

LA ATROFIA PROSTÁTICA FOCAL Y EL FACTOR DE AGLUTINACIÓN NUCLEAR EN EPITELIO ACINAR PROLIFERATIVO: UN ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Vicente Signorile¹, Ivonne Martínez ¹, Marco Álvarez ²

RESUMEN: *Los parámetros morfométricos que han sido propuestos para ser usados como índices predictivos de las lesiones del cáncer de próstata han mostrado contradicciones sobre su eficiencia. Sin embargo, el índice de aglutinación nuclear, (IAN), hasta donde se conoce, ha sido poco considerado. Un grupo de tres series de preparaciones histológicas provenientes de biopsias transrectales de tejido epitelial con diagnóstico de Atrofia Prostática Focal, contrastadas con Hematoxilina y Eosina, fueron fotografiados con cámara digital y analizadas a través del Programa de análisis de imagen ImageJ Fiji. La población nuclear del epitelio proliferativo acinar fue seleccionada como áreas de interés a través de la segmentación en escala de grises y el valor del área promedio de la aglutinación nuclear (APAN) fue cuantificado. Todos los datos fueron procesados en el Programa GraphPad Prims. El APAN en la Serie III fue mayor respecto a la Serie II y a la Serie I, es decir la AN en la Serie III > Serie II > Serie I. La precisión de la prueba de segmentación morfométrica, representada en la gráfica ROC, mostro un valor de 0.8084 ± 0.07 o equivalente a 80.84 % de probabilidad de aceptar que la AN pueda ser un parámetro morfométrico con potencial predictivo o IAN estadísticamente significativo, **** $p < 0.0006$, a ser incorporado en el proceso diagnóstico de la neoplasia prostática.*

PALABRAS CLAVE: *Atrofia Prostática, Epitelio Proliferativo Acinar, Aglutinación Nuclear, análisis de imagen, segmentación en escala de grises, ImageJ Fiji.*

ABSTRACT: *The morphometric parameters that have been proposed to be used as predictive indices of prostate cancer lesions have shown contradictions regarding their efficiency. However, the nuclear agglutination index, (NAI), as far as is known, has been little considered. A group of three series of histological preparations from transrectal biopsies of epithelial tissue with a diagnosis of Focal Prostatic Atrophy, contrasted with Hematoxylin and Eosin, were photographed with a digital camera and analyzed through the ImageJ Fiji Image Analysis Program. The nuclear population of the acinar proliferative epithelium was selected as areas of interest through grayscale segmentation and the mean area of nuclear agglutination (APAN) value was quantified. All data were processed in the GraphPad Prims Program. The APAN in Series III was higher*

*compared to Series II and Series I, that is, the AN in Series III> Series II> Series I. The precision of the morphometric segmentation test, represented in the ROC graph, showed a value of 0.8084 ± 0.07 or equivalent to 80.84% probability of accepting that AN can be a morphometric parameter with predictive potential or statistically significant ANI, **** $p < 0.0006$, to be incorporated in the diagnostic process of prostatic neoplasia.*

KEY WORDS: *Prostatic Atrophy, Alveolar Tubule, Nuclear Agglutination, Proliferative Acinar Epithelium, image analysis, grayscale segmentation, ImageJ Fiji.*

INTRODUCCIÓN

La Atrofia Prostática (AP) es una lesión benigna que se presenta morfológicamente con dos expresiones distintas; una denominada Atrofia Difusa (AD) y la otra denominada Atrofia Focal (AF), que a nivel histológico pudiera simular un adenocarcinoma^{1,2}. Particularmente dentro de las características histopatológicas de la AF se ha destacado su diversidad, debida en parte a variantes o subtipos morfológicos que, si bien ha dificultado su estudio y comprensión, también ha servido de incentivo para profundizar las

investigaciones en búsqueda de posibles parámetros morfológicos con característica de valor predictivo en el seguimiento del potencial maligno de estas lesiones. Lesiones que, de no ser abordadas a tiempo, podrían comprometer la salud de los individuos que la presenten. Entre las variantes o subtipos de AF, hacemos énfasis en la Atrofia Focal Completa (AFC), que a su vez ha sido subdividida en AFC-Simple (AFCS), la Atrofia AFC-Hiperplásica (AFCH), la AFC- Esclerótica (AFCE)³. Todas estas variantes se caracterizan por presentar acinos prostáticos con hiperproliferación epitelial, pérdida de la capa basal, descomposición de la membrana basal, infiltración de células inmunes, así como la presencia de células acinares con visibles núcleos hipercrómicos, escaso citoplasma, y arquitectura mono

¹ Estudiantes de Medicina. Escuela de Medicina Luis Razetti. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela. Programa PEEI.

