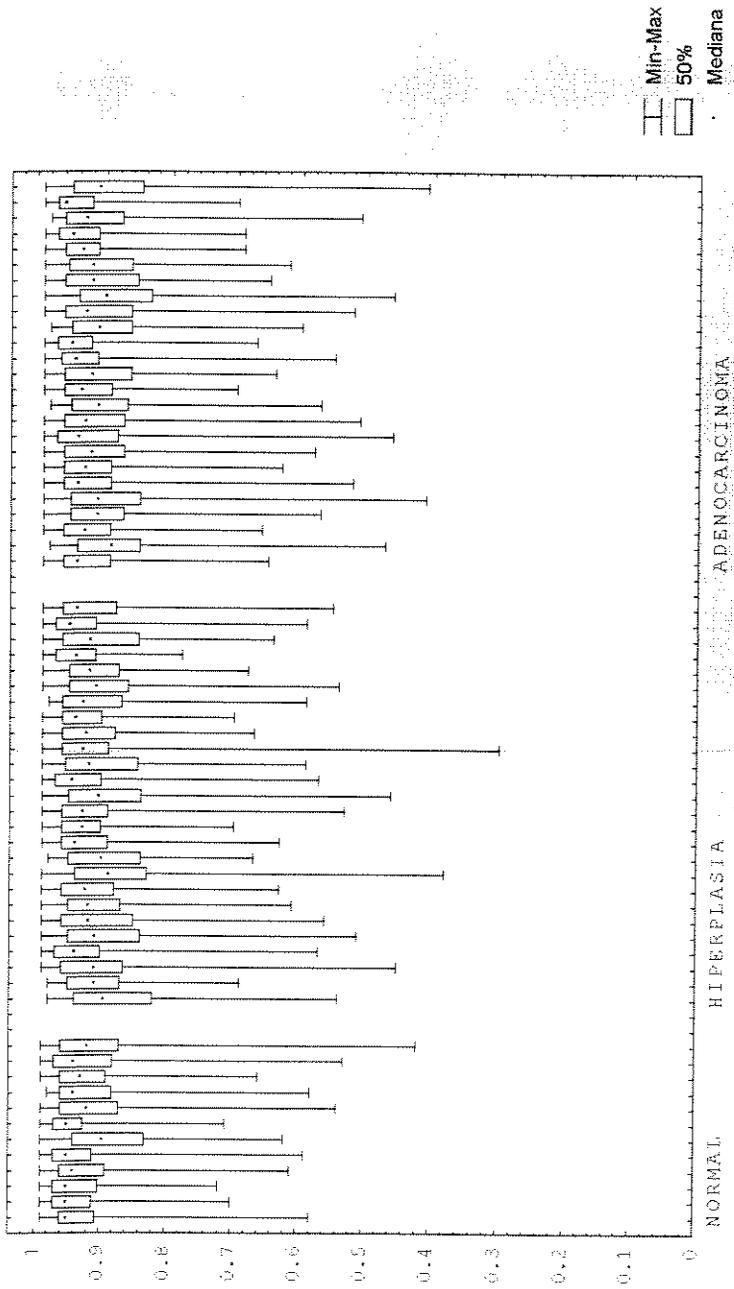


FIGURA 16: Representação gráfica em *Box-Plot* dos valores obtidos para o fator forma de núcleos das lesões da próstata. Os núcleos das próstatas normais (12 casos), hiperplásicas (26 casos) e dos adenocarcinomas (25 casos) estão representados sequencialmente. As plotagens referem-se aos 200 valores obtidos para cada paciente. Os *Box-Plots* dos adenocarcinomas estão em ordem crescente de classificação segundo o sistema combinado de Gleason (respectivamente onze casos Gleason 3.3; quatro casos Gleason 3.4; um caso Gleason 3.5; quatro casos Gleason 4.4; três casos Gleason 4.5 e dois casos Gleason 5.5).

TABELA 5: Dados de mediana, quartis, valores extremos e teste de Kruskal-Wallis para o fator forma nuclear das lesões da próstata. O referido teste foi efetuado considerando-se os dados apresentados no gráfico de *box-plot* da FIGURA 16.

Itens	Próstata Normal	Hiperplasia Nodular Prostática	Adenocarcinoma Prostático
Mediana	0,94	0,92	0,93
Quartil 1	0,92	0,91	0,91
Quartil 3	0,95	0,95	0,94
Mínimo	0,895	0,89	0,89
Máximo	0,95	0,95	0,96
valor p	0,0513(ns) ¹		

(ns) não significativo. ¹Aplicado o teste da mediana (NOETHER, 1976) o valor de $p=0,0615$ o que explica a não significância do teste acima.

TABELA 6. Dados de mediana, quartis, valores extremos e teste de Kruskal-Wallis para o fator forma nuclear dos adenocarcinomas da próstata. Para o referido teste considerou-se os valores medianos apresentados no gráfico de *box-plot*. Os tumores foram agrupados de acordo com o grau predominante (primeiro dígito) da classificação combinada de Gleason.

Itens	Gleason 3	Gleason 4	Gleason 5
Mediana	0,93	0,93	0,935
Quartil 1	0,91	0,92	-
Quartil 3	0,94	0,935	-
Mínimo	0,89	0,90	0,91
Máximo	0,95	0,95	0,96
valor p	0,9202 (ns)		

(ns) não significativo; (-) não calculado devido ao tamanho reduzido da amostra, n=2.

3.4. Correlação entre áreas e perímetros nucleares

Estes dados foram obtidos a partir do ajuste de retas de regressão pelo método de mínimos quadrados, com confiança de 95%. As FIGURAS 17, 18 e 19, mostram respectivamente a correlação entre as medianas de áreas e perímetros dos casos normais, hiperplasias nodulares e adenocarcinomas. Cada gráfico apresenta a equação de reta de regressão. Pôde-se observar que para os núcleos normais, a correlação é baixa com $r=0,12952$ e $p=0,688$ (não significativo). Na hiperplasia nodular prostática a correlação é alta, com $r=0,97731$ e $p=0,0001$ (altamente significativo). Nos adenocarcinomas, a correlação é mais baixa em comparação com a hiperplasia ($r=0,84434$ e $p=0,0001$), mesmo assim é altamente significativo. Outro fator que mostra diferença marcante entre as retas de regressão é o coeficiente angular das retas (o coeficiente angular determina a inclinação da reta). Para os núcleos normais o valor do coeficiente é $0,03503$, que determina uma baixa inclinação. Para as lesões benignas e malignas a inclinação é mais acentuada e, respectivamente os coeficientes angulares são $0,29105$ e $0,19148$.

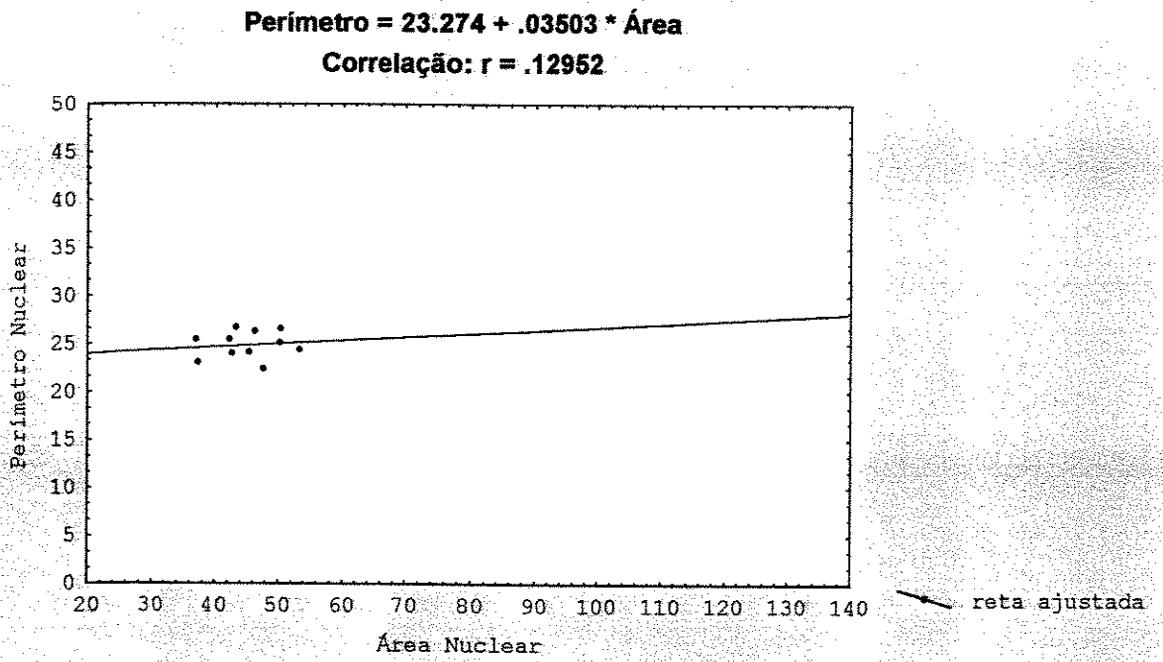


FIGURA 17. Coeficiente de correlação e reta de regressão ajustada para valores medianos de perímetro (μm) em função da área (μm^2) para os núcleos normais. A expressão matemática que representa a função citada está no topo do gráfico.

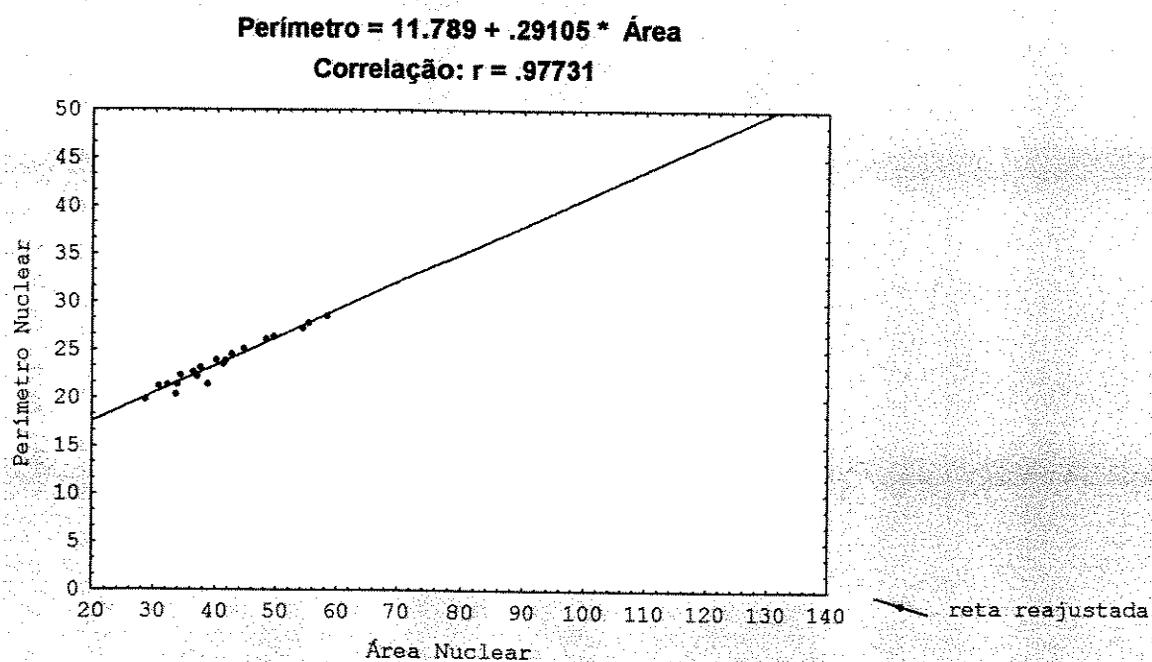


FIGURA 18. Coeficiente de correlação e reta de regressão ajustada para valores medianos de perímetro (μm) em função da área (μm^2) para os núcleos das hiperplasias. A expressão matemática que representa a função citada está no topo do gráfico.

