



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Clarice Fraga Esteves Maciel Osorio

**Expressão dos elementos estromais
dos adenocarcinomas prostáticos nos diferentes escores de Gleason**

Rio de Janeiro

2019

Clarice Fraga Esteves Maciel Osorio

**Expressão dos elementos estromais
dos adenocarcinomas prostáticos nos diferentes escores de Gleason**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Sistema Urogenital

Orientador: Prof Dr Francisco José Barcellos Sampaio

Co-orientadores: Dra Carla Braga Mano Gallo

Prof Dr Waldemar Silva Costa

Rio de Janeiro

2019

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

O83 Osório, Clarice Fraga Esteves Maciel
Expressão dos elementos estromais dos adenocarcinomas prostáticos nos
diferente escore de Gleason / Clarice Fraga Esteves Maciel Osório. – 2019.
57 f.

Orientador: Francisco José Barcellos Sampaio.

Coorientadores: Carla Braga Mano Gallo e Waldemar Silva Costa.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de
Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências
Cirúrgicas.

1. Próstata – Cancêr – Teses. 2. Neoplasias da próstata. 3. Morfologia. 4.
Células estromais. 5. Adenocarcinoma. 6. Fatores de tempo. I. Sampaio,
Francisco José Barcellos. II. Gallo, Carla Braga Mano. III. Costa, Waldemar
Silva. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências
Médicas. IV. Título.

CDU 616.65-002

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira. CRB-7/5302

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Clarice Fraga Esteves Maciel Osorio

**Expressão dos elementos estromais dos adenocarcinomas prostáticos nos diferentes
escores de Gleason**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-
Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas
da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 19 de junho de 2019.

Orientador: Prof Dr Francisco José Barcellos Sampaio

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Coorientador(es): Dra Carla Braga Mano Gallo

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof. Luciano Alves Favorito
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Marco Aurélio Rodrigues da Fonseca Passos
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Waldemar Silva Costa (coorientador)
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Luiz Carlos de Miranda
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Mauricio Gonçalves Rubinstein
Universidade do Rio de Janeiro

Prof. João Paulo Martins de Carvalho
Hospital Federal Cardoso Fontes

Rio de Janeiro

2019

RESUMO

OSORIO, Clarice Fraga Esteves Maciel. **Expressão dos elementos estromais dos adenocarcinomas prostáticos nos diferentes escores de Gleason**. 2019. 57 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

A classificação do cancer de próstata em diferentes escores proposta por Gleason é um indicador bem estabelecido, que tem suportado o teste do tempo. No entanto, trata-se de um método subjetivo, baseado exclusivamente nas características do parênquima. A avaliação e classificação algorítmica são baseadas em dois critérios fundamentais: o grau de diferenciação glandular e o padrão arquitetural de desenvolvimento tumoral. Comparar os elementos estromais prostáticos (colágeno, fibra elástica, músculo e vasos) de área tumoral com área não tumoral (controle) do mesmo paciente. Comparar estes elementos estromais prostáticos nos diferentes escores de Gleason e nos dois subgrupos de Gleason 7, 3+4 e 4+3. Peças cirúrgicas de prostatectomia radical (n=132) foram processadas para inclusão em parafina e construída uma matriz de TMA contendo cortes de adenocarcinoma e de tecido não tumoral. Os cortes foram corados pela hematoxilina & eosina, tricrômico de Masson, Weigert para fibras elásticas e técnica imuno-histoquímica para vasos sanguíneos. Esses elementos foram identificados e quantificados percentualmente utilizando-se o software ImageJ. Foram observadas modificações estromais importantes que acompanham o desarranjo do parênquima, observado nos escores de Gleason mais elevados. Estas variações estromais seguiram as variações do Gleason. Diferenças significativas nos elementos analisados só começaram a aparecer a partir do Gleason 7. As fibras musculares lisas sofreram uma diminuição significativa nas amostras de Gleason 7. Nas amostras de Gleason mais elevado (8 a 10), três parâmetros analisados apresentaram diferença significativa: músculo (diminuição), fibras do sistema elástico e vasos (aumento). Houve diferença significativa entre a matriz extracelular na área tumoral, isto é, no adenocarcinoma prostático, quando comparado à área não tumoral (controle), principalmente a partir do Gleason 7. Modificações significativas dos elementos do estroma prostático corroboram fortemente com diferentes escores de Gleason e podem contribuir para o prognóstico do câncer de próstata.

Palavras chave: Cancer de próstata. Gleason. Elementos estromais. Histologia.

ABSTRACT

OSORIO, Clarice Esteves Fraga Maciel. **Expression of stromal elements of prostatic adenocarcinoma in different Gleason scores.** 2019. 57 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

The classification of prostate cancer into grades by Gleason is a well-established indicator that has endured the test of time. However, it is a subjective method and based exclusively on the characteristics of parenchyma. The evaluation and algorithm classification is based on two fundamental criteria: the degree of glandular differentiation and tumor development architectural pattern. The objective of this study was to quantify and compare the expression of stromal elements in prostate adenocarcinoma with different Gleason scores with non-tumor tissue (control), corroborating with the data of the parenchyma and the Gleason's classification. Surgical specimens from radical prostatectomy (n = 133) were processed for paraffin embedding and constructed a TMA matrix with fragments of adenocarcinoma and non-tumor tissue. The sections were stained with hematoxylin & eosin, Masson's trichrome, Weigert for elastic fibers and immunohistochemical technique to vessels. These elements were identified and quantified as percentage by using the Image-J software. We observed significant stromal changes that corroborate the derangement of parenchyma found in higher Gleason grades. Significant differences in the elements analyzed only started to appear from Gleason 7. The smooth muscle fibers were significantly decreased in samples with Gleason 7. In samples with higher Gleason (8-10), three of the parameters analyzed presented significant differences: smooth muscle decreased while elastic fiber system and vessels increased. This study revealed that there is a significant difference between the extracellular matrix in prostate cancer compared to the non-tumor area (control) especially in Gleason 7. In addition, our data showed that important modifications of the prostatic stromal elements strongly correlate with different Gleason scores and can contribute to predict the pathological staging of prostate cancer. Also, these data can contribute for the studies of the morphological substrate of prostate cancer applied to new prognostic proposal.

Keywords: Prostate cancer. Gleason. Stromal elements. Histology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Distribuição do CP por estados no Brasil	11
Figura 2-	Diagrama de Gleason	12
Figura 3-	Fotomicrografia de CP Gleason 3	13
Figura 4-	Fotomicrografia de CP Gleason 4	13
Figura 5-	Fotomicrografia de CP Gleason 5	13
Tabela 1 –	Colégio Americano de Patologistas. Arquivos de patologia e medicina laboratorial	14
Figura 6-	Sobrevida de cura bioquímica após prostatectomia radical de acordo com grupo grau	15
Tabela 2 -	Classificação patológica TNM para carcinomas prostáticos	16
Figura 7-	Esquema das zonas prostáticas, base e ápice próstatico	17
Figura 8-	Preparados histopatológicos de próstata e respectivos blocos de parafina .	22
Figura 9-	Construção do TMA	23
Figura 10-	Mapa de um TMA	23
Figura 11-	Fotomicrografia de CP Gleason 3	24
Figura 12-	Fotomicrografia de CP Gleason 4	25
Figura 13-	Fotomicrografia de CP Gleason 5	26
Figura 14-	Fotomicrografia de CP Gleason 5	27
Figura 15-	Fotomicrografia de CP Gleason 4	28
Figura 16-	Fotomicrografia de CP Gleason 4	30

Tabela 3 -	Análise quantitativa do estroma prostático tumoral e não tumoral associados aos escores de Gleason e subtipos de Gleason 7	32
Figura 17-	Análise quantitativa das fibras colágenas	33
Figura 18-	Análise quantitativa das fibras elásticas	34
Figura 19-	Análise quantitativa das das fibras musculares	35
Figura 20-	Análise quantitativa dos vasos sanguíneos	36
Figura 21-	Fotomicrografias de vasos sanguíneos, fibras elásticas, fibras musculares e colágeno	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
CP	Cancer de próstata
CD 31	antígeno CD 31 - <i>plaquet-endothelial cell adhesion molecule 1</i> - PECAM-1
H-E	Hematoxilina eosina
HPB	Hiperplasia prostática benigna
INCA	Instituto Nacional do Cancer
ISUP	<i>International Society of Urological Pathology</i>
MEC	Matriz extracelular
OMS	Organização Mundial de Saúde
PSA	Antígeno prostático específico
TMA	Arranjo em matriz tecidual ou <i>tissue microarray</i>
TNM	Tumor primário, linfonodos regionais e metástases distantes
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1		
1	OBJETIVO	19
2	MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1	Seleção dos casos	20
2.2	Processamento anátomo-patológico	20
2.3	Construção do arranjo em matriz tecidual (TMA)	21
2.4	Análises microscópicas	24
2.4.1	<u>Histoquímica</u>	24
2.4.2	<u>Imuno-histoquímica</u>	28
2.4.3	<u>Análise quantitativa</u>	29
2.5	Análise estatística	30
3	RESULTADOS	31
4	DISCUSSÃO	38
	CONCLUSÕES	41
	REFERÊNCIAS	42
	ANEXO A - Documento de aprovação do comitê de ética	46
	ANEXO B - Método de processamento tecidual em parafina	47
	ANEXO C - Método de coloração de hematoxilina-eosina (H-E)	48
	ANEXO D - Método de colocação de Masson	50
	ANEXO E - Método de coloração de Weight para fibra elástica	53

ANEXO F - Método de imuno-histoquímica	55
ANEXO G - Artigo publicado	57

INTRODUÇÃO

No Brasil o câncer de próstata (CP) é o segundo mais comum entre os homens, atrás apenas do câncer de pele não melanoma. Em valores absolutos e considerando ambos os sexos é o quarto tipo mais comum.

A taxa de incidência é maior nos países desenvolvidos em comparação aos países em desenvolvimento.

Mais do que qualquer outro tipo, é considerado um câncer da terceira idade, já que cerca de três quartos dos casos no mundo ocorrem a partir dos 65 anos.

O aumento observado nas taxas de incidência no Brasil pode ser parcialmente justificado pela evolução dos métodos diagnósticos, pela melhoria na qualidade dos sistemas de informação do país e pelo aumento na expectativa de vida.

Segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Cancer) a estimativa de novos casos de cancer de próstata para 2018 é de 68.220 e a distribuição dos casos mostra predileção pela região sul do Brasil, alguns estados do centro-oeste e Espírito Santo (Figura 1) (1).

Figura 1: Distribuição do CP por estados no Brasil



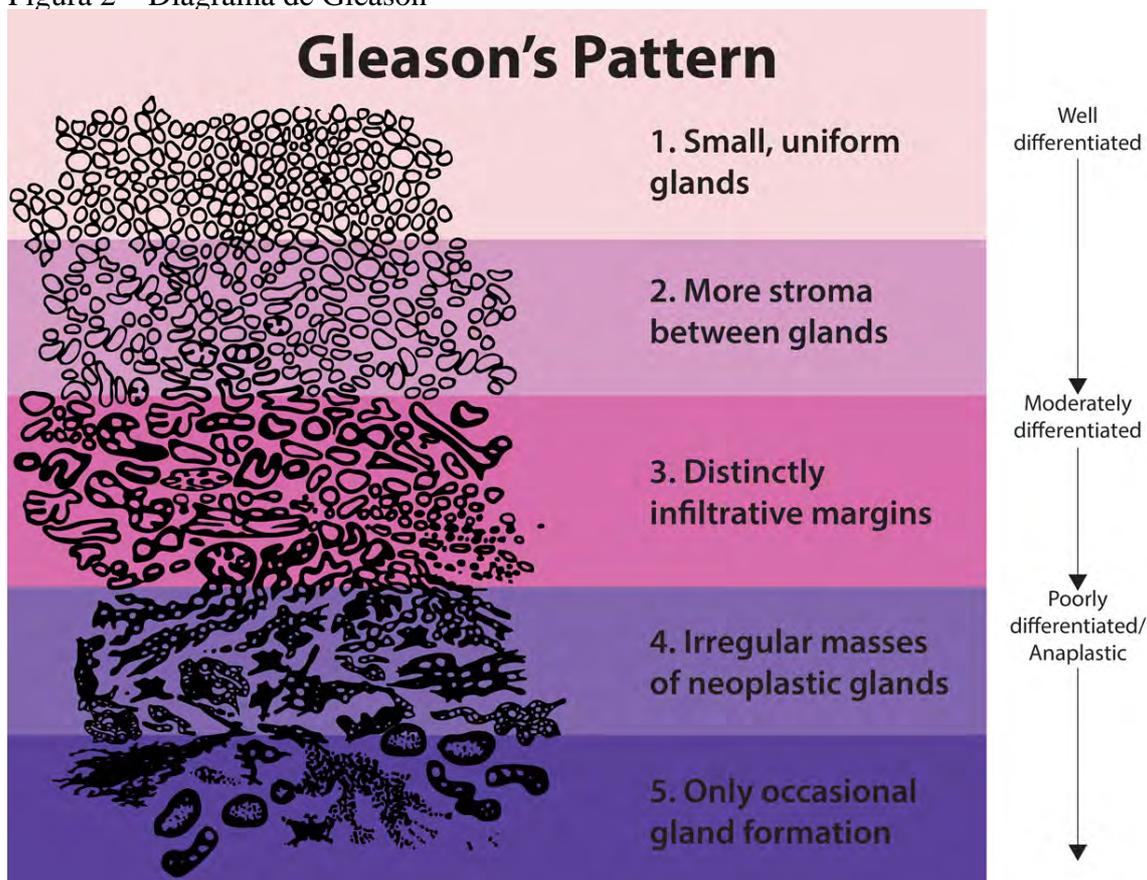
Fonte: INCA, 2018.

