

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID.

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

**Aplicación de herramientas estereológicas y de
cuantificación no lineal al estudio de la distribución,
isotropía y tamaño del lecho microvascular en
próstata normal y patológica**

TESIS DOCTORAL

JESUS RUIZ DE LAS HERAS

Madrid, 2012

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. LA PRÓSTATA	2
1.1. Embriología y desarrollo de la próstata humana	2
1.2. Anatomía de la próstata	3
1.2.1. Anatomía macroscópica	3
Relaciones anatómicas extrínsecas	3
Relaciones anatómicas intrínsecas	3
Regiones prostáticas	5
Vascularización prostática	6
Inervación prostática	7
1.2.2. Anatomía microscópica	8
1.3. Fisiología de la próstata	11
1.3.1. Actividad funcional: secreción	11
1.3.2. Regulación de la función y el mantenimiento de la próstata.....	11
Regulación endocrina.....	12
Regulación autocrina-paracrina.....	14
Regulación nerviosa.....	14
1.4. Angiogénesis prostática	15
1.4.1. Distribución de la microvascularización prostática.....	15
1.4.2. Cuantificación de la microvascularización prostática.....	16
2. HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA (HBP)	17
3. ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA	18
4. ESTEREOLOGÍA	21
5. CUANTIFICACIÓN NO LINEAL	22
5.1. Breve panorámica de los sistemas dinámicos no lineales.....	22
5.2. Concepto de sistema dinámico	22
5.3. Como representar un sistema dinámico	23
5.3.1. Espacio de fase y dimensiones	23

5.3.2. Los operadores (Φ)	25
5.4. Atractores extraños	25
5.5. Abordaje no lineal de la microvascularización prostática	26
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29
1. HIPÓTESIS DE TRABAJO	29
2. OBJETIVOS.....	29
MATERIAL Y MÉTODOS	31
1. MATERIAL.....	31
2. MÉTODOS.....	31
2.1. Procesamiento del material	31
2.1.1. Piezas control.....	32
2.1.2. Piezas patológicas (HBP y carcinoma).....	35
2.2. Técnica de inmunotinción. Avidina-Biotina-Peroxidasa	37
2.2.1. Protocolo de inmunotinción	39
3. MÉTODOS CUANTITATIVOS LINEALES (ESTEREOLOGÍA)	40
3.1. Densidad de longitud vascular (L_V)	40
3.2. Radio promedio de difusión vascular ($rdif$)	41
3.3. Diámetro vascular medio (dvm).....	42
3.4. Fracción de volumen del estroma ocupada por Factor-VIII	42

4. MÉTODOS CUANTITATIVOS NO LINEALES	43
4.1. Adquisición de datos	43
4.2. Reconstrucción del espacio de fase	46
4.3. Clasificación del sistema dinámico	52
4.4. Test para discriminar caos determinístico de ruido autocorrelado	59
4.4.1. Método de los datos subrogados	59
4.5. Correlaciones de largo rango en series espaciales (método DFA)	63
4.6. Controles negativos. Series totalmente aleatorias	68
4.7. Patrones fractales del lecho vascular	69
4.7.1. Dimensión fractal (Box counting).....	69
4.7.2. Lacunaridad.....	71
4.8. Espectro multifractal del lecho vascular	72
4.9. Análisis multifractal mediante wavelets	73
5. HERRAMIENTAS UTILIZADAS	76
5.1. Análisis lineal (estereología).....	76
5.2. Análisis no lineal.....	77
6. RESUMEN DE LOS PARÁMETROS UTILIZADOS	78
7. COMPARACIONES ESTADÍSTICAS	80
8. FOTOGRAFÍA	81
RESULTADOS	82
1. RESULTADOS CUALITATIVOS	82

2. RESULTADOS CUANTITATIVOS ESTEREOLÓGICOS	88
2.1. Isotropía y comparación regional de la estimación de L_V en próstata control.....	88
2.2. Isotropía y comparación regional de las estimaciones de d_{vm} y $rdif$ en próstata control.....	89
2.3. Isotropía y comparación regional de la estimación de V_V Factor-VIII en próstata control.....	91
2.4. Comparación de la estimación de L_V en próstata control, HBP y carcinoma.....	92
2.5. Comparación de las estimaciones de d_{vm} y $rdif$ en próstata control, HBP y carcinoma.....	93
2.6. Comparación de la estimación de V_V Factor-VIII en próstata control, HBP y carcinoma.....	95
3. RESULTADOS CUANTITATIVOS NO LINEALES	96
3.1. Adquisición de datos	96
3.2. Reconstrucción del espacio de fase.....	103
3.3. Isotropía y comparación regional de la estimación de la dimensión de correlación (D_2) en próstata control.....	106
3.4. Comparación de la estimación de D_2 controles, HBP y carcinoma	112
3.5. Isotropía y comparación regional de las estimaciones del coeficiente de Hurst (α) en próstata control.....	116
3.6. Comparación de las estimaciones del coeficiente de Hurst (α) en próstata control, HBP y carcinoma	117
3.7. Controles negativos. D_2 y coeficiente α de series totalmente aleatorias (ruido blanco) en comparación con datos reales (normales y patológicos)	118
3.8. Isotropía y comparación regional de las estimaciones de la dimensión fractal por “box counting” (D_0) y de la lacunaridad (Λ) en próstata control.....	119
3.9. Estimación de D_0 y Λ en próstata control, HBP y carcinoma	122
3.10. Comparación de las estimaciones de D_0 y D_2 en próstata control, HBP y carcinoma	123

4. ESTRUCTURA MULTIFRACTAL DEL LECHO MICROVASCULAR	125
4.1. Transformadas wavelet de series espaciales inmunoteñidas para Factor-VIII en próstata control, HBP y Ca	125
4.2. Comparación de las estimaciones del espectro multifractal $\tau(q)$ en próstata control, HBP y Ca	128
4.3. Estimaciones del espectro de singularidad $D(h)$ en próstata control	130
4.4. Estimaciones del espectro de singularidad $D(h)$ en próstata control, HBP y Ca.....	132
 DISCUSIÓN	 134
 1. HALLAZGOS CUALITATIVOS	 134
 2. ESTEREOLOGÍA.....	 134
 3. ESTUDIOS NO LINEALES.....	 139
 CONCLUSIONES	 149

CITAS BIBLIOGRÁFICAS 151

APÉNDICE 166

PUBLICACIONES RELACIONADAS 166

INTRODUCCIÓN

La próstata es una glándula exocrina y se considera como la glándula accesoria principal del tracto reproductor masculino (Leissner and Tisell 1979; Walsh et al. 2002). La próstata contribuye en un 20% a la composición del semen. La secreción prostática es un fluido opalescente, rico en citrato, fosfatasa ácida y enzimas proteolíticas (fibrinolisin, activador del plasminógeno, pepsinógeno II, etc.). Esta secreción contribuye a la licuefacción del semen después de eyaculado y a la capacitación del esperma (Fawcett and Raviola 1994).

En el varón, la próstata causa un número importante de problemas médicos, muchos relacionados con el envejecimiento (Heinzer and Steuber 2009; Froehner 2010). Los tres más relevantes son la infección (prostatitis), la hiperplasia (adenoma) y la neoplasia (adenocarcinoma). La hiperplasia benigna de próstata (HBP) es el tumor benigno más frecuente en el varón adulto, independientemente de la raza o cultura (Guess 2001; Bushman 2009). El cáncer de próstata ocupa el cuarto lugar entre las neoplasias malignas diagnosticadas en el mundo y es la segunda causa de muerte oncológica en hombres después del cáncer de pulmón (Herranz et al. 2003; Granado S. et al. 2006; Borrás et al. 2008; Wells et al. 2009; Alcaraz et al. 2009). En las últimas décadas se ha incrementado su diagnóstico, debido tanto a los avances tecnológicos como al aumento de la vida media (Rogers 2009; Ficarra et al. 2009).

Actualmente la patología prostática tiene gran relevancia sanitaria debido a que constituye un problema creciente de salud pública por varios factores (Berry et al. 1984b; Kirby 1992; Holtgrewe 1995; Hunter et al. 1996): a) prevalencia elevada, b) disminución la calidad de vida de los afectados, c) incremento de la morbi-mortalidad, d) consumo de gran cantidad de recursos sanitarios, y e) previsión de que esta demanda aumente en base a diagnósticos cada vez más precoces, que dilatarán el periodo de tiempo durante el que los individuos requerirán asistencia médica.

Por todas estas razones nos parece interesante profundizar en el conocimiento de la próstata normal y de sus patologías para, cada vez con más datos, poder luchar contra la enfermedad en mejores condiciones.

Este trabajo pretende establecer diferencias entre los vasos de la próstata humana normal, la HBP y el adenocarcinoma usando estimaciones estereológicas como la longitud de vaso y técnicas propias de la geometría fractal que permitan describir la disposición en el espacio de la vascularización prostática en estas tres entidades.

1. LA PRÓSTATA

1.1. Embriología y desarrollo de la próstata humana

La próstata deriva principalmente del seno urogenital embrionario, excepto el verumontanum y parte de las glándulas acinares de la región central que tienen su origen en los conductos de Wolff (Tanagho EA 1982).

El tejido prostático comienza su diferenciación en la séptima semana postconcepción completándose entre las semanas undécima y decimotercera. A partir de la vigesimocuarta semana de gestación empiezan a desarrollarse las luces glandulares y al término de la gestación algunos acinos están tapizados por un epitelio cilíndrico alto. Los andrógenos fetales son los principales reguladores del crecimiento prenatal y del desarrollo de la próstata (Algaba F 1993).

Durante los primeros años de vida, la próstata es inaparente y sus células carecen de capacidad secretora. Alrededor de los 12 años se produce un incremento importante en el número de acinos que se prolonga hasta la pubertad. Durante ésta, la estimulación hormonal produce un agrandamiento de las yemas y conductos glandulares y hay evidencia de actividad secretora. La glándula prostática alcanza su tamaño adulto a los 20 años de edad, momento precedido de una fase de crecimiento exponencial, con un tiempo de duplicación del peso prostático de 2.8 años (Aumuller 1991; Algaba F 1993).

1.2. Anatomía de la próstata

La próstata está situada en la línea media de la pelvis por debajo de la base de la vejiga urinaria, por encima del recto y posterior a la sínfisis del pubis y rodeada por una vaina fascial.

Tiene forma de cono de base posterosuperior y vértice anteroinferior. Rodea a la parte proximal de la uretra y se encuentra atravesada por los conductos eyaculadores. En el adulto joven llega a pesar 20 ± 6 grs. Sus dimensiones medias pueden alcanzar 26 mm en el eje anteroposterior, 44 mm en el eje transversal y 34 mm en el longitudinal.

1.2.1. Anatomía macroscópica

Relaciones anatómicas extrínsecas

En la próstata podemos distinguir:

- . Base: En relación con la vejiga y las vesículas seminales. La uretra penetra en la próstata en un punto cercano al centro de su base.

- .Vértice: Situado por encima del diafragma urogenital, se apoya en el esfínter estriado de la uretra.

- . Cara posterior: Se relaciona con el recto, del que se separa por la aponeurosis prostatoperitoneal.

- . Cara anterior: Cubierta por las fibras más altas del esfínter estriado de la uretra. Se relaciona con los ligamentos pubovesicales y el plexo venoso de Santorini, que la separan de la sínfisis del pubis. Entre la próstata y dicho plexo se sitúa la expansión preprostática de la aponeurosis perineal media.

- . Caras laterales: Apoyadas en la fascia que recubre los músculos elevadores del ano. Se relacionan con elementos vasculonerviosos.

Relaciones anatómicas intrínsecas

Podemos dividir la próstata en tejido glandular, formado por las zonas de McNeal, que analizaremos más adelante; y tejido no glandular constituido por:

a- Esfínter preprostático: manguito de fibras musculares lisas que rodea el segmento proximal de la uretra. En la zona posterior el esfínter es compacto pero en la anterior las fibras se dispersan entre el estroma fibromuscular anterior y en las laterales las fibras se introducen entre los conductos y acinos de la zona de transición. Se cree que su función es impedir el flujo retrógrado del líquido seminal durante la eyaculación.

b- Estroma fibromuscular anterior: Formado por fibras musculares lisas orientadas verticalmente y separadas por tejido fibroso que se extienden por la superficie anteromedial de la próstata desde el cuello vesical hasta el ápex.

c- Esfínter estriado: Formado por fibras musculares estriadas que se localizan entre el verumontanum y el ápex.

d- Cápsula prostática: Constituida por fibras musculares lisas, orientadas transversalmente en su mayoría, y tejido fibroso del que se desprenden abundantes bandas fibromusculares hacia el interior dividiendo a la glándula en unos cincuenta lobulillos. Desde la cápsula parten trabéculas que dividen la glándula en lóbulos:

- . anterior: ventral respecto a la uretra.
- . medial: entre la uretra y los conductos eyaculadores.
- . lateroposterior: dorsalmente a la uretra.

e- En el ápex prostático hay un defecto capsular donde las fibras distales del estroma fibromuscular anterior y del esfínter estriado se entremezclan con los tejidos glandulares prostáticos.

f- Uretra prostática: Porción inicial del conducto uretral. En su cara posterior presenta un repliegue longitudinal, cresta uretral, a cuyos lados se sitúan los senos uretrales. La cresta se sobreeleva en su porción media dando lugar al colículo seminal o verumontanum. Este se encuentra excavado centralmente por el orificio del utrículo prostático y a cada lado por los orificios de los conductos eyaculadores. La uretra prostática se divide en dos segmentos de aproximadamente igual longitud

por un punto de inflexión con una angulación anterior de 35° a nivel del verumontanum.

Regiones prostáticas

En la actualidad se acepta universalmente el modelo de McNeal que divide la próstata en 4 regiones (McNeal 1981; McNeal 1984; McNeal 1997) (Fig.1). Estudios morfológicos, histoquímicos y clínicos apoyan este modelo (Laczko et al. 2005):

Zona periférica (ZP): supone el 70 - 75% del tejido glandular. Sus glándulas drenan en la porción distal de la uretra. El 90% de los cánceres de próstata aparecen en esta región.

Zona central (ZC): representa el 20 - 25% del tejido glandular. Rodeada parcialmente por la zona periférica, forma parte de la base y es atravesada por los conductos eyaculadores.

Zona de transición (ZT): constituye el 5% del tejido glandular del adulto joven y se incrementa con la edad. Está formada por dos pequeños lóbulos situados alrededor de la porción mas distal de la uretra proximal. Contiene escasas glándulas y abundante estroma fibromuscular denso. El 100% de los casos de HBP aparecen en esta zona.

Estroma fibromuscular anterior: este compartimento puede ser considerado como el componente más anterior de la zona periférica. Formado por un tejido fibroconectivo con abundantes fibras de músculo liso y casi desprovisto de glándulas (sólo algunas en contacto con las zonas periférica y de transición). La ausencia de componente epitelial excluye esta región de la próstata glandular verdadera.