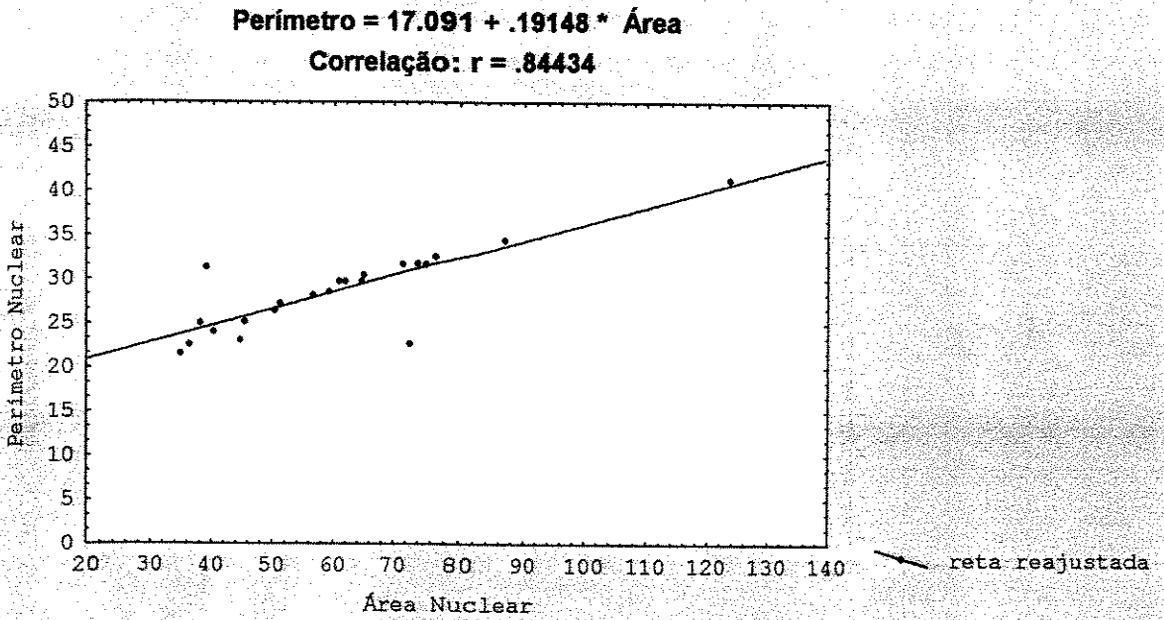


FIGURA 19. Coeficiente de correlação e reta de regressão ajustada para valores medianos de perímetro (μm) em função da área (μm^2) para os núcleos dos adenocarcinomas. A expressão matemática que representa a função citada está no topo do gráfico.

4. Componentes fibrilares do estroma nas lesões da próstata

As regiões normais (FIGURA 20) e hiperplásicas (FIGURA 21) exibem fibras colágenas com espessura e direções diferentes, estabelecendo uma rede tridimensional. Estas fibras, quando observadas sob luz polarizada, exibem birrefringência e dicroísmo característicos da integridade fibrilar do colágeno. Pela metodologia empregada, isto é, coloração pela reticulina sem o tratamento enzimático prévio para remoção de carboidratos (VIDAL, 1988), fica evidente que a maioria das fibras, por serem birrefringentes, são colágenas e não reticulares. Por outro lado pôde-se observar um aumento na variabilidade da distribuição e birrefringência nos adenocarcinomas (FIGURAS 22 e 23).

Em algumas áreas do adenocarcinoma, uma rede tridimensional de fibras, delimita a base das células epiteliais transformadas (FIGURA 22e) em contraste com outras áreas em que o colágeno encontra-se sob forma de fibras desorganizadas e não estabelece limite entre células tumorais e estroma (FIGURAS 23a, e). Nestas áreas, o colágeno apresenta-se com birrefringência alterada e forma placas hialinas de material argirófilo amorfo, o que pode sugerir degradação destes componentes no processo de invasão tumoral.

Nos tumores mais agressivos e indiferenciados pôde-se detectar um pronunciado aumento de vasos sanguíneos nas regiões do estroma próximo ao tumor (FIGURA 23e).

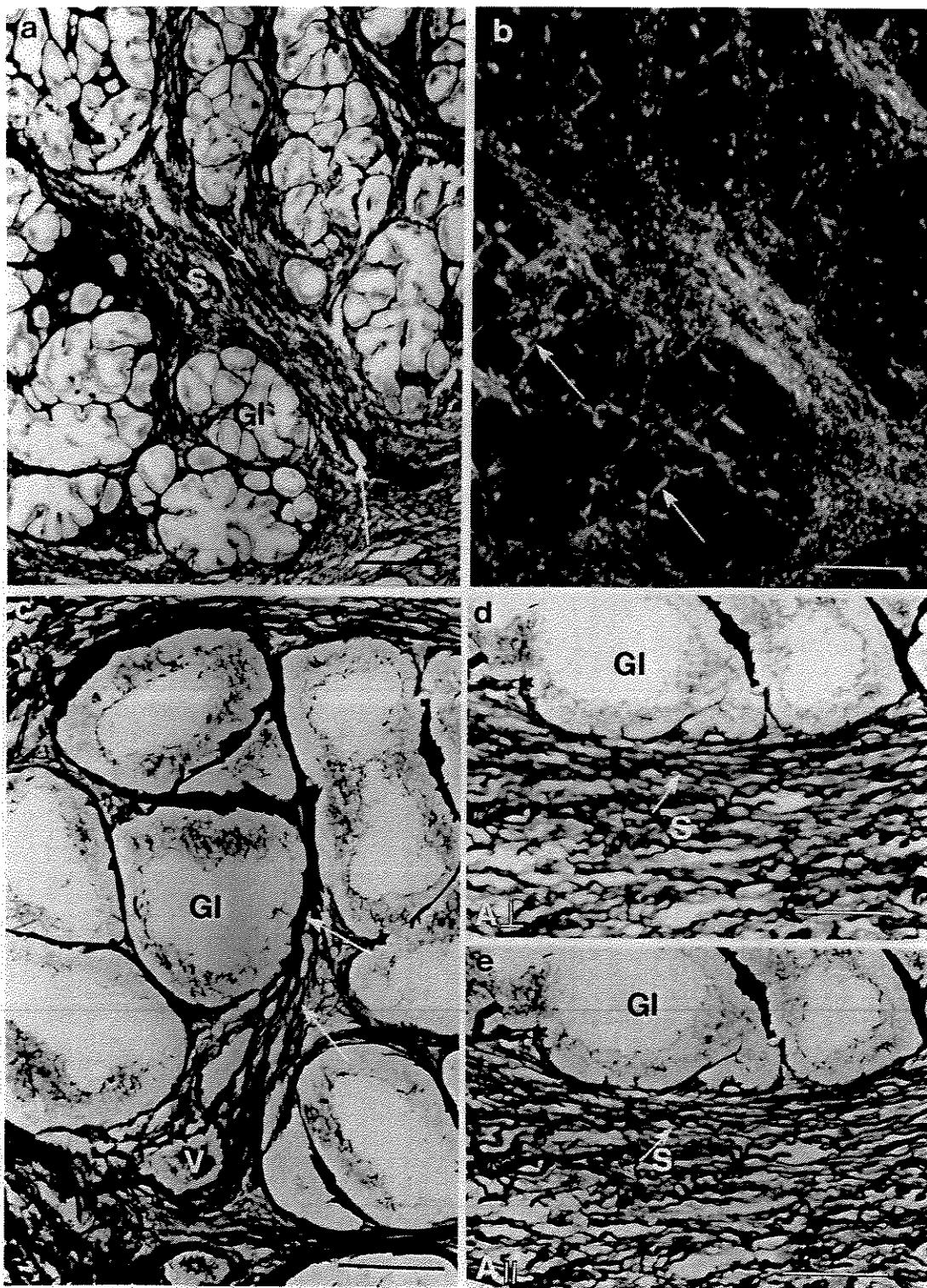


FIGURA 20: Corte histológico de próstata em regiões livres de comprometimento neoplásico, submetido à impregnação pela prata. a) Fibras colágenas nas regiões septais inter-acinares com poucos vasos sanguíneos no estroma (setas). Porção glandular (GI), estroma (S). Barra=100µm. b) As fibras colágenas podem ser identificadas pela birrefringência característica entre os ácinos da porção glandular (setas). Barra=100µm. c) Detalhe das fibras colágenas impregnadas pela prata (setas) nos espaços intra-lobulares e entre os ácinos da glândula (GI). Vasos sanguíneos (V). Barra=50µm. d-e) Dicroísmo linear das fibras colágenas do septo intra-lobular (setas). Porção glandular (GI), estroma (S). Barra=50µm.

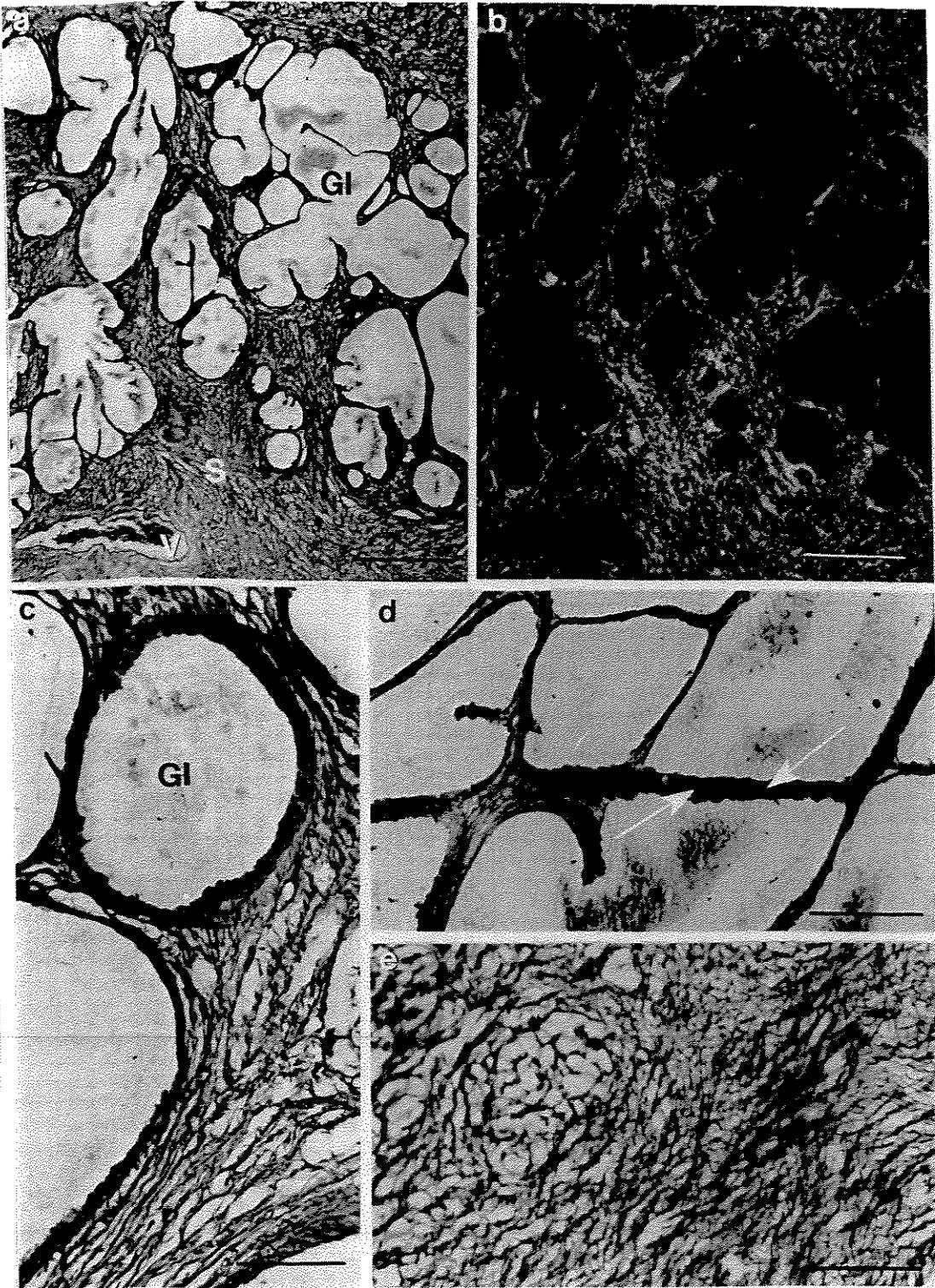


FIGURA 21: Cortes histológicos de hiperplasias nodulares prostáticas submetidos à impregnação argêntica de Gômöri para colágeno. a) Nestas regiões podem ser observados um marcado aumento do estroma (S) e um alargamento das porções glandulares (GI). As fibras colágenas se apresentam com aspecto mais fino e com menor compactidade. Vasos sanguíneos (V). Barra=100µm. b) Birrefringência do colágeno semelhante à das áreas normais. Barra=100µm. c) Detalhe da rede colagênica no estroma da periferia dos ácinos glandulares (GI). As fibras são mais finas e menos compactas quando comparadas com aquelas das regiões normais (seta). Barra=50µm. d) Algumas fibras helicoidalmente organizadas são observadas entre os ácinos hiperplásicos (setas). Barra=50µm. e) Detalhe da matriz extracelular na periferia da lesão. Nesta região, a disposição das fibras em rede tridimensional revela o dicróismo característico do colágeno. Barra=50µm.