Durante as últimas décadas foram utilizados diferentes métodos com o objetivo de determinar o prognóstico do paciente portador de câncer de próstata. Entre eles está a classificação histopatológica proposta por Donald F. Gleason (2).

Gleason, em sua classificação original, observou que o CP podia exibir morfologicamente mais de um padrão arquitetural, incorporando este conceito a um sistema de gradação definido por um padrão primário e um padrão secundário, cuja soma desses dois padrões seria utilizada como o grau (score) final do tumor (3).

Em 1974, a classificação sofreu sua primeira modificação em relação aos cinco padrões histopatológicos. Em 1977, Gleason incluiu seu clássico diagrama com as ilustrações dos cinco padrões histopatológicos (Figura 2, 3, 4 e 5), diagrama este revisto em 1992, quando então ele também acrescentou subtipos aos padrões 3, 4 e 5, mais tarde não utilizados por não revelarem valor prognóstico (4).

Figura 2 – Diagrama de Gleason



Fonte: GLEASON, 1977.

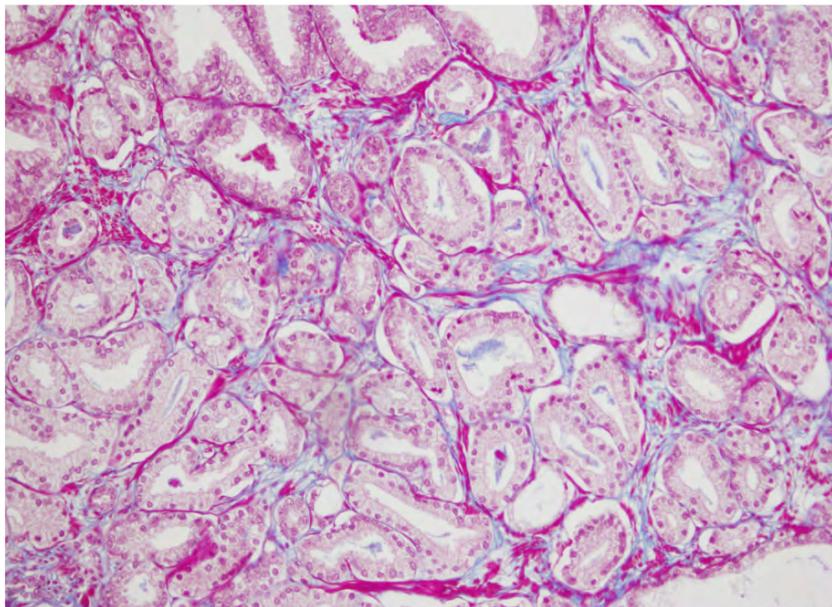


Figura 3 Fotomicrografia de CP Gleason 3. 200x.
Tricrômico de Masson.
Fonte: A Autora, 2019.

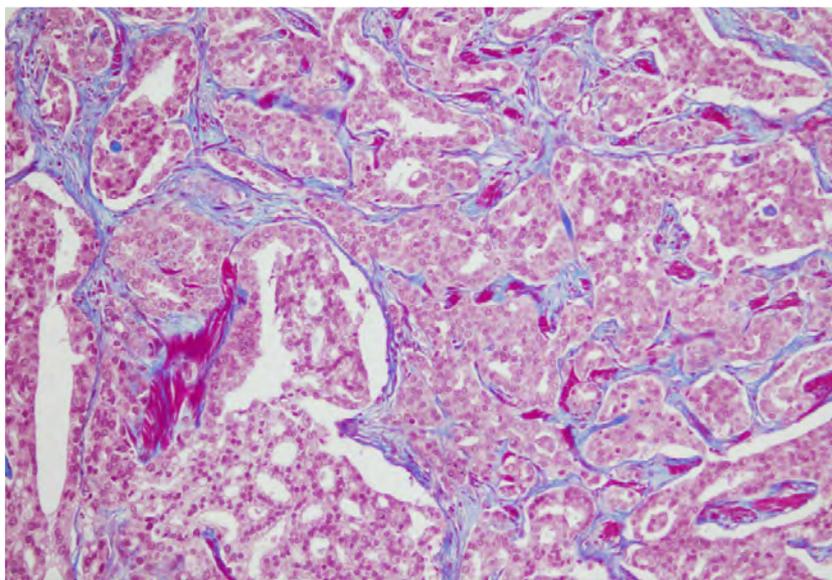


Figura 4 Fotomicrografia de CP Gleason 4. 200x.
Tricrômico de Masson.
Fonte: A Autora, 2019.

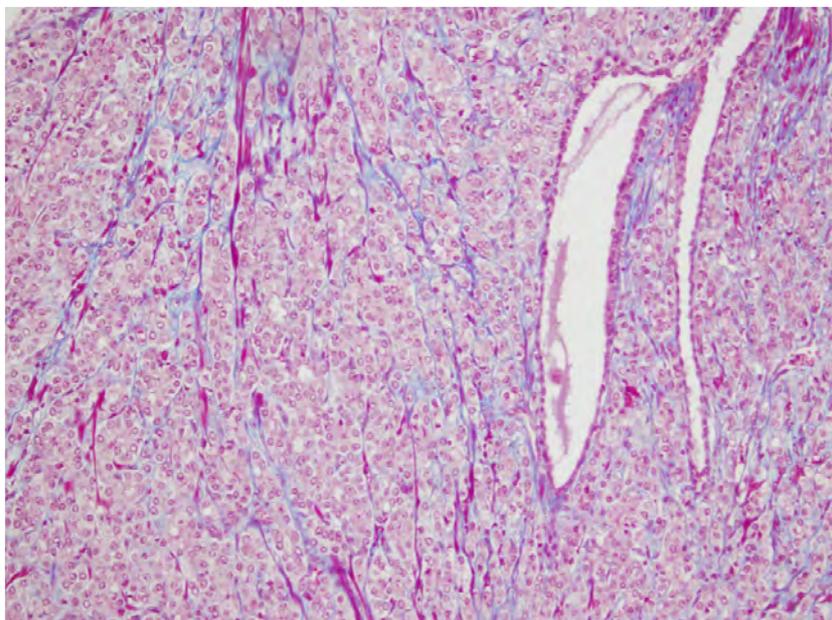


Figura 5 Fotomicrografia de CP Gleason 5. 200x.
Tricrômico de Masson.
Fonte: A Autora, 2019.

Em 2013, um novo sistema composto de grupo grau de 1 a 5 foi desenvolvido pelo Johns Hopkins Hospital e validada como um grande estudo multi institucional e multimodal pelo International Society of Urological Pathology (ISUP) em 2014 (5) (Tabela 1). O novo sistema de graduação prove mais acurácia do que o sistema de Gleason.

O sistema de Gleason com os seus padrões primários e secundários é um sistema de classificação subjetivo e complicado, tendo em vista que os sistemas de classificação utilizados para outros tumores normalmente são simplificados, variando de grau 1 a 3 (bem, moderadamente e mal diferenciado) ou de baixo grau, grau intermediário ou alto grau.

A classificação atual proposta pela ISUP e OMS utiliza um grupo grau 1 para Gleason 6 e grupo grau 2 para Gleason 3 + 4 possibilitando propostas prognósticas e terapêuticas comuns (5).

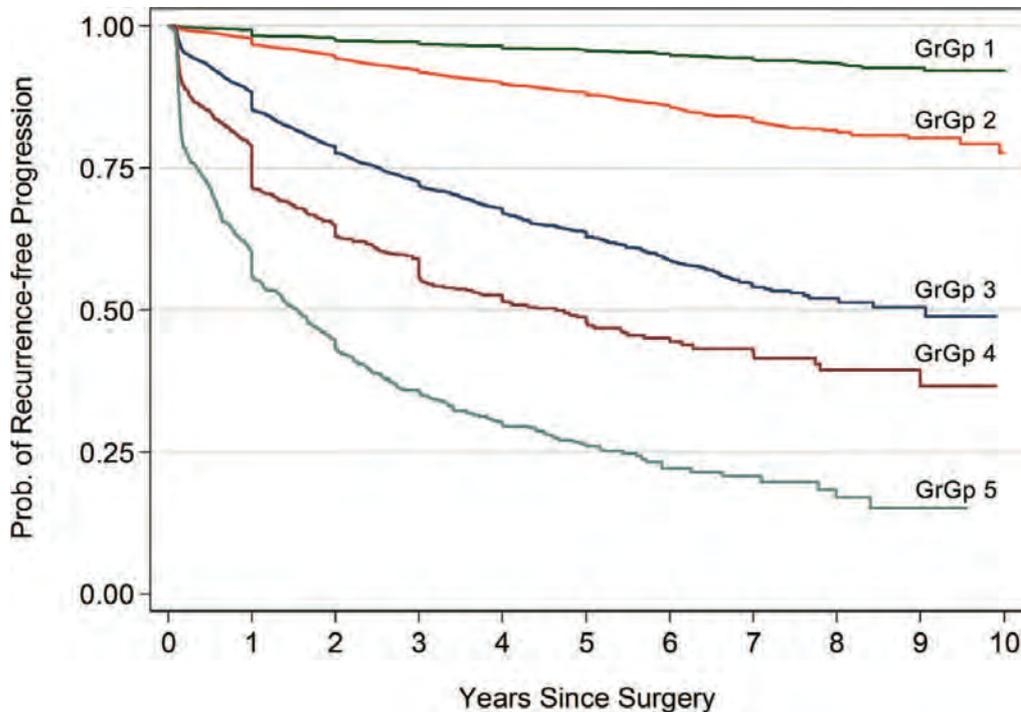
Similarmente a classificação em grupo grau 4 para Gleason 8 e grupo grau 5 para Gleason 9 ou 10 poderá permitir melhor estratificação e estudos futuros que determinem se o CP grupo grau 5 necessitará de uma terapia mais intensiva (5) (Figura 6).

Tabela 1: Colégio Americano de Patologistas. Arquivos de patologia e medicina laboratorial.

Grupo grau	Definição do padrão
Grupo grau 1 - escore de Gleason ≤ 6	Somente glândulas bem formadas, pequenas e individuais
Grupo grau 2 - escore de Gleason 3+4=7	Predomínio de glândulas bem formadas com escasso componente de glândulas mal formadas/pouco fusionadas/cribriformes
Grupo grau 3 - escore de Gleason 4+3=7	Predomínio de glândulas mal formadas/fusionadas/cribriformes com escasso componente de glândulas bem formadas
Grupo grau 4 - escore de Gleason 8	Somente glândulas mal formadas/fusionadas/cribriformes ou predomínio de glândulas bem formadas com escasso componente de padrão sem glândulas ou predomínio de padrão sem glândulas com escasso componente de glândulas bem formadas
Grupo grau 5 - escore de Gleason 9-10	Sem formação de glândulas /necrose com ou sem glândulas mal formadas/fusionadas/cribriformes

Fonte: *International Society of Urological Pathology (ISUP)*, 2014.

Figura 6: Sobrevida de cura bioquímica após prostatectomia radical de acordo com grupo grau.



Fonte: *International Society of Urological Pathology (ISUP)*, 2014

A classificação de Gleason é utilizada nos casos de adenocarcinoma acinar próstático e noutras variantes histopatológicas, não podendo ser utilizada no carcinoma de pequenas células, carcinoma escamoso, carcinoma de células transicionais e no carcinoma basalóide/adenóide cístico. A classificação também não se aplica nos CP com evidências de tratamento prévio (5,7).

A classificação de Gleason é amplamente utilizada por ter boa correlação com a extensão patológica da doença (3,6).

A correlação entre o escore de Gleason e o grau de mortalidade é muito significativa (3,8). O CP Gleason 6 é considerado um carcinoma de baixo grau, o CP Gleason 7 é considerado um carcinoma de grau intermediário e o CP Gleason 8-10 é considerado um carcinoma de alto grau. Pacientes com baixo grau quase nunca desenvolvem doença agressiva, ao passo que aqueles com grau 8 a 10 morrem de CP, na maioria dos casos. A combinação de estadiamento clínico e graduação de Gleason ainda é o melhor valor preditivo prognóstico (9,10).

A graduação histopatológica de Gleason e o conjunto de fatores que determinam o estadiamento patológico da doença como a invasão extraprostática, o comprometimento da margem cirúrgica de ressecção, o comprometimento de margens uretral e vesical e a invasão de vesículas seminais são de importância prognóstica e úteis na conduta clínica do paciente (9,11,12).