² Profesor Titular. Licenciado en Biología. MSc., PhD. Director del Instituto Anatómico "José Izquierdo". Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

Recibido: 21/12/2020

Aceptado: 01/02/2021

estratificada^{4,5}. También, se han incluido particularidades como la presencia de una población celular del epitelio proliferativo con tendencia a aglutinarse, formando conglomerados o estructuras glomeruloides, en un mayor o menor grado; una característica celular poco considerada como parámetro con valor predictivo⁶. Cabe destacar que la descripción de los numerosos procesos celulares expresados en las diferentes variaciones histológicas de las lesiones descritas, ha estado guiada predominantemente por el análisis cualitativo, siendo por lo general escasamente acompañados por los análisis morfológicos cuantitativos^{7,8,9}. Sin embargo, en los últimos años el campo de la Anatomía Patológica del cáncer de próstata se ha ido enriqueciendo a través de la cuantificación de procesos celulares tumorales que son poco perceptible por el ojo humano^{10,11,12}. Muchas de estas herramientas para el análisis, se encuentran incorporadas en programas de libre distribución como el llamado ImageJ y especialmente su versión Fiji^{13,14}, con el cual se ha podido mejorar la eficiencia del diagnóstico precoz^{15,16}. En tal sentido el objetivo del trabajo fue

analizar la organización nuclear de las células epiteliales, particularmente la Aglomeración Nuclear (AN) de la población de células del Epitelio Acinar Prostático, sobre cortes histológicos teñidos con Hematoxilina y Eosina proveniente de biopsias transrectales diagnosticadas con AF. Para ello, área promedio de la aglutinación nuclear (APAN) de las células del epitelio, fue considerada como una variable politómica que adquirirá tres valores; pequeños, medianos o grandes aglomerados, definidos por segmentación.

MÉTODOS

Muestras histológicas

Se realizó un estudio retrospectivo con muestreo no probabilístico de muestras histopatológicas provenientes de biopsias transrectales de tejido prostático de pacientes diagnosticados con AF. Los cortes histológicos seriados de 5 micras y de forma cilíndrica, teñidos con Hematoxilina y Eosina, se nos fueron entregados en lamineros contentivos de un promedio de 5 a 6 cortes por lámina, rotuladas como Serie I, II y III. Las muestras fueron obtenidas mediante la autorización del Dr. Cirac, Anatomico-

Patólogo del Centro Diagnóstico de San Bernardino, Caracas, República Bolivariana de Venezuela, con el respectivo consentimiento informado, de acuerdo con las directrices y la aprobación del Comité de Ética de Investigación de la institución.

Adquisición de las imágenes

Los cortes histológicos fueron registrados en imágenes digitales adquiridas a través de un sistema de captura Capture IC.22. Imaging Source, incorporado a un Microscopio Olympus BX50, en un número de 5 cinco imágenes por cada corte, siguiendo la trayectoria longitudinal de los cortes de la región periférica. Se hizo énfasis sobre la región nuclear del epitelio acinar prostático.

Pre procesamiento de la imagen

El análisis por segmentación de la población nuclear, a través del Programa Image J Fiji, comenzó con la transformación de las imágenes originales a color (H&H), hacia imágenes en blanco y negro de 8 bit, realizando luego la calibración y el ajuste de contraste respectivo. Una vez realizada la transformación de la imagen original

se procedió a la obtención de la imagen binaria o máscara a través de la aplicación del umbral en escala de grises, para con ello proceder e estimar los respectivos valores de Área Promedio de la Aglutinación Nuclear (APAN). Este fue obtenido a partir del factor de redondez nuclear equivalente a la expresión matemática: $4\pi \cdot \text{área nuclear} / \text{perímetro nuclear}^2$. El área y el perímetro nuclear fueron arrojados por el programa ImageJ en su análisis de partículas. El índice de Aglutinación Nuclear (IAN), fue estimado en función del Área Bajo la Curva (ABC) de una curva ROC (Receiver-Operating Characteristic, por sus siglas en inglés)¹⁷, construida con los datos de aglutinación de la Serie III y no aglutinación Serie I. Se expresó en $X \pm EE$ y un intervalo de confianza del 95%, con el apoyo del Programa Estadístico GraphPad Prims.