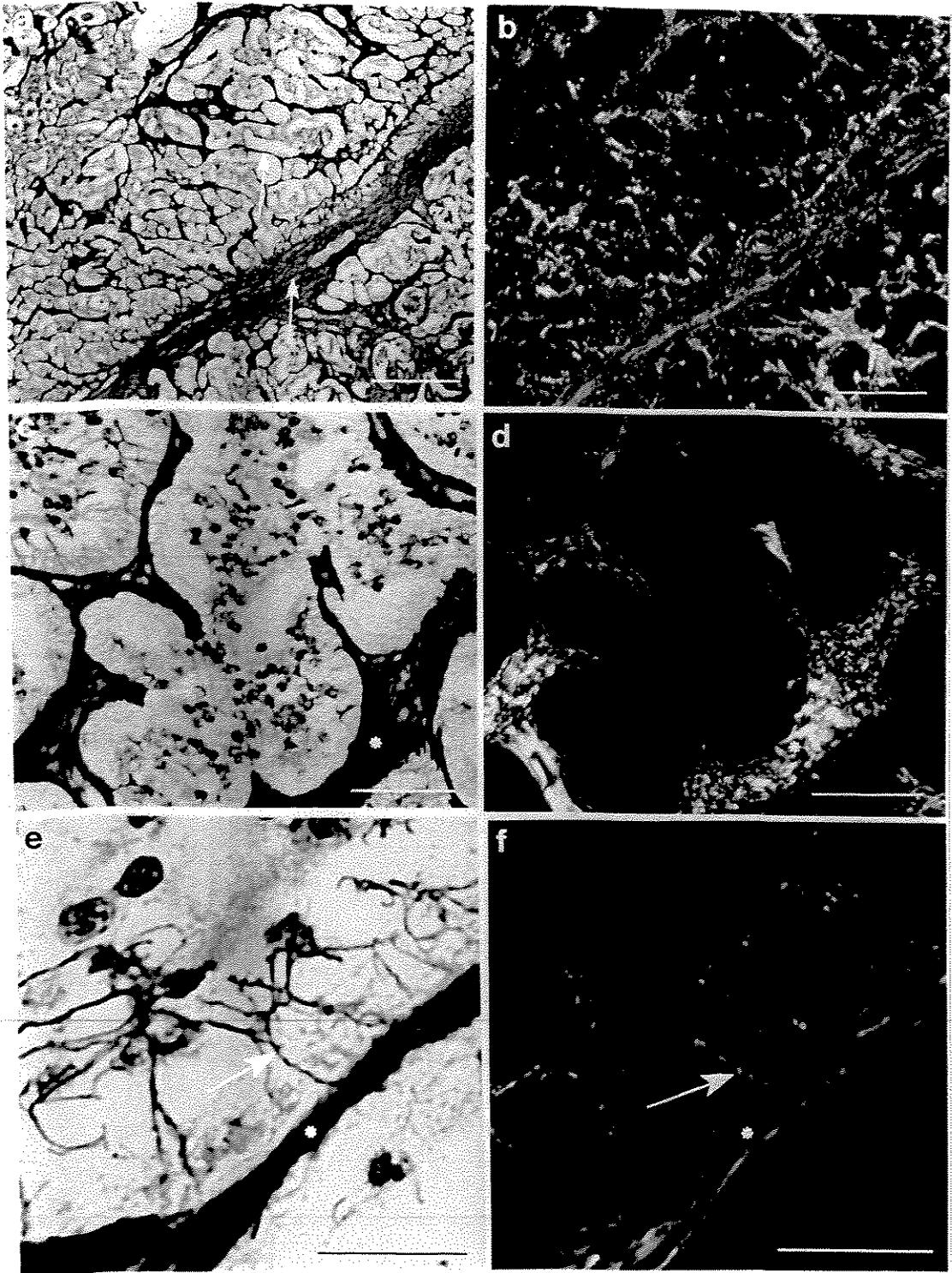


FIGURA 22: Corte histológicos de adenocarcinoma de próstata submetidos à impregnação argêntica de Cömöri para colágeno. a) A área adenocarcinomatosa observada apresenta uma diminuição da densidade das fibras (setas), bem como uma descaracterização do padrão organizacional dos feixes de colágeno. Barra=100 μ m. b) Sob luz polarizada as fibras são curtas e com birrefringência fraca, o que aparentemente pode sugerir fragmentação do complexo fibrilar. Barra=100 μ m. c-d) Nas regiões septais dos tumores podem ser observados agregados de material colagênico, identificado pela intensa argirofilia e birrefringência (*). Barra=50 μ m. e) Nas áreas de proliferação tumoral, finas fibrilas helicoidalmente organizadas, estabelecem uma rede de sustentação para o tumor (seta). Barra=50 μ m. f) Algumas fibras da região septal dos tumores não apresentam birrefringência (*), provavelmente pelo estado de compactação ou pelo fato de apresentarem material não colagênico argirófilo associado. Barra=50 μ m.

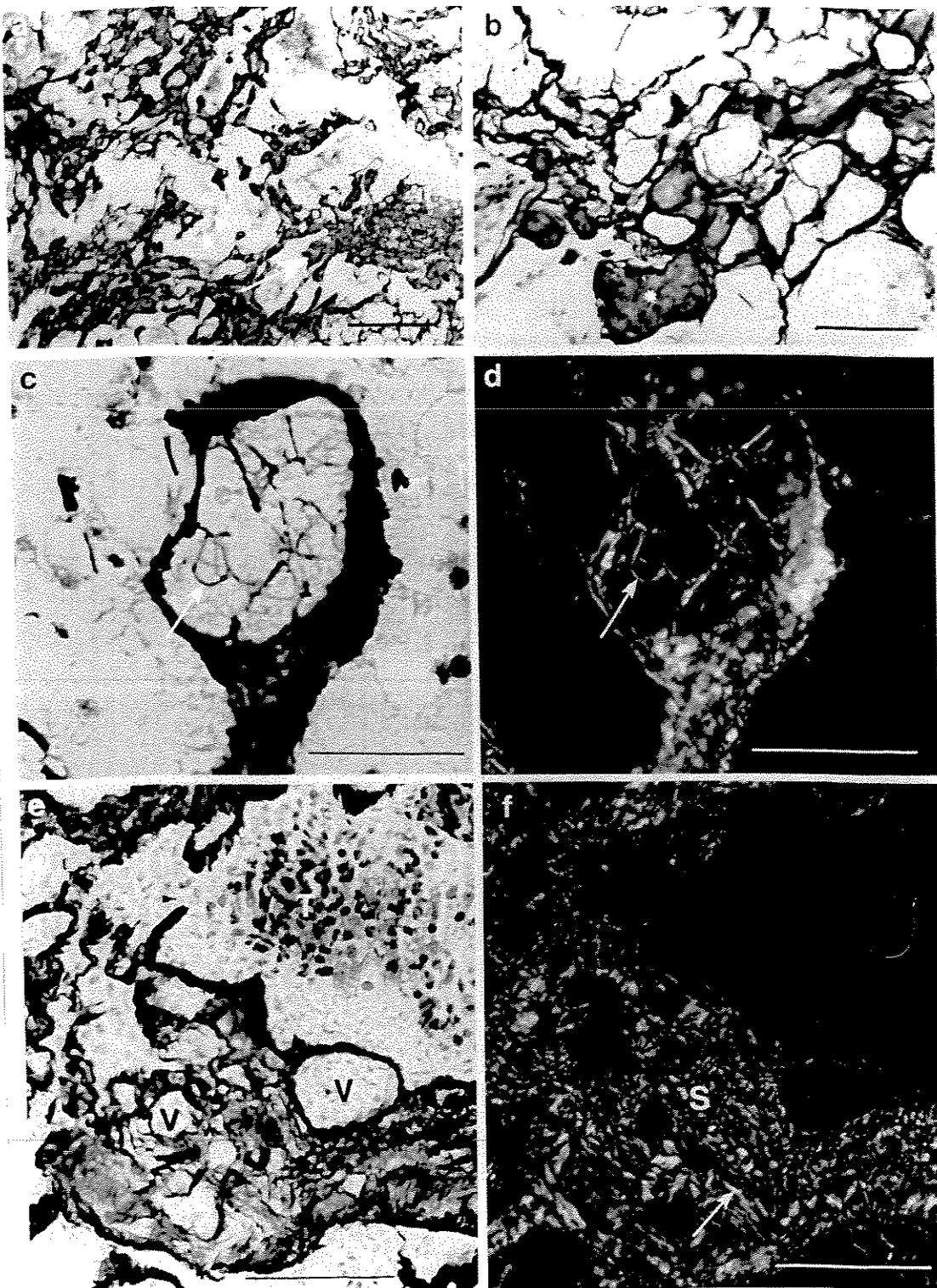


FIGURA 23: Cortes histológicos de adenocarcinomas de próstata (Gleason combinado grau 10) submetidos à impregnação argêntica de Gömöri para colágeno. a) Nas áreas indiferenciadas do tumor, placas de material argirófilo (seta) são observadas entremeando as células tumorais (cabeças de seta). Barra=100 μ m. b) Detalhe das placas na matriz, com aspecto hialino não fibrilar (*), associadas com finas fibras de colágeno (seta). Barra=50 μ m. c) Uma rede de fibras finas (seta) estabelecem um arcabouço tumoral. Barra=50 μ m. d) Sob luz polarizada, estas fibras são birrefringentes (seta) contrastando-se com as fibras reticulares, não birrefringentes, das áreas adjacentes (cabeça de seta). Barra=50 μ m. e) Muitos vasos sanguíneos são observados nas regiões mais agressivas do tumor (V). O estroma perde as características fibrilares, assumindo padrões de placas hialinas argirófilas. Entretanto, a detecção do dicroísmo linear, nestas placas, sugere a presença de material colagênico associado a outros elementos argirófilos da matriz. Células tumorais (T). Barra=50 μ m. f) A microscopia de polarização demonstra que nas placas hialinas existe colágeno na sua constituição. A birrefringência revela a integridade estrutural das fibras (seta). O aspecto hialino das placas resulta da associação do colágeno com elementos glicoprotéicos não colagênicos reativos à prata. Barra=50 μ m.

DISCUSSÃO

1. Distribuição cromatínica e dados de morfometria nuclear nas lesões prostáticas

O padrão de distribuição cromatínica nas células acinares da próstata, pode ser fator importante na diagnose e prognose de lesões prostáticas, desde que a este se aliem outros parâmetros estruturais, tais como o padrão arquitetural da lesão (BILLIS, 1995) e fatores cariométricos (VESALAINEN *et al.*, 1995).

Os resultados do presente estudo mostraram que os núcleos hiperplásicos, quando comparados com os normais, tanto na morfologia e distribuição cromatínica, como em termos de respostas de basofilia frente à coloração pelo azul de toluidina, são muito semelhantes. Isto pode dever-se ao fato de não haver malignidade na lesão. As lesões não malignas tendem a responder semelhantemente às normais, frente às técnicas histoquímicas tradicionais (COTRAN *et al.*, 1994).

As pequenas alterações estruturais dos núcleos e nos padrões de distribuição da cromatina na hiperplasia podem ser atribuídas a variações morfo-funcionais da região hiperplásica em resposta aos estímulos de variação hormonal localizado. Deve-se levar em consideração que a hiperplasia nodular prostática é um fenômeno patológico morfo-funcional dinâmico onde os nódulos podem sofrer regressão ou se hipertrofiar, na dependência do estímulo hormonal (ROSAI, 1996).

Este fato explicaria a variabilidade nas medidas nucleares e no fator forma do perímetro, pois a dinâmica do epitélio prostático, seja no desenvolvimento ou regressão do fenômeno hiperplásico levaria a esta variação estrutural.