Atualmente, os fatores prognósticos estabelecidos para o câncer de próstata são o estadiamento TNM (tumor primário, linfonodos regionais e metástases distantes) do tumor da AJCC (*American Joint Committee on Cancer*) (13) (Tabela 2), o *status* das margens cirúrgicas, nível de PSA (antígeno prostático específico) sérico e escore de Gleason (6).

Tabela 2: Classificação patológica TNM para carcinoma prostáticos

T Categoria	T Critério
T2	Tumor confinado ao órgão
T3	Extensão extraprostática
T3a	Extensão extraprostática (uni ou bilateral) ou invasão microscópica do colo vesical
T3b	Tumor invadindo vesícula(s) seminal(is)
T4	Tumor aderido ou invadindo estruturas adjacentes outras que vesículas seminais como esfinter externo, reto, bexiga, músculo elevador e/ou parade pélvica

Nota 1: Não há classificação patológica T1.

Nota 2: Margem cirúrgica positiva deve ser sinalizada como R1, indicando doença microscópica residual.

Fonte: *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, 2018.

O prognóstico do paciente com CP pode ser definido como a previsão do comportamento biológico da doença, quer na ausência de ou após terapia.

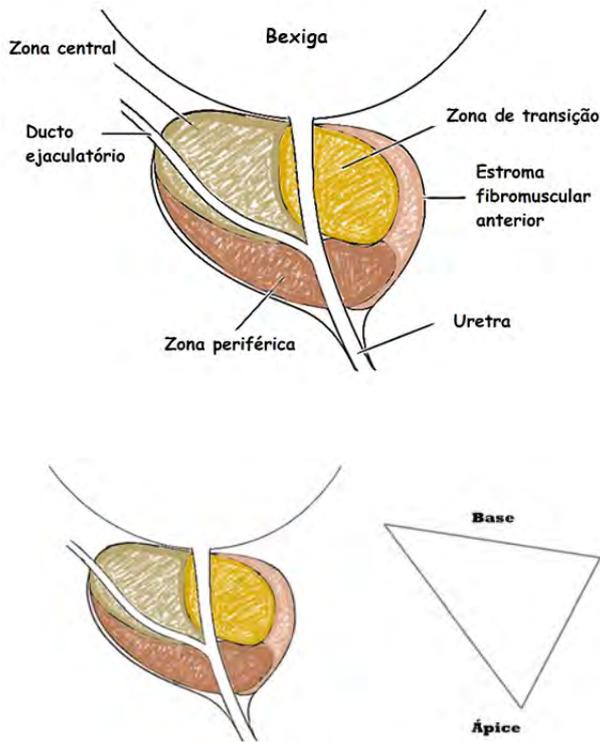
Os fatores prognósticos são aqueles que prevêm a recidiva ou progressão da doença, independente de efeito tratamento futuro.

Já os fatores preditivos são aqueles que prevêm uma resposta ou resistência a uma terapia específica. Não há fatores preditivos ou marcadores que são utilizados no CP (6,14).

McNeal publicou o conceito de anatomia zonal da próstata. Foram identificadas três zonas distintas: zona periférica, zona central e zona de transição (Figura 7) (15).

Cada uma dessas áreas possui histologia e comportamento biológico distintos. A zona periférica e a zona de transição tem importância clínica pois estão associadas ao CP e a hiperplasia prostática benigna, respectivamente (16, 17).

Figura 7: Esquema das zonas prostáticas, base e ápice próstático



Fonte: Faculdade de Ciências Médicas, UNICAMP, 2019.

A glândula prostática é composta por dois compartimentos distintos: o epitelial e o estromal. Analogamente, o CP é composto por células epiteliais malignas e por um estroma de sustentação, cuja transformação é importante para o crescimento e desenvolvimento tumoral (18).

O estroma prostático é formado pelos elementos fibrosos da matriz extracelular (MEC): colágeno e sistema elástico fibrilar, fibras musculares lisas, fibroblastos, miofibroblastos, vasos sanguíneos, nervos e substância fundamental amorfa: proteoglicanos e glicosaminoglicanos. Estes constituem os elementos mais importantes no crescimento e diferenciação da próstata normal, na hipertrofia prostática benigna (HPB) e no CP (19).

O colágeno é a proteína mais abundante nos mamíferos e o maior constituinte da MEC e membrana basal (20). Os componentes do compartimento estromal prostático: fibroblastos, miofibroblastos e células do músculo liso secretam fatores de crescimento, produzem MEC, expressam receptores de androgênio, de estrogênio e receptores adrenérgicos.

A MEC é constituída por uma malha fibrilar de tecidos intersticiais e por lâminas bidimensionais de membrana basal, que sustenta os tecidos epiteliais e endoteliais (21).

Componentes estruturais como as fibras colágenas e elásticas promovem força mecânica e flexibilidade ao tecido e também servem como substrato para adesão celular e migração, que são mediados por glicoproteínas de adesão, como a fibronectina e laminina (22).

As fibras colágenas e as musculares são mais numerosas na zona de transição que na zona periférica. As fibras do sistema elástico da zona de transição diferem significativamente daquelas da zona periférica e da zona central. De modo similar, os nervos da zona periférica diferem significativamente daqueles da zona central (16).

O crescimento tumoral e as metástases são dependentes da angiogênese tumoral, esta baseada no crescimento de novos vasos em direção ao tumor, como também dentro do tumor. Esta neovascularização pode ser estimulada por fatores liberados a partir das células tumorais, de células inflamatórias associadas ao tumor e pela MEC (23).

A densidade dos microvasos está associada a agressividade do tumor, recorrência do PSA, metáteses após a prostatectomia radical e sobrevida do paciente (23).

As características dos componentes estromais bem como suas expressões no tecido prostático parecem ter correlação com a predileção de localização do CP pela zona periférica da próstata (24).

A classificação do CP em diferentes escores, proposta por Gleason, é um indicador bem estabelecido, que tem suportado o teste do tempo (6). No entanto, trata-se de um método subjetivo, baseado exclusivamente nas características do parênquima. A avaliação e classificação algorítmica são baseadas em dois critérios fundamentais: o grau de diferenciação glandular e o padrão arquitetural de desenvolvimento tumoral (4).

Uma análise quantitativa dos elementos que constituem o estroma do CP associada aos escores de Gleason mostrando uma correlação estroma/carcinoma na progressão e metástases pode contribuir para novas abordagens terapêuticas/prognósticas (25). A associação desses diferentes fatores parece ainda não ter sido feita.

1. OBJETIVO

Como a classificação histopatológica proposta por Gleason leva em consideração somente o parênquima, o objetivo do trabalho foi comparar os elementos estromais prostáticos (fibras colágenas, fibras elásticas, fibras musculares e vasos sanguíneos) de área tumoral com área não tumoral adjacente (controle) do mesmo paciente.

Comparar estes elementos estromais prostáticos nos diferentes escores de Gleason e nos dois subgrupos de Gleason 7, 3+4 e 4+3.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção dos casos

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética (CAAE número 12685413.6.0000.5259 - HUPE - UERJ (ANEXO A).

Os resultados das peças foram obtidos a partir de amostras retiradas da zona periférica da próstata. Foram selecionadas aleatoriamente cento e trinta e duas peças cirúrgicas de prostatectomias radicais a céu aberto provenientes de Hospitais e Casas de Saúde particulares da cidade do Rio de Janeiro para estudo de áreas de adenocarcinomas e áreas não tumorais (controle) do mesmo paciente, ou seja, com a mesma carga genética.

Os casos estudados foram separados em três grupos, de acordo com o escore de Gleason encontrado: grupo de Gleason 6 (n=44), grupo de Gleason 7 (n= 64) e grupo de Gleason 8 a 10 (n= 24). O grupo de Gleason 7 foi subdividido em dois subgrupos: (3+4) e (4+3).

Foram comparados os parâmetros analisados (fibras colágenas, fibras elásticas, fibras musculares e vasos sanguíneos) nas áreas tumorais com os mesmos parâmetros encontrados nas áreas não tumorais (controle) do mesmo indivíduo.

A média de idade dos pacientes foi de 63 anos, a idade mínima de 45 anos e a idade máxima de 82 anos.

Como critério de inclusão foi considerado apenas os casos com diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma acinar prostático.

Não foram considerados os adenocarcinomas prostáticos com evidências histopatológicas de tratamento prévio e outras variantes histopatológicas de CP.

2.2 Processamento anátomo-patológico

Após a retirada cirúrgica as peças foram encaminhadas ao Laboratório Heitor Paiva Clarice Fraga Anatomia Patológica e Citopatologia Ltda, fixadas em bloco por imersão em formaldeído a 4% por 24 horas.

As margens cirúrgicas de ressecção foram marcadas com tinta nanquim e a peça clivada em fatias transversais a partir da base até o ápice, de ambos os lobos direito e esquerdo, das quais foram retirados doze fragmentos para análise histológica. Foram, ainda, retirados fragmentos dos limites vesical (superior) e uretral (inferior).

Os fragmentos retirados foram acomodados em cassetes plásticos e processados para inclusão em parafina (ANEXO B).

Foram obtidos cortes histológicos de 5 μ m de espessura em micrótomo rotativo.

Todos os blocos de parafina foram doados a Unidade de Pesquisa Urogenital - UERJ para este estudo.

2.3 Construção do arranjo em matriz tecidual (TMA)

A partir dos blocos parafinados (blocos doadores), foram selecionados e marcados um campo tumoral e um campo não tumoral (controle) do mesmo paciente, conforme a prévia determinação das lâminas correspondentes.

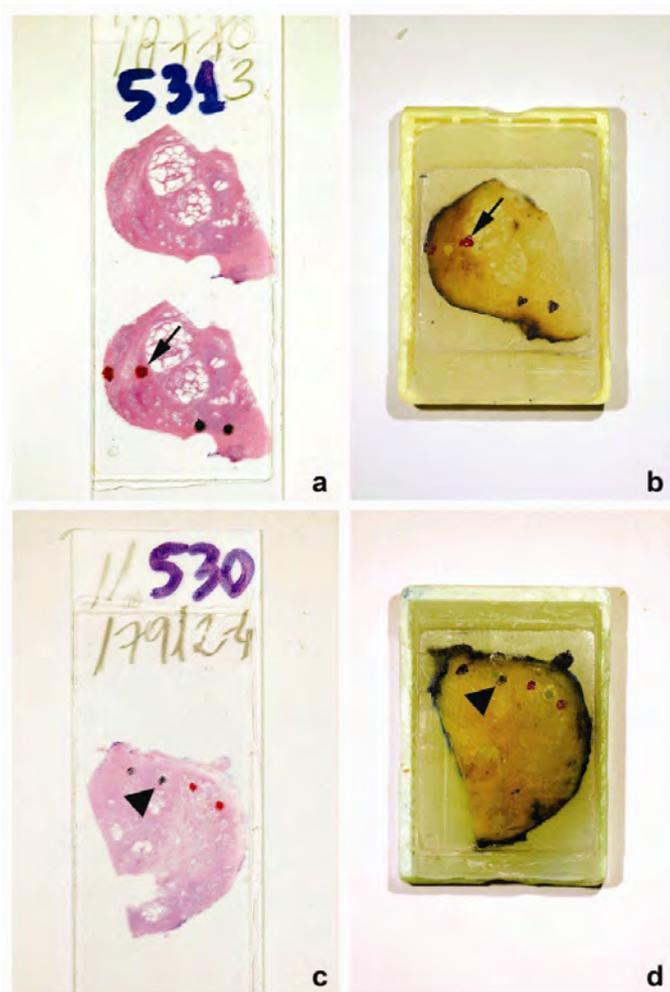
Estipulou-se que o campo marcado em azul corresponderia ao campo de adenocarcinoma e campo marcado em vermelho corresponderia ao campo não tumoral (controle) da mesma amostra (Figura 8) (26).

De cada área selecionada do bloco doador, foi coletado um fragmento por punção direta sobre a área marcada utilizando-se uma agulha de 1mm.

Estes fragmentos foram incluídos em um novo bloco (bloco receptor). Este bloco receptor recebeu até 288 fragmentos (16 colunas e 18 linhas) orientados de forma que se soubesse a origem de cada um deles quando mapeados (Figuras 9 e 10). Cada fragmento era identificado com o número de registro do paciente no Laboratório (27).

Desta matriz de TMA foram obtidos cortes histológicos com 5 μ m de espessura, utilizando-se micrótomo rotativo.