RESULTADOS

La histología de la Serie I (Fig. 1A) mostró el epitelio acinar conformado por células acinares distribuidas en mono capa de núcleos hipercrómicos orientados basalmente y circunscritos al espacio estromal (*) Se pudo evidenciar

LA ATROFIA PROSTATICA FOCAL Y EL FACTOR DE AGLUTINACION NUCLEAR EN EPITELIO ACINAR PROLIFERATIVO: UN ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

mayor cantidad de núcleos individualizados y pocas regiones de aglutinación nuclear (Fig.1A´flecha). La Serie II, (Fig.1B), mostro el epitelio acinar conformado por células organizadas en bicapa de núcleos hiperocrómicos de manera desordenada y circunscritos al estroma. Se pudo evidenciar una disminución de núcleos individuales y un aumento de las regiones de aglutinación nuclear (Fig.1B´flecha). Por último, la

Serie III (Fig.1C), mostro características histológicas de una región central glandular, con células acinares en una disposición azarosa de núcleos hiperocrómicos invadiendo el espacio acinar. Se destacó la ausencia de núcleos individualizados y un incremento en el conglomerado nuclear con mayores regiones de aglutinación nuclear (Fig.1C´flecha).

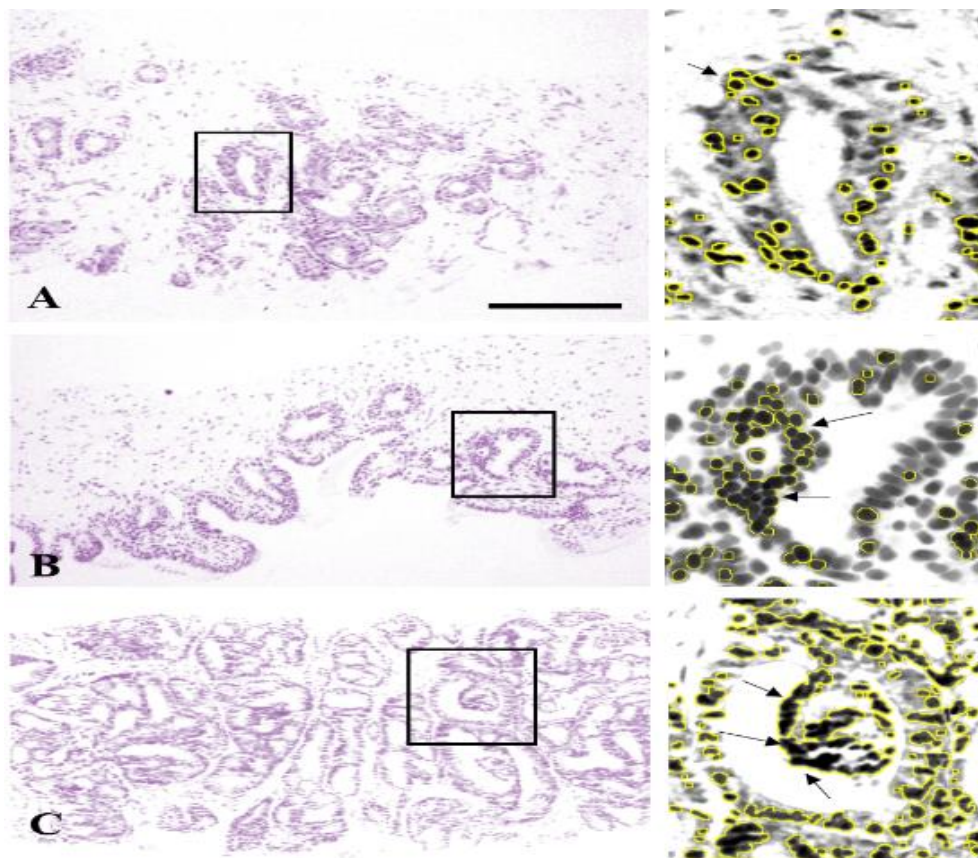


Figura 1. Histología de epitelio prostático acinar. Serie I (A), Serie II (B) y Serie III (C). Acinos (recuadro). Población nuclear segmentada. Mayor proporción de núcleos individualizados (A´) e incremento de Aglutinación Nuclear (B´y C´). Barra= 0.85 μ m.