A avaliação dos resultados relativos ao padrão de distribuição mais uniforme da cromatina nas hiperplasias, em comparação com os núcleos normais, bem como a análise do tamanho nuclear foram também abordado em trabalho anterior de BEILL e colaboradores (1996), quando da análise em

microscopia confocal a laser. Usando um método de reconstrução tridimensional, estes autores concluem ser significativamente diferente o grau de compactação das massas cromatínicas nesses tumores. Entretanto a abordagem se deu principalmente em relação ao volume nuclear e distribuição das massas cromatínicas ao longo dos eixos x, y, z.

Nosso trabalho vem complementar este estudo, principalmente pelo fato dos núcleos aqui analisados serem os mesmos da avaliação pelo patologista. A limitação do uso do microscópio confocal reside principalmente no preparo das amostras, que ainda é inacessível às rotinas dos laboratórios de patologia.

A análise do volume médio de núcleos tumorais da próstata tem sido feita na tentativa de confrontar com a graduação proposta por Gleason (FUJIKAWA *et al.*, 1997), contudo, estudos estereológicos parecem ser ainda insipientes para tumores da próstata e as comparações dos estudos de FUJIKAWA e colaboradores (1997) são prognosticamente iguais àquelas obtidas pela análise morfológica da graduação proposta por GLEASON (1977).

Outro fator que há de ser levado em consideração no que diz respeito à análise dos nossos resultados é que a análise visual da distribuição cromatínica foi feita para muitos núcleos por lesão, fato que permitiu a descrição de um padrão geral para cada lesão. No trabalho de BEILL e colaboradores (1996), um dos fatores problemáticos e restritivos levantados pelos autores foi o da análise individual dos núcleos nas lesões, pois os descritores matemáticos por eles utilizados ainda não estão estabelecidos para análises de grandes amostragens.

A comparação dos núcleos normais e hiperplásicos com os núcleos dos adenocarcinomas mostra diferenças visuais quanto à cromatina. Isto é, nos núcleos normais e hiperplásicos a cromatina comporta-se de maneira semelhante, onde as massas coráveis são uniformemente distribuídas e com padrão semelhante de coloração. Nos adenocarcinomas, as massas de cromatina se heterogeinizam, os nucléolos ficam mais conspícuos e padrões distintos de distribuição da cromatina são observados.

As diferenças são também detectáveis em nível dos valores cariométricos além da distribuição dos elementos da cromatina, seja na forma, textura ou até no agrupamento das massas coráveis, que variam nos diferentes graus do tumor.

A frouxidão da cromatina e a distribuição das massas de cromatina condensada e dos nucléolos e até mesmo o pleiomorfismo são critérios de grande relevância para o diagnóstico histopatológicos dos tumores (BEILL *et al.*, 1996). Segundo BILLIS (1995), a atipia nuclear ou pleiomorfismo acentuado podem aumentar sobremaneira a graduação final do tumor, mesmo que a sua distribuição arquitetural possa contribuir para que se classifique o tumor com baixo grau.

Os resultados do presente estudo são relativos aos tumores de graduação médio-alta e altamente indiferenciados segundo a classificação de Gleason (graus de 6 a 10, na escala combinada). Isto explicaria o alto pleiomorfismo e a grande heterocedasticidade observados.

É interessante salientar que o maior grau de heterogeneidade amostral ocorre nos tumores de grau 8 (Gleason combinado 4.4), seja quanto à forma nuclear, medidas cariométricas ou até mesmo na distribuição da cromatina, com alto grau de atipia e pleiomorfismo cromático, tanto após a coloração com azul de toluidina como com hematoxilina-eosina. Deve-se mencionar o fato de muitos autores suporem que os indivíduos portadores de tumores classificados como Gleason 4.4, tenham uma sobrevida menor do que outros com a graduação maior, porém com menor grau de atipia nuclear (ROSAI, 1996).

A heterogeneidade celular nos tumores prostáticos é um fator importante da progressão nas lesões da próstata, tanto nas lesões neoplásicas como nas pré-neoplásicas. Têm-se atribuído isto como sendo resultado dos mecanismos genéticos da diferenciação tumoral, que muitas vezes são observados somente nas lesões severas, muito indiferenciadas (MONTIRONI *et al.*, 1990a,b). No entanto, parece consensual que as lesões com maior índice de aneuploidias sejam as classificadas morfológicamente como Gleason 4.4 e, em consequência destas aneuploidias, haveria uma maior heterogeneidade nos valores de áreas dos núcleos e distribuição da cromatina.

O resultado da análise estatística pelo teste de Kruskal-Wallis mostrou que as variações entre os três grupos distintamente estabelecidos (normal, hiperplasias nodulares e adenocarcinomas) são significativamente separadas e distintas. Entretanto, nos diferentes casos de adenocarcinomas esta separação não existe, provavelmente devido à heterogeneidade das variâncias. Isto fica

patente quando se reagrupam os tumores de acordo com o primeiro dígito da graduação de Gleason (itens 3.1, 3.2, e 3.3 dos resultados), onde a diferença estatística também não foi detectada.

Este fato é interessante de ser ressaltado, pois mesmo quando parece haver diferenças na distribuição cromatínica e tamanho nuclear nos adenocarcinomas, o pleiomorfismo mascara as diferenças estatísticas que possam existir. Portanto, somente as medidas nucleares não são suficientemente consistentes para discriminar isoladamente os graus de invasividade tumoral. É importante que sejam aliados a estes resultados, os dados de textura cromatínica e padrão arquitetural do tumor.

Resultados semelhantes aos nossos foram encontrados em trabalho de WANG e colaboradores (1992), onde os autores, utilizando valores de médias das áreas nucleares, também detectaram padrões semelhantes. As diferenças que estes autores encontraram residia nos grupos pobremente e moderadamente diferenciados, quando comparados com os de alto grau de indiferenciação. Entretanto não detectaram diferenças estatísticas expressivas internamente nos três grupos.

Nossos resultados apontam, semelhantemente aos obtidos por VESALAINEN e colaboradores (1995), no sentido de que as medidas nucleares sejam complementares ao diagnóstico por se tratarem de limitada aplicabilidade para valor diagnóstico e prognóstico isoladamente. Isto tanto nos dados obtidos pela análise das médias dos parâmetros observados (WANG *et al.*, 1992; VESALAINEN *et al.*, 1995) como por medianas apresentados no presente trabalho.

É importante salientar que a opção pela utilização dos valores de mediana se deu pelo fato das médias não serem representativas das distribuições, havendo acentuada heterogeneidade das variâncias (HOLLANDER & WOLFE, 1973).

A análise das retas de regressão obtidas para os três casos indicou que nos núcleos normais não há uma correlação entre área e perímetro ($r = 0,12952$), já nas lesões a correlação é alta ($r = 0,97731$ para a hiperplasia nodular e $r = 0,84434$ para os adenocarcinomas). A baixa correlação nos núcleos normais indicam que estes são muito uniformes quanto às suas medidas de área e

perímetro, formando um arranjo em “cluster”. O arranjo em “cluster” é refletido principalmente pela uniformidade da distribuição dos quartis nos “box-plot”, tanto nos valores de área quanto nos valores de perímetro. A inclinação das retas de regressão, dada pelo coeficiente angular, também pode ser de importância fundamental para comparações das diferenças entre os três grupos aqui estudados.

Outro fato que há de ser levado em conta na amostragem de núcleos normais, é que núcleos com áreas semelhantes podem possuir perímetros diferentes. Isto ocorre devido haver, nas células normais, uma irregularidade de contorno dos núcleos, o que aumentaria o perímetro (calculado por uma fórmula de ordem linear) sem aumentar a área (calculada por uma fórmula de ordem exponencial). Nos dados obtidos para as lesões benignas e malignas isso não ocorre.

Dos dados de morfometria apresentados, as retas de regressão foram as que melhor demonstraram as diferenças entre os grupos. Nos dados da literatura relativos às retas de regressão, como instrumentos de análise comparativa para núcleos, têm-se: considerando área nuclear/IOD - “integrated optical density” (SMITH *et al.*, 1996) e superfície nuclear/valores Feulgen-DNA (VIDAL, 1994). Existem expressivas correlações entre estes parâmetros.

Juntamente com os referidos parâmetros, os nossos dados parecem contribuir para o diagnóstico histopatológico, pois estas análises podem se integrar às outras de rotina nos laboratórios de histopatologia e histotecnologia.

2. Apoptose nas lesões prostáticas

Nas lesões teciduais associadas ao crescimento do órgão ou aumento da massa total, acham-se envolvidos principalmente fatores proliferativos (ROSAL, 1996). Uma contrapartida fisiológica contrária à proliferação celular que regula a homeostase tecidual (número constante de células) e de certa forma o volume do órgão, e conseqüentemente a taxa de crescimento tumoral, é representada pelos fenômenos denominados de apoptose e morte celular programada (RAFF, 1992).

As relações existentes entre a taxa de apoptose e hiperplasia tecidual foram bem estabelecidas em condições experimentais na bexiga de coelhos (SANTAROSA *et al.*, 1994). A obstrução da bexiga urinária destes animais promove uma proliferação celular dos tecidos da mucosa e serosa. A taxa de apoptose aumenta nos processos de recuperação da hiperplasia, após a desobstrução do órgão. Assim os autores concluem que a apoptose e hiperplasia são fenômenos antagônicos.

Na próstata, o principal fator que leva à apoptose é a ablação hormonal, ou o descontrole de hormônios durante a vida adulta (BURSCH *et al.*, 1990). Os fenômenos de apoptose na próstata parecem ser de grande interesse, pois a chave para o entendimento das relações entre proliferação e morte celular no tratamento dos tumores parece estar endereçada para este campo do conhecimento.

Sabendo que o tratamento mais comum para os tumores prostáticos é a terapia endócrina, ou seja, a orquiectomia médica ou cirúrgica (BRÄNDSRÖM *et al.*, 1994), alguns trabalhos envolvendo castração experimental e apoptose têm mostrado resultados expressivos (BRÄNDSRÖM *et al.*, 1994; LANDSTRÖM *et al.*, 1994 e WESTIN *et al.*, 1995). Em linhas gerais, as principais conclusões dos trabalhos nesse campo apontam para o fato que a castração reduz a massa prostática, entretanto 80% desta massa é de tecido normal (WESTIN *et al.*, 1995). Experimentalmente, a próstata ventral responde melhor à castração. Quando da análise dos índices de apoptose e proliferação (BRÄNDSRÖM *et al.*, 1994), considerou-se que a manutenção do tecido prostático normal e tumoral pode ser andrógeno-específica, embora outros fatores possam estar envolvidos.

Se fisiologicamente muitas questões ainda não podem ser resolvidas em relação à queda de hormônio e apoptose nos tecidos tumorais, a terapia química parece resolver, em parte, algumas questões. DENMEADE e colaboradores (1996), utilizando agentes quimioterápicos anti-proliferativos em ratos portadores de tumores prostáticos, detectaram um aumento da taxa de apoptose nos tumores sem requerimento de proliferação; entretanto, algumas questões continuam em aberto, como, por exemplo, se estes agentes anti-proliferativos, por diminuírem a taxa de mitoses, não estariam matematicamente aumentando artificialmente o índice de apoptose.

A taxa de apoptose pode ter implicações significantes na progressão do tratamento do câncer na próstata, assim como nas terapias hormônio-dependentes. Contudo, nos tumores com maior grau de indiferenciação e anaplasia, parece não haver detecção de células apoptóticas em resposta à ablação hormonal (TENNISWOOD, 1997).

Em tumores prostáticos humanos, o trabalho pioneiro de correlação entre graduação tumoral e taxa de apoptose mostram uma correlação positiva entre ambos (AIHARA *et al.*, 1994). Entretanto, estes mesmos autores acham tal fenômeno um paradoxo e supõem que esteja havendo uma persistência maior dos corpos apoptóticos no tecido, fato que poderia estar induzindo tal resultado.

Em trabalho posterior BROWM e colaboradores (1996) questionam a publicação anterior e levantam a hipótese de que os tumores com grau de indiferenciação médio-alto (Gleason 6-7) apresentam taxa de apoptose baixa, e assim este parâmetro não poderia ser considerado bom discriminante na graduação e análise da progressão tumoral.

Outro fator de relevância fundamental é que as taxas de apoptose são altas em lesões pré-malignas e em tumores localizados e bem diferenciados (BERGES *et al.*, 1995).