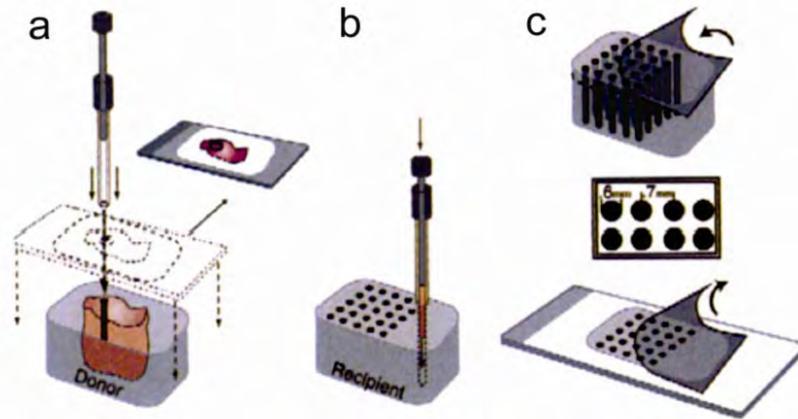
Figura 8: Preparados histopatológicos de próstata e respectivos blocos de parafina



Legenda: Preparados histopatológicos de próstata corados pela H-E (**a** e **c**) com as áreas de carcinoma marcadas em azul (cabeça de seta) e áreas não tumorais em vermelho (seta) e seus respectivos blocos parafinados com a mesma marcação, indicando de onde foram coletadas as amostras para confecção do bloco receptor de TMA (**b** e **d**).

Fonte: A Autora, 2013.

Figura 9: Construção do TMA



Legenda: a) Biópsias de agulha coletadas de regiões selecionadas do bloco doador. As regiões para coleta da amostra são baseadas em cortes histológicos previamente analisados. b) As amostras são transferidas da agulha de biópsia para o bloco receptor. c) O material é cortado com auxílio de uma fita adesiva de forma que as amostras não se percam e mantenham-se equidistantes uma das outras.

Fonte: KONONEM, 1998.

Figura 10: Mapa de um TMA



Legenda: a) Cortes histológicos corados por H-E obtidos a partir de um bloco de TMA. b) Matriz do TMA correspondente a lâmina. Cada fragmento corresponde a uma área previamente selecionada e devidamente mapeada.

Fonte: A Autora, 2013.

2.4 Análises microscópicas

2.4.1. Histoquímica

Os cortes histológicos foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (H-E) (ANEXO C, Figura 11), tricrômico de Masson (ANEXO D, Figura 12 e 13) e método de Weigert para fibras elásticas. (ANEXO E, Figura 14).

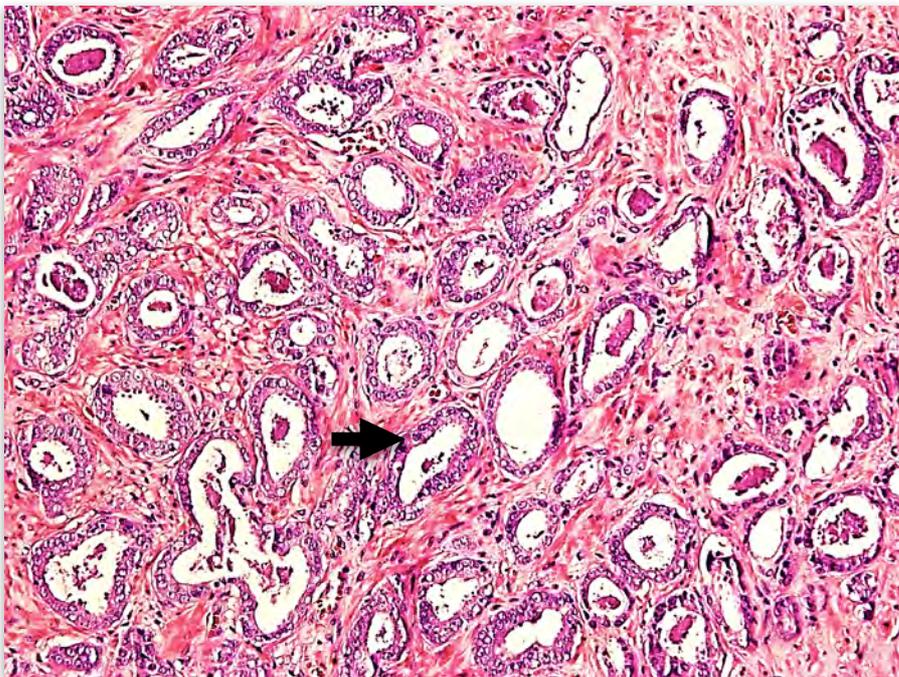
Os cortes foram observados em microscópio ótico binocular Nikon YS100. Nestes cortes foi confirmado o diagnóstico de adenocarcinoma prostático utilizando-se a classificação de Gleason.

A partir desta análise, foram identificadas áreas tumorais de adenocarcinoma e áreas não tumorais (controle).

Os casos estudados foram separados em três grupos, de acordo com o escore de Gleason encontrado: grupo de Gleason 6 (n= 44), grupo de Gleason 7 (n= 64) e grupo de Gleason 8 a 10 (n= 24).

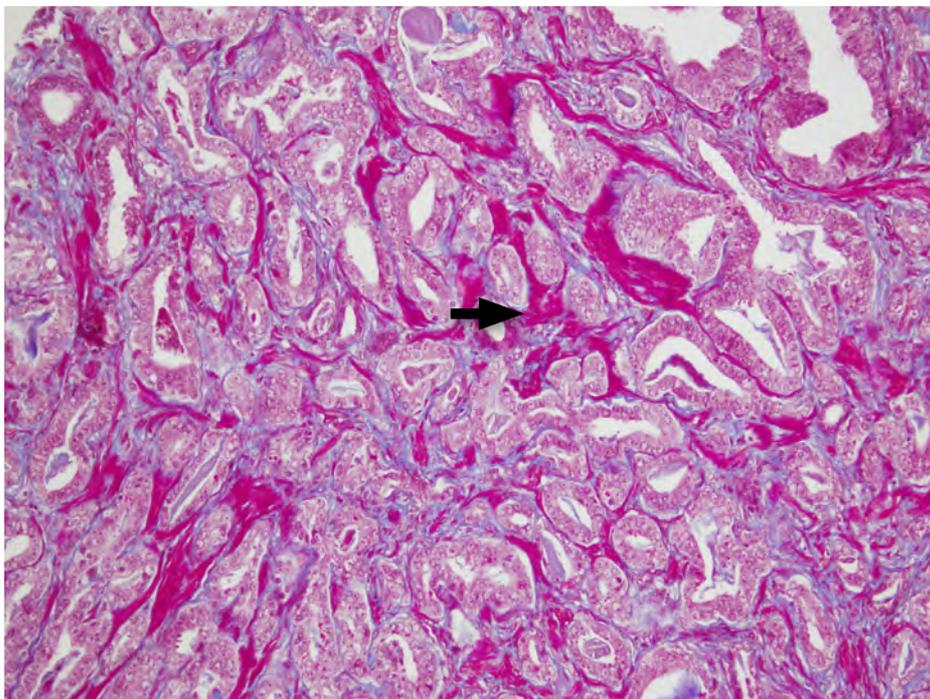
O grupo de Gleason 7 foi subdividido em dois subgrupos: (3+4) e (4+3).

Figura 11: Fotomicrografia de CP Gleason 3



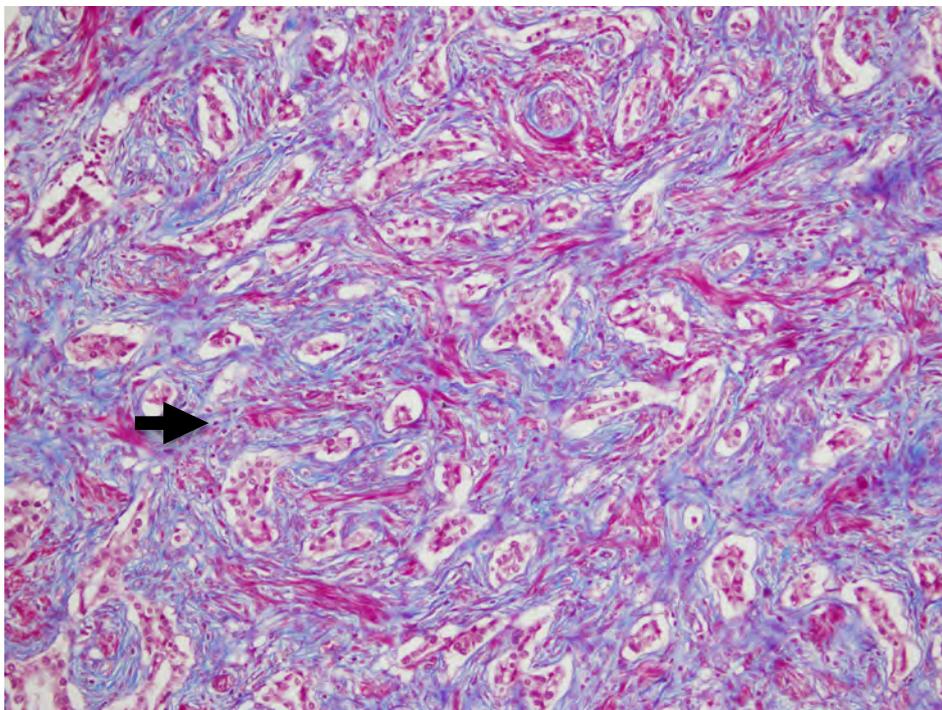
Legenda: Fotomicrografia de CP Gleason 3 com ácinos neoplásicos corados em roxo (seta).
200x. H-E. Fonte: A Autora, 2019.

Figura 12: Fotomicrografia de CP Gleason 4



Legenda: Fotomicrografia de CP Gleason 4 com fibras musculares coradas em vermelho (seta). 200x. Masson.
Fonte: A Autora, 2019.

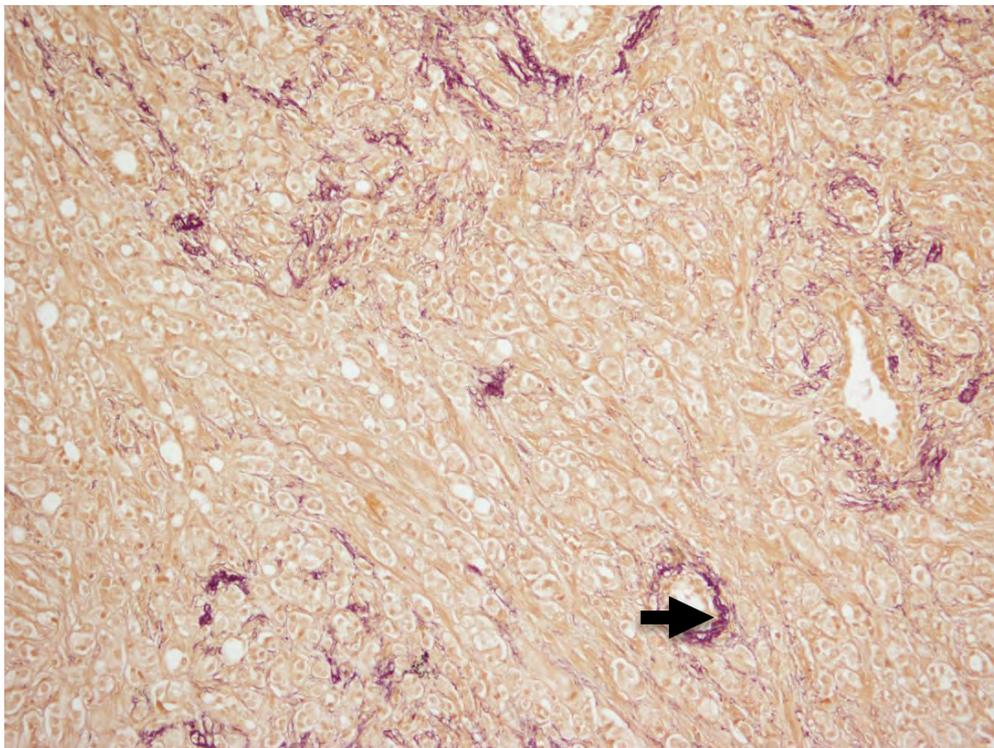
Figura 13: Fotomicrografia de CP Gleason 5



Legenda: Fotomicrografia de CP Gleason 5 com fibras colágenas coradas em azul (seta).
200x. Masson.

Fonte: A Autora, 2019.

Figura 14: Fotomicrografia de CP Gleason 5



Legenda: Fotomicrografia de CP Gleason 5 com fibras elásticas coradas em roxo (seta). 200x.
Weigert para fibras elásticas.

Fonte: A Autora, 2019.