Fuente: Elaboración propia.

El APAN de la Serie III fue mayor respecto a las Serie II y respecto a la Serie I, lo cual se tradujo en un incremento en el conglomerado nuclear cuantificado como APAN (Gráfico 1). Así se estableció la Aglutinación Nuclear fue mayor en la Serie III > Serie II > Serie I. La precisión diagnóstica de la prueba, representada en la gráfica ROC (Gráfico 2), mostro un valor de 0.8084 ± 0.07 o el equivalente a 80.84 % de probabilidad estadísticamente significativa, **** $p < 0.0006$.

DISCUSIÓN

El análisis de la aglutinación nuclear (AN) de las células epiteliales acinares del tejido prostático con diagnóstico de AF, realizado a través de la segmentación por umbrales de grises, permitió cuantificar y proponer al evento celular de aglutinación nuclear como un parámetro morfométrico con potencial de índice predictivo a ser incorporado en los análisis del diagnóstico asociado con las Atrofias Prostáticas. Hallazgos reportados por otros investigadores, han emitido diversos informes contradictorios sobre los parámetros que, hasta el momento, han sido considerados como los posibles candidatos a factores

predictivos; entre ellos parámetros nucleares como el tamaño y la forma del núcleo¹⁸.

En relación al tamaño nuclear, las propuestas han sido poco convincentes debido a la baja o moderada sensibilidad y especificidad que han presentado¹⁹. El valor de tamaño nuclear mayor ha sido correlacionado con la disminución de la tasa de supervivencia; sin embargo, muchos resultados falsos positivos y falsos negativos han hecho que esta característica por sí sola sea menos útil para el uso clínico rutinario²⁰.

En cuanto a la forma nuclear, varios estudios han encontrado que el factor de redondez nuclear podría ser útil en la predicción del adenocarcinoma de próstata²¹. Por otra parte, ha sido planteado que las diferencias en cuanto a las técnicas analíticas y las diferencias en los protocolos de selección de materiales, incorporan elementos de discrepancia²², sin embargo, dichas condiciones han sido también desestimadas²³. Además de los parámetros antes descritos, se han analizados otros como la elipticidad nuclear; sin embargo, este también ha sido cuestionado²⁴.

LA ATROFIA PROSTATICA FOCAL Y EL FACTOR DE AGLUTINACION NUCLEAR EN EPITELIO ACINAR PROLIFERATIVO: UN ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

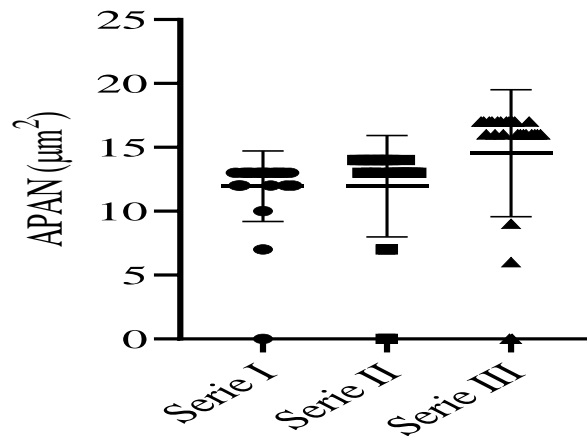


Gráfico 1. Media geométrica del Área Promedio de Aglutinación Nuclear (APAN)r en función de las series analizadas. Se destaca la diferencia significativa entre la Serie I y III. ANOVA. $F=14.27$. $****p<0.0001$. Brown-Forsyth-test. $F(DFn, DFd) 8.139(2,60)$. $*** p = 0.0007$. Bartlett test. Corrector 11.27 $**p=0.0036$. Serie I mayor cantidad de núcleos individuales. Serie III mayor aglutinación nuclear.

Fuente: Elaboración propia.

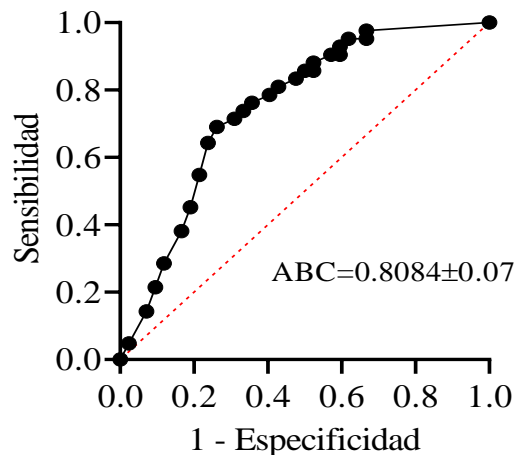


Gráfico 2. Curva ROC. Precisión diagnóstica de la Aglutinación Nuclear (AN) a través de la morfometría de segmentación. Se obtuvo un valor IAN de 0.8084 ± 0.07 con un IC 95% 0.6689 a 0.9479 y $p<0.0006$.