Nossos resultados acham-se de acordo com os achados de BROWM e colaboradores (1996), entretanto, o fato curioso ora detectado é que grandes quantidades de corpos apoptóticos, metacromáticos, foram observados nas regiões de hiperplasias nodulares associadas aos tumores, bem como nos pacientes que apresentaram apenas a lesão benigna diagnosticada.

O fato de serem detectadas grandes quantidades de corpos apoptóticos nas regiões hiperplásicas pode nos remeter à idéia de SANTAROSA e colaboradores (1994), em seu modelo experimental, de que a apoptose seja consequência da readaptação do epitélio hiperplásico, quando da recuperação da lesão após a retirada do estímulo indutor da lesão. Embora na próstata hiperplásica não sejam retirados os estímulos causadores da lesão, o dinamismo de redução e aumento dos nódulos hiperplásicos pode ser observado, mesmo com pequenas variações dos estímulos hormonais ao longo do tempo.

O fato que pode corroborar com esta idéia é que as regiões acinares onde os núcleos estão mais alongados são aquelas que no presente estudo mostraram

maior concentração de corpos apoptóticos. Os núcleos alongados estão associados com o mecanismo dinâmico de regressão dos ácinos hiperplásicos (ROSAI, 1996).

Os presentes dados sugerem que a metodologia proposta por VIDAL e colaboradores (1996) pode ser útil na avaliação histológica complementar da progressão terapêutica das hiperplasias nodulares da próstata, já que a uma regressão substancial de tecido, podem estar envolvidos processos de apoptose. Cerca de 25% da área regredida por dia nos tecidos são devidos a processos apoptóticos (BURSCH *et al.*, 1990).

Embora a fixação em formalina seja considerada um fator limitante para a interpretação dos resultados de basofilia e metacromasia dos ácidos nucléicos e digestões enzimáticas (LISON, 1960), na próstata parece não haver ocorrido grandes influências. Este fato é muito importante, pois o material de arquivo patológico, na sua grande maioria, é fixado em formalina. Desta forma, abre-se um caminho para utilização destes materiais no estudo citoquímico clássico e mesmo imunohistoquímico.

3. Organização das fibras da matriz extracelular no estroma das lesões próstaticas

O estroma da próstata está constituído principalmente de fibras conjuntivas colágenas (ROSS *et al.*, 1993 e CARVALHO *et al.*, 1997a), elásticas (CARVALHO *et al.*, 1997b) e de outros componentes de natureza contráctil (ZHANG *et al.*, 1997).

As células musculares lisas compõem a maior parte dos componentes celulares do estroma prostático, juntamente com os fibroblastos (BILLIS, 1995).

No estroma prostático residem os principais compartimentos celulares que regulam a função da glândula. As células musculares lisas são responsáveis pela regulação da taxa de hormônios esteróides durante o desenvolvimento do compartimento epitelial da próstata na embriogênese e também durante a manutenção do órgão adulto (CUNHA, 1985). Após a diferenciação da célula muscular lisa prostática ocorre uma interação recíproca entre epitélio e célula

muscular lisa, que promove a homeostase e manutenção da estrutura e função prostática (HAYWARD *et al.*, 1997).

Além dos componentes celulares do estroma, outros fatores hão que ser mencionados com fundamental importância na regulação da homeostase tecidual: as macromoléculas da matriz extracelular.

Os colágenos, os proteoglicanos e glicosaminoglicanos, e as glicoproteínas estruturais não colagênicas estão estruturadas em complexos supra-moleculares de grande ordem molecular (VIDAL & MELLO, 1987 e VIDAL, 1988), todo este conjunto chamamos de matriz extracelular que compõe boa parte do estroma fibro-muscular na próstata.

A matriz extracelular apresenta importante papel na manutenção da arquitetura tecidual, morfogênese, filtração seletiva de macromoléculas e substrato de ancoragem (WEWER *et al.*, 1986) e também nos processos de diferenciação celular normal (BISSEL *et al.*, 1982) e patológica (COTRAN *et al.*, 1994).

Na tentativa de desenvolver um modelo experimental que evidenciasse a dinâmica da remodelação do estroma glandular, SILVA (1988) descreveu as alterações histológicas e histométricas das fibras no desenvolvimento e regressão normais da mama de ratas albinas.

Em próstata, a dinâmica do estroma glandular, ao longo do desenvolvimento em ratos, tem sido estabelecida por CUNHA (1985) e nos processos de remodelação frente à castração por CARVALHO e colaboradores (1996, 1997a,b).

As alterações no estroma prostático provocadas pelo envelhecimento, foram descritas morfológica, histométrica e ultra-estruturalmente em cobaias e homens idosos por HORSFALL e colaboradores (1994). Estes autores descrevem haver uma reativação da atividade de síntese das fibras musculares lisas no estroma de indivíduos senescentes. Esta retomada da atividade de síntese é presumida pelo aumento de organelas como retículo endoplasmático e complexo de Golgi.

A matriz extracelular tem particular importância nos mecanismos de manutenção do estado diferenciado das glândulas (COTRAN *et al.*, 1994). Na

próstata, tanto a matriz extracelular quanto as células do estroma sofrem influências dos hormônios androgênicos, seja pela queda ou aumento da taxa na corrente sanguínea. Estas variações hormonais refletem em alterações estruturais e fisiológicas do órgão.

Durante o processo de instalação do neoplasma, a interação estroma/epitélio é perturbada. Depois do dano genético ocorrido nas células epiteliais existe uma quebra sequencial na homeostase estroma/epitélio que resulta em alterações morfológicas nos componentes celulares e da matriz extracelular do estroma prostático (HAYWARD *et al.*, 1997).

Os resultados apresentados no presente trabalho, isto é, as diferenças na distribuição e organização dos componentes fibrilares do estroma nas lesões, mostram que os graus de agregação ou dispersão da trama molecular fibrosa dos colágenos no estroma das lesões prostáticas, quando comparados ao estroma normal, podem ser indicativos morfológicos de respostas da matriz à lesão glandular, já que a proliferação celular é um fator a ser levado em conta em ambas as lesões (benignas e malignas). Estas proliferações, sejam de natureza maligna ou não, sempre promovem alterações localizadas na glândula, onde a matriz deverá responder com remodelações regionais.

A variação regional dos componentes do estroma em resposta às lesões da próstata ocorre também em outros níveis que não os fibrilares. NEMETH & LEE (1996) detectaram aumento de outras macromoléculas da matriz extracelular e do citoesqueleto nas células do estroma em próstata de rato.

Outro aspecto de fundamental importância é o da proliferação de vasos nas regiões de maior grau de invasividade tumoral. Nos tumores de maior grau de indiferenciação ocorre uma maior vascularização (VARTANIAN & WEIDNER, 1996). Se a matriz extracelular do estroma hospedeiro do tumor funciona como uma barreira de forças biomecânicas antagônicas (IOZZO, 1995), forças agonísticas permissivas acabam por induzir a neovascularização e conseqüentemente fenótipos tumorais mais agressivos (NAKANISHI *et al.*, 1994). Entretanto, não se pode deixar de levar em conta, neste processo, as possíveis atuações de fatores angiogênicos (ROSAI, 1996).

A agressividade e anaplasia tumoral também podem ser avaliadas através dos componentes fibrosos da matriz. Nossos resultados mostram que as formas

mais agressivas e anaplásicas dos tumores apresentaram uma trama sustentacular de finas fibras, sendo que, à medida que o número de células aumenta no local da proliferação neoplásica, estas fibras se ramificam. Fato semelhante ocorre no estroma hepático, quando este sofre processos de regeneração (MARTINEZ-HERNANDEZ & AMENTA, 1995).

É importante ressaltar que o estroma hospedeiro do tumor é um componente essencial para o processo carcinogênico. Pois, o estabelecimento da anaplasia tumoral é facilitado, ou pelo menos parece estar relacionado com a linhagem fibroblástica do estroma hospedeiro e não com a linhagem muscular deste tecido (BOSMAN *et al.*, 1993).

As deposições de material hialino de natureza colagênica, em forma de placas amorfas, pode ser indicativo de degradação dos componentes do estroma hospedeiro do tumor pelas células neoplásicas, quando da invasividade tumoral. Haja visto que que, nestes tecidos, a invasividade é alta e pode ser observada morfológicamente pelo aumento de vasos no compartimento estromal hospedeiro e pelo número de células no compartimento tumoral.

Pela interação dinâmica que se estabelece entre as células do carcinoma e o estroma hospedeiro, leva admitir que o estroma não é simplesmente uma malha sustentacular para o neoplasma, mas um compartimento essencial na carcinogênese e tumorigênese. Assim, RONNOV-JESSEN e colaboradores (1996) postularam que, sem a resposta dinâmica do estroma hospedeiro do tumor, não haveria o estabelecimento do tumor.

Os mecanismos detalhados deste cenário não estão bem estabelecidos. A maior questão que existe se refere ao fato de não se poder ainda afirmar se as células neoplásicas atuariam reprogramando as fibras musculares lisas a assumirem fenótipos fibroblásticos ou, alternativamente, o neoplasma promoveria a proliferação fibroblástica local (HAYWARD *et al.*, 1997) e conseqüentemente o aparecimento da trama fibrilar intra tumoral e placas hialinas reorganizadas por estes fibroblastos no estroma adjacente ao tumor.

4. Considerações finais

Os aspectos morfológicos aqui abordados, sejam de natureza celular ou extracelular, são de importância fundamental no entendimento da biologia e manutenção do estado diferenciado da próstata madura, bem como para a compreensão do estabelecimento de fenótipos caracterizados como sendo patológicos.

Embora os resultados concernentes às medidas nucleares, isoladamente, não revelem diferenças significativas, para a discriminação de categorias internas nos sub-tipos de tumores, estas medidas diferenciam os três tipos de lesões. Os resultados da cariometria também mostram ser as medianas, melhores parâmetros para serem avaliados no caso de medidas cariométricas de cortes histológicos, pois revelam melhor a heterocedasticidade do universo amostral utilizado.

Outra contribuição nossa para a biologia celular das doenças prostáticas reside no fato de que a hiperplasia, por ser uma doença localizada e dinamicamente regulada pela variação local de hormônios, pode levar ao desequilíbrio na homeostase tecidual e este pode ser detectado pelo aumento dos corpos apoptóticos, que foram detectados pelos métodos da CEC e imunocitoquímica somente nas hiperplasias.

Em relação às fibras do estroma prostático, a nossa principal contribuição refere-se à distribuição e caracterização das fibras colágenas no estroma. Sendo a hiperplasia uma doença que gera uma certa compressão do órgão ou de parte dele, é de se supor que a matriz responda com produção ou reassociação da porção fibrilar do estroma em resposta compensatória à estas forças.

Nas lesões malignas, a matriz forma uma fina trama de sustentação junto das células transformadas e placas hialinas no estroma do tecido hospedeiro do tumor. Estas placas hialinas são altamente coráveis pela prata e birrefringentes (indicativo de ordem molecular). O fenômeno de formação de placas hialinas pode indicar degradação do estroma hospedeiro do tumor ou, pelo menos, revelar uma reassociação da massa fibrilar total em placas hialinas.

Os presentes dados se referem a um grupo de pacientes da Região Norte do Estado de São Paulo. No entanto, pela abordagem do presente estudo não se pôde fazer correlações ou inferências aos fatores ambientais, dietas e outras variantes que poderiam ter influências regionais. Mesmo sendo importantes estes tipos de abordagens, nos arquivos dos laboratórios de patologia ainda não estão acessíveis estes tipos de informações.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos após métodos citoquímicos, morfométricos e análise sob luz polarizada aqui empregados, nos permitem concluir que:

- Existem diferenças visuais na textura e distribuição da cromatina, principalmente nos seus padrões de coloração e distribuição de massas nas lesões prostáticas humanas.

- As medidas nucleares não são suficientemente consistentes para discriminar isoladamente os graus de invasividade tumoral. É importante que sejam aliados a estes resultados, os dados de textura cromatínica e padrão arquitetural do tumor. Embora não ocorram diferenças significativas nas medidas de área, perímetro e fator-forma nuclear para os diferentes graus de adenocarcinomas estudados, as medidas cariométricas, no entanto, são bons parâmetros discriminantes do tipo de lesão e, associadas a outros dados de histoarquitetura, podem ser úteis na análise diagnóstica.

- Das lesões prostáticas analisadas no presente estudo, somente as regiões de hiperplasia nodular responderam positivamente aos testes para detecção de apoptose. Este fenômeno parece estar associado com a resposta de recuperação localizada da lesão, em pontos restritos dentro da glândula. Não somente a apoptose é indicativo morfológico disto, como também a modificação da forma nuclear arredondada para fenótipos mais alongados.