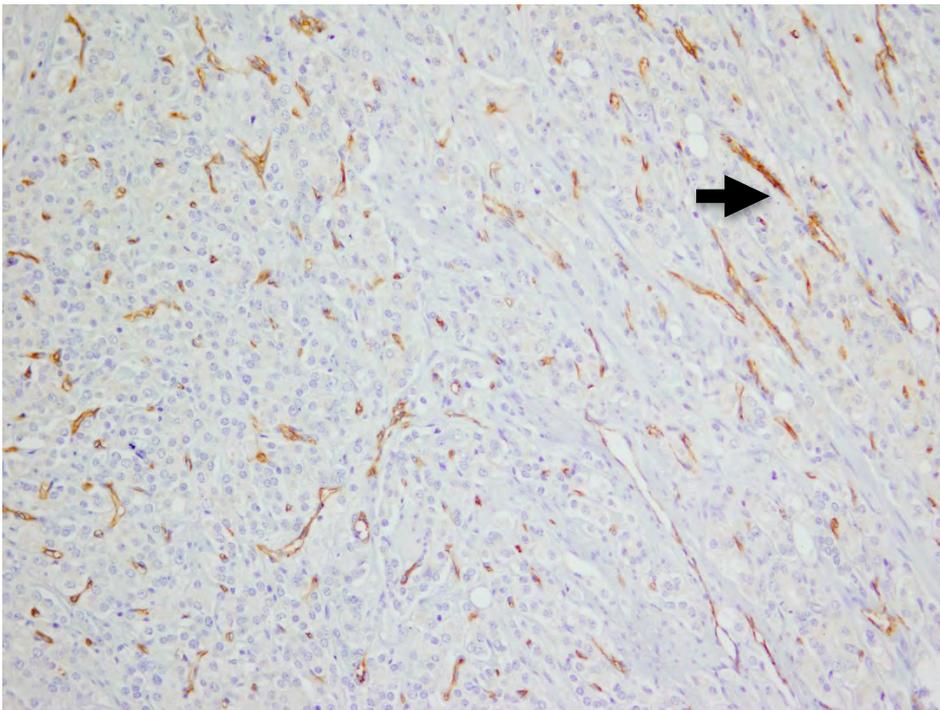
2.4.2. Imuno-histoquímica

No método imuno-histoquímico utilizou-se o anticorpo CD 31 (Abcam, policlonal, Ref: ab28364, Cambridge, USA) para vasos sanguíneos (ANEXO F, Figura 15).

O CD 31 também conhecido como platelet-endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) é uma 130-kD glicoproteína transmembrana expressa pelas células endoteliais, megacariócitos, plaquetas e histiócitos.

Esse marcador é altamente restrito ao endotélio, onde mostra um padrão de marcação de membrana e sua excelente sensibilidade (28).

Figura 15: Fotomicrografia de CP Gleason 4



Legenda: Fotomicrografia de CP Gleason 4 com vasos sanguíneos corados em marrom (seta). 200x. CD 31.

Fonte: A Autora, 2019.

2.4.3. Análise quantitativa

Os campos tumoral e não tumoral (controle) do mesmo indivíduo foram fotografados na matriz de TMA em aumento aproximado de 200x com uma câmera digital (DP70) acoplada a microscópio Olympus (BX51).

As imagens foram capturadas pelo programa Image Pro Plus.

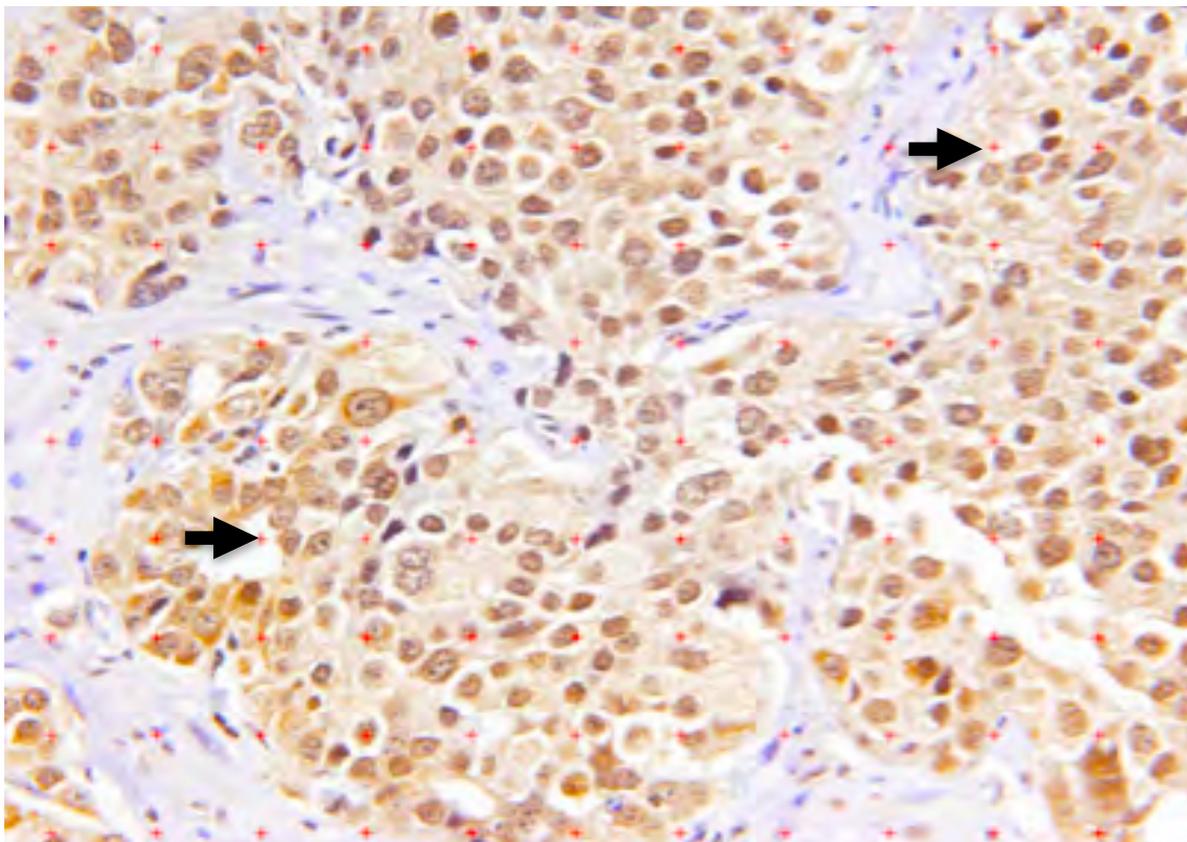
As imagens foram analisadas pelo software ImageJ, utilizando-se as ferramentas grid crosses e cell counter.

Os elementos analisados foram quantificados utilizando-se uma grade com cem (100) cruces superposta resultando em um valor percentual (Figura 16).

Pela coloração de Masson foram quantificadas as fibras musculares em vermelho e fibras colágenas em azul quando havia superposição das cruces nestes elementos.

De modo semelhante, pela coloração de Weigert foram quantificadas as fibras elásticas em roxo e pela marcação anti-CD 31 foram quantificados os vasos sanguíneos em marrom.

Figura 16: Fotomicrografia de CP Gleason 4



Legenda: Fotomicrografia de CP Gleason 4, utilizando-se a ferramenta *grid crosses* do programa *Image J* com cruzes em vermelho (seta). 200x. CD 31.

Fonte: A Autora, 2019.

2.5 Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando-se o teste t não pareado e o programa Graph Pad Prism 5.03 versão para Windows.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

A comparação entre área tumoral e área não tumoral (controle) do mesmo paciente mostrou diferenças significativas entre os elementos do estroma prostático (Figuras 17 a 21).

Estas variações estromais acompanharam as variações do Gleason.

Foram observadas modificações estromais importantes que corroboram com o desarranjo do parênquima, encontrado nos escores de Gleason mais elevados.

Diferenças significativas nos elementos analisados só começaram a aparecer a partir do Gleason 7 (Tabela 3).

O grupo de Gleason 6 quando comparado ao grupo não tumoral (controle) não mostrou diferença estatística para fibras colágenas e elásticas. Houve diminuição das fibras musculares no grupo de Gleason 6 quando comparado ao grupo não tumoral (controle). Ao contrário, houve aumento de vasos no grupo de Gleason 6 quando comparado ao grupo não tumoral (controle) (Tabela 3).

O grupo de Gleason 7 quando comparado ao grupo não tumoral (controle) mostrou diferença estatística para os quatro parâmetros analisados (Tabela 3).

O grupo de Gleason 7 (3+4) quando comparado ao grupo não tumoral (controle) mostrou aumento de fibras colágenas, de fibras elásticas, de vasos sanguíneos e diminuição de fibras musculares (Tabela 3).

O grupo de Gleason 7 (4+3) quando comparado ao grupo não tumoral (controle) mostrou, em relação aos parâmetros analisados, os mesmos resultados que o grupo (3+4) (Tabela 3).

No entanto, se compararmos os dois subgrupos de Gleason 7 observamos que existe diferença entre eles (Tabela 3). Esta diferença mostrou também em nível parenquimal modificações significativas nos diferentes elementos analisados justificando a divisão 4+3 e 3+4 proposta por Gleason.

O grupo de Gleason 8-10 quando comparado ao grupo não tumoral (controle) mostrou diferença estatística para os elementos analisados, exceto fibras colágenas. Houve aumento estatístico das fibras elásticas e vasos no grupo de Gleason 8-10 quando comparado ao grupo não tumoral (controle). Ao contrário, houve diminuição das fibras musculares no grupo de Gleason 8 quando comparado ao grupo não tumoral (controle) (Tabela 3).

Tabela 3: Análise quantitativa do estroma prostático tumoral e não tumoral associados aos escores de Gleason e subtipos de Gleason 7

%	Não tumoral	Gleason 6 n= 44 M= 62.70	Gleason 7 (3+4) n= 45 M= 64.20	Gleason 7 (4+3) n= 19 M= 64.20	Gleason 8-10 n= 24 M= 64.99
Colágeno	19.90	22.46	26*	25.70*	23.74
Fibra elástica	1.48	1.81	2.54*	3.05*	4.08*
Músculo	24.87	17.08*	18*	16*	15.78*
Vasos	3.22	4.39*	4*	4.33*	5.66*

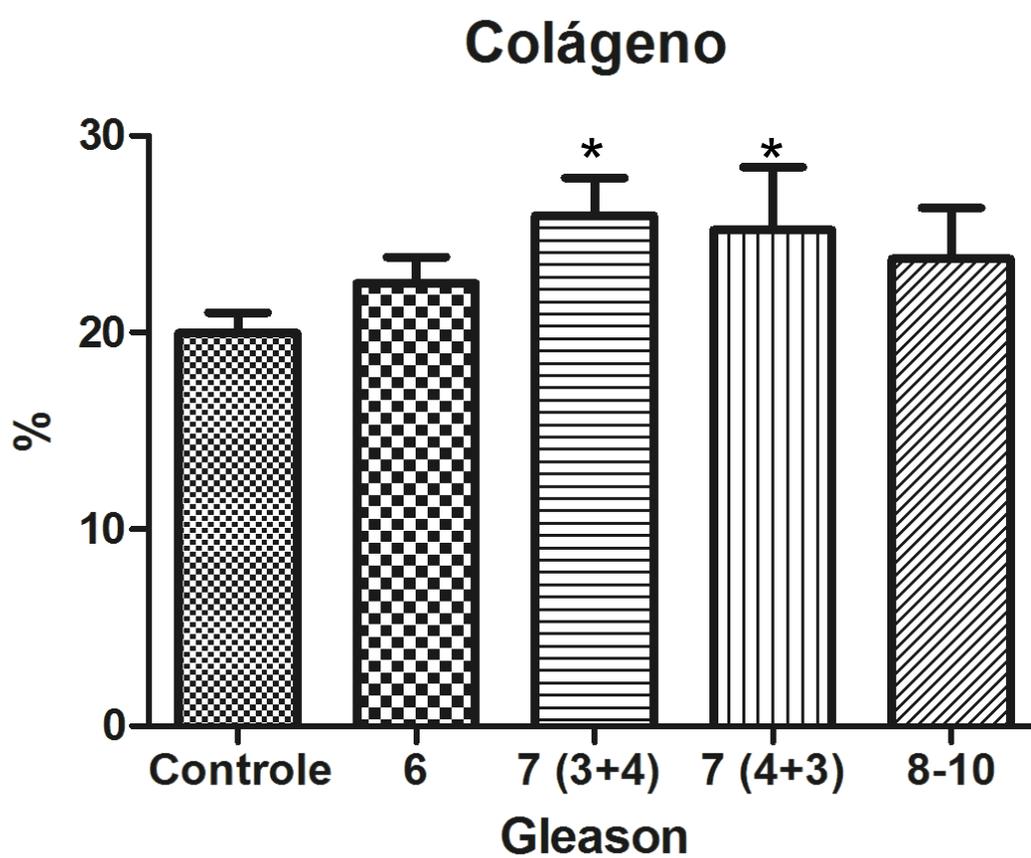
*: diferença estatística

M: média da idade

$p < 0.05$

Fonte: A Autora, 2019.