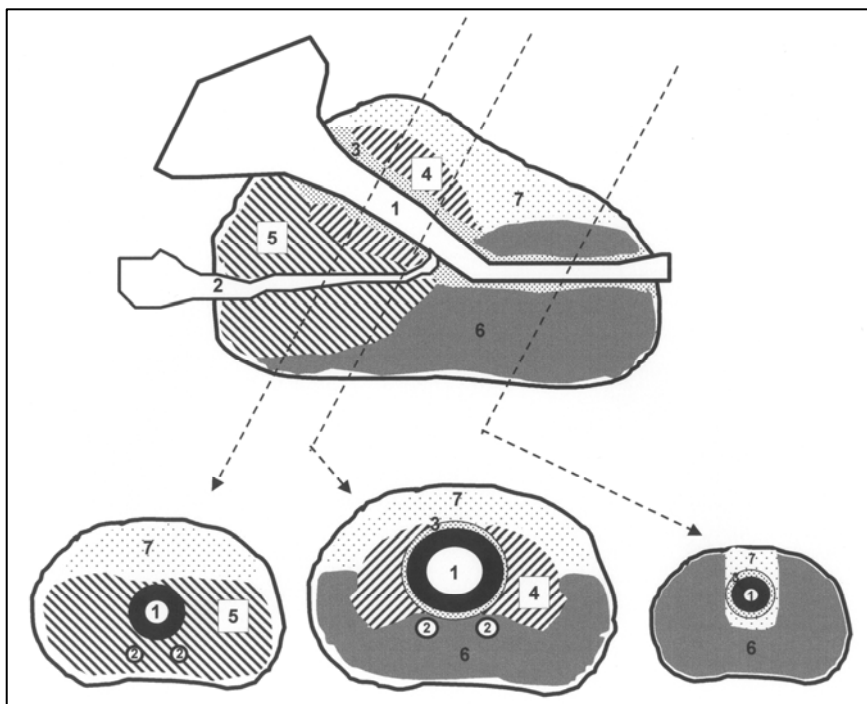


Figura 1. Regionalización macroscópica de la próstata humana, según McNeal. Las flechas de trazo discontinuo que atraviesan la sección sagital indican secciones transversales a tres niveles. (1) Uretra prostática; (2) conductos eyaculadores; (3) región periuretral; (4) zona de transición (ZT); (5) zona central (ZC); (6) zona periférica; (7) estroma fibromuscular anterior.

Vascularización prostática

- Arterial: A cargo de las arterias pudenda interna, vesical inferior y rectal media (hemorroidal). La arteria vesical inferior, que irriga fundamentalmente el lóbulo medio y los laterales, emite una rama prostática, la cual a su vez se bifurca para originar una rama uretral y una rama capsular (Fig. 2). (Hinman 1994; Walsh et al. 2002).

- Venosa: Las venas drenan anterolateralmente en el plexo prostático anterolateral o plexo de Santorini y posteriormente en el plexo seminal. Desde aquí, la sangre es conducida a la vena hipogástrica por las venas vesicales.

- Linfática: Los linfáticos de la próstata forman una red superficial periprostática de la que nacen varios colectores que terminan en los ganglios linfáticos ilíacos internos (hipogástricos), sacros, vesicales e ilíacos externos.

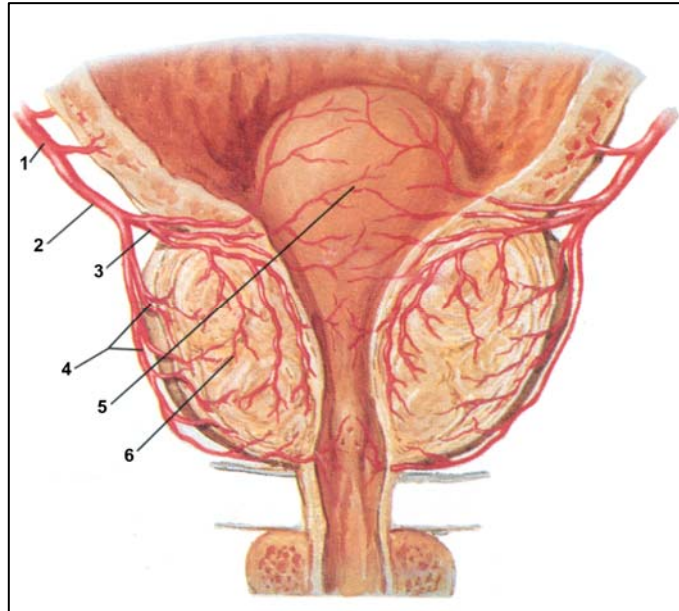


Figura 2. Irrigación arterial del lóbulo prostático medio y de los lóbulos laterales. (1) Arteria vesical inferior; (2) rama prostática de la arteria vesical inferior; (3) rama uretral; (4) rama capsular; (5) lóbulo medio; (6) lóbulo lateral (Tomado de Atlas of Human Anatomy, F.H. Netter, 1994).

Inervación prostática

La próstata está inervada por el sistema nervioso autónomo a través del plexo pélvico dividido en fibras simpáticas (procedentes de los segmentos medulares D₁₁-L₂ que se incorporan a dicho plexo a través del nervio hipogástrico) y parasimpáticas (originadas en los segmentos medulares S₂-S₄ que forman los nervios esplácnicos) (McVary et al. 1998; Powell et al. 2005). La porción del plexo pélvico que inerva la próstata recibe el nombre de plexo prostático, situado fuera de la cápsula prostática y que aborda la próstata a través de los fascículos laterales de la fascia endopélvica (Benoit et al. 1994).

Los impulsos nerviosos se inician en receptores viscerales y son conducidos al sistema nervioso central a través de vías aferentes mientras que la respuesta es transmitida por vías eferentes (simpáticas y parasimpáticas) (Pennefather et al. 2000; Witte et al. 2008).

La cápsula prostática está cubierta por una red de fibras nerviosas postganglionares simpáticas y parasimpáticas que penetran hacia el interior de la glándula adoptando a menudo una morfología varicosa y describiendo trayectos flexuosos (Mottet et al. 1999; Ali et al. 2004).

Los vasos sanguíneos están inervados por fibras nerviosas de pequeño calibre. Ocasionalmente se han descrito cordones nerviosos más gruesos que siguen un trayecto paralelo a los vasos (Cabo Tamargo et al. 1985).

La secreción prostática se incrementa tras la estimulación parasimpática. La estimulación simpática produce contracciones del músculo prostático, provocando que el fluido prostático sea expelido en la uretra (Chapple et al. 1991; Moriyama et al. 1994; Kurimoto et al. 1998).

Existe un componente del sistema autónomo “no adrenérgico no colinérgico” que contiene neuropéptidos (Gu et al. 1983; Polak and Bloom 1983; Cabo Tamargo et al. 1985; Crowe et al. 1991; Tainio 1995). El empleo de técnicas inmunohistoquímicas ha permitido el estudio de una importante inervación peptidérgica en la próstata (Gu et al. 1983; Polak and Bloom 1983; Cabo Tamargo et al. 1985; Crowe et al. 1991; Santamaria et al. 1994; Tainio 1995; Jen and Dixon 1995). La función de los neuropéptidos en la próstata es poco conocida. Se piensa que puedan ejercer una función trófica o neuromoduladora (Hokfelt 1991).

1.2.2. Anatomía microscópica

La próstata está formada por lóbulos divididos en lobulillos que poseen conductos excretores que desembocan en la uretra prostática por separado. Estos

conductos se ramifican conectando con unidades secretoras de tipo túbuloalveolar llamadas acinos (Santamaria et al. 2007b).

En la próstata se distinguen 3 tipos de glándulas (Fig. 3):

- a) Mucosas. Dispuestas en la zona periuretral. Constituyen el componente glandular de los nódulos adenomatosos en la HBP. Son las menos numerosas.
- b) Submucosas: Situadas en el tejido que rodea a la zona periuretral.
- c) Principales: Localizadas en la zona mas externa a la que ocupan las glándulas submucosas. Son las mas abundantes, ocupando el resto del parénquima.

Las glándulas mucosas desembocan en distintas localizaciones de la luz uretral. Las submucosas y las principales lo hacen en los labios posteriores de los senos uretrales.

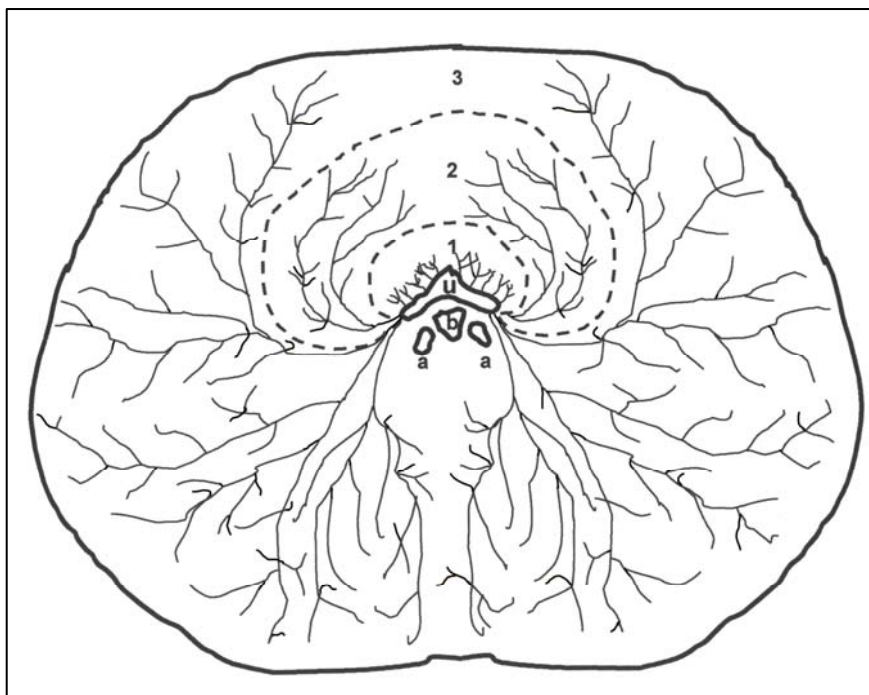


Figura 3. Esquema de una sección transversal de la próstata humana, mostrando los tipos topográficos de glándulas. (a) Conductos eyaculadores; (b) utrículo prostático; (u) luz uretral; (1) glándulas mucosas; (2) glándulas submucosas; (3) glándulas principales.

El epitelio prostático es cilíndrico pseudoestratificado y muestra 4 tipos de células (McNeal 1997): secretoras, basales, transicionales y neuroendocrinas. Las células secretoras tienen abundante retículo endoplásmico rugoso, prominente aparato de Golgi y numerosos gránulos de secreción (Burkilt et al. 1996).

El epitelio glandular está soportado por un estroma que parte de la cápsula prostática compartimentalizando el tejido en lobulillos prostáticos. El estroma se compone de un tejido conectivo muy abundante en células contráctiles, similares a las fibras musculares lisas, y por un material de la membrana basal inmunorreactivo a laminina y a colágeno tipo IV.

Varios estudios han centrado el interés en buscar particularidades histofisiológicas de las distintas zonas de McNeal de la próstata que puedan explicar el diverso comportamiento patológico (Begun et al. 1995; Martin et al. 2000).

La inmunohistoquímica y la estereología permiten comprobar si las regiones de McNeal tienen un significado histofuncional además de interés topográfico (Bartsch 1977; Bartsch et al. 1979; Bartsch et al. 1987; Robert et al. 1995).

Se indican a continuación algunas diferencias:

Las células neuroendocrinas (NE) constituyen una subpoblación celular prostática cuyo origen embriológico y función no es suficiente conocida. Se localizan en el epitelio glandular, entre las células secretoras y se identifican fácilmente mediante técnicas inmunohistoquímicas y ultraestructurales. La población de células NE es más abundante en las zonas de transición y periférica (Santamaria et al. 2002; Santamaria et al. 2007a).

Algunos autores afirman que la proliferación y la apoptosis son más relevantes en la zona periférica que en las de transición y central (Harriss and Savill 1995; Colombel et al. 1998). A este respecto, estudios con caspasa-3 y PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) demuestran una mayor susceptibilidad por la apoptosis en la ZT y no aprecian diferencias en cuanto a proliferación celular entre regiones (Santamaria et al. 2007b). La fracción ocupada por el epitelio es mayor en

la ZC que en las otras, debido a una menor cantidad de luz glandular y estroma en esta zona.

1.3. Fisiología de la próstata

1.3.1. Actividad funcional: secreción

La secreción prostática es rica en citrato, zinc, espermina, colesterol, fosfatasa ácida, prostaglandinas y varias enzimas proteolíticas (proteasas) (Kepper ME and Keast JR 1995). La función de la mayor parte de estos elementos es incierta, aunque se sugieren actividades potenciales. Por ejemplo, el citrato contribuye al mantenimiento del equilibrio osmótico y el pH, y además es agente quelante de ciertos iones metálicos. El Zn forma parte de muchas metaloenzimas y el Zn libre tiene actividad bacteriostática en el plasma seminal. Las fosfatasas ácidas intervienen en la hidrólisis de los ésteres monofosfato; sin embargo, su papel biológico específico en el semen es incierto. Las proteasas son fundamentales en la licuefacción del semen (Coffey DS 1988) y además son clínicamente importantes, por ejemplo, las células metastásicas del carcinoma prostático secretan enzimas en el suero como la fosfatasa ácida prostática o el antígeno prostático específico (PSA) que es útil como marcador del cáncer de próstata. Las prostaglandinas parece ser que aumentan la actividad del músculo liso en el tracto reproductor femenino.

1.3.2. Regulación de la función y del mantenimiento de la glándula prostática

La secreción proteica de la glándula prostática está regulada por la acción de: los andrógenos y otras hormonas (Dodd et al. 1986; Wang et al. 1991a; Ho et al. 1992), el zinc (Matusik et al. 1986) y los neurotransmisores (Crowe et al. 1991; Wang et al. 1991a; Wang et al. 1991b; Gkonos et al. 1995; Jen et al. 1996). También se modula por estímulos paracrinos del tejido conectivo circundante (Hayashi et al. 1993; Kinbara and Cunha 1996).

Regulación endocrina.

La glándula prostática forma parte del sistema reproductivo al aportar parte del plasma seminal durante la fertilización. Por tanto, los sistemas endocrinos centrales influyen de forma directa o indirecta sobre ella, siendo los más importantes el eje gonadotropo y el lactotropo, sin olvidar el somatotropo.

I.- Eje hipotálamo-hipófisis-gónadas o gonadotropo

El hipotálamo segrega la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), un decapeptido muy restringido en el cerebro, limitándose su presencia al hipotálamo y a otras estructuras relacionadas con el sistema límbico.

En el varón la FSH estimula la espermatogénesis y la secreción de proteína ligadora de andrógenos (ABP) por las células de Sertoli. La ABP se utiliza en la captación de testosterona y de dihidrotestosterona, ya que son necesarias altas concentraciones de estas hormonas para la maduración normal de las espermatogonias. Las células de Sertoli segregan también la hormona inhibina, que suprime la secreción de FSH por la hipófisis.

La LH o ICSH promueve la secreción de testosterona por las células de Leydig. No obstante, para la maduración de los espermatozoides se requiere la estimulación tanto de LH como de FSH. Mediante retroalimentación negativa sobre la adenohipófisis, la testosterona inhibe la LH y para suprimir la FSH se requiere una combinación de testosterona e inhibina.

La actividad funcional de la glándula prostática depende fundamentalmente de la testosterona plasmática. El 90-95% de testosterona es sintetizada y secretada por las células de Leydig de los testículos (Baird et al. 1969; Lipsett MB 1970) bajo control de la LH. Los niveles de LH son controlados por retroalimentación negativa del esteroide sobre el eje hipotálamo-hipofisario. El resto de la producción de testosterona procede de la glándula suprarrenal y del metabolismo periférico de la androstenodiona. En la experimentación animal se demuestra como los esteroides

C₁₉ suprarrenales pueden influir en la funcionalidad y crecimiento prostáticos (Muntzing 1971).

La testosterona libre entra en la célula epitelial y se convierte en dihidrotestosterona por acción de la 5- α -reductasa (tipo I o II). Al unirse al receptor intracelular, el complejo hormona-receptor penetra en el núcleo celular y activa varios genes específicos, con la consiguiente síntesis de mRNA y la posterior síntesis de proteínas específicas (Baird et al. 1973; Tindall et al. 1984; George and Peterson 1988; Frick and Aulitzky 1991; Srinivasan et al. 1995; Wilson JD 1996).