Fuente: Elaboración propia.

En resumen, los análisis de diversos parámetros morfométricos hasta el momento propuestos, han dado como resultado valores predictivo poco firmes y cuestionable para ser introducidos como elementos de guía en el diagnóstico de las tan diversas lesiones prostáticas. Sin embargo, el IAN entendido como la probabilidad de clasificar a la AN como indicador predictivo en el proceso de neoplasia prostática, ha sido fundamentado en un proceso celular cuantificable morfométricamente, mostrándose evidencias de que dicho parámetro podría ser caracterizado como un Índice con fortaleza por su alto grado de sensibilidad y especificidad como fue demostrado. En cuanto a la naturaleza de proceso de aglutinación, cabe destacar que dicho proceso pudiera ser la consecuencia de la pérdida de componente de matriz extracelular y muy probablemente de la pérdida de otras moléculas señalizadores del espacio extracelular durante el proceso inflamatorio^{25,26}. De manera que para las series histológicas analizadas ha sido posible indexarles un distinto grado de aglutinación que podría estar vinculado con desarreglo a distintos grados de la

matriz extracelular que definirían la clasificación en subtipos de pequeños, mediano o grandes aglomerados de células del epitelio acinar, como fue cuantificado. Este nuevo elemento, podría proporcionar un valor agregado al análisis de las denominadas lesión de células con núcleos pequeños hiperocrómicos abarrotados con escaso citoplasma, cromatina finamente granular y nucléolos indistintos, que forma estructuras en roseta, carentes de mitosis, apoptosis y necrosis, vinculada con cáncer prostático de alto grado²⁷.

CONCLUSIONES

De todo lo analizado en el presente trabajo se ha podido concluir que el fenómeno de aglutinación nuclear (AN) descrito como una de las características histológicas de las neoplasias prostáticas, podría ser considerada como un parámetro morfométrico de carácter predictivo a ser incluido en el proceso diagnóstico de tan comprometedoras patologías, asignándole propiedades de un índice de aglutinación nuclear (IAN). Por otra parte, quedo fortalecido el gran aporte que proporciona el Análisis de Imagen y la morfometría a la histopatología de

LA ATROFIA PROSTATICA FOCAL Y EL FACTOR DE AGLUTINACION NUCLEAR EN EPITELIO ACINAR PROLIFERATIVO: UN ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

procesos neoplásicos haciendo uso de programas de libre acceso y bajos costos como el Programa Image J Fiji y estadísticos como el GraphPad Prims.

REFERENCIAS

1. Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J., & DePinho, R. A. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & development*. 2018; 32(17-18):1105–1140.
- 2.- Billis A. Prostatic Atrophy. Clinic pathological Significance. *International Braz J Urol*. 2010; 36 (4): 401-409.
3. Humphrey PA. Histopathology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017; 7(10): a030411.
4. Ruska KM, Sauvageot J, Epstein JI: Histology and cellular kinetics of prostatic atrophy. *Am J Surg Pathol*. 1998; 22: 1073-74.
5. Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(6 Pt A):1238-1260.
6. Epstein JI. Diagnosis and reporting of limited adenocarcinoma of the prostate on needle biopsy. *Mod Pathol*. 2004;17(3):307-315.
7. J.M. Haggerty, X.N. Wang, A. Dickinson, C.J. O'Malley, E.B. Martin. Segmentation of epidermal tissue with histopathological damage in images of hematoxylin and eosin stained human skin. *BMC Med Imaging*. 2014; 14 (1): 21.
8. Avenel C, Tolf A, Dragomir A, Carlbohm IB. Glandular Segmentation of Prostate Cancer: An Illustration of How the Choice of Histopathological Stain Is One Key to Success for Computational Pathology. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019; 7:125–136.
9. De Torres Ramírez I. Factores pronósticos y predictivos del carcinoma de próstata en la biopsia prostática. *Actas Urol Esp*. 2007;31(9):1025-1044.
10. Avenel C, Tolf A, Dragomir A, Carlbohm IB. Glandular Segmentation of Prostate Cancer: An Illustration of How the Choice of Histopathological Stain Is One Key to Success for Computational Pathology. *Front Bioeng Biotechnol*. 2019; 7:125-136.
11. Anant Madabhushi, George Lee. Image Analysis and Machine Learning in Digital Pathology: Challenges and Opportunities. *Medical Image Analysis*. 2016; 33: 170-175.
12. Lawson P, Sholl AB, Brown JQ, Fasy BT, Wenk C. Persistent homology for the quantitative evaluation of architectural features in the histology of prostate cancer. *Sci Rep*. 2019; 9 (1): 1139.
13. Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*. 2012; 9 (7): 676–682.