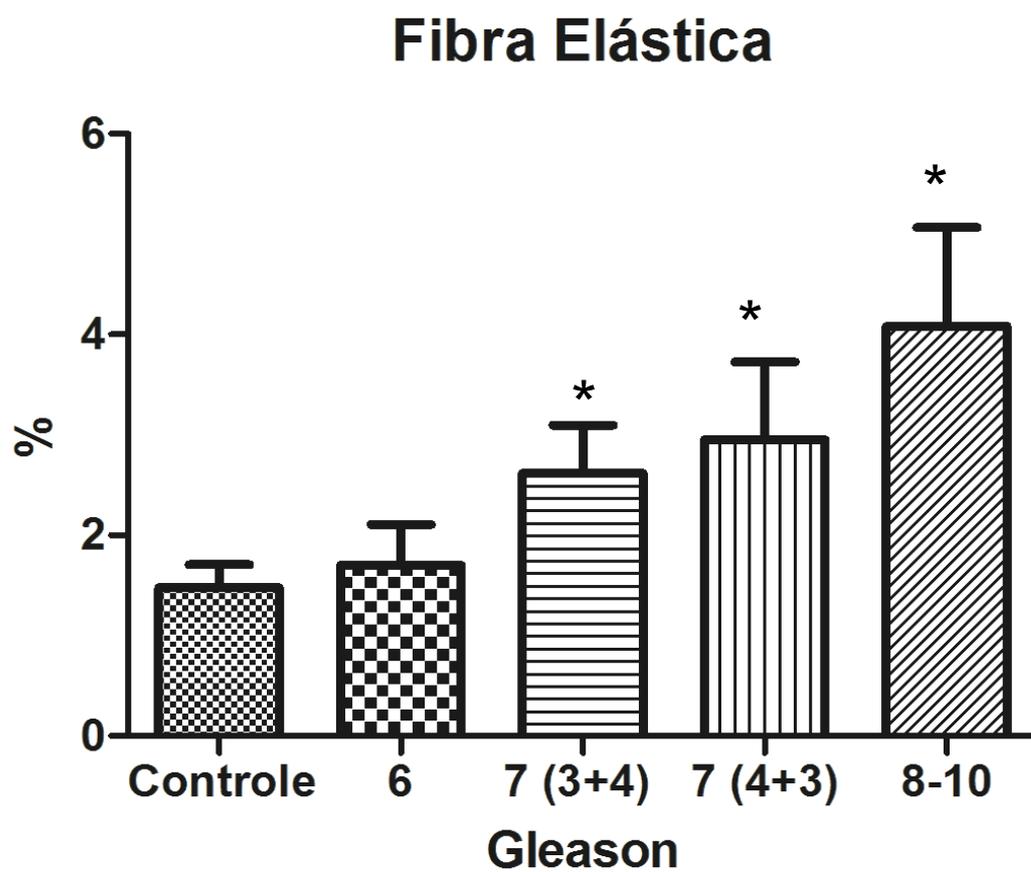
Figura 17: Análise quantitativa das fibras colágenas



Legenda: Análise quantitativa das fibras colágenas no grupo não tumoral (controle), no grupo de Gleason 6, Gleason 7(3+4), Gleason 7 (4+3) e Gleason 8-10.

Fonte: A Autora, 2019.

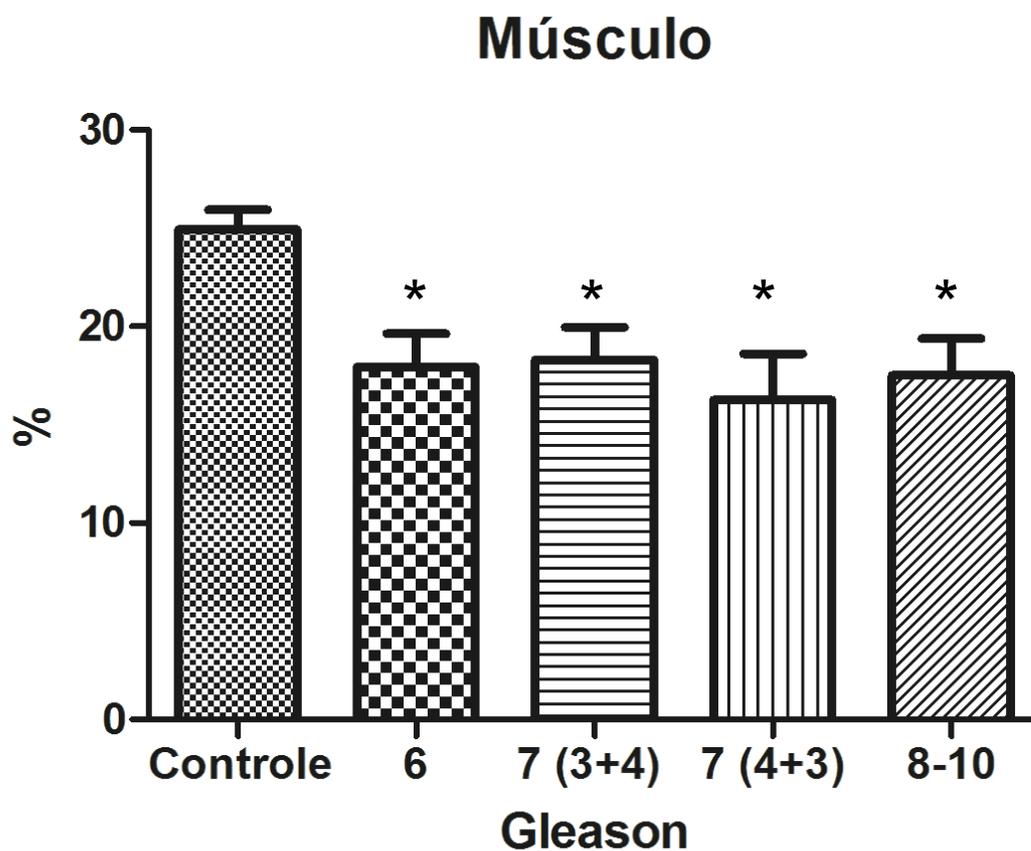
Figura 18: Análise quantitativa das fibras elásticas



Legenda: Análise quantitativa das fibras elásticas no grupo não tumoral (controle), no grupo de Gleason 6, Gleason 7(3+4), Gleason 7 (4+3) e Gleason 8-10.

Fonte: A Autora, 2019.

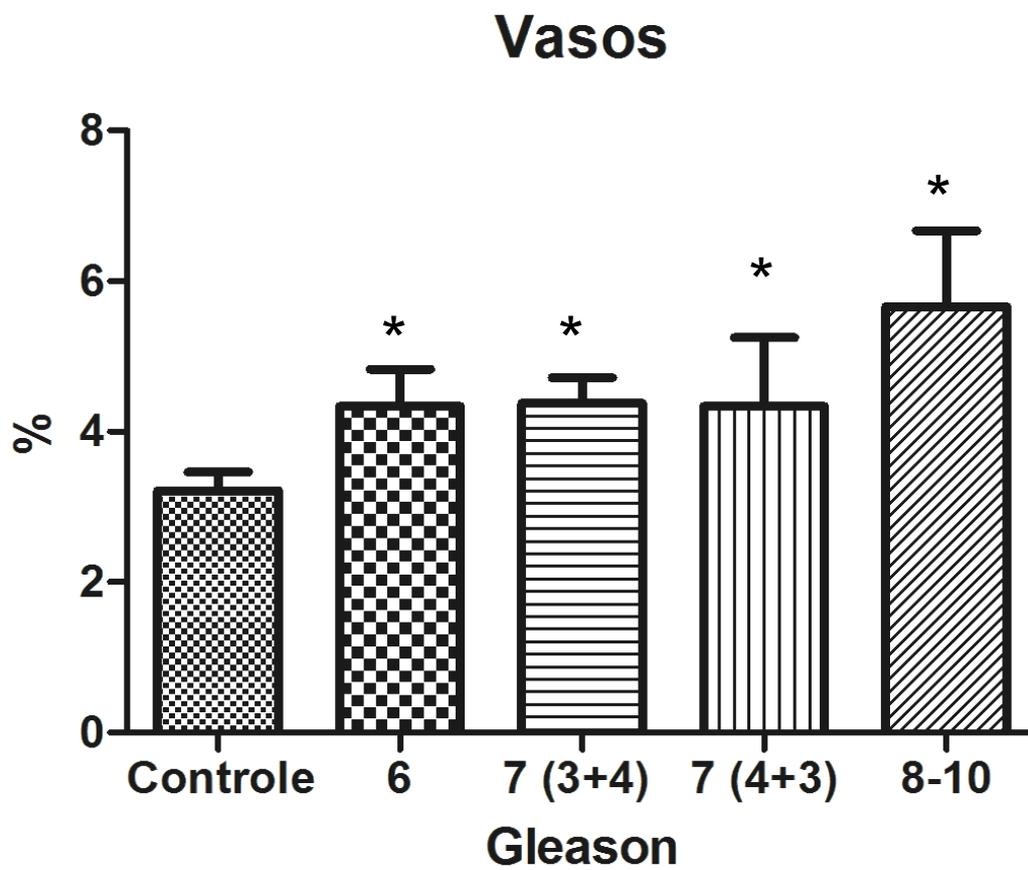
Figura 19: Análise quantitativa das fibras musculares



Legenda: Análise quantitativa de fibras musculares grupo não tumoral (controle), no grupo de Gleason 6, Gleason 7(3+4), Gleason 7 (4+3) e Gleason 8-10.

Fonte: A Autora, 2019.

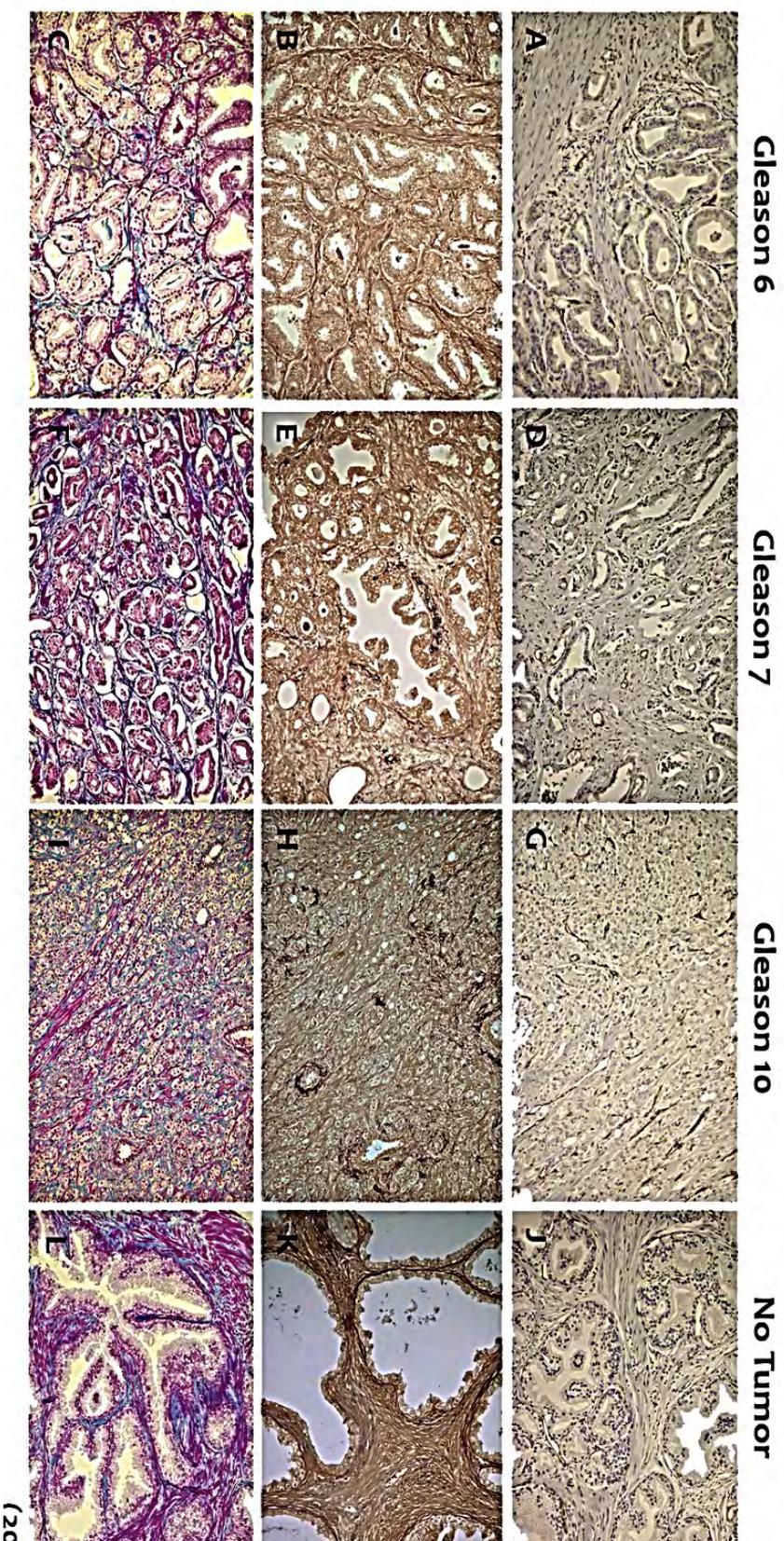
Figura 20: Análise quantitativa dos vasos sanguíneos



Legenda: Análise quantitativa dos vasos sanguíneos no grupo não tumoral (controle), no grupo de Gleason 6, Gleason 7(3+4), Gleason 7 (4+3) e Gleason 8-10.

Fonte: A Autora, 2019.