- A matriz extracelular do estroma prostático, em sua dinâmica supra-molecular, pode responder a estímulos externos ao estroma, modificando a sua disposição e o seu grau de compactação fibrilar.

- Na hiperplasia nodular prostática parece não haver modificações na integridade molecular do colágeno, pois a afinidade tintorial e birrefringência não são alteradas.

- Nos adenocarcinomas com alto grau de indiferenciação, fibras colágenas finas, ramificadas e fortemente argirófilas e birrefringentes são detectadas nas regiões de proliferação tumoral. No estroma adjacente, hospedeiro do tumor, placas hialinas de matriz extracelular sugerem degradação ou remodelação dos componentes da matriz.

RESUMO

Uma expressiva fração da população masculina brasileira tem sido diagnosticada com lesões na próstata ou com sintomas de prostatismo. O presente trabalho teve como objetivo a caracterização dos núcleos e da matriz extracelular, com enfoque à morfologia, citoquímica, cariometria e imunocitoquímica de lesões prostáticas humanas.

Foram examinadas biópsias de ressecções trans-uretrais e punção por agulha fina de um total de 26 pacientes com hiperplasia nodular prostática (HNP) e 25 pacientes com adenocarcinomas (AC) de pacientes da Região Norte do Estado de São Paulo. Dos casos acima estudados, 12 pacientes com regiões livres de comprometimento histopatológico foram considerados controles ou regiões normais (NOR). Cortes histológicos de 6-8 μ m de espessura foram submetidos às colorações pela hematoxilina-eosina para as análises da distribuição da cromatina e cariometria (área e perímetro nucleares e fator forma de 200 núcleos para cada paciente estudado); azul de toluidina pH 4,0 e suas variantes para estudos citoquímicos de ácidos nucléicos; Reação de Feulgen para estudo do DNA; Reação imunocitoquímica para detecção de Apoptose - Apoptag e Impregnação argêntica de Gömöri para o estudo da matriz extracelular.

Da análise das lâminas e das medidas nucleares pôde-se concluir que existem diferenças visuais, principalmente nos adenocarcinomas, onde predomina um acentuado pleiomorfismo nuclear. As diferenças cariométricas observadas, foram significativas para os valores de área e perímetro nucleares e não significativas para o fator forma, entre as três classes, utilizando-se o teste estatístico não-paramétrico de Kruskal-Wallis. Para a comparação das populações amostrais utilizou-se as medianas dos valores obtidos na cariometria, como mostra a tabela abaixo.

Classes	Área nuclear (μm^2)	Perímetro nuclear (μm)	Fator Forma
NOR	44,30	24,80	0,94
HNP	37,14	22,52	0,92
AC	60,86	29,70	0,93
valor p	p=0,0001	p=0,0001	p=0,0513(ns)

(ns) não significativo

Entretanto, nas categorias internas da classificação dos adenocarcinomas, segundo a graduação clássica proposta por Gleason, na versão combinada e considerando apenas o primeiro dígito da graduação, não se detectaram diferenças significativas ($p=0,838$ para área; $p=0,6076$ para perímetro e $p=0,9202$ para fator forma). Nestas categorias vale ressaltar a grande heterogeneidade do universo amostral.

Assim conclui-se que os dados de morfometria não podem ser utilizados como parâmetros discriminatórios isoladamente, sem levar em conta a histoarquitetura do tumor.

Da análise dos cortes corados pelo azul de toluidina na sua variante para detecção de apoptose e da imunocitoquímica para detecção de apoptose, pôde-se concluir não serem detectadas células apoptóticas nas regiões normais e nos adenocarcinomas, mas serem detectados corpos apoptóticos nas hiperplasias, principalmente em áreas onde estaria ocorrendo a regressão do ácino hiperplástico. Isto pode sugerir que o fenômeno apoptótico seja um modulador da recuperação localizada da hiperplasia, podendo ser inclusive um parâmetro auxiliar para o acompanhamento diagnóstico durante o tratamento.

Da análise dos cortes submetidos à impregnação argêntica, pôde-se concluir que as fibras colágenas na matriz extracelular do estroma prostático, em sua dinâmica supra-molecular, respondem a estímulos externos ao estroma, modificando a disposição e o grau de compactação fibrilar. Na hiperplasia nodular prostática parece não haver modificações na integridade molecular do colágeno, pois a sua afinidade pela prata e birrefringência não são alteradas. Nos adenocarcinomas com alto grau de indiferenciação, fibras colágenas finas, ramificadas e fortemente argirófilas e birrefringentes são detectadas nas regiões de proliferação tumoral. E no estroma adjacente, hospedeiro do tumor, placas hialinas de matriz extracelular sugerem degradação ou remodelação dos componentes da matriz.

ABSTRACT

An expressive fraction of the Brazilian male population has been diagnosed with prostatic lesions or presents prostatism symptoms. The present work aimed at characterizing the nuclei and the extracellular matrix, emphasizing the morphology, cytochemistry, kariometrics and immunocytochemistry in some human prostatic lesions.

Transurethral resections and fine needle aspiration of patients presenting prostatic nodular hyperplasia (PNH - 26 cases) or adenocarcinoma (AC - 25 cases), from the north region of the São Paulo State were examined. Twelve of these cases presented regions with no histopathological alterations which were considered normal and employed as control (Ct). Six to eight micrometers thick histological sections were stained by hematoxylin and eosin for the analysis of chromatin distribution and kariometry (nuclear area and perimeter and form factor - 200 measurements for each patient); toluidine blue at pH 4.0 and its modifications for the cytochemical study of nucleic acids; Feulgen reaction for DNA; immunocytochemistry for detection of apoptosis (Apoptag kit) and Gömöri's silver impregnation for study of fibrillar collagens.

The analysis showed the existence of visual differences in the nuclear phenotype among the studied cases, in special in AC, which showed a marked nuclear pleomorphism. Karyometry showed significative differences in area and perimeter values but form factor, amongst the three classes, by the use of the Kruskal-Wallis non-parametric statistical test. The median values employed for comparison between the samples are shown in the table below.

Classes	Nuclear area (μm^2)	Nuclear perimeter (μm)	Form factor
Ct	44.30	24.80	0.94
PHN	37.14	22.52	0.92
AC	60.86	29.70	0.93
p value	p=0.0001	p=0.0001	p=0.0513(ns)

(ns)non-significant

The different classifications of the adenocarcinomas, according to the Gleason grading, in the combined version and considering only the first grading, showed no significant differences ($p=0.838$ for the area, $p=0.6076$ for perimeter and $p=0.9202$ for the form factor). It is worth to refer to the large heterogeneity of the nuclear population. It is concluded that morphometrics cannot be used isolatedly to discriminate prostatic lesions, without considerations of the tumor histoarchitecture.

The use of toluidine blue staining modification for detection of apoptosis and the Apoptag test demonstrated the absence of apoptotic cells and in adenocarcinomas but in hyperplasia, especially in areas of regressing hyperplastic acina. This is suggestive that apoptosis may represent a factor involved in localized recover of hyperplasia and its detection is likely to represent an additional parameter for the follow up after treatment.

The analysis of silver impregnated tissue sections allowed for the conclusion that collagen fibers of the prostatic stroma, in their supramolecular dynamics, respond to external stimuli, modifying their disposition and fibrillar compactation. In PNH, there is no modifications in collagen molecular integrity, since the silver affinity and birefringence are similar to controls. In AC with high degree of non-differentiation, thin and branched collagen fibers, strongly argyrophilic and birefringent are detected in regions of cell proliferation. In the adjacent stroma, host of the tumor, hyaline plaques are probable signs of matrix degradation or remodellation.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ¹

- AIHARA, M.; TRUONG, L.D.; DUNN, J.K.; WHEELER, T.M.; SCARDINO, P.T. & THOMPSON, T.C. Frequency of apoptotic bodies positively correlates with Gleason grade in prostate cancer. *Human Pathol.*, v.25, p.797-801, 1994.
- AL-ABADI, H. & NAGEL, R. Nuclear DNA analysis: relevance of ploidy, DNA heterogeneity and phases of cell cycle in 329 patients with prostatic carcinoma - A study on a follow-up of eight years. *Urol. Int.*, v.45, p. 350-355, 1990.
- ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTIS, K. & WATSON, J.D. *Molecular Biology of the Cell*. 3ed., Garland Publish.Inc., NY, 1294p. 1994.
- BEHMER, O.A; TOLOSA, E.M.C. & NETO, A.G.F. *Manual de práticas para histologia normal e patológica*. EDART-EDUSP, SP.329p. 1976.
- BEÇAK, W. & PAULETE, J. *Técnicas de citologia e histologia*. Livraria Nobel, SP., 470p. 1970.
- BEIL, M.; IRINOPOULOU, T. & RIGAUT, J.P. Application of confocal scanning laser microscopy for an automated nuclear grading of prostate lesions in three dimensions. *J.Microsc.*, v. 183, p.231-240, 1996.
- BERGES, R.R.; VUKANOVIC, J.; EPSTEIN, J.I.; CARMICHEL, M.; CISEK, L.; JOHNSON, D.E.; VELTRI, R.W.; WALSH, P.C. & ISAACS, J.T. Implication of cell kinetic changes during progression of human prostatic cancer. *Clin. Can. Res.*, v. 1, p. 437-480, 1995.
- BERRY, S.J.; COFFEY, D.S.; WALSH, P.C. & EWING, L.L. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J. Urol.*, v.132, p. 474-479, 1984.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 6023: referências bibliográficas. Rio de Janeiro, 19p., 1989.

- BILLIS, A. *Uropatologia: Próstata*. Guia prático para diagnóstico uropatológico. UNICAMP, Campinas, SP., (apostila técnica). 165p. 1995.
- BISSEL, N.J.; HALL, H.G. & PARRY, G. How does the extracellular matrix direct gene expression? *J. Theor. Biol.*, v. 99, p. 31-68, 1982.
- BOSMAN, F.T.; BRUINE, A. & FLOHIL, C. Epithelial-stromal interaction in colon cancer. *Int. J. Dev. Biol.*, v. 37, p. 203-211, 1993.
- BOSTWICK, D.G. Premalignant lesions of the prostate. *Sem. Diagn. Pathol.*, v. 5, p. 240-253, 1988.
- BOSTWICK, D.G. & BRAWER, M. Prostatic intraepithelial neoplasia and early invasion in prostate cancer. *Cancer*, v. 59, p. 788-794, 1987.
- BRÄNDSTRÖM, A.; WESTIN, P.; CAJANDER, S. & DAMBER, J.E. Castration induces apoptosis in the ventral prostate but not in a androgen-sensitive prostatic adenocarcinomas in rat. *Cancer Res.*, v. 54, p. 3594-3601, 1994.
- BRODERS, A.C. Carcinoma: grading and practical application. *Arch. Pathol.*, v. 2, p. 376-381, 1926.
- BROWM, C.; SALVAGEOT, J.; KAHANE, H. & EPSTEIN, J.I. Cell proliferation and apoptosis in prostate cancer - correlation with pathologic stage? *Mod. Pathol.*, v. 9, p. 205-209, 1996.
- BURSCH, W.; KLEINE, L. & TENNISWOOD, M. The biochemistry of cell death by apoptosis. *Biochem. Cell. Biol.*, v.68, p. 1071-1074, 1990.
- CAREY, F.A. Measurement of nuclear DNA content in histological and cytological specimens: principles and applications. *J. Pathol.*, v. 172, p. 307-312, 1994.