14. Rueden CT, Schindelin J, Hiner MC, et al. ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics*. 2017;18(1):529.
15. Schwendy M, Unger RE, Bonn M, Parekh SH. Automated cell segmentation in FIJI® using the DRAQ5 nuclear dye. *BMC Bioinformatics*. 2019;20(1):20–39.
16. S.H. Ong, C.X. Jin, Sinniah R. Jayasooriah. Image analysis of tissue sections. *Comput Biol Med*. 1996; 26 (3): 269-279.
17. Domínguez Alonso Emma, González Suárez Roberto. Análisis de las curvas receiver-operating characteristic: un método útil para evaluar procedimientos diagnósticos. *Rev Cubana Endocrinol [Internet]*. 2002; Vol 13 (2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S156129532002000200010&lngs.
18. Van der Poel HG, Schaafsma HE, Vooijs GP, Debruyne FM, Schalken JA. Quantitative light microscopy in urological oncology. *J Urol*. 1992; 148(1):1-13.
19. Ten Kate F.J.W. Gallee M.P.W, Schmitz, P.I.M, Joebsis A.C, Van Der Heul R.O Prins M.E.F, Blom J.H.M. Problems in grading of prostatic carcinoma. Inter observer reproducibility of 5 different grading systems. *World J. Urol*. 1986; 4: 147-152.
20. Auer G, Askensten U, Ahrens O. Cytophotometry. *Hum Pathol*. 1989; 20(6): 518-527.
21. deVere White RW, Olsson CA, Deitch AD. Flow cytometry: role in monitoring transitional cell carcinoma of bladder. *Urology*. 1986; 28(1):15-20.
22. Diamond D.A, Berry S.J, Jewett H.J, Eggleston J.C, Coffey D.S. A new method to assess metastatic potential of human prostate cancer: relative nuclear roundness. *J Urol*. 1982;128(4):729-734.
23. Epstein J.I, Berry S.J, Eggleston J.C. Nuclear roundness factor. A predictor of progression in untreated Stage A2 prostate cancer. *Cancer*. 1984; 54(8):1666-1671.
24. Kryvenko, O. N., Williamson, S. R., Trpkov, K., Gupta, N. S., Athanazio, D., Selig, M. K., Smith, P. T., Magi-Galluzzi, C., & Jorda, M. Small cell-like glandular proliferation of prostate: a rare lesion not related to small cell prostate cancer. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology*. 2017; 470(1), 47–54.
25. Robinson S, Laniado M, Montgomery B. prostate specific antigen and acinar density: a new dimension, the “prostatocrit”. 2017; Vol. 43 (2): 230-238.
26. Wang W, Bergh A, Damber JE: Morphological transition of proliferative inflammatory atrophy to high-grade intraepithelial neoplasia and cancer in human prostate. *Prostate*. 2009; 69: 1378-86.
27. Nadal R, Schweizer M, Kryvenko ON, Epstein JI, Eisenberger MA. Small cell

**LA ATROFIA PROSTATICA FOCAL Y EL FACTOR DE AGLUTINACION NUCLEAR EN EPITELIO
ACINAR PROLIFERATIVO: UN ANÁLISIS MORFOMÉTRICO**

carcinoma of the prostate. Nat Rev Urol.
2014;11(4):213-219.

CORRESPONDENCIA

Marco Alvarez. Dirección: Instituto Anatómico
"José Izquierdo" Facultad de Medicina.
Universidad Central de Venezuela. Teléfono:
0212 6053449. Dirección de correo electrónico:
alvarezmenator@gmail.com.