Figura 21: Fotomicrografias de vasos sanguíneos, fibras elásticas, fibras musculares e colágeno



Legenda: Fotomicrografias de vasos sanguíneos em áreas tumorais de Gleason 6 (A), Gleason 7 (D), Gleason 10 (G) e áreas não tumorais (J). CD31. 200x.

Fibras do sistema elástico em áreas tumorais Gleason 6 (B), Gleason 7 (E), Gleason 10 (H) e áreas não tumorais (K). Weigert. 200x.

Fibras musculares e colágeno em áreas tumorais de Gleason 6 (C), Gleason 7 (F), Gleason 10 (I) e áreas não tumorais (L), tricrômico de Masson. 200x. Fonte: A autora, 2019.

4 DISCUSSÃO

Para corroborar o estudo do componente parenquimatoso Leze et al. (29) mostraram correlação entre o padrão primário de Gleason e volume nuclear médio.

O CP é visto não apenas como uma proliferação celular epitelial maligna, mas como uma condição que afeta as interações complexas entre as células do compartimento epitelial prostático e o compartimento estromal (30).

Diferenças histológicas observadas nos diferentes escores de Gleason mostram que existe uma constante mudança no estroma dos CP.

O desenvolvimento das neoplasias agressivas parece estar associado com a biossíntese da MEC e, portanto, com alterações de sua estrutura (31, 21).

As células epiteliais tumorais em interação com as células estromais e outros elementos da MEC criam um microambiente suscetível para a proliferação, movimentação e diferenciação celular cancerígena (31).

A caracterização quantitativa de parâmetros estromais viria se associar as características parenquimatosas já analisadas e confirmar uma associação entre elas e os escores de Gleason, corroborando com os dados subjetivos de Gleason, na elaboração do prognóstico do CP.

Nakada e Kubota (31) mostraram que a concentração de colágeno e proteínas não colagenosas é semelhante tanto na HPB como no CP. Em nosso trabalho houve um aumento do colágeno tumoral em relação ao não tumoral (controle). Foi observado um aumento estatístico no Gleason 7 de aproximadamente 30%. Os resultados estão de acordo com Zhang et al. (24) que assinalam, além de um aumento de fibras colágenas no CP, uma diminuição das fibras musculares.

Segundo Cunha et al. (32) o CP envolve uma ruptura sequencial na interação de epitélio-músculo liso, resultando num ciclo vicioso de dediferenciação progressiva, tanto do componente epitelial como de músculo liso, o que levaria a progressão tumoral. Uma diminuição das fibras musculares corrobora a hipótese que o epitélio modificado é incapaz de manter a diferenciação normal do músculo adjacente (20). No presente trabalho foi observado uma diminuição estatística das fibras musculares lisas em todos os escores de Gleason analisados e os achados de Wong e Tam (33) apontam também nesta direção.

Existem poucos dados sobre o papel das fibras elásticas e seus receptores na invasão tumoral. Sabe-se que apresentam-se desorganizadas no estroma intratumoral do CP (31). Além da desorganização, nossos resultados mostraram que elas sofrem um aumento à medida que o escore de Gleason aumenta, sendo significativa nos Gleason 7 e Gleason 8-10. A concentração de elastina nos CP bem diferenciados e moderadamente diferenciados mostra-se maior do que nas áreas não tumorais (controle) (31), fato este também observado no presente trabalho.

A densidade dos microvasos é considerada um fator prognóstico importante e alvo terapêutico em vários tipos de tumores como cancer de mama, cólon, colo uterino, melanoma e carcinoma de cabeça e pescoço, mas seu significado no CP ainda é controverso (34). No entanto, o controle do mecanismo e da regulação da angiogênese é de grande importância para o desenho de novas estratégias no tratamento do CP (19).

Tretiakova et al. (34) observaram correlação significativa entre a expressão de VEGF (vascular endothelial growth factor), o escore de Gleason e o grau tumoral. Segundo Bono et al. (35) há uma associação do alto grau do CP com alta densidade de microvasos. Esta mesma observação foi feita por outros autores (36, 37).

Estudos iniciais demonstraram angiogênese aumentada no CP e correlação com grau tumoral, estágio, progressão e sobrevida (38,39) Estudos posteriores falharam em confirmar um valor prognóstico independente na contagem da densidade de microvasos (36). Nossos resultados mostraram um aumento significativo de vasos de acordo com o grau tumoral, o que estaria de acordo com estudos iniciais mostrando angiogênese aumentada no CP.

Apesar de estudos mostrando que a densidade de microvasos ainda não seja um parâmetro prognóstico implementado por não apresentar contribuição clínica indubitável (34), este seria mais um dado que, acrescido aos demais, poderia corroborar no prognóstico. Estudos de diferentes tipos de cancer em humanos mostraram fenótipos de células estromais ativadas, composição alterada da MEC e aumento na densidade de microvasos (31).

O microambiente nas quais tais células tumorais evoluem para um fenótipo agressivo é altamente heterogêneo. A interrupção na comunicação entre estroma e parênquima poderia levar ao desenvolvimento de terapias anticancer cujo alvo fossem elementos estromais tumorais (30).

Estudos recentes em CP revelaram um papel crítico do microambiente tumoral na iniciação e progressão da doença avançada. Estudos experimentais revelaram uma relação de reciprocidade entre as células do microambiente e células tumorais malignas nas quais mudanças iniciais no microambiente do tecido normal podem promover tumorigênese e por sua vez as células tumorais podem promover mudanças pro-tumor no microambiente (40).

Sabe-se que as células estromais têm uma relação de reciprocidade com as células epiteliais adjacentes na manutenção da integridade estrutural e funcional da próstata (41).

No nosso trabalho procuramos analisar o comportamento de tais elementos frente os diferentes escores de Gleason.

CONCLUSÕES

Houve diferença significativa entre a matriz extracelular na área tumoral, isto é, no adenocarcinoma prostático, quando comparado à área não tumoral (controle), principalmente a partir do Gleason 7 e no grupo do Gleason 8-10.

No grupo Gleason 6 houve diferença estatística para fibras musculares e vasos.

No grupo Gleason 7 houve diferença estatística para todos os elementos analisados.

O grupo Gleason 8-10 mostrou diferença estatística para todos os elementos analisados, exceto fibras colágenas.

Modificações significativas dos elementos do estroma prostático corroboram fortemente com diferentes escores de Gleason e podem contribuir para predizer o prognóstico do cancer de próstata. Assim como contribuir para estudos do substrato morfológico do cancer de próstata.

REFERÊNCIAS

1. www2.inca.gov.br
2. GLEASON, D.F. Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep.* 1966 Mar;50(3):125-8. PMID: 5948714.
3. DELAHUNT, B. et al. Gleason grading: past, present and future. *Histopathology.* 2012 Jan; 60(1):75-86. doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04003.x.
4. GLEASON, D.F. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol.* 1992 Mar;23(3):273-9. PMID: 1555838.
5. *Arch Pathol Lab Med.* doi: 10.5858/arpa.2015-0487-SA.
6. HUMPHREY, P.A. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol.* 2004 Mar;17(3):292-306. DOI:10.1038/modpathol.3800054.
7. Rosai & Ackerman's *Surgical Pathology.* 10th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2011. vol. 1, pp.1382-1387.
8. PARK, J. et al., The Impact of Pathologic Upgrading of Gleason Score 7 Prostate Cancer on the Risk of the Biochemical Recurrence after Radical Prostatectomy. *Biomed Res Int.* 2018 Apr 30;2018:4510149. doi: 10.1155/2018/4510149. eCollection 2018.
9. GLEASON, D.F.; MELLINGER, G.T. Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *J Urol.* 1974 Jan; 111(1):58-64.
10. SATHIANATHEN, N.J. et al. Landmarks in prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2018 Oct; 15(10):627-642. doi: 10.1038/s41585-018-0060-7.
11. LEE, J.T. et al. Prediction of Perineural Invasion and Its Prognostic Value in Patients with Prostate Cancer. *Korean J Urol.* 2010 November; 51(11):745–751.
12. BOSTWICK, D.G. et al. Prediction of capsular perforation and seminal vesicle invasion in prostate cancer. *J Urol.* 1996 Apr;155(4):1361-7. PMID: 8632575.
13. American Joint Committee on Cancer, 80. Edition, Springer, Chicago, 58: 715-726.
14. KORNBERG, Z. et al. Genomic biomarkers in prostate cancer. *Transl Androl Urol.* 2018 Jun;7(3):459-471. doi: 10.21037/tau.2018.06.02.
15. fcm.unicamp.br

16. ALVES, E.F. et al. Histological and quantitative analyzes of the stromal and acinar components of normal human prostate zones. *Prostate*. 2018 Mar;78(4):289-293. doi: 10.1002/pros.23472. Epub 2018 Jan 8.
17. VILLERS, A.; STEG, A.; BOCCON-GIBOD, L. Anatomy of the prostate: review of the different models. *Eur Urol*. 1991;20(4):261-8.
18. KRUŠLIN, B.; ULAMEC, M.; TOMAS, D. Prostate cancer stroma: an important factor in cancer growth and progression. *Bosn J Basic Med Sci*. 2015 May 13;15(2):1-8. doi: 10.17305/bjbms.2015.449.
19. CIONI, B. et al. Loss of androgen receptor signaling in prostate cancer-associated fibroblasts (CAFs) promotes CCL2- and CXCL8-mediated cancer cell migration. *Mol Oncol*. 2018 Aug;12(8):1308-1323. doi: 10.1002/1878-0261.12327. Epub 2018 Jul 10.
20. BURNS-COX, N. et al. Changes in collagen metabolism in prostate cancer: a host response that may alter progression. *J Urol*. 2001 Nov; 166(5):1698-701.
21. LEBLEU, V.S.; MACDONALD, B.; KALLURI, R. Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2007 Oct; 232(9):1121-9.
22. TUXHORN, J.A.; AYALA, G.E.; ROWLEY, D.R. Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol*. 2001 Dec; 166(6):2472-83.
23. LUCZYŃSKA, E.; GASIŃSKA, A.; WILK, W. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor in clinically localized prostate cancer. *Pol J Pathol*. 2013 Apr;64(1):33-8. DOI: <https://doi.org/10.5114/pjp.2013.34601>.
24. ZHANG, Y. et al. Characteristics of normal stromal components and their correlation with cancer occurrence in human prostate. *Oncol Rep*. 2003 Jan-Feb;10(1):207-11. PMID: 12469170.
25. BARRON, D.A.; ROWLEY, D.R. The reactive stroma microenvironment and prostate cancer progression. *Endocr Relat Cancer*. 2012 Oct 30;19(6):R187-204. doi: 10.1530/ERC-12-0085. Print 2012 Dec.
26. OSORIO, C.F. et al. Leptin and leptin receptor expressions in prostate tumors may predict disease aggressiveness? *Acta Cir Bras*. 2014;29 Suppl 3:44-8.
27. KONONEN, J. et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumour specimens. *Nature Medicine*, 4: 844-847, 1998.
28. DABBS, D. J. *Diagnostic Immunohistochemistry: theranostic and genomic applications*. Philadelphia, Elsevier: 2019; 4:89.

29. LEZE, E.; MACIEL-OSORIO, C.F.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Advantages of Evaluating Mean Nuclear Volume as an Adjunct Parameter in Prostate Cancer. *PLoS One*. 2014 Jul 9;9(7):e102156. doi: 10.1371/journal.pone.0102156. eCollection 2014.
30. CHIARUGI, P.; PAOLI, P.; CIRRI, P. Tumor microenvironment and metabolism in prostate cancer. *Semin Oncol*. 2014 Apr;41(2):267-80. doi: 10.1053/j.seminoncol.2014.03.004. Epub 2014 Mar 5.
31. NAKADA, T.; KUBOTA, Y. Connective tissue protein in the prostate gland. *Int Urol Nephrol*. 1994;26(2):183-7. PMID: 7518423.
32. CUNHA, G.R.; HAYWARD, S.W.; DAHIYA, R. Smooth muscle-epithelial interactions in normal and neoplastic prostatic development. *Acta Anat (Basel)*. 1996;155(1):63-72. PMID: 8811117.
33. WONG, Y.C.; TAM, N.N.C. Dedifferentiation of stromal smooth muscle as a factor in prostate carcinogenesis. *Differentiation*. 2002 Dec;70(9-10):633-45. DOI: 10.1046/j.1432-0436.2002.700916.x.
34. TRETIAKOVA, M. et al. Microvessel density is not increased in prostate cancer: digital imaging of routine sections and tissue microarrays. *Hum Pathol*. 2013 Apr;44(4):495-502. doi: 10.1016/j.humpath.2012.06.009. Epub 2012 Oct 12.
35. BONO, A.V. et al. Microvessel density in prostate carcinoma. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2002;5(2):123-7 DOI: 10.1038/sj.pcan.4500572.
36. ERBERSDOBLER, A. et al. Prognostic value of microvessel density in prostate cancer: a tissue microarray study. *World J Urol*. 2010 Dec;28(6):687-92. doi: 10.1007/s00345-009-0471-4. Epub 2009 Aug 28.
37. GARCIA, F.U. et al. Increased Cellularity of Tumor-Encased Native Vessels in Prostate Carcinoma Is a Marker for Tumor Progression. *Mod Pathol*. 2000 Jul;13(7):717-22. DOI: 10.1038/modpathol.3880124.
38. WEIDNER, N. Intratumor microvessel density as a prognostic factor in cancer. *Am J Pathol* 1995;147:9-19.
39. BOSTWICK, D.G. et al. Optimized microvessel density analysis improves prediction of cancer stage from prostate needle biopsies. *Urology* 1996;48:47-57.
40. SHIAO, S.L.; CHU, G.C.; CHUNG, L.W. Regulation of prostate cancer progression by the tumor microenvironment. 2016 Sep 28; 380(1):340-8. doi: 10.1016/j.canlet.2015.12.022. Epub 2016 Jan 28.