II.- Eje hipotálamo-hipófisis-glándula mamaria o lactotropo

La prolactina (PRL) también puede producirse en otros órganos además de la hipófisis. La PRL extrapituitaria es idéntica a la adenohipofisaria, la diferencia radica en los promotores de su regulación. Estudios *in vitro* han demostrado que, después de la estimulación con plasma seminal, las células musculares lisas estromales de la próstata humana segregan mas cantidad de prolactina que las células epiteliales. A diferencia de la prolactina hipofisaria (endocrina), la secreción de PRL local o paracrina por el epitelio prostático no se afecta por la dopamina ni por los estrógenos (Ben Jonathan et al. 1996; Harkonen 2003). Tampoco depende de las prostaglandinas (E1, E2, PGE-1, PGE-2), ni de sustancias AMPc-estimulantes (Untergasser et al. 2001).

La función fisiológica de la PRL en el varón es desconocida, no obstante se observa una relación entre aumento de PRL e incremento de patología prostática. La presencia de receptor para la PRL en la próstata humana y en la de rata es bien conocida. La PRL estimula el crecimiento prostático, aumenta la tasa de proliferación celular e inhibe la apoptosis, de ahí que se considere un factor de supervivencia del epitelio prostático (Wennbo et al. 1997; Leav et al. 1999; Goffin et al. 2002; Bartke 2004). Además, la PRL estimula la función adrenal aumentando la producción de testosterona libre y de dehidroepiandrosterona, por lo que indirectamente ocasiona síntomas de exceso androgénico.

Regulación autocrina – paracrina

Las interacciones entre el epitelio glandular y el estroma están descritas desde hace tiempo (Cunha and Chung 1981; Cunha et al. 1986) y tienen un relieve especial en la regulación funcional de la glándula. Las células epiteliales por tanto están influidas por el estroma circundante. De esta forma, el estroma interglandular está considerado como el factor regulador más importante de la actividad funcional de la próstata así como de su desarrollo y mantenimiento.

Las células del estroma prostático tienen un papel importante en la patogénesis de la HBP. Las variaciones regionales de la composición del estroma provocan modificaciones en las actividades biológicas y en la respuesta androgénica sobre el epitelio glandular (Nemeth and Lee 1996). Por tanto, se puede deducir que la regulación endocrina y la regulación autocrina-paracrina no son dos entidades independientes. El estroma prostático es la primera zona de acción de los andrógenos y la reacción epitelial a éstos aparece mediada a través de factores estromales (Cunha et al. 1983; Tenniswood 1986; Angelsen et al. 1999). Existen una serie de factores estromales de crecimiento -de naturaleza peptídica- cuyos efectos mediadores sobre los andrógenos hacen que intervengan en la regulación paracrina entre las células epiteliales y estromales.

Regulación nerviosa

La secreción de la glándula prostática está regulada por el sistema nervioso autónomo. Parece ser que la inervación colinérgica (Ventura et al. 2002) se distribuye entre los acinos e interviene en los procesos de síntesis de productos de secreción en el epitelio glandular y afecta directamente al volumen de la secreción. De hecho, la estimulación parasimpática o del nervio pélvico aumenta el volumen de secreción (Kepper ME and Keast JR 1995). La actividad ortosimpática es en su mayoría adrenérgica e inicia la contracción del músculo liso de los conductos prostáticos lo que genera la expulsión del material de secreción contenido en los acinos hacia la uretra (Vaalasti et al. 1986; Chapple et al. 1991).

1.4. Angiogénesis prostática

1.4.1. Distribución de la microvascularización prostática

La microvascularización en la próstata normal muestra una preferente distribución periglandular (Montironi et al. 1996), formando plexos capilares en íntimo contacto con la membrana basal del epitelio glandular.

La angiogénesis se define como el proceso de formación de nuevos vasos (O'Brien and Harris 1995). En los adultos normales la angiogénesis activa ocurre infrecuentemente (D'Amore 1992). La angiogénesis anormal es un rasgo crítico de muchos trastornos, incluyendo cánceres y sus precursores (neoplasia intraepitelial prostática) (Folkman 1992; Montironi et al. 1993). Existen estudios concernientes a la neovascularización en el cáncer invasivo, de modo que hay cierta correlación entre el incremento de la densidad vascular y un fenotipo tumoral agresivo (Folkman 1992; Weidner 1993; O'Brien and Harris 1995; Montironi et al. 1996). Algunos estudios indican incremento de microvascularización en HBP (Doll et al. 2001), pero no ha sido demostrado con rigurosos métodos estereológicos (Deering et al. 1995).

Para cuantificar la microvascularización se utiliza habitualmente un estimador denominado genéricamente “densidad de microvasos” (Bigler et al. 1993; Weidner 1993; Weidner et al. 1993; Deering et al. 1995). Sin embargo, la estimación estereológica de la longitud de microvaso por unidad de volumen del espacio de referencia (L_V) es más segura y libre de sesgo que la densidad de microvasos, “microvessel density” (MVD), profusamente empleada en la mayoría de los estudios revisados (Bigler et al. 1993; Deering et al. 1995; Lekas et al. 2006). Existen dos razones fundamentales para preferir la L_V a la MVD para cuantificar el tamaño del lecho microvascular: la primera es que, cuando se emplea la MVD, es habitual el identificar ese parámetro con el “número de vasos por unidad de área”; sin embargo es erróneo utilizar estimaciones por unidad de área, pues no es posible contar vasos en secciones, que son planos bidimensionales (2D), ya que los vasos son estructuras tubulares o lineales sumergidas en un espacio tridimensional (3D). Tampoco es correcto hablar de contaje de vasos, ya que las estructuras vasculares

forman un continuo (lecho o red microvascular) y por tanto no son numerables. Realmente lo que estima la MVD son perfiles de microvasos (es decir, secciones de vasos) pero no vasos enteros. Además, cuando se cuentan dos secciones vasculares muy cercanas, es muy probable que las dos secciones no sean de vasos diferentes sino que pertenezcan al mismo vaso cortado dos veces.

1.4.2. Cuantificación de la microvascularización prostática

Los estudios cuantitativos de elementos integrantes del microvaso (esencialmente del endotelio) no son demasiado concluyentes en cuanto a la existencia de diferencias regionales en la próstata normal, ya que no muestran diferencias significativas entre las tres zonas prostáticas cuando se estima el número de células endoteliales por unidad de longitud de microvasos (N_{LEC}). Sin embargo, el número absoluto de células endoteliales es significativamente superior en la ZP que en ZC y ZT. La estimación de N_{LEC} positiva para PCNA (células endoteliales en proliferación) es significativamente mayor en la zona periférica que en la zona central, pero no hay diferencias entre ZP y ZT ni entre zonas de transición y central. El número absoluto de células endoteliales inmunorreactivas para PCNA es de nuevo significativamente más alto en la ZP que en la ZC y la ZT (Santamaria et al. 2007b).

Todos estos datos indican que la cantidad de células endoteliales (PCNA inmunopositivas o no) es más dependiente del tamaño de la zona prostática (la ZP representa aproximadamente el 75% del volumen prostático total) que de algunas características histofisiológicas de las regiones prostáticas (Santamaria et al. 2007b).

El índice de marcado con PCNA para células endoteliales no muestra diferencias significativas entre las 3 regiones prostáticas; por lo tanto, puede considerarse que la proliferación endotelial es similar en las 3 zonas (Santamaria et al. 2007b).

Como ya indicamos la MVD no parece que sea el mejor estimador de la cantidad de microvasos, debido a la probable existencia de sesgos en sus mediciones. Sin embargo las estimaciones relativas y absolutas de la longitud del

lecho microvascular, considerado como un todo, pueden ser evaluadas por herramientas estereológicas libres de sesgo (Santamaría et al. 2009).

La longitud relativa de microvasos, es decir, la longitud de microvasos por unidad de volumen de estroma prostático (L_V) no muestra diferencias significativas entre las zonas de McNeal; mientras que la longitud absoluta de microvasos es significativamente mayor en la ZP que en la ZT y en la ZC (Santamaria et al. 2007b). Estos datos indican que el tamaño del lecho microvascular en la próstata normal depende principalmente del volumen de la zona prostática, como ocurre con la cantidad de las células endoteliales.

2. HIPERPLASIA BENIGNA DE PRÓSTATA (HBP)

Es la enfermedad benigna más frecuente de la próstata humana (Barry 1990; Kirby 1992). Produce sintomatología urológica en el 54% de los varones entre 60 y 70 años. La frecuencia de HBP detectada en autopsias por examen microscópico es mayor que la de los síntomas (alrededor del 70% de los varones en ese mismo rango de edad) (Birkhoff 1983; Berry et al. 1984d). Representa aproximadamente el 50% de las consultas que se realizan por patología urológica (Burgos Rodríguez and Chicharro Molero 1993).

La HBP presenta dos fases: patológica y clínica. La primera tiene a su vez dos estadios: HBP microscópica, con presencia de pequeños focos de hiperplasia prostática, y la HBP macroscópica, con evidencia de adenomas. Aproximadamente el 80% de los hombres de más de 40 años desarrollarán una HBP microscópica, pero sólo la mitad evolucionará a HBP macroscópica en un tiempo medio de cinco años (Oesterling 1991; Peinado-Ibarra 1998; Fitzpatrick 2006).

La próstata crece desde el nacimiento hasta la pubertad para alcanzar entre los 20 y 30 años un peso medio de 20 ± 6 grs. Desde aquí hasta los 90 años su velocidad de crecimiento disminuye. A partir de la quinta década de la vida, con el desarrollo de la HBP histológicamente identificable se produce un aumento del peso de la próstata alcanzando un peso medio de 33 ± 16 grs (Berry et al. 1984c).

Las células del estroma prostático juegan un importante papel en la patogénesis de la HBP. Los primeros cambios histológicos consisten en nódulos microscópicos en el estroma que rodea a las glándulas periuretrales. La hiperplasia acinar comienza alrededor de estos pequeños nódulos y va incrementándose con el paso de los años, llegando a producir nódulos de hasta varios centímetros de diámetro cuya histología puede presentar un predominio de elementos epiteliales, estromales o un patrón mixto. En función de según qué elementos predominen podemos dividir la HBP en 5 variedades: nódulos estromales, fibromusculares, musculares, fibroadenomatosos y adenofibromiomatosos (la mas frecuente) (Berry et al. 1984a). La HBP afecta principalmente a la zona de transición y a la zona periuretral (Algaba F 1993; Di Silverio et al. 1993).

Aunque la etiopatogenia de la HBP no es clara, sí se sabe que es multifactorial y que es necesaria la presencia de dos factores para que se produzca crecimiento prostático: el estímulo androgénico y la edad (Burgos Rodríguez and Chicharro Molero 1993).

Se han propuesto distintas teorías basadas en cambios histológicos, hormonales y relacionados con la edad, sin que actualmente se acepte una única explicación (Partin et al. 1991). Posiblemente los andrógenos actúen como iniciadores de la hiperplasia estromal, que a su vez induciría hiperplasia del epitelio (Birkhoff 1983; Narayan 1992). También se sugiere que las células neuroendocrinas estén implicadas en la génesis de la HBP, quizás ejercen alguna mediación entre estroma y epitelio (Bonkhoff et al. 1991; Cockett et al. 1993; Algaba and Trias 1995; Santamaria et al. 2007a).

3. ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA

Durante los últimos años, el cáncer de próstata se ha colocado en el tercer lugar como causa de muerte en varones en España por detrás de los tumores de pulmón y de los colorrectales.

Es una neoplasia rara en hombres menores de 50 años, edad a partir de la cual la incidencia aumenta más rápidamente que en cualquier otro cáncer. El cáncer de próstata tiene su mayor impacto en el subgrupo de población con menor expectativa de vida: el 90% de los casos aparecen en mayores de 65 años y producen la muerte a una edad superior a los 75.

En el año 2000 se produjeron en España 5448 defunciones por este tumor, lo que supone una tasa estandarizada por edad de 22.9 defunciones por 100000 habitantes. También en la Unión Europea el cáncer de próstata es el tercero como causa de muerte, siendo la tasa para el conjunto de países de la Unión en 1998 de 25.55 por 100000. Según las estimaciones parciales de la prevalencia realizadas por la IARC, en España existirían 36492 pacientes con cáncer de próstata de diagnóstico reciente (últimos 5 años). Las tasas de mortalidad son, sin embargo, considerablemente inferiores a las de incidencia.

En nuestro país, la evolución de las tasas de mortalidad por este tumor ha sido ascendente desde los años 50, si bien la tendencia se ha suavizado a partir de 1970. Globalmente, se observa un incremento medio en torno al 1% anual, con un cambio en la tendencia que se produce en el año 1998, a partir del cual la mortalidad empieza a disminuir. Esta disminución afecta a las CCAA de Baleares, Valencia, Cataluña y Madrid, mientras en las 11 CCAA restantes la tendencia sigue siendo ascendente. En otros países europeos la evolución es similar, aunque en los últimos años países como Francia, Alemania o Italia han invertido la tendencia. El aumento de la mortalidad se atribuye a mejoras en el diagnóstico y en la certificación de la causa de muerte. Sin embargo, es un hecho aceptado que muchos tumores de próstata permanecen latentes: aproximadamente sólo un tercio de los que se descubren en autopsias se han manifestado clínicamente. La supervivencia relativa a los 5 años estimada para España es de un 54%, ligeramente inferior a la europea (60%).

El adenocarcinoma acinar es el tumor maligno más frecuente de la próstata, representando el 90 - 95% de los carcinomas prostáticos, y la práctica totalidad de los estudios sobre clasificación histológica, estadio, pronóstico y tratamiento del

cáncer de próstata se refieren exclusivamente a este grupo; en un 90% de los casos se origina en la zona periférica de la glándula.

Aunque el adenocarcinoma es la neoplasia prostática más frecuente, existen otros tipos histológicos de cáncer de próstata con significación clínica definida (Rioja et al. 1993): adenocarcinoma ductal, carcinoma endometriode, neuroendocrino, adenocarcinoma mucinoso, carcinoma de células pequeñas, transicional y escamoso.

El adenocarcinoma de próstata se considera un tumor de crecimiento lento, con una historia natural imprevisible, que puede presentar patrones morfológicos y citológicos polimorfos (Gleason 1966). Por esto, son muchos los investigadores que han desarrollado clasificaciones anatomopatológicas que intentan predecir la evolución del tumor en un paciente dado, correlacionando el grado histológico del tumor con los datos de supervivencia observados en tumores de grado comparable.

Las clasificaciones histológicas de Gleason (Gleason 1966) y Brawn (Brawn et al. 1982) están basadas exclusivamente en el grado de diferenciación glandular. Las clasificaciones de Mostofi (Mostofi 1975), Gaeta (Gaeta et al. 1980) y Böcking (Bocking et al. 1982) consideran también el grado de anaplasia celular en la tipificación microscópica de los adenocarcinomas.

En la actualidad, es la clasificación propuesta por Gleason la más ampliamente utilizada, y ha sido aconsejado su uso como clasificación de referencia por distintos grupos de trabajo (Murphy and Whitmore, Jr. 1979; Gaeta et al. 1986), con el fin de conseguir criterios histológicos uniformes a la hora de realizar estudios clínicos y ensayos terapéuticos.

En el momento actual, existen una serie de trabajos en relación con la neovascularización y el cancer prostático invasivo, los cuales sugieren correlaciones entre el incremento de la densidad vascular y un fenotipo tumoral agresivo (Montironi et al. 1996; Sinha et al. 2004; Revelos et al. 2007; Kong et al. 2007). Investigaciones recientes (Santamaría et al. 2009) indican que se dá un incremento significativo de la longitud relativa de los microvasos en el cáncer de próstata en comparación con el

tejido prostático normal, lo que concuerda con las observaciones de otros autores y puede ponerse en relación con el incremento de actividad angiogenética descrito por diversos autores tanto en el cáncer como en las lesiones preinvasivas prostáticas (Sinha et al. 2004; Condon 2005; Padhani et al. 2005; Pallares et al. 2006; Kong et al. 2007; Delves et al. 2007).

4. ESTEREOLOGÍA

La estereología es una metodología coherente que combina la probabilidad geométrica y la estadística para cuantificar estructuras espaciales, generalmente tridimensionales, para lo que utiliza información adecuadamente muestreada y se basa en principios generales de análisis sencillos.