- CARVALHO, H.F. & LINE, S.P. Basement membrane changes in the rat ventral prostate following castration. *Cell Biology International*, v. 20, p. 809-819, 1996.
- CARVALHO, H.F.; TABOGA, S.R. & VILAMAIOR, P.S.L. Collagen type VI is a component of the extracellular matrix microfibril network of the prostatic stroma. *Tissue & Cell*, v. 29, p. 163-170, 1997a.
- CARVALHO, H.F.; VILAMAIOR, P.S.L. & TABOGA, S.R. Elastic system of the rat ventral prostate and its modifications following orchiectomy. *Prostate*, v. 32, p. 27-34, 1997b.
- CHOPRA, D.P. & WILKOFF, L.F. Effects of carcinogens and retinoids on prostatic explants. *Clin. Androl.*, v. 6, p. 166. 1981. apud SROUGI, M. & SIMON, S.D. *Câncer urológico*. Gráfica Platina, SP., 460p. 1990.
- COLOMBEL, M.; SYMMANS, F.; GIL, S.; O'TOOLE, K.M.; CHOPIN, D.; BENSON, M.; OLSSON, C.A.; KORSMEYER, S. & BUTAYAN, R. Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein *bcl-2* in hormone-refractory human prostatic cancers. *Am. J. Pathol.*, v. 143, p. 390-400, 1993.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, J. & ROBINS, S.L. Male Genital System. In: *Robins - Pathologic Basis of Disease*. W.B. Saunders, 5 ed., Philadelphia, p. 1007-1032. 1994.
- CRISMAN, J.D.; SAKR, W.A.; HUSSEIN, M.E. & PONTES, J.E. DNA quantitation of intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma of the prostate. *Prostate*, v. 22, p. 156-162, 1993.
- CUNHA, G.R. Mesenchymal-epithelial interactions during androgen-induced development of the prostate. In: *Developmental Mechanisms: Normal and Abnormal*, New York, AR Liss, p.15-24, 1985.

- DAVIES, P. & EATON, C.L. Regulation of prostate growth. *J. Endocrinol.*, v. 131, p. 5-17, 1991.
- DENMEADE, R.S.; LIN, X.S. & ISAACS, J.T. Role of programmed (Apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *Prostate*, v. 28, p. 251-265, 1996.
- DERMER, G.P. Basal proliferation in benign prostatic hyperplasia. *Cancer*, v. 41, p. 1857-1862, 1978.
- DIETRICH, C.P.; SAMPAIO, L.O. & TOLEDO, O.M.S. Characteristics of sulfated mucopolysaccharides in different tissues and their respective mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 71, p. 1-10, 1976.
- DiSANT'AGNESE, P.A.; de MESY JENSEN, K.L. & CHURKIAN, C.V. Human prostatic endocrine-paracrine (APUD) cells: distributional analysis with a comparison of serotonin and neuron-specific enolase immunoreactivity and silver stains. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 109, p. 607-612, 1985.
- DiSANT'AGNESE, P.A. Calcitonin-like and bombesin-like immunoreactive endocrine-paracrine cells of the human prostate. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 110, p. 412-415, 1986.
- DROLLER, M.J. Medical approaches in the management of prostatic disease. *Br. J. Urol.*, v. 79, p. 42-52, 1997.
- DUNN, J.E. Cancer epidemiology in populations of the United States - with emphasis on Hawaii and California - and Japan. *Cancer Res.*, v. 35, p. 3240-3245, 1975.
- EFFERT, P.J.; McCOY, R.H.; WALTHER, P.J. & LIU, E.T. p53 gene alterations in human prostate carcinoma. *J. Urol.*, v. 150, p. 257-261, 1993.

- FALCO, J.R.P. & MELLO, M.L.S. Critical Electrolyte Concentration (CEC) of H₅ histone-bearing chromatin. *Braz. J. Morphol. Sci.*, (supl) v. 13, p. 87, 1996.
- EKMANN, P.; PAN, Y.; LI, C. & DICH, J. Enviromental and genetic factors: A possible link in prostate cancer. *Br. J. Urol.*, (supl) v. 79, p. 35-41, 1997.
- FRAUENHOFFER, E.E.; RO,J.I.; EL-NAGGAR, A.K.; ORDONEZ,N.G. & AYALA, A.G. Clear cribriform hyperplasia of the prostate: Immunohistochemical and DNA flow cytometric study. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 95, p. 446-453, 1991.
- FRANKFURT, S.O.; CHIN, J.L.; ENGLANDER, L.S.; GRECO, W.R.; PONTES, J.E. & RUSTUM, Y.M. Relationship between DNA ploidy, glandular differentiation, and tumor spread in human prostate cancer. *Cancer Res.*, v. 45, p. 1418-1423, 1985.
- FUJIKAWA, K.; SASAKI, M.; ARAI, Y.; OGAWA, O. & YOSHIDA, O. Prognostic criteria in patients with prostatic cancer: Gleason score *versus* volume-weighted mean nuclear volume. *Clin. Cancer Res.*, v. 3, p. 613-618, 1997.
- GAETA, J.F. Glandular profile and cellular patterns in prostatic cancer grading. *Urology*, (supl) v. 17, p. 33, 1981.
- GARCIA-SCHURMANN, M. & COFFEY, D.S. The concept of evolution in the pathogenesis and treatment of prostatic cancer. *Br. J. Urol.*, (supl), v. 79, p. 9-17, 1997.
- GARNETT, J.E.; OYASU, R. & GRAYHACK, J.T. The accuracy of diagnostic biopsy specimens in predicting tumor grades by Gleason's classification of radical prostatectomy specimens. *J. Urol.*, v. 131, p. 390, 1984 apud PALMA, P.C.R. *O valor preditivo do Sistema Gleason de graduação histológica na detecção de metástases ganglionares no adenocarcinoma de próstata*. Dissertação de Mestrado, Unicamp, Campinas-SP., 33p, 1987.

- GARNICK, M.B. The dilemmas of prostatic cancer. *Sci. Am.* v.270, p.52-59, 1994.
- GARRAWAY, W.M. & ALEXANDER, F.E. Prostate disease: Epidemiology, natural history and demography. *Br. J. Urol.*, (supl), v. 79, p. 3-8, 1997.
- GAVRIELI, Y.; SHERMAN, Y. & BEN-SASSON, S.A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J. Cell Biol.*, v. 119, p. 493-450, 1992.
- GHAZIZADEH, M.; SASAKI, Y.; OGURO, T. & AIHARA, K. Silver staining of nucleolar organizer in prostatic lesions. *Histopathol.*, v. 19, p. 369-372, 1991.
- GITTES, R.F. & CHU, T.M. Detection and diagnosis of prostate cancer. *Sem. Oncol.*, v. 3, p. 123-130, 1976.
- GLEASON, D.F. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother. Rep.*, v. 50, p. 125-128, 1966.
- GLEASON, D.F. Histologic grading and clinical staging of prostatic carcinoma. In: *Urologic Pathology: The prostate.*, Lea & Febiger, Philadelphia, p.171-197, 1977.
- GLUKSMAN, A. Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.*, v. 26, p. 59-86, 1950.
- GÖMÖRI, G. Silver impregnation of reticulum in paraffin sections . *Am. J. Pathol.*, v. 13, p. 993-1002, 1937.
- HAM, A. & CORMACK, D.H. *Histologia*. Guanabara Koogan, 9ed., RJ., 570p 1991.
- HARMON, B.V. & ALLAN, D.J. Apoptosis. *Adv. Genetics*, v. 35, p. 35-53, 1997.

- HAYWARD, S.W.; ROSEN, M.A. & CUNHA, G.R. Stromal-epithelial interactions in the normal and neoplastic prostate. *Br. J. Urol.*, (supl), v. 79, p. 18-26, 1997.
- HELPAP, B. Observations on number, size and localization of nucleoli in hyperplastic and neoplastic prostatic disease. *Histopathol.*, v. 13, p. 203-211, 1988.
- HENSON, D.E. The histological grading of neoplasms. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v. 112, p. 1091-1096, 1988.
- HOCKENBERY, D. Defining Apoptosis. *Am. J. Pathol.*, v. 146, p. 16-18, 1995.
- HOLLANDER, M. & WOLFE, D.A. *Nonparametric statistical methods*. J. Willey & Sons, New York.
- HOPSON, J.L. & WESSELLS, N.K. 1990. *Essentials of Biology*. McGraw-Hill, NY., 865p, 1973.
- HORSFALL, D.J.; MAYNE, K.; RICCIARDELLI, C.; RAO, M.; SKINNER, J.M.; HENDERSON, D.W.; MARSHALL, V.R. & TILLEY, W.D. Age-related changes in guinea pig prostatic stroma. *Lab. Invest.*, (supl), v. 70, p. 753-763, 1994.
- HUTCHINSON, G.B. Incidence and etiology of prostatic cancer. *Virology*, (supl), v. 17, p. 4, 1981. apud COTRAN, R.S.; KUMAR, J. & ROBINS, S.L. *Robins - Patologia Estrutural e Funcional*. Guanabara Koogan, 4 ed., RJ., 1231p. 1991.
- IOZZO, R.V. Tumor stroma as a regulator of neoplastic behavior - Editorial. *Lab. Investig.*, v. 73, p. 157-160, 1995.
- JONES, E.C.; McNEAL, J.; BRUCHOVSKY, N. & JONG, G. DNA content in prostatic adenocarcinoma - A flow cytometry study of the predictive value of

- aneuploidy for tumor volume, percentage Gleason grade 4 and 5, and lymph node metastases. *Cancer*, v. 66, p. 752-757, 1990.
- KEETCH, D.W.; HUMPHREY, P.; STHAL, D.; SMITH, D.S. & CATALONA, W.J. Morphometric analysis and clinical followup of isolated prostatic intraepithelial neoplasia in needle biopsy of the prostate. *J. Urol.*, v. 154, p. 347-35, 1995.
- KERR, J.F.R.; WYLE, A.H. & CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, v. 26, p. 239-257, 1972.
- KERR, J.F.R.; GOBÉ, G.C.; WINTERFORD, C.M. & HAMON, B.V. Anatomical methods in cell death. *In: Methods in Cell Biology*, v. 46, Ed. by L.M. Schwartz and B. A. Osborne, cap. 1, 27p. 1995.
- KRAIN, L.S. Some epidemiologic variables in prostatic carcinoma in California. *Prev. Med.*, v. 3, p. 154, 1974. apud SROUGI, M. & SIMON, S.D. *Câncer urológico*. Gráfica Platina, SP., 460p, 1990.
- LANDSTRÖN, M.; DAMBER, J.E. & BERGH, A. Prostatic tumor regrowth after initially successful castration therapy may be related to a decreased apoptotic cell death rate. *Cancer Res.*, v. 54, p. 4281-4284, 1994.
- LINDEN, R. Apoptose: a morte programada das células. *Anais da 49ª Reunião Anual da SBPC*, Belo Horizonte, v. 1, p. 55-58, 1997.
- LISON, L. *Histoquímica et Cytoquímica Animales*. Gautier-Villars, Paris, 1960.
- LUNDBERG, S.; CARSTENSEN, J. & RUNDQUIST, I. Cytometry and histopathological grading of paraffin-embedding prostate biopsy specimens in a survival study. *Cancer Res.*, v. 47, p. 1973-1977, 1987.

- MAJNO, G. & JORIS, I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am. J. Pathol.*, v. 146, p. 3-15, 1995.
- MAO, P. & ANGRIST, A. The fine structure of basal cell of the human prostate. *Lab. Invest.*, v. 15, p. 1768-1782, 1966.
- MARTINEZ-HERNANDEZ, A. & AMENTA, P.S. The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J.*, v. 9, p. 1401-1409, 1995.
- McNEAL, J.E. Regional morphology and pathology of the prostate. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 49, p. 347-357, 1968.
- McNEAL, J.E. Normal and pathologic anatomy of prostate. *Urology*, (supl), v. 17, p. 11, 1981.
- McNEAL, J.E. Prostate. In: *Histology for Pathologists*. ed by S. S. Sternberg. Raven Press., NY., p749-763, 1992.
- McNEAL, J.E. & BOSTWICK, D.G. Intraductal dysplasia. A premalignant lesion of the prostate. *Hum. Pathol.*, v. 17, p. 64-71, 1986.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. *Ciên. Cult.*, v. 30, p. 665-676, 1978.
- MELLO, M.L.S. & VIDAL, B.C. *Práticas de Biologia Celular*. Edgard Blücher-Funcamp. 71p, 1980.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C.; DANTAS, M.M. & MONTEIRO, A.L.P. Discrimination of the nucleolus by a Critical Electrolyte Concentration method. *Acta Histochem. Cytochem.*, v. 26, p. 1-3, 1993.