41. LEE, C. et al. Role of the Adjacent Stroma Cells in Prostate Cancer Development and Progression: Synergy between TGF- β and IGF Signaling. *Biomed Res Int.* 2014;2014:502093. doi: 10.1155/2014/502093. Epub 2014 Jun 25.

ANEXO A - Documento de aprovação do comitê de ética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO PROTEICA DA LEPTINA E SEU RECEPTOR NO CANCER DE PRÓSTATA COM DIFERENTES GRAUS DE GLEASON

Pesquisador: Clarice Fraga Esteves Maciel Osorio

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 12685413.6.0000.5259

Instituição Proponente: Hospital Universitário Pedro Ernesto/UERJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 335.816

Data da Relatoria: 17/07/2013

Apresentação do Projeto:

O cancer de próstata é um tumor bastante frequente e o escore de Gleason é o método mais comumente utilizado para avaliar o grau de agressividade desse tumor. Contudo este é um método subjetivo e como tal, é sujeito a erros. A obesidade e a leptina estão associados ao aparecimento de diferentes neoplasias, inclusive o cancer de próstata. Neste trabalho será avaliado se existe correlação entre o grau de Gleason e a expressão de leptina e seu receptor em carcinomas prostáticos. Para isso serão analisadas lâminas histológicas para avaliação do grau de Gleason e da imunomarcção de tais anticorpos.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho é traçar um paralelo entre os graus da classificação de Gleason dos adenocarcinomas de próstata e os respectivos perfis de imunomarcção para leptina e para o receptor da leptina.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nenhum já que as amostras já foram coletas para avaliação diagnóstica rotineira

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão estudados 500 casos de adenocarcinomas prostáticos diagnosticados em peças provenientes de prostatectomias radicais a céu aberto, provenientes de um laboratório privado de

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **Fax:** (21)2264-0853 **E-mail:** cep-hupe@uerj.br

ANEXO B - Método de processamento tecidual em parafina

- 1 - Desidratação em álcool 80% por 1h.
- 2 - Desidratação em álcool 90% por 1h.
- 3 - Desidratação em álcool 95% por 1h.
- 4 - Desidratação em álcool 100% por 1h.
- 5 - Desidratação em álcool 100% por 1h.
- 6 - Desidratação em álcool 100% por 1h.
- 7 - Desidratação em álcool 100% por 1h.
- 8 - Clarificação em xilol I por 1h.
- 9 - Clarificação em xilol II por 1h.
- 10 - Clarificação em xilol III por 1h.
- 11 - Impregnação em parafina I por 1h.
- 12 - Impregnação em parafina II por 1h.

ANEXO C - Método de coloração de hematoxilina-eosina (H-E)

Soluções:

A) Ácido-álcool 1%:

Ácido clorídrico (HCl) - 1ml

Etanol 70% - 99ml

B) Carbonato de lítio saturado:

Carbonato de lítio (LiCO) - 1,54g

Água destilada - 100ml

C) Eosina

Eosina - 5g

Álcool etílico absoluto - 800ml

Água Destilada - 200ml

Ácido acético glacial PA - 4ml

Dissolva a eosina na água e acrescente o álcool. Na hora do uso adicione o ácido.

D) Hematoxilina de Harris (Harris, 1900):

Hematoxilina - 5,0g

Etanol 100%.- 50,0ml

Alúmen de potássio ou de amônio - 100g

Água destilada - 1.000ml

Óxido amarelo de mercúrio - 2,5g

Dissolva o alúmen em água destilada com o auxílio de uma placa aquecedora e um agitador magnético em um recipiente. Dissolva a hematoxilina no álcool a temperatura ambiente em

recipiente separado. Lentamente misture as duas soluções aquecendo em placa aquecedora até entrar em ebulição. Retire da fonte de calor e, com cuidado, acrescente lentamente o óxido mercúrio, que faz com que a solução entre rapidamente em ebulição podendo transbordar do recipiente. Retorne a solução para a fonte de calor até que adquira a cor púrpura escura. Esfrie e a solução estará pronta. Na hora do uso acrescente 20ml de ácido acético glacial para intensificar a coloração dos núcleos. Filtre sempre antes de cada uso.

Procedimento:

- 1- Desparafinizar e hidratar os cortes até a água destilada.
- 2- Corar com solução recém filtrada de hematoxilina de Harris por 6 a 10 minutos.
- 3- Lavar em água de torneira por 5 minutos.
- 4- Diferenciar em álcool-ácido com 1 ou 2 mergulhos.
- 5- Lavar rapidamente em água de torneira.
- 6- Colocar em solução fraca de carbonato de lítio saturada até que os cortes fiquem azul-brilhantes.
- 7- Lavar completamente em água de torneira por 10 minutos.
- 8- Colocar em álcool etílico 80% por 1 a 2 minutos.
- 9- Contra corar em solução de eosina por 2 minutos.
- 10- Desidratar a partir do álcool 95%.
- 11- Desidratar com 3 banhos de álcool absoluto.
- 12- Clarificar em 3 banhos de xilol e montar.

Resultados:

Núcleos: azul.

Citoplasma: róseo a vermelho.

Demais estruturas tissulares: róseo a vermelho.

ANEXO D - Método de colocação de Masson

Soluções:

A) Solução aquosa saturada de ácido pícrico:

Ácido pícrico - 1,2 g

Água destilada - 100ml

B) Solução fixadora de Bouin:

Solução aquosa saturada de ácido pícrico - 750ml

Formalina (37-40%) - 250ml

Ácido acético glacial - 50ml

C) Solução de uso de hematoxilina férrica de Weigert:

Misturar em partes iguais as soluções estoques A e B (100ml de cada solução)

Solução estoque A:

Hematoxilina, cristais - 1g

Etanol 95% -100ml

Solução estoque B:

Cloreto férrico (FeCl) 29% - 4ml

Água destilada - 95ml

Ácido clorídrico concentrado (HCl) - 1ml

D) Solução de fucsina ácida - Biebrich Scarlet:

Biebrich Scarlet (C.I. 26905), solução aquosa 1% - 90ml

Fucsina ácida (C.I. 42685), solução aquosa 1% - 10ml

Ácido acético glacial - 1ml

E) Solução de ácido fosfotúngstico - fosfomolibdico:

Ácido fosfotúngstico - 5g

Ácido fosfomolibdico - 5g

Água destilada - 200ml

F) Solução de azul de anilina:

Azul de anilina - 2,5g

Ácido acético glacial - 2ml

Água destilada - 100ml

G) Solução de ácido acético glacial 1%:

Procedimento:

1- Desparafinizar e hidratar até a água destilada.

2- Colocar no líquido de Bouin por 1 hora a 56 C ou a temperatura ambiente por uma noite, se os cortes foram fixados em formalina. Essa etapa não é necessária se a fixação for feita no líquido de Bouin.

3- Deixar esfriar por 10 minutos.

4- Lavar em água corrente até que os cortes fiquem claros. Em seguida, enxaguar em água destilada.

5- Corar na solução de hematoxilina férrica de Weigert por 10 minutos.

6- Lavar em água corrente por 10 minutos. Após, enxaguar em água destilada.

7- Corar em solução aquosa de Biebrich Scarlet a 1% por 5 minutos.

8- Enxaguar em água destilada.

9- Colocar na solução de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico por 10 a 30 minutos.

10- Corar em solução de azul de anilina por 15 a 30 minutos.

11- Enxaguar em água destilada.

12- Diferenciar na solução aquosa de ácido acético a 1% por 3 a 5 minutos.

13- Desidratar a partir do etanol a 95%, clarificar com xilol e montar.

Resultados:

Núcleos: preto.

Músculo, citoplasma, queratina: vermelho.

Colágeno: azul.

ANEXO E - Método de coloração de Weight para fibra elástica

Soluções:

A) Resorcina fucsina de Weigert:

Fucsina básica - 2g

Resorcina - 4g

Água destilada - 200ml

Cloreto férrico 30% - 25ml

Dissolver 2g de Fucsina básica e 4g de Resorcina em 200ml de água destilada em ebulição. Adicionar 25ml de cloreto férrico a 30%, deixando ferver por mais 5 minutos. Filtrar e desprezar o filtrado. O precipitado que ficou no papel de filtro deve ser dissolvido em 200ml de etanol 90% aquecido. Após esfriar, completar para 200ml com etanol 90% e juntar 4ml de ácido clorídrico concentrado. O corante deve ser guardado na geladeira pois o álcool pode evaporar com o calor.

B) Solução de persulfato de potássio 10% ou monopersulfato de potássio 10% ou ozona 10%

C) Solução de Van Gieson:

Fucsina ácida, solução aquosa a 1% -5ml

Ácido pícrico, solução saturada aquosa (21g para 1l de água) - 100ml

Ácido clorídrico concentrado - 0,25ml

Procedimento:

1- Desparafinizar e hidratar os cortes até o álcool 70%.

2- Oxidar pela ozona 10% (desprezar após o uso).

3- Corar pela resorcina-fucsina durante 1 hora.

4- Passar por 3 banhos de álcool 95% (em borreiros), para retirar o excesso de corante por alguns segundos em cada banho.

5- Lavar em água destilada.

6- Contra corar ou não com a solução de Van Gieson.

7- Desidratar rapidamente em 3 banhos de álcool absoluto (em borreiros).

8- Clarificar em 3 banhos de 3 minutos de xilol e montar.

Resultados: Fibras elásticas: roxo.

ANEXO F - Método de imuno-histoquímica

- 1- desparafinização das lâminas silanizadas com os cortes na estufa a 60°C ±5°C por, no mínimo, 40 minutos.
- 2- hidratação das lâminas em quatro banhos de EasyClean Solvente ecológico por 5 minutos, em seguida, dois banhos de álcool absoluto por 5 minutos, dois banhos de álcool 95% também por 5 minutos e lavagem em água destilada.
- 3- bloqueio da peroxidase endógena: as lâminas passam por banho de 3.2ml de peróxido de hidrogênio (30 volumes) diluído em 250ml de metanol a 30% por 15 minutos e, em seguida, lavadas em água destilada.
- 4- recuperação antigênica: as lâminas são colocadas em cuba preenchida por tampão de recuperação antigênica (tampão citrato pH 6.0) em câmara de pressão elétrica para imuno-histoquímica por 5 minutos a 125°C em alta pressão. Ao final, são retiradas e resfriadas por 20 minutos em água corrente e lavadas com tampão PBS.
- 5- diluição dos anticorpos que utilizados com solução diluidora comercial na proporção de 1:100.
- 6- bloqueio de ligações inespecíficas presentes na solução diluidora de anticorpos.
- 7- incubação com o anticorpo primário por uma hora.
- 8- lavagem das lâminas com tampão PBS.
- 9- incubação com o polímero – anticorpo secundário e reagente de ligação – por 30 minutos em cada polímero.
- 10- lavagem das lâminas com tampão PBS.
- 11- revelação com DAB (5-diaminobenzidina, Biocare, código M4BD534L) por 5 minutos.
- 12- lavagem das lâminas com água destilada.
- 13- contra coloração das lâminas com hematoxilina de Harris.

14- lavagem das lâminas com água amoniacal (10 gotas de amônia para cada 250ml de água destilada).

15- desidratação dos cortes em dois banhos de álcool 95% por 2 minutos, dois banhos de álcool absoluto por 2 minutos e quatro banhos de EasyClean Solvente ecológico por 2 minutos.

16- montagem das lâminas.

ANEXO G - Artigo publicado

Acta Cirúrgica Brasileira

ANEXO G - artigo

ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA

EXPRESSION OF STROMAL ELEMENTS OF PROSTATIC ADENOCARCINOMA IN DIFFERENT GLEASON SCORES

Journal:	Acta Cirúrgica Brasileira
Manuscript ID	ACB-2019-0038.R1
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	30-Apr-2019
Complete List of Authors:	Osorio, Clarice; State University of Rio de Janeiro Biomedical Centre, Urogenital Research Unit Costa, Waldemar; State University of Rio de Janeiro Biomedical Centre, Urogenital Research Unit GALLO, CARLA; Rio de Janeiro State University, Urogenital Research Unit sampaio, francisco; State University of Rio de Janeiro Biomedical Centre, Urogenital Research Unit
Keyword - Go to DeCS or MeSH to find your keywords.:	prostate cancer, Gleason, stromal elements, histology

SCHOLARONE[™]
Manuscripts