Las secciones bidimensionales contienen información cuantitativa de las estructuras tridimensionales en un sentido estadístico. Mientras por técnicas morfométricas podemos medir el tamaño, la forma o la situación de elementos celulares o tisulares exclusivamente en dos dimensiones, mediante técnicas estereológicas podemos obtener valores tridimensionales. Esto se consigue empleando fórmulas basadas en la existencia de relaciones geométricas entre parámetros tridimensionales y cantidades observadas en dos dimensiones. Siempre que se utilicen adecuadamente, las técnicas estereológicas proporcionan información no sesgada y objetiva, independiente de la forma de las partículas y del personal que realiza el estudio, lo que proporciona información fiable y reproducible sobre muestras tridimensionales (Howard and Reed 2005a).

Para que la estimación estereológica sea correcta, la estructura motivo de estudio y/o las sondas de medida deben ser isotrópicas. La isotropía viene definida como la distribución uniforme de una estructura en todas las direcciones posibles en tres dimensiones. Se trata de garantizar un encuentro isotrópico al azar entre la sonda de medida y la estructura estudiada.

La inmunorreactividad positiva de marcadores de microvasos, por ejemplo, el Factor VIII de coagulación, denominado también factor anti-hemofílico A o factor de

Von Willebrand, que se expresa en el endotelio (Deering et al. 1995), se manifiesta en forma de estructuras que se pueden visualizar como esencialmente lineales. El parámetro estereológico más adecuado para cuantificar estos “elementos lineales” es la ya indicada L_V (Howard and Reed 2005a). Cada perfil vascular puede ser definido como una porción inmunorreactiva positiva de un segmento microvascular, independientemente de su tamaño y longitud.

En principio no se puede asumir la isotropía del lecho vascular, es decir que la distribución de microvasos en el interior de la próstata forme un entramado sin direcciones predeterminadas en tres dimensiones.

5. CUANTIFICACIÓN NO LINEAL

5.1. Breve panorámica acerca de los sistemas dinámicos no lineales

En lo que sigue se pretende resumir los principales conceptos e instrumentos metodológicos que pueden ser de utilidad para el abordaje del análisis no lineal de estructuras tisulares. Como es natural, no se explican con rigor matemático, ni tampoco se intenta elaborar un tratado de dinámica del caos (Strogatz 2000). Se trata de desarrollar una guía práctica para no perderse en la lectura del trabajo que nos ocupa.

5.2. Concepto de sistema dinámico

A efectos de lo que interesa para el presente estudio, un sistema dinámico tiene las siguientes características:

a.- Sistema físico o biológico, por ejemplo: la actividad eléctrica cerebral puesta en evidencia por el electroencefalograma, la actividad cardíaca manifestada en el electrocardiograma y en el registro del ritmo cardíaco, un tejido en proliferación, etc. (podemos denotarlo como X_i).

b.- Que evoluciona en el tiempo (t).

c.- Sometido a ciertas leyes de transformación (operadores: ϕ), con frecuencia desconocidas o muy complejas (v.g. ecuaciones diferenciales no lineales).

Todo lo anterior se puede simbolizar del siguiente modo: $X_B = \phi (X_A, t)$.

5.3. Como representar un sistema dinámico

5.3.1. Espacio de fase y dimensiones

Sea un sistema dinámico: $X_B = \phi (X_A, t)$:

- Este sistema se puede definir por un conjunto de parámetros que varían con el tiempo. Pueden ser parámetros físicos (carga eléctrica, velocidad, presión, temperatura, etc.) que definen su comportamiento y evolucionan en el tiempo. Para un sistema biológico (v.g. un cáncer de próstata) podrían ser: expresión de marcadores de proliferación, apoptosis, angiogénesis, etc.

- Cada estado del sistema (en un momento dado t) viene definido por los valores que tengan en ese momento los parámetros, es decir por un conjunto de números que se pueden usar como coordenadas para representar un punto, evidentemente solo se podría representar gráficamente el sistema si el número de parámetros es ≤ 3 .

- El número de parámetros (linealmente independientes) que definen un sistema se llama dimensión (D). Por ejemplo, sea un sistema físico "ideal" definido por V (velocidad) T (temperatura) y Q (carga eléctrica) es decir $D = 3$; en el tiempo t_1 tendríamos un punto (V_1, T_1, Q_1) , en el tiempo t_2 tendríamos (V_2, T_2, Q_2) , etc. etc. La evolución del sistema $t_1 \rightarrow t_2 \rightarrow t_3 \rightarrow \dots$ se puede representar por una línea que une los diferentes puntos en un gráfico 3D, estas líneas pueden describir órbitas si al cabo de cierto tiempo el sistema vuelve a los valores iniciales (Fig. 4):

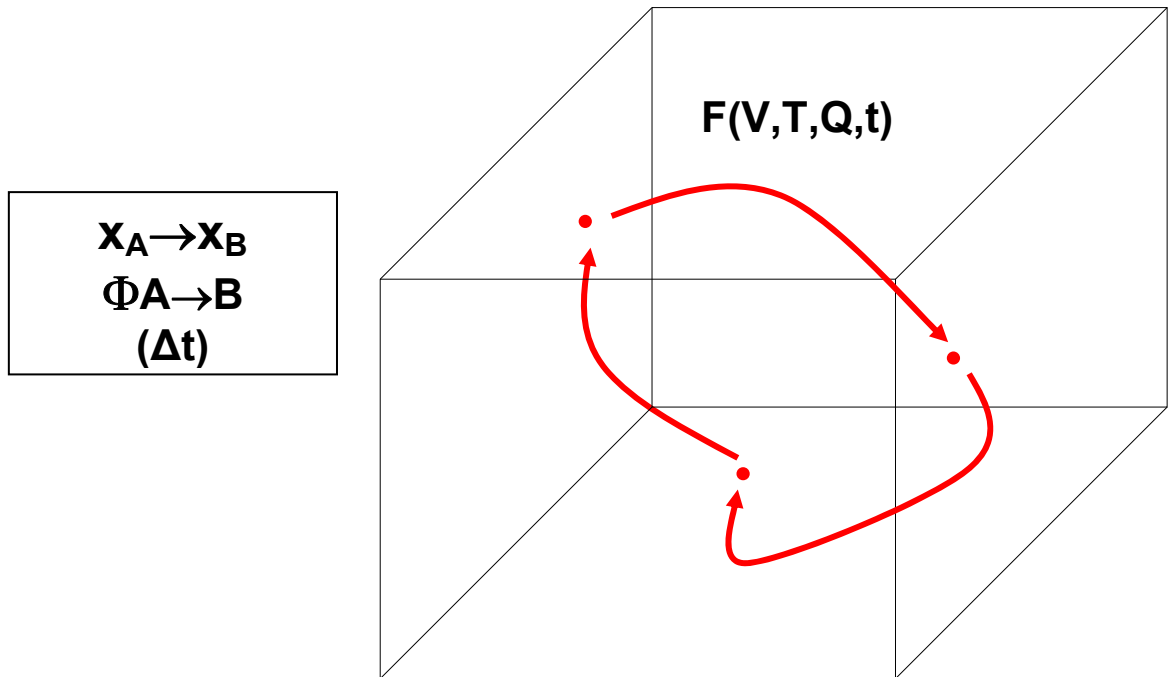


Figura 4. Representación de una órbita (flechas de trazo rojo) de un sistema dinámico ideal evolucionando en el tiempo (t), en el que las variables del espacio de fase (3D) son velocidad (V), temperatura (T) y carga eléctrica (Q).

- El espacio donde se representa la evolución del sistema se denomina espacio de fase (no es un espacio físico sino matemático). Las dimensiones también se llaman fases o grados de libertad del sistema. El número de dimensiones puede ser >3 , de hecho, para la mayoría de los sistemas dinámicos hay más de 3 parámetros que explican la evolución del sistema (imaginemos un cáncer: proliferación, apoptosis, expresión de oncoproteínas, volumen nuclear, etc. etc.).

- Si el número de parámetros es infinito (infinitos grados de libertad), la evolución del sistema será impredecible, estamos ante un proceso estocástico, puramente debido al azar y que se rige por las leyes del azar.

5.3.2. Los operadores (ϕ)

Son instrumentos matemáticos que llevan a un parámetro de un valor a otro, en función del tiempo (ecuaciones o mapas). Pueden ser de diversos tipos, por ejemplo: operadores lineales y periódicos; operadores no lineales; operadores estocásticos, (v.g. un generador de números al azar) y los que más interesan aquí, los denominados caóticos deterministas, (parecen erráticos y aperiódicos): sus órbitas no se cierran nunca, pasan una y otra vez por zonas muy próximas en el espacio de fase y tienden a localizarse en una zona precisa de dicho espacio como si fueran atraídas por ésta, por ello esa región se denomina atractor.

Por tanto un atractor se puede definir como aquella región del espacio de fase donde se localizan las trayectorias definidas por la aplicación de un operador sobre los elementos de un sistema dinámico.

5.4. Atractores extraños

Sea un proceso donde A_1 evoluciona en el tiempo hasta A_n . El paso de A_1 a A_n dependerá de las condiciones iniciales en las que se encuentre A_1 (el valor de los parámetros en el espacio de fase). Si esas condiciones cambian ligeramente, es decir, se parte de A'_1 , estando A'_1 y A_1 muy próximos en el espacio de fase, y el resultado final es A'_n tal que A'_n difiere mucho de A_n , se dice entonces que el sistema es sensible a las condiciones iniciales y que el atractor de ese sistema es un atractor extraño. Se sabe que el número que caracteriza a ese atractor (su dimensión) es fractal. La existencia de un atractor extraño caracteriza a un sistema caótico determinista (Mattfeldt 1997) (Fig. 5).

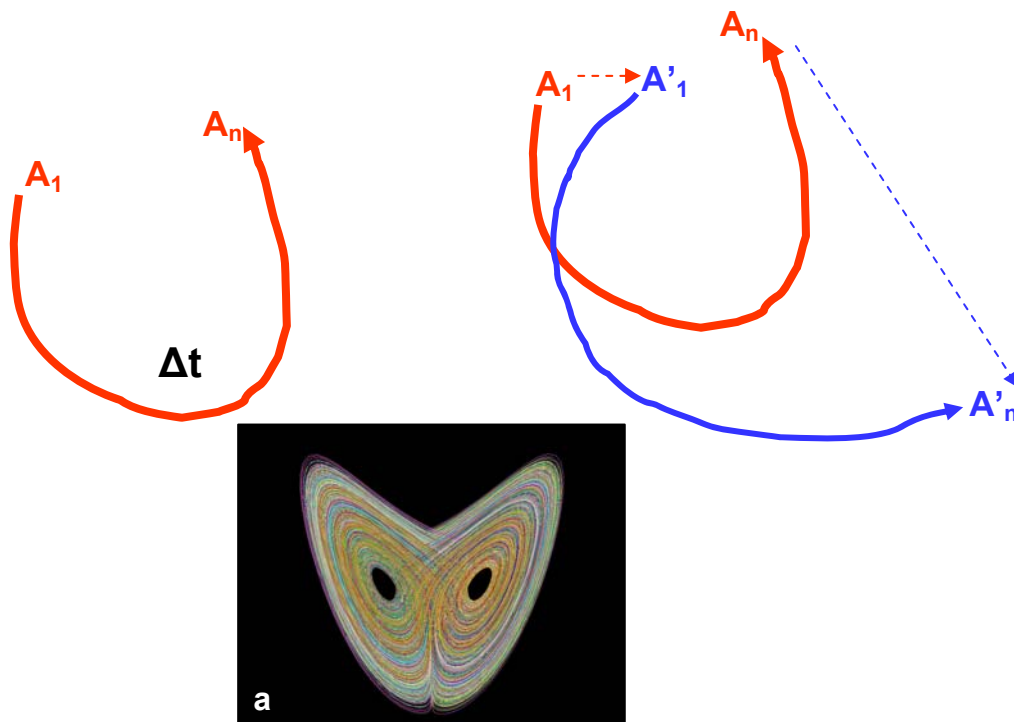


Figura 5. Representación esquemática de la sensibilidad a las condiciones iniciales en un atractor extraño. En el intervalo de tiempo Δt , el punto A_1 evoluciona a A_n . Cuando se varía ligeramente la condición inicial de A_1 (pasa a ser A'_1) el nuevo punto final A'_n difiere grandemente de A_n . En (a) se ilustra un ejemplo clásico de atractor extraño: el atractor de Lorenz.

5.5. Abordaje no lineal de la microvascularización prostática

La complejidad del lecho microvascular considerado en el espacio tridimensional y su posible alteración en condiciones de angiogénesis tumoral lleva a pensar que para el estudio completo de su organización no bastan los abordajes estereológicos clásicos de tipo lineal, y que quizás exista una dinámica no lineal subyacente a la organización microvascular (caracterizada por la presencia de un atractor extraño).

En las últimas décadas, un creciente número de estudios hacen referencia a sistemas determinísticos no lineales cuyas señales observables son aperiódicas y aparentemente erráticas, como si surgieran de un proceso estocástico. Si tales sistemas muestran divergencia exponencial de las señales tras pequeños cambios en las condiciones iniciales, se califican como caos determinista, convergiendo a dominios con dimensión fractal (Theiler 1990; Mattfeldt 1997), de aquí se infiere que el caos determinista se relaciona íntimamente con la geometría fractal.

De hecho se han demostrado caos determinista y propiedades fractales para la fisiología o la fisiopatología de algunos sistemas biológicos (Skinner et al. 1992; Keipes et al. 1993; Skinner 1994; Davey et al. 1996), casi todos estos sistemas son ejemplo de caos temporal, es decir, sus variables en el espacio de fase son tiempo-dependientes (Koch and Zacek 1991; Elbert et al. 1994; Heffernan 1996; Zhang and Johns 1998).

El concepto de caos espacial, que denota caos con referencia a coordenadas espaciales (Couillet et al. 1987) puede ser aplicado al estudio de estructuras histológicas mediante la evaluación estadística de estimaciones estereológicas a lo largo de un eje situado en el interior del objeto tridimensional de interés (en nuestro caso el tejido prostático). Para una cierta escala de resolución, las estimaciones de la fracción de volumen de componentes tisulares (por ejemplo vasos inmunoteñidos) pueden ser estudiadas en función de su posición a lo largo de líneas contenidas en planos a través de conjuntos 3D, asumida su isotropía y estacionariedad (Mattfeldt et al. 1993a; Mattfeldt et al. 1993b; Mattfeldt et al. 1996; Mattfeldt 1997).

Hay algunos estudios acerca del comportamiento no lineal de tejidos normales o patológicos (Cross and Cotton 1994; Losa and Nonnenmacher 1996; Cross 1997), a causa de que la estructura histológica de muchos tejidos manifiesta patrones complejos y erráticos en apariencia. Además, aunque los principios básicos de la morfogénesis son conocidos, el número, naturaleza e interacción de variables genéticas y ambientales no pueden ser formulados exactamente (Mattfeldt 1997), por ello se podrían considerar los tejidos como sistemas generados ya sea por procesos estocásticos o por procesos caóticos deterministas (Cross and Cotton 1994; Mattfeldt 1997; Waliszewski et al. 1998). En este sentido, el análisis no lineal determinista se ha usado para estudiar la textura epitelial del cáncer mamario comparándolo con lesiones de mastopatía (Mattfeldt 1997), sin embargo, la aplicación de la dinámica no lineal no ha sido aún descrita en próstata humana normal o patológica.

El lecho microvascular prostático es un buen modelo para aplicar herramientas de análisis no lineal a una estructura distribuida como una red de isotropía aún no demostrada en un espacio 3D, que puede sufrir cambios no solo de

tamaño sino también de orientación y complejidad en el desarrollo de procesos patológicos proliferativos benignos (HBP) o malignos (carcinoma prostático).

Como ocurre con otras texturas biológicas (Landini and Rippin 1993; Losa and Nonnenmacher 1996; Sedivy and Windischberger 1998), la complejidad de ramificación y distribución de los microvasos prostáticos podría ser caracterizada mediante la geometría fractal y tal geometría podría relacionarse con una dinámica determinista no lineal subyacente a los procesos de angiogénesis normal o patológica (Skinner 1994; Waliszewski et al. 1998). Además es probable que la complejidad del lecho microvascular se extienda a través de distintas escalas, ya que existen distintos tamaños y órdenes de ramificación, por ello es probable que la dimensión fractal no sea única sino que estemos ante una estructura multifractal (Ivanov et al. 1999; Reljin and Reljin 2002).

Para el propósito del presente estudio, los microvasos prostáticos serán considerados como conjuntos binarios en un espacio 3D, constituido por dos compartimentos: a) la pared vascular compuesta esencialmente por células musculares lisas de arteriolas y venas de pequeño calibre junto con el endotelio que reviste la luz vascular tanto de arteriolas y venas como de capilares y vénulas y b) el resto de los componentes tisulares, que podemos denominar espacio de poro (Mattfeldt 1997) (tejido conjuntivo, estroma contráctil, acinos glandulares, etc.).

Las estructuras vasculares pueden ser fácilmente evidenciadas por inmunotinción para el Factor VIII (factor de Von Willebrand) conocido componente de la coagulación y que se expresa en la célula endotelial (Santamaría et al. 2009). La estructura inmunorreactiva para el Factor VIII puede ser posteriormente capturada y procesada por análisis de imagen con el propósito de estudiar sus características caóticas en relación con el espacio de poro de modo similar a como se ha estudiado el componente epitelial del cáncer de mama (Mattfeldt 1997).

Ante estas circunstancias se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. HIPÓTESIS DE TRABAJO

El lecho microvascular de la próstata humana normal se estructura como una red tridimensional posiblemente anisotrópica y con propiedades geométricas fractales atribuibles a procesos caóticos deterministas subyacentes a los fenómenos de angiogénesis.

Esta estructura experimenta cambios de tamaño, orientación y dimensión fractal en la hiperplasia prostática benigna y el adenocarcinoma de próstata. El análisis de estos cambios puede ser relevante para profundizar en el comportamiento de la neoplasia prostática.

2. OBJETIVOS

Para verificar la hipótesis anteriormente indicada, se proponen los siguientes objetivos:

1.- Estimar parámetros estereológicos lineales no sesgados como: densidad de longitud vascular, el radio promedio tisular de difusión vascular, diámetro capilar medio, fracción de volumen del estroma ocupada por los vasos, etc.; para los vasos prostáticos normales y patológicos, en todas las direcciones espaciales con objeto averiguar si la isotropía se aplica a la estimación de estos parámetros lineales y si varía el valor de estos parámetros en función de la región prostática o de la patología.

2.- Comprobar el carácter caótico determinista de series espaciales de tejido prostático normal y patológico (HBP y cáncer) evidenciando las estructuras vasculares mediante inmunotinción para Factor VIII.

3.- Estimar un conjunto de dimensiones fractales microvasculares (dimensión de correlación, dimensión de Hausdorff, espectro multifractal), en las series espaciales orientadas en las tres direcciones del espacio, en orden a comprobar la existencia de isotropía, comparando los resultados de las regiones de la próstata normal con la HBP y con el carcinoma.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para alcanzar los objetivos indicados y verificar la hipótesis de trabajo, se ha empleado la siguiente metodología:

1. MATERIAL

El material utilizado como control consiste en 20 próstatas procedentes de hombres adultos, edad (media \pm SD): 33 ± 8.5 ; rango: 20-47 años. Todas las piezas pertenecen a sujetos sanos, sin patología del tracto reproductor ni alteraciones endocrinas, fallecidos en accidente de tráfico, que donaron sus órganos para trasplante.

Se ha obtenido autorización de Comité de Bioética del centro hospitalario donde se realizó la extracción (Hospital de La Princesa) y en cada caso se obtuvo de los familiares del fallecido el consentimiento informado para la extracción y uso con fines de investigación de los tejidos prostáticos.

El material patológico consiste en 22 piezas quirúrgicas de adenomectomía procedentes de pacientes diagnosticados clínicamente de HBP, edad (media \pm SD): 75 ± 12 ; rango: 60-85 años y en 22 piezas quirúrgicas procedentes de prostatectomías radicales en pacientes diagnosticados de adenocarcinoma prostático, edad (media \pm SD): 70 ± 15 ; rango: 56-85 años. Los requerimientos éticos para este tipo de material se cumplieron de modo análogo a lo indicado con el material control.

2. MÉTODOS

2.1. Procesamiento del material

Todo el material se fijó inmediatamente tras su extracción en paraformaldehído al 10% en tampón fosfato salino (PBS) a pH 7.4 durante 7 días y

se incluyó en parafina. El muestreo del material a estudiar se realizó según el protocolo indicado a continuación:

2.1.1. Piezas control

Se procesaron los especímenes según los siguientes protocolos (Fig. 6):

Protocolo A- Siete especímenes seccionados exhaustivamente en rodajas perpendiculares al eje mayor de la glándula (conducto uretral) de 3 mm de grosor medio. Del total de rodajas obtenidas en cada caso se seleccionaron para su estudio 3 de ellas por muestreo sistemático con comienzo al azar (Howard and Reed 2005b). Estas rodajas se incluyeron en parafina, obteniéndose posteriormente cortes histológicos seriados de 5 μ m de espesor. Sobre estas secciones se efectuaron inmunotinciones para visualizar los perfiles vasculares detectando la inmunorreactividad endotelial para Factor VIII.

Protocolo B- Siete especímenes seccionados exhaustivamente en rodajas conteniendo el eje mayor de la glándula (conducto uretral), se trata de secciones horizontales, perpendiculares a las efectuadas en **A** y que contienen el plano de los conductos eyaculadores. Las manipulaciones de estas rodajas son idénticas a las efectuadas con las del protocolo **A**.

Protocolo C- Seis especímenes seccionados exhaustivamente siguiendo un protocolo de obtención de secciones con orientación al azar isotrópica y uniforme "Isotropic Uniform Random" (IUR) (Howard and Reed 2005b). Las manipulaciones de estas rodajas son idénticas a las efectuadas con las de los protocolos **A** y **B**, las tiras de tejido analizadas en este grupo están orientadas isotrópicamente y las denominaremos cortes IUR.

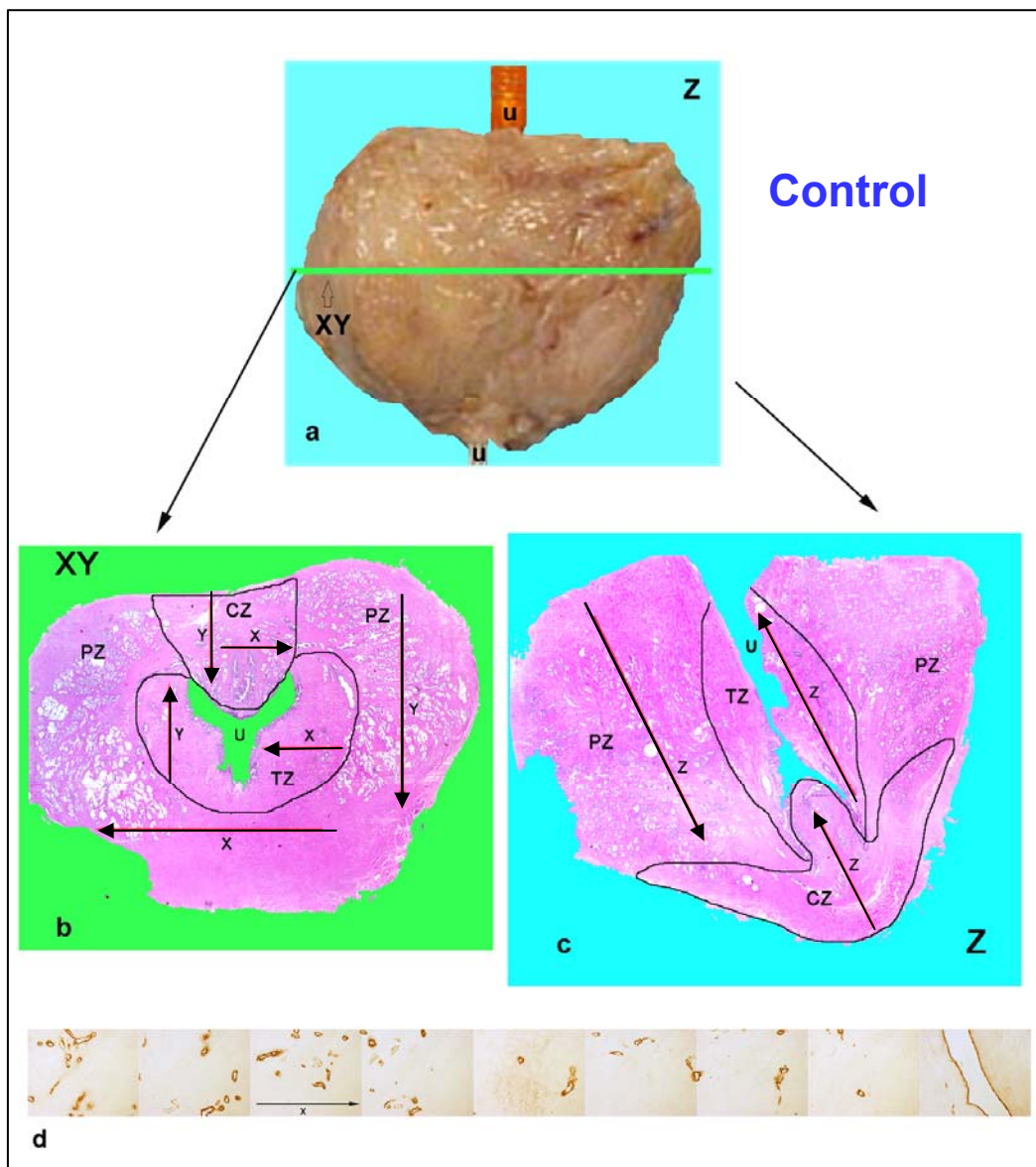


Figura 6. Diagramas que muestran los protocolos de muestreo para los casos control. a) Vista anterior de la próstata; la uretra está marcada por un catéter (u). El plano que contiene el conducto uretral viene denotado por Z ; XY indica un plano perpendicular a la uretra y por tanto perpendicular al plano Z. b) Sección prostática contenida en el plano XY (protocolo **A**), las flechas marcadas con X indican la orientación de las tiras muestreadas en la dirección latero-medial, las marcadas con Y denotan la dirección antero-posterior de las tiras. TZ, zona de transición; PZ, zona periférica; CZ, zona central; u, luz uretral. c) Sección prostática contenida en el plano Z (protocolo **B**), las flechas marcadas con Z manifiestan la orientación de las tiras paralelas a la uretra (u). TZ, zona de transición; PZ, zona periférica; CZ, zona central. d) Ejemplo de una tira de tejido inmunoteñida para Factor VIII y orientada según el eje X (flecha).

Sobre los cortes inmunoteñidos y en cada una de las zonas prostáticas descritas por Mac Neal (zona de transición, periférica y central) (McNeal 1981) se efectuó un muestreo de series espaciales (tiras de tejido) con distinta orientación en los tres protocolos. En el protocolo **A**, en un grupo de series se orientó el eje mayor de las tiras de tejido perpendicularmente al conducto uretral y en dirección anteroposterior (eje Y) y en otro grupo, la orientación del eje mayor fue de 90° con el eje Y (eje X) (Fig. 6).

Para el protocolo **B**, el muestreo de series espaciales se efectuó con su eje mayor paralelo al conducto uretral (eje Z) (Fig. 6). En el protocolo **C**, no tiene relevancia la orientación del eje mayor, ya que se trata de secciones IUR.

El origen del eje orientador de cada tira se seleccionó en los tres protocolos mediante muestreo sistemático con comienzo al azar. Todo el proceso de muestreo de campos microscópicos y de posterior captación de las imágenes seleccionadas se realizó utilizando un microscopio Olympus equipado con un objetivo de 20x y a un aumento final de 300x empleando el software estereológico CAST-GRID (Interactivision, Silkeborg, Denmark). Este programa permite la selección de campos de estudio por muestreo sistemático con comienzo al azar tras la introducción de una fracción de muestreo apropiada.

2.1.2. Piezas patológicas (HBP y carcinoma)

El material procedente de todos los casos de HBP y cáncer de próstata se procesó según el protocolo **C** de los controles (Figs. 7 y 8), pues las piezas quirúrgicas tanto de las adenomectomías como las de las prostatectomías radicales no muestran una orientación intrínseca. Se trataron por lo tanto como secciones IUR.

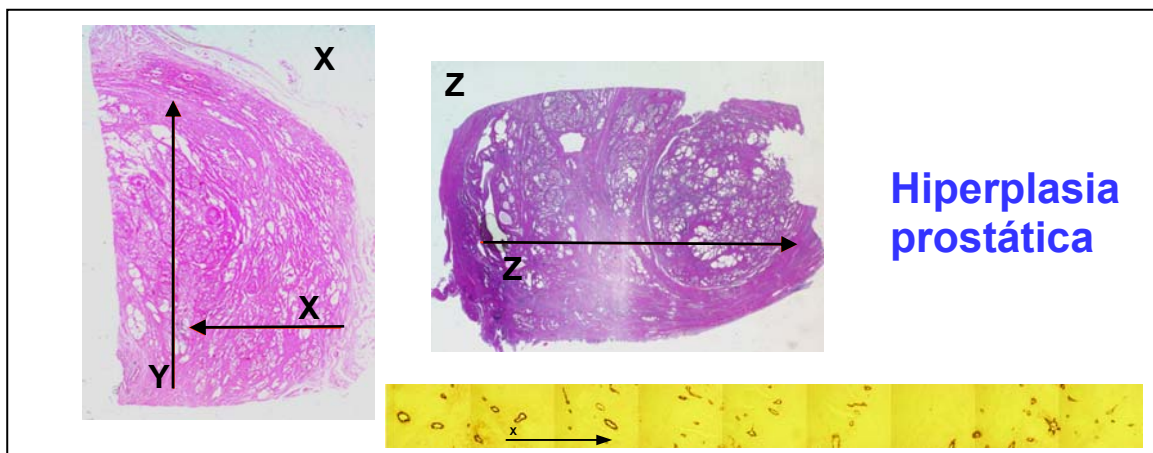


Figura 7. Diagrama que muestra el protocolo de muestreo para la HBP. X) Sección de un adenoma en un plano IUR, se indican dos direcciones perpendiculares entre sí marcadas por flechas (X, Y). Z) Sección orientada perpendicularmente a la anterior, la flecha marcada con Z indica la orientación de las tiras muestreadas en ese plano. En la porción inferior de la imagen se muestra un ejemplo de una tira de tejido inmunoteñido para Factor VIII y orientada según el eje X (flecha).

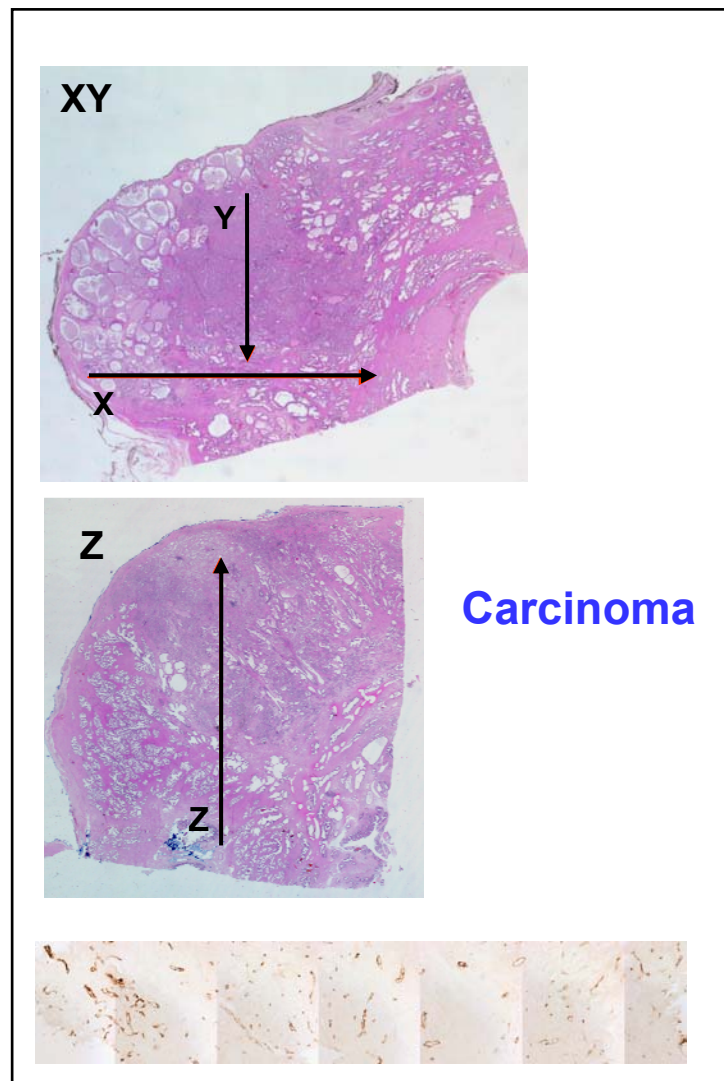


Figura 8. Diagrama que muestra el protocolo de muestreo para el carcinoma prostático. **XY**) Sección IUR que incluye carcinoma, se indican dos direcciones perpendiculares entre sí marcadas por flechas (X, Y). **Z**) Sección orientada perpendicularmente a la anterior, la flecha marcada con Z indica la orientación de las tiras muestreadas en ese plano. En la porción inferior de la imagen se muestra un ejemplo de una tira de tejido inmunoteñida para Factor VIII y orientada según el eje Y (flecha).

Sobre los cortes inmunoteñidos, tanto en HBP como en el carcinoma, se efectuó un muestreo de series espaciales (tiras de tejido) en tres rodajas orientadas perpendicularmente entre sí. El origen del eje orientador de cada tira se seleccionó también mediante muestreo sistemático con comienzo al azar. Todo el proceso de

muestreo de campos microscópicos y de posterior captación de las imágenes seleccionadas se realizó de modo idéntico al empleado en los casos control.

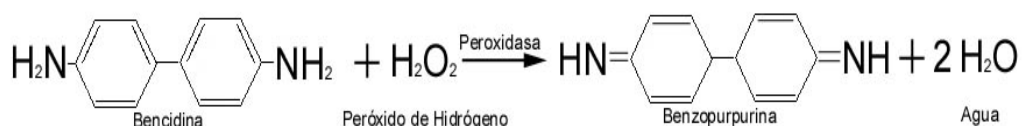
2.2. Técnica de Inmunotinción: Avidina-Biotina-Peroxidasa

Los métodos inmunohistoquímicos sirven para detectar antígenos celulares o tisulares y se basan en la reacción inmunológica de antígeno-anticuerpo. Para visualizar el lugar donde ocurre la reacción es preciso emplear un marcador con el fin de evidenciar la inmunolocalización.

En este trabajo el marcaje se ha realizado con el enzima peroxidasa. El lugar de la reacción antígeno-anticuerpo se visualiza añadiendo al final de la reacción el sustrato de la enzima más un cromógeno (diaminobencidina en nuestro caso). El producto originado al actuar la enzima sobre el sustrato interacciona a su vez sobre el cromógeno y da lugar a un precipitado insoluble y coloreado.

El método de la bencidina consiste en la aparición de un precipitado de color azul-verdoso debido a la formación de benzopurpurina tras la descomposición de la bencidina en presencia de peróxido de hidrógeno y por acción de la enzima peroxidasa. El inconveniente que tiene esta reacción deriva de la inestabilidad de la benzopurpurina. Para solventarlo, se sustituye la bencidina por un derivado suyo; la 3,3'-diaminobencidina la cual proporciona pigmentos polimerizados de color pardo de mayor estabilidad. Se recomienda extremar las precauciones en su manejo por su posible potencial carcinogénico.

El esquema de la reacción se representa a continuación:



El método inmunohistoquímico utilizado en este trabajo es un método indirecto. Mediante este procedimiento, el anticuerpo primario sin conjugar se une con el antígeno presente en la sección de tejido. En una segunda fase se añade un

anticuerpo secundario que en una tercera fase se conjugará con el marcador enzimático. Se ha utilizado el anticuerpo secundario biotinilado. La razón estriba en que las moléculas de biotina tienen gran afinidad por las moléculas de avidina de forma que se generan fuertes enlaces no inmunes entre sí. A su vez la molécula de avidina está formada por cuatro subunidades que configuran una estructura terciaria con cuatro regiones hidrofóbicas de unión a la biotina.

Por otro lado, la biotina a su vez se conjuga fácilmente de forma covalente con anticuerpos y marcadores. Se considera que pueden unirse hasta 150 moléculas de biotina a una sola molécula de anticuerpo. Aunque la avidina también tiene una gran capacidad de combinarse con anticuerpos, es la biotina la que normalmente se conjuga debido a su pequeño tamaño.

En este trabajo se ha aplicado un complejo de avidina y marcador enzimático biotinilado que contiene lugares de unión libres en la avidina para que se produzca la fijación sobre el anticuerpo secundario biotinilado (método del complejo avidina-biotina-peroxidasa).

En la Figura 9 se muestra un esquema detallado del método inmunohistoquímico utilizado:

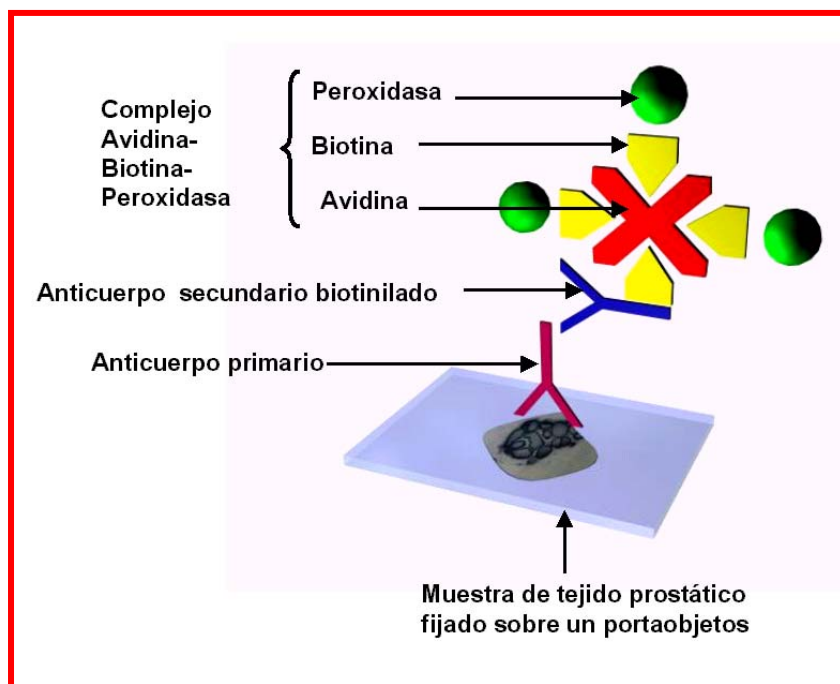


Figura 9. Método inmunohistoquímico indirecto.

2.2.1. Protocolo de inmunotinción

Las secciones de los tejidos, una vez rehidratadas en serie de alcoholes decreciente, se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno al 0.3% en agua destilada durante 30 minutos con el fin de inactivar la peroxidasa endógena.

El desenmascaramiento del antígeno se realiza mediante digestión con solución de pepsina (Digest-All, Zymed, San Francisco, CA, USA) a 37 °C durante 5 minutos.

Posteriormente, las secciones se pasaron por tres baños de PBS, pH 7.4, durante 5 minutos en cada uno.

A continuación las preparaciones se incubaron con el antisuero primario policlonal anti-Factor VIII (Sigma, S. Luis, USA). El antisuero se diluyó a 1:1000 en una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS pH 7.4 más azida sódica al 0.1%. A continuación las preparaciones se incubaron con el anticuerpo secundario durante 24 horas en cámara húmeda a 4 °C.

Como anticuerpo secundario se utilizó una inmunoglobulina biotinilada anti-ratón (Biomed, Foster City, CA, USA), diluida a 1:400 en PBS más BSA al 1% sin azida sódica. La incubación se efectuó durante 10 min a temperatura ambiente. A continuación, los cortes fueron tratados con un complejo streptavidina-biotina-peroxidasa (Biomed) durante 10 min a temperatura ambiente. La inmunotinción fué revelada con 100 mg de diaminobenzidina (DAB) (Sigma) disueltos en 200 mL de PBS, más 40 μ L de peróxido de hidrógeno.

En algunos cortes de cada grupo (destinados para el estudio cualitativo) se procedió al contraste nuclear con hematoxilina de Harris. Sobre los cortes empleados para la cuantificación tanto lineal como no lineal, no se realizó ninguna tinción de contraste.

Finalmente, las preparaciones se deshidrataron en serie creciente de alcoholes, se pasaron por xileno y se montaron con Depex (Serva, Heidelberg, Alemania).

La especificidad de las reacciones inmunohistoquímicas ha sido comprobada mediante incubación de las secciones con suero no inmune como sustituto del anticuerpo primario.

3. MÉTODOS CUANTITATIVOS LINEALES (ESTEREOLOGÍA)

Sobre las tiras de imágenes obtenidas como se indica más arriba y en cada uno de los grupos de estudio, se estimaron los siguientes parámetros estereológicos:

3.1. Densidad de longitud vascular (L_V)

Las microestructuras biológicas como capilares, túbulos y axones, pueden considerarse a efectos prácticos, como elementos lineales (Santamaría et al. 2009). El atributo estereológico más importante de estas estructuras lineales es la densidad de longitud (L_V) (Mattfeldt et al. 2006). Se evaluará la L_V de los microvasos

prostáticos, es decir la longitud microvascular por unidad de volumen de tejido prostático. Se utilizó como espacio de referencia para esta estimación el compartimento estromal.

Se empleó el retículo del disector, siguiendo la regla de Sterio (Sterio 1984) para muestrear los perfiles vasculares inmunoteñidos para el factor VIII y elegibles para ser contados sobre las tiras de tejido utilizadas para los análisis no lineales (Fig. 10).

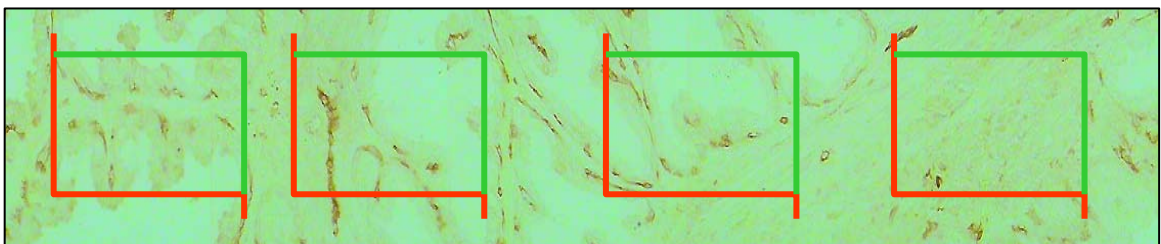


Figura 10. Serie de retículas de disector superpuestas a una imagen de una serie espacial inmunoteñida para Factor VIII, 20x.

La densidad de longitud se estimó aplicando la fórmula:

$$L_V = (2 \times \Sigma Q^-) / \Sigma A$$

Donde, Q^- = número de perfiles vasculares inmunopositivos y ΣA = área total muestreada, es decir: área de la retícula del disector ($20249 \mu\text{m}^2$) multiplicada por el número de retículos seleccionados. La L_V se expresó en mm^{-2} .

3.2. Radio promedio tisular de difusión vascular (rdif)

Se trata de estimar el cilindro virtual de tejido “asignado” a un capilar (Santamaría et al. 2009) sabiendo que el área de sección de un tejido en torno a un capilar sería: volumen ocupado por el estroma / longitud total de microvaso; este cociente sería igual a $1 / L_V$; desarrollando esta igualdad, obtenemos que el radio

promedio tisular (expresado en μm) de difusión vascular es:

$$\text{rdif} = \sqrt{\frac{1}{\pi \cdot L_V}}$$

3.3. Diámetro vascular medio (dvm)

A partir de L_V , fracción de volumen vascular (V_V vasc) y de la fracción de volumen ocupada por el estroma prostático (V_V estrom), se calculó el diámetro microvascular medio, expresado en μm (dvm), dado por la fórmula:

$$dvm = 2 \cdot 10^3 \sqrt{\frac{V_V \text{ vasc}}{V_V \text{ estrom} \cdot \pi \cdot L_V}}$$

3.4. Fracción de volumen del estroma ocupada por Factor VIII

Se calcula dividiendo el área inmunorreactiva para Factor VIII entre el área total.

$$V_V \text{ Factor VIII} = \frac{\Sigma \text{ área inmunoteñida}}{\Sigma \text{ área total}}$$

Para esta estimación se empleó el programa Scion Image for Windows (www.scioncorp.com). Para ello, analizamos los niveles de gris de la muestra de partida, segmentamos y binarizamos la imagen, y sobre la imagen binarizada el programa calcula la V_V Factor VIII (Fig. 11).

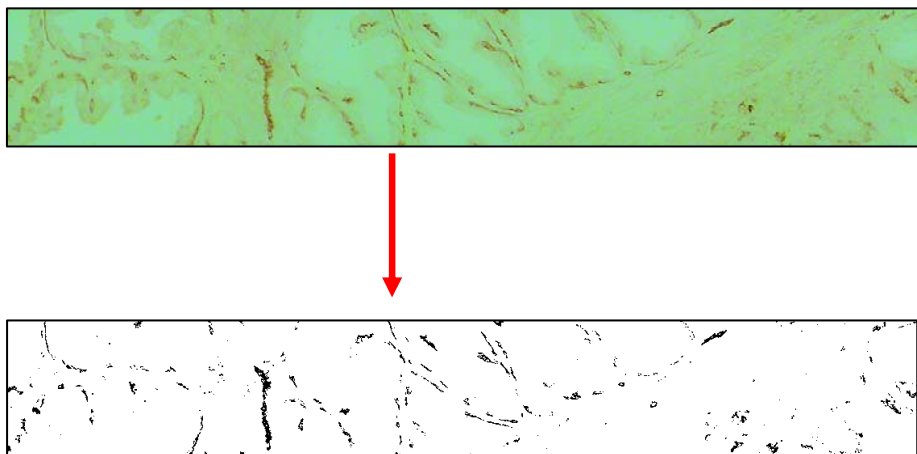


Figura 11. La serie espacial inmunoteñida para Factor VIII de la imagen anterior se procesa para obtener una imagen binaria y segmentada que se utilizará para la estimación la V_V Factor-VIII.

4. MÉTODOS CUANTITATIVOS NO LINEALES

4.1. Adquisición de datos

Las secciones obtenidas con los protocolos indicados más arriba fueron utilizadas para el análisis no lineal en próstatas control, HBP y carcinoma. Para obtener series de datos de suficiente longitud, se exploraron por sección tres tiras constituidas por al menos 10 cuadrats adyacentes. En el caso de los controles, este muestreo se realizó en cada una de las regiones prostáticas de McNeal. Las tiras se muestrearon de tal modo que se obtuvieron series ininterrumpidas de cuadrats (Baddeley and Vedel Jensen 2005) con perfiles vasculares, el resultado se muestra en la Figura 12.

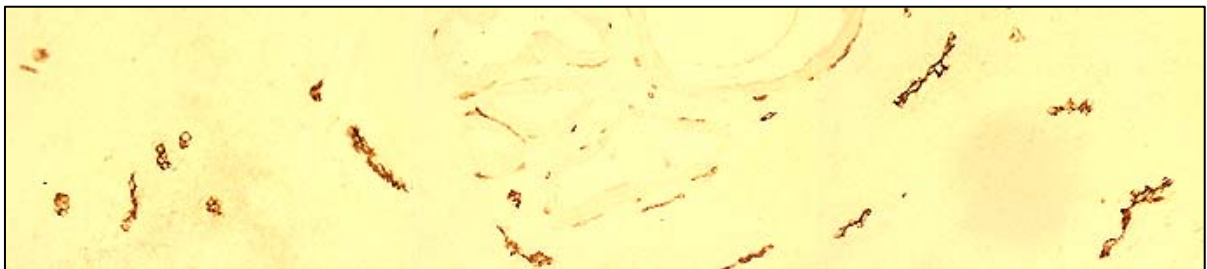


Figura 12. Tira construida por la unión de cuadrats adyacentes. Próstata normal (ZP). Inmunotinción para Factor VIII. X20.

Como ya se ha indicado, los campos microscópicos fueron captados y digitalizados a través del sistema Cast Grid y más tarde procesados utilizando el programa de dominio público NIH Image, desarrollado por US National Institutes of Health y disponible en Internet en <http://rsb.info.nih.gov/nih-image> (Rasband and Bright 1995). Los resultados consistieron en series de imágenes en nivel de grises de un tamaño promedio de 175 x 5000 pixels. Mediante segmentación interactiva y eliminación del fondo y de tejidos inmunorreactivos para Factor VIII no correspondientes a la pared vascular, se produjo una imagen binaria, donde los perfiles vasculares inmunorreactivos aparecen en negro y el espacio de poro en blanco (Fig. 13).

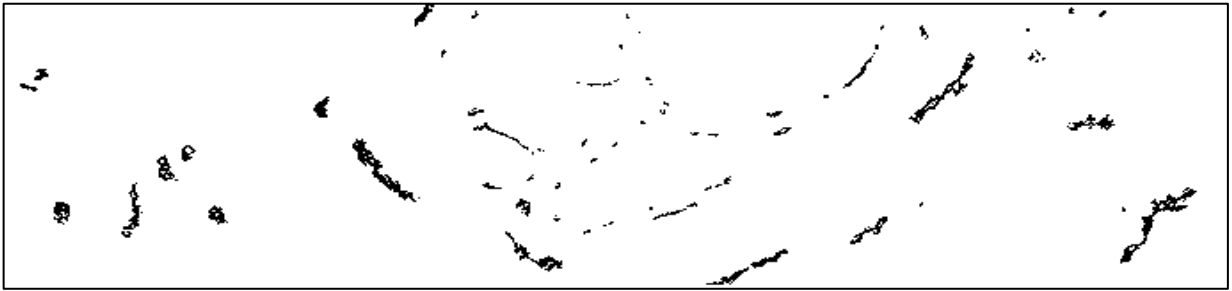


Figura 13. Imagen binarizada y segmentada de la tira que se muestra en la Figura 12. Se observan los perfiles vasculares en negro y el espacio de poro en blanco.

La fracción de volumen (V_V) de píxeles pertenecientes al componente vascular inmunoteñido para Factor VIII fue automáticamente registrada por el sistema de análisis de imagen para todas las N columnas ortogonales al eje orientador de la tira en cada punto de dicho eje denotado como $t \in [1, N]$, donde $N = 5000$ (promedio) (Fig. 14).

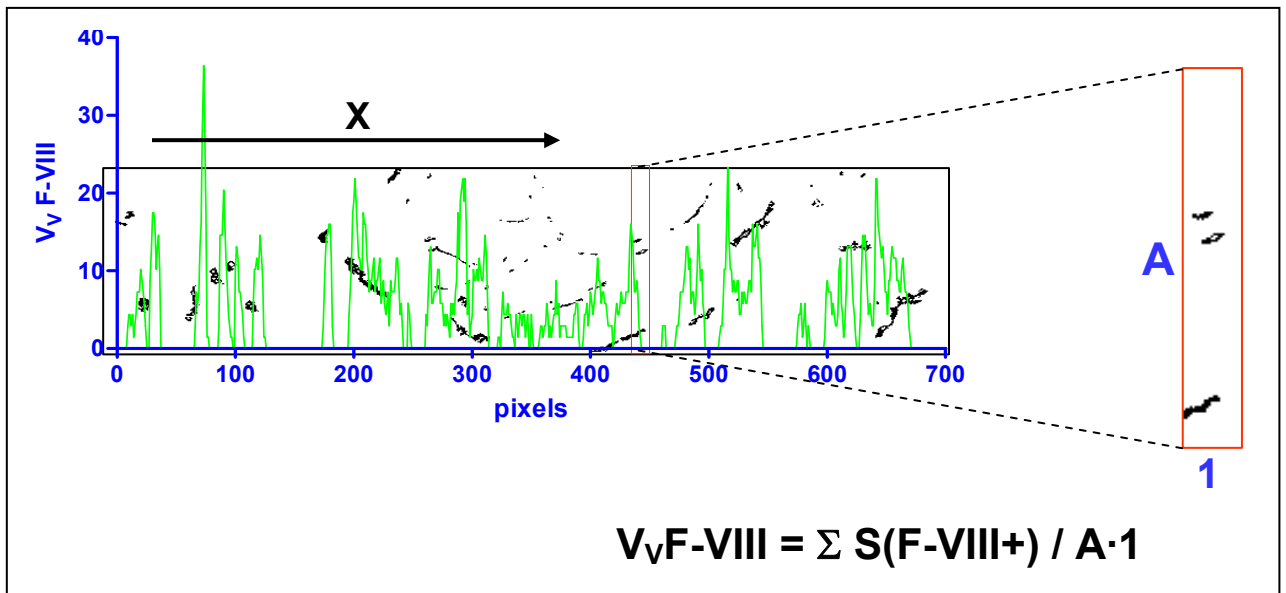


Figura 14. Gráfica de la variación de V_V Factor-VIII en función de los pixels del eje orientador X, superpuesta a la tira de tejido binarizada y segmentada. El rectángulo rojo indica una columna de A pixels de alto por 1 pixel de ancho; la medida de la fracción de volumen de la columna ocupada por la inmunotinción para Factor VIII viene dada por la fórmula expresada en el borde inferior derecha de la imagen, donde V_V F-VIII = fracción de volumen del Factor VIII; $S(F-VIII+)$ = área positiva para el Factor-VIII; $A \cdot 1$ = área total de la columna.

- 1.6587
- 2.4909
- 2.4909
- 2.4909
- 3.3231
- 2.4909
- 2.4909
- 1.6587
- 4.9818
- 7.4727
- 8.3049
- 7.4727
- 6.6462
- 6.6462
- 5.8140

Las series resultantes de N números racionales consecutivos por campo muestreados en cada grupo de estudio (Fig. 15) sirvieron como señales de input en los análisis no lineales a efectuar. Cada número racional (serie de datos) indica el valor que toma V_V a lo largo de una dirección espacial.

Figura 15. Fragmento de una serie resultante de la medición de una serie espacial. Los números indican los valores que toma la V_V Factor-VIII en cada pixel a lo largo del eje orientador de la tira de tejido.

4.2. Reconstrucción del espacio de fase

La reconstrucción de atractores es una técnica estadística para sistemas no lineales, en la que se reemplaza conceptualmente un espacio de fase desconocido de n dimensiones por un pseudo-espacio de fase de d dimensiones ($d \leq n$) (Mattfeldt 1997).

En nuestro estudio partimos de una serie de datos sobre el eje X , que es unidimensional por definición (Fig. 16).

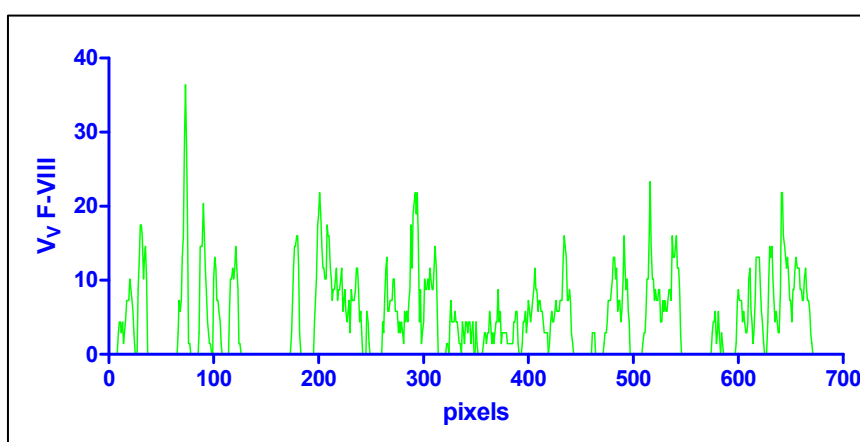


Figura 16. Variación de V_V Factor-VIII en función de los pixels del eje orientador X , esta gráfica muestra exclusivamente como cambia la fracción de volumen de Factor VIII a lo largo de una línea, por tanto sólo aporta datos unidimensionales.

Por ser unidimensional, no es posible conocer el número real de grados de libertad (dimensiones). Tampoco es posible determinar la totalidad de los operadores que actúan en el establecimiento del patrón de microvascularización cuya imagen final es la fracción de volumen del estroma ocupada por la inmunotinción para Factor VIII. Por lo tanto no se puede construir el atractor en d dimensiones.

Sin embargo existe un método para construir un espacio de fase de dimensión \leq dimensión real, conocido como pseudo-espacio de fase (Nichols and Nichols 2001). En el pseudo-espacio de fase se refleja como influye un punto sobre otro u otros situados más adelante en la serie espacial.

Sea la serie de V_V Factor-VIII a lo largo del eje X con valores: $x_1, x_2, x_3, \dots, x_n$. Se puede ver como influye x_1 sobre otro valor situado, por ejemplo, 7 posiciones más adelante en la serie, es decir sobre x_8 , y en general como influye x_i sobre el valor x_{i+7} . Para ello se generan una serie de pares de la forma: $(x_1, x_8) (x_2, x_9) (x_3, x_{10}) \dots \dots \dots (x_{n-7}, x_n)$ (Fig. 17).

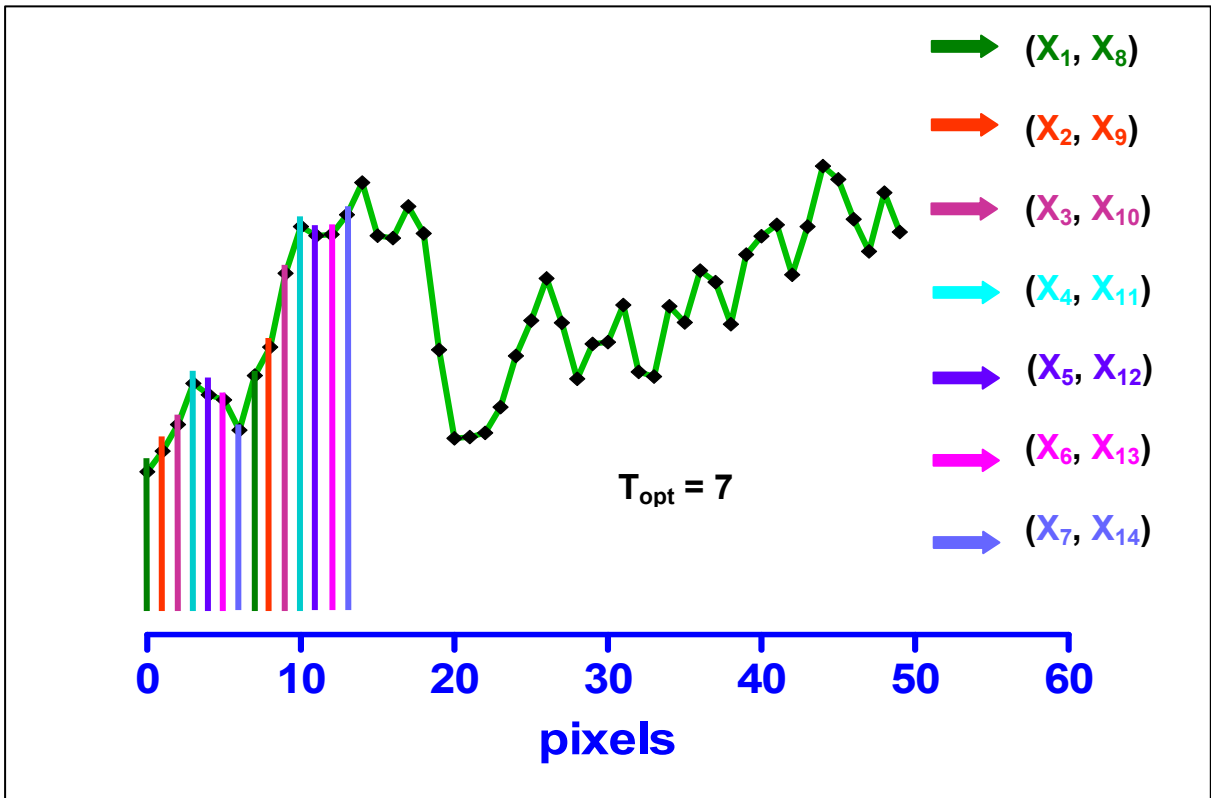


Figura 17. Generación de pares de valores de valores de V_V Factor VIII, espaciados por un lag $\tau_{opt} = 7$. Las parejas de líneas del mismo color perpendiculares al eje X, indican los pares de puntos correspondientes.

Este conjunto de pares se pueden tratar como coordenadas y representarlos sobre un plano cartesiano (Fig. 18).

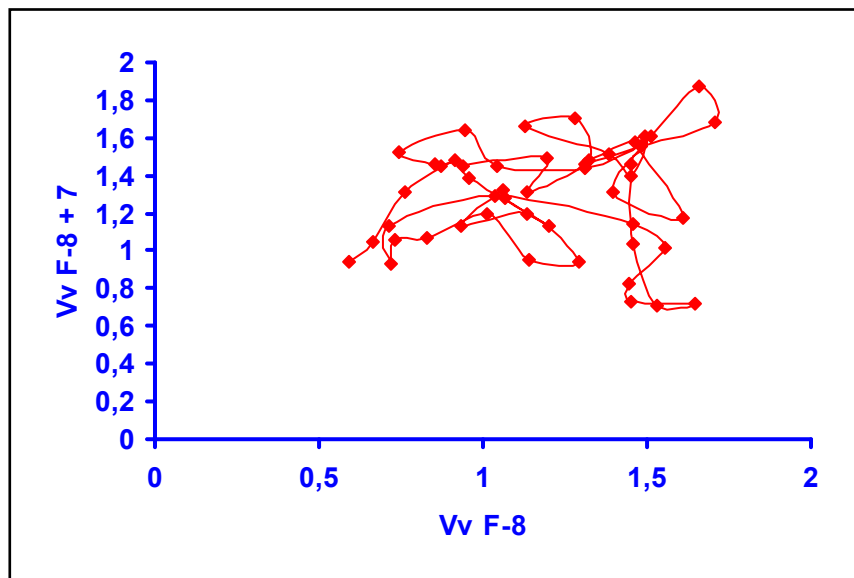


Figura 18. Representación en el plano cartesiano de los pares indicados en la Fig. 17. En el eje X se consigna el primer elemento del par y en el Y el segundo (el primer elemento + τ_{opt}). Los puntos resultantes se unen mediante trayectorias que representan las órbitas en el pseudo-espacio de fase $d = 2$.

Ésto se puede hacer para más de 2D, pero solo se pueden representar gráficamente los datos para $D \leq 3$, la Figura 19 representa la reconstrucción del atractor en 3 dimensiones.

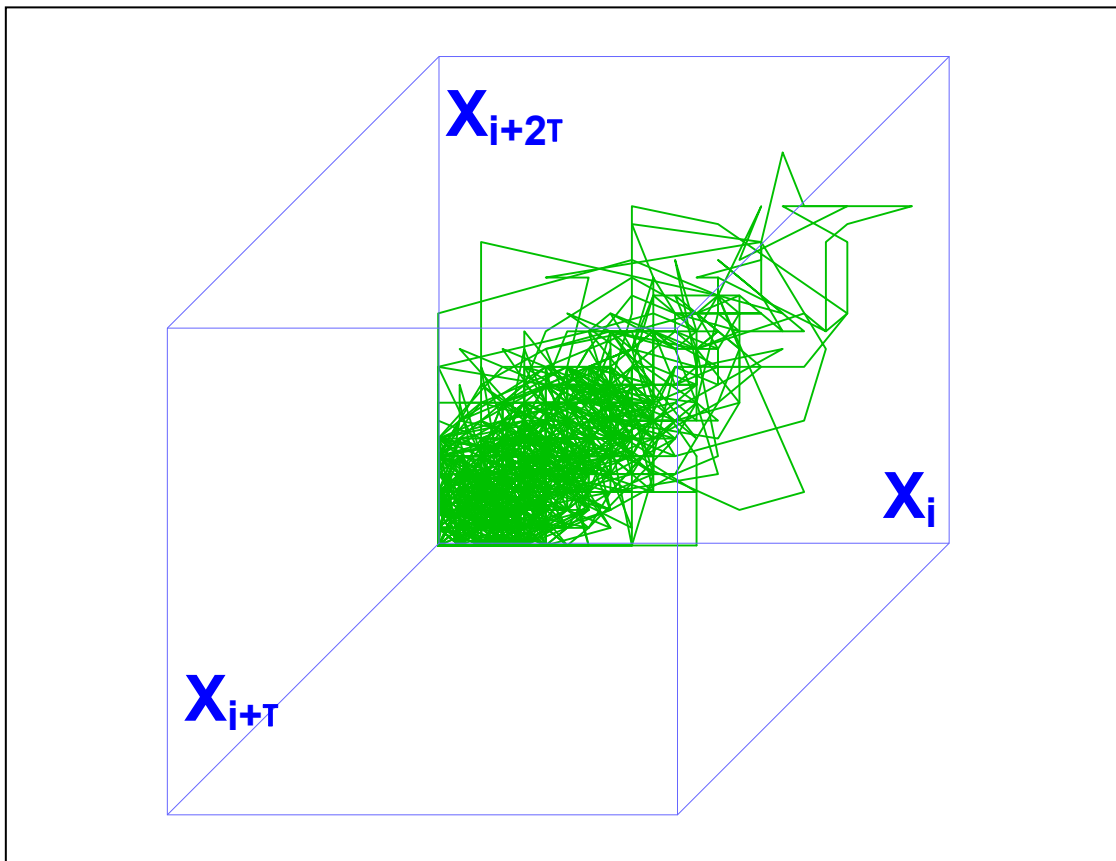


Figura 19. Representación en 3D de tripletes de puntos espaciados por un lag T . El enmarañamiento de las órbitas puede ser real (fruto de la complejidad de las interrelaciones entre los puntos) o artefactual, debido a la proyección y solapamiento de las órbitas que se desplegarían óptimamente a una dimensión superior.

Para hacer esto, hay que seleccionar en la serie espacial un cierto “lag” o “retardo” de reconstrucción τ (Abarbanel 1996), que indica a cada cuantas posiciones a lo largo del eje X se escogerán los puntos para construir los vectores que sitúan a los puntos en el pseudoespacio de fase. La magnitud de ese lag debe de estar en consonancia con el objetivo que se persigue con la construcción del pseudoespacio de fase, obtener información multidimensional a partir de una fuente unidimensional. El retardo no puede ser tan grande que X y $X+\tau$ sean totalmente independientes, ni tan pequeño que ambos vectores estén totalmente correlacionados, en estos dos casos extremos la reconstrucción no extrae ninguna información relevante de la serie espacial. En el presente estudio el lag se ha obtenido de acuerdo con el criterio de la información mutua promedio “average mutual information: AMI” (Abarbanel 1996): el retardo óptimo para la reconstrucción del atractor (τ_{opt}) se considera como el primer mínimo de la función AMI.

En este trabajo, se efectuó una reconstrucción del espacio de fase del atractor en tres dimensiones usando las variables dinámicas [V_V Factor-VIII (N), V_V Factor-VIII (N + τ_{opt}), V_V Factor-VIII (N + $2\tau_{opt}$)] para las series espaciales de cada grupo de estudio. Se calculó además el valor medio del atractor \bar{A} y el tamaño del atractor (R_A), siendo $R_A = \text{error cuadrático medio de los datos en relación a } \bar{A}$.

Una vez reconstruido el atractor, se investigaron las dimensiones del seudoespacio de fase mediante el método de los falsos vecinos próximos “false nearest neighbours: FNN” (Kennel et al. 1992; Abarbanel 1996). Se trata de averiguar a que dimensión de inclusión se encuentran óptimamente desplegadas las órbitas del atractor, ya que a dimensiones bajas la agrupación de los puntos del atractor puede ser artefactual y debida a la proyección de las órbitas que estarían realmente separadas en una dimensión superior. En la Figura 20 se representa gráficamente el atractor en 2 dimensiones. Cada punto está representado por un vector definido por tantas coordenadas como dimensiones tenga el atractor que estemos considerando, se observa un gran enmarañamiento de las órbitas que quizás pueda ser desplegado en $d > 2$. Para conseguir ese despliegue, se estiman las distancias entre los puntos del atractor a dimensiones crecientes (1, 2, 3, etc.). Si la distancia entre los puntos (p_1 y p_2 , por ejemplo) se hace mayor que un umbral prefijado conforme aumentan las dimensiones del atractor, consideramos que esos puntos son falsos vecinos próximos (FNN) (Fig. 21).

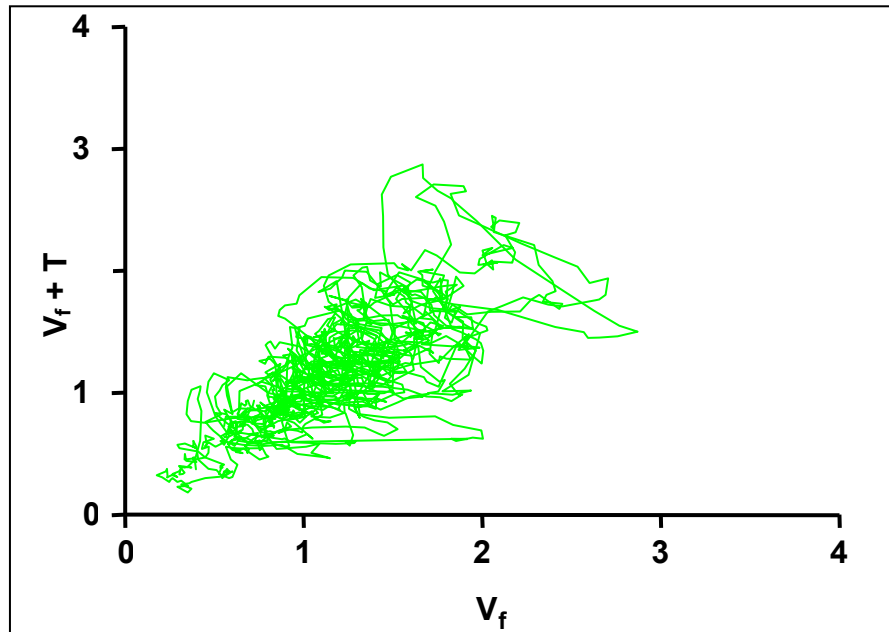


Figura 20. Representación de un atractor en 2 dimensiones

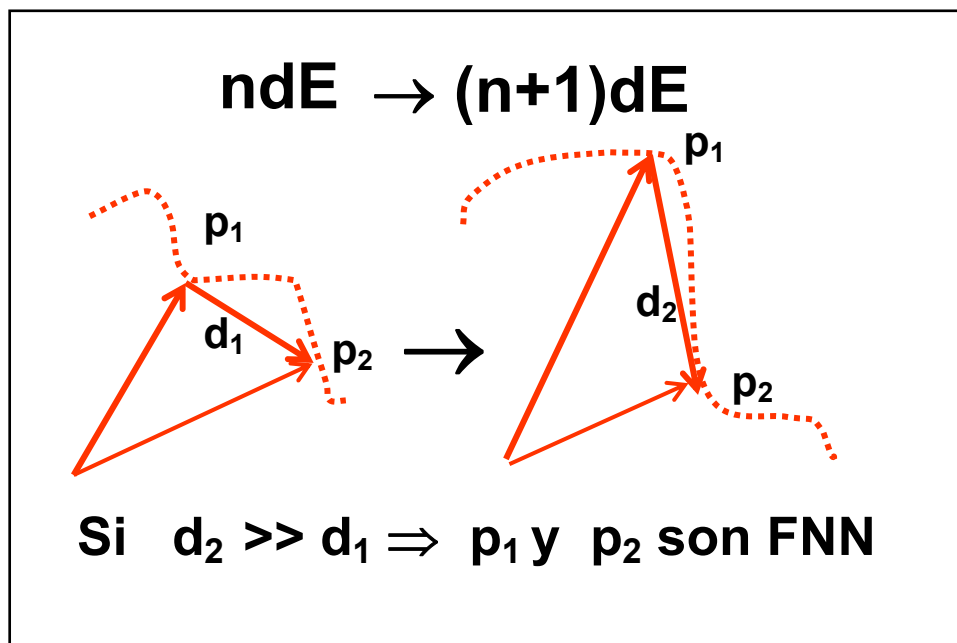


Figura 21. Esquema de la estimación de puntos como “falsos vecinos próximos” (FNN). Cuando la distancia entre p_1 y p_2 aumenta por encima de un cierto umbral prefijado al incrementar la dimensión de inclusión (dE), se considera que p_1 y p_2 son FNN.

Estas dimensiones indican el número de coordenadas necesarias para desplegar las órbitas del solapamiento que se origina en la proyección del atractor a un espacio de dimensión más baja (Abarbanel 1996). La dimensión más baja suficiente para desplegar el atractor de modo que desaparezcan los solapamientos se denomina dimensión global de inclusión (dE), que es el entero que minimiza el número de FNN (por ejemplo por debajo del 10%) (Fig. 22).

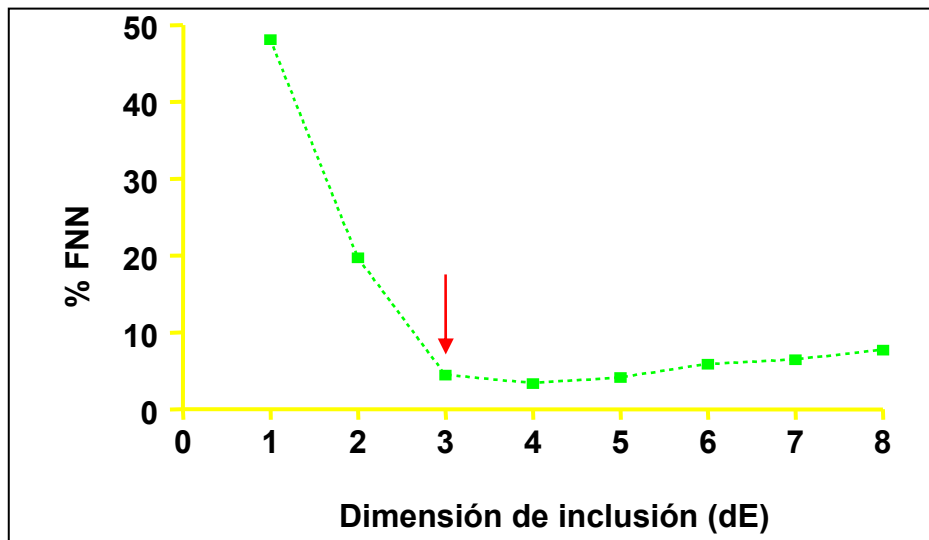


Figura 22. Gráfica que manifiesta el decrecimiento del % de FNN en función del incremento dimensional. A la dimensión en la que el porcentaje de FNN cae por debajo del 10% (flecha roja) se la considera la dimensión global de inclusión, en el ejemplo, $dE = 3$.

4.3. Clasificación del sistema dinámico

Se realiza obteniendo alguna característica invariante de la dinámica (es decir independiente de los cambios de las condiciones iniciales de las órbitas y del sistema de coordenadas en el que se observa el atractor). En este estudio se empleó la dimensión de correlación (D_2).

Ya sabemos que el atractor es un “lugar” del espacio de fase en donde evolucionan las órbitas del sistema. A este lugar se le puede asignar un “volumen” Q con una geometría determinada por la distancia r a la que se encuentren los puntos que dibujan las órbitas del sistema (Fig. 23).

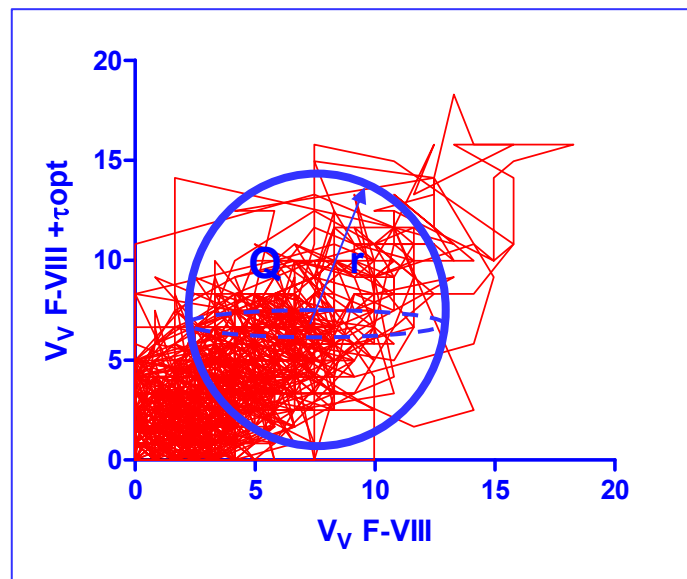


Figura 23. Atracción representada en 2D, sobre éste se indica una región simbolizada por una esfera Q que tiene un tamaño determinado por su radio r , que en realidad es una medida de la dispersión de los puntos del atracción contenidos en la región Q .

Q y r se relacionan de modo que $Q \sim r^{D_2}$, Q se puede representar por una función llamada integral de correlación. Esta se obtiene evaluando la distancia r entre los puntos del sistema tomados 2 a 2 hasta agotar todas las posibilidades de combinación en parejas de esos puntos.

La dimensión de correlación, D_2 , es una dimensión fractal (Theiler 1990; Skinner 1994; Abarbanel 1996) asociada con el atracción, se obtiene a partir de la integral de correlación $C(2,r)$ del atracción, y representa la probabilidad de que dos puntos del espacio de fase estén separados por una distancia euclídea menor o igual que r (Mattfeldt 1997). Para sistemas determinísticos, D_2 converge hacia un valor constante cuando crece la dE mientras que para sistemas estocásticos se eleva indefinidamente en función del incremento de dE (Mattfeldt 1997; Buchler and Kandrup 1997). La dimensión de correlación representa una característica de la geometría del atracción y se relaciona con el modo de distribución de los puntos de éste en el espacio de dimensión dE de manera que cuanto más complejas y plegadas sean las órbitas del atracción mayor será D_2 .

A continuación veamos como se construye la dimensión de correlación D_2 (Skinner et al. 1994). Partimos de la serie de datos: $X_1, X_2, X_3, X_4, \dots, X_n$ donde X_i es la V_V de Factor VIII de los vasos prostáticos a lo largo de un eje al azar X .

Se toma el primer punto (X_1) y con un lag prefijado, determinado habitualmente como el primer mínimo de la función AMI (sea $\tau = 4$), se obtienen pares de puntos (dE_2): $(X_1, X_5), (X_2, X_6), (X_3, X_7)$, etc. Estos pares