- MONTEIRO, A.L.P. *Concentração Crítica de eletrólitos em cromossomos politênicos de Trichosia pubescens (Diptera: Sciaridae)*. Tese de Mestrado, Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, SP., 98p, 1993.
- MONTIRONI, R.; SCARPELLI, M.; SISTI, S.; BRACCISCHI, A.; GUSELLA, P.; PISANI, E.; ALBERTI, R. & MARIUZZI, G.M. Quantitative analysis of prostatic intraepithelial neoplasia on tissue sections. *Analyt. Quant. Cytol. Histol.*, v. 12, p. 366-372, 1990a.
- MONTIRONI, R.; SCARPELLI, M.; SISTI, S.; BRACCISCHI, A. & MARIUZZI, G.M. Morphological and quantitative analysis of intraductal dysplasia of the prostate. *Analyt. Cell. Pathol.*, v. 2, p. 277-285, 1990b.
- MOORE, R.A. Benign hypertrophy of the prostate. A morphological study. *J. Urol.*, v. 50, p. 680-710, 1943.
- MOSTOFI, F.K. Problems of grading carcinoma of prostate. *Sem. Oncol.*, v. 3, p. 161-169, 1976.
- MOSTOFI, F.K. & PRICE, E.B. *Tumors of the male genital system*. Armed Forces Institute of Pathology, 2ed, Washington, 310p., 1973.
- MOSTOFI, F.K.; MURPHY, G.B.; METTLIN, C.; SESTERHENN, I.A.; BATSAKIS, J.G.; KHALIQ, S.U.; NADINPALLI, V.; TAHAN, S.; SIDERS, D.B.; KOLLIN, J.; MARSH, W.; OWINGS, M. & SWEET, J. Pathology review in early prostate cancer detection program: Results from the American Cancer Society - National Prostate Cancer Detection Project. *Prostate*, v. 27, p. 7-12, 1995.
- MUIR, E.G. Carcinoma of the prostate. *Lancet.*, v. 1, p. 667-672, 1934.
- MURPHY, G.P. & WHITMORE-Jr, W.F. A report of the workshops on the current status of the histologic grading of prostate cancer. *Cancer*, v. 44, p. 1490-1494, 1979.

- NADLER, R.B.; HUMPHREY, P.A.; SMITH, D.S.; CATALONA, W.J. & RATLIFF, T.L. Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate specific antigen levels. *J. Urol.*, v. 154, p. 407-413, 1995.
- NAKANISHI, H.; OGURI, K.; TAKENKA, K.; HOSODA, S. & OKAYAMA, M. Differential fibrotic stromal responses of host tissue to low- and high-metastatic cloned Lewis lung carcinoma cells. *Lab. Invest.*, v. 70, p. 324-332, 1994.
- NEMETH, J.A. & LEE, C. Prostatic ductal system in rats: regional variation in organization. *Prostate*, v. 28, p. 124-128, 1996.
- NETTER, F.H. *Reproductive Systems - The Ciba Collection of Medical Illustration*. CIBA, 5ed, NY., 286p, 1965.
- NOETHER, G.E. *Introduction to statistics: A nonparametric Approach*. Houghton Miffling Company, 2ed. 1976.
- PALMA, P.C.R. *O valor preditivo do Sistema Gleason de graduação histológica na detecção de metástases ganglionares no adenocarcinoma de próstata*. Dissertação de Mestrado, FCM, Unicamp, Campinas-SP., 33p., 1987.
- PARTIN, A.W. & COFFEY, D.S. Benign and malignant prostatic neoplasms: human studies. *Rec. Progr. Horm. Res.*, v. 49, p. 293-331, 1994.
- PERSONS, D.L.; TAKAI, K.; GIBNEY, D.J.; KATZMANN, J.A.; LIEBER, M.M. & JENKINS, R.B. Comparison of fluorescence in situ hybridization with flow cytometry and static image analysis in ploidy analysis of paraffin-embedded prostate adenocarcinoma. *Human Pathol.*, v. 25, p. 678-683, 1994.
- RAFF, M.C. 1992. Social controls on cell survival and death. *Nature*, v. 356, p. 397-400, 1994.

- RAUCH, F. ; POLZAR, B.; STEPHAN, H.; ZANOTTI, S.; PADDEMBERG, R. & MANNHERZ, H.G. Androgen ablation leads to an upregulation and intranuclear accumulation of deoxiribonuclease I in rat prostate epithelial cells paralleling their apoptotic elimination. *J.Cell Biol.*, v. 137, p. 909-923, 1997.
- REBELO, M.S. & ABREU, E. Boletim do Instituto Nacional de Câncer. Gráfica Pro-onco, R.J., 1994.
- REESE, J.H.; McNEAL, J.E.; REDWINE, E.A.; SAMLOFF, I.M. & STAMEY, T.A. Differential distribution of pepsinogen II between the zones of the human prostate and seminal vesicle. *J. Urol.*, v. 136, p. 1148-1152, 1986.
- REESE, J.H.; McNEAL, J.E.; REDWINE, E.A.; SATNEY, T.A. & FREIHA, F.S. Tissue type plasminogen activator as a marker for functional zones within the human prostate gland. *Prostate*, v. 12, p. 47-53, 1988.
- RONNOV-JESSEN, L. ; PETERSON, O. & BISSELL, M. Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: Importance of stromal reaction. *Physiological Rev.*, v. 76, p. 69-125, 1996.
- ROSAI, J. Male reproductive system. In: J. Rosai ed. *Ackerman's Surgical Pathology*. Mosby-Year, INC., 8ed., St.Louis-USA, v.1 , p. 1221-1256, 1996.
- ROSS, M.H.; REITH, E.J. & ROMRELL, L.J. *Histologia - Texto e Atlas*. Panamericana, 2ed, RJ., 779p, 1993.
- SAHIN, A.A.; RO, J.Y.; EL-NAGGAR, A.K.; ORDONEZ, N.G.; BABAIN, R.J. & AYALA, A.G. Pseudosarcomatous fibromyxoid tumor of the prostate: A case report with immunohistochemical, electron microscopy and DNA flow cytometry analysis. *An. J. Clin. Pathol.*, v. 96, p. 253-258, 1991.

- SALLES, A.B.C.F.de. *Estudo citogenético em lesões de próstata*. Dissertação de Mestrado, Departamento de Biologia, IBILCE, UNESP, São José do Rio Preto, SP, 80p, 1994.
- SANTAROSA, R.; COLOMBEL, M.C.; KAPLAN, S.; MONSON, F.; LEVIN, R.M. & BUTTYAN, R. Hyperplasia and apoptosis: opposing cellular processes that regulate the response of the rabbit bladder to transient outlet obstruction. *Lab. Investig.*, v. 70, p. 503-510, 1994.
- SCHULMAN, L.M.; MANDEL, L.J.; BLACKARD, C.; BAUER, H.; SCARLETT, J. & McHUGH, R. Epidemiologic study of prostatic cancer: preliminary report. *Cancer Treat. Rep.*, v. 61, p. 181-186, 1971.
- SHIMAMURA, A. & FISHER, D.E. p53 in the life and death. *Clin Cancer Res.*, v. 2, p. 435-440, 1996.
- SILVA, J.A.N. *Matriz extracelular de mama: caracterização histológica de fibras de colágeno e quantificação de mastócitos*. Tese de Mestrado. Instituto de Biologia, Unicamp, Campinas, SP., 73p, 1988.
- SILVERBERG, E. & LUBERA, J.A. Cancer statistics. *Cancer J.*, v. 39, p. 3, 1989. apud SROUGY, M. & SIMON, S.D. *Câncer Urológico*. Gráfica Platina, São Paulo, 460p, 1990.
- SROUGI, M. & SIMON, S.D. *Câncer urológico*. Gráfica Platina, SP., 460p, 1990.
- SMITH, P.S.; PARKINSON, I.H. & LEONG, A.S.Y. Principles of ploidy analysis by static cytometry. *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.*, v. 49, p. 104-111, 1996.
- SVANHOLM, H.; STARKLINT, H.; BARLEBO, H. & OLSEN, S. Histological evaluation of prostatic cancer (II): Reproducibility of a histological grading system. *APMIS*, v. 98, p. 229-236, 1990.

- TENNISWOOD, M. Apoptosis, tumor invasion and prostate cancer. *Br. J. Urol.*, v. 79, p. 27-34, 1997.
- THIEBAUT, F.; RIGAUT, J.P. & REITH, A. Improvement in the specificity of the silver staining technique for AgNOR-associated acidic proteins in paraffin sections. *Stain. Technol.*, v. 59, p. 181-185, 1984.
- THOMPSON, T.C. Growth factors and oncogenes in prostate cancer. *Cancer Cells*, v. 2, p. 345-354, 1990.
- UMANSKY, S.R. Apoptosis: molecular and cellular mechanisms (A Review). *Mol. Biol.*, v. 30, p. 285-295, 1996.
- VARTANIAN, R. & WEIDNER, N. Endothelial cell proliferation in prostatic carcinoma and prostatic hyperplasia: correlation with Gleason's score, microvessel density, and epithelial cell proliferation. *Lab. Invest.*, v. 73, p. 884-850, 1995.
- VESALAINEN, S.; LIPPONEN, P.; TALJA, M.; KASURINEN, J. & SYRJÄNEN, K. Nuclear morphometry is of independent prognostic value only in T1 prostatic adenocarcinomas. *Prostate*, v. 27, p. 110-117, 1995.
- VIDAL, B.C. 1984. Polyploidy and nuclear phenotypes in salivary glands of the rat. *Biol. Cell.*, v. 50, p. 137-146, 1995.
- VIDAL, B.C. Histochemical and anisotropical properties characteristics of silver impregnation: the differentiation of reticulin fibers from the other interstitial collagens. *Zool. Jb. Anat.*, v. 117, p. 485-494, 1988.
- VIDAL, B.C. Human renal carcinoma: Feulgen-DNA, area and chromatin condensation determined by scanning cytometry. *Rev. Bras. Genet.*, v. 15, p. 945-961, 1994.

VIDAL, B.C. & MELLO, M.L.S. *Biologia Celular*. Atheneu, RJ, 347p., 1987.

VIDAL, B.C.; PLANDING, W.; MELLO, M.L.S. & SCHENCK, U. Quantitative evaluation of AgNOR in liver cells by high resolution image cytometry. *Anal. Cell. Pathol.*, v. 7, p. 27-41, 1994.

VIDAL, B.C.; BARBISAN, L.F.; MARIA, S.S.; RUSSO, J. & MELLO, M.L.S. Apoptosis: identification by a critical electrolyte concentration method. *Apoptosis*, v. 1, p. 218-221, 1996.

WANG, N.; STENKVIST, B.G. & TRIBUKAIT, B. Morphometry of nuclei of normal and malignant prostate in relation to DNA ploidy. *Analyt. Quant. Cytol. Histol.*, v. 14, p. 210-216, 1992.

WEISS, L. & GREEP, R.O. *Histologia*. Guanabara Koogan, 4ed, RJ., 1016p., 1981.

WESTIN, P.; BRÄNDSTÖN, A.; DEMBER, J.E. & BERG, A. Castration plus oestrogen treatment induces apoptosis, but castration alone suppresses epithelial cell apoptosis in an androgen-sensitive rat prostatic adenocarcinoma. *Br. J. Cancer*, v. 72, p. 140-145, 1995.

WILLIAMS, G.T. Programmed cell death: Apoptosis and oncogenes. *Cell*, v. 65, p. 1097-1098, 1991.

WILSON, J.D. The pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Am. J. Med.*, v. 68, p. 745-755, 1980.

WEWER, V.M.; ALBERCHTSEN, R.; RAO, C.N. & LIOTTA, L.A. The extracellular matrix in malignancy. *Reumatol. Am. Rev.*, v. 10, p. 451-478, 1986.

WHITMORE-Jr, W.F. The natural history of prostatic cancer. *Cancer*, v. 32, p. 1104-1112, 1973.

- WYLE, A.H.; KERR, J.F.R. & CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, v. 68, p. 251-306, 1980.
- YOUNG, R.H. Tumor-like lesions of the prostate gland. *Am. J. Clin. Pathol.*, v. 104, p. 607-610, 1995.
- YOUNG, H.H. & DAVIS, D.M. *Young's Practice of Urology*. Saunders, Philadelphia. 1926.
- ZAKERI, Z.; BURSCH, W.; TENNISWOOD, M. & LOCKSHIN, R.A. Cell death. Programed, apoptosis, necrosis or other. *Cell Death Differ.*, v.2, p. 87-96, 1995.
- ZHANG, J.; HESS, M.W.; THURNHER, M.; HOBISCH, A.; RADMAYR, C.; CRONAUER, M.V.; HITTMAYER, A.; CULIG, Z.; BARTSCH, G. & KLOCKER, H. Human prostatic smooth muscle cells in culture: estradiol enhances expression of smooth muscle cell-specific markers. *Prostate*, v. 30, p. 117- 129, 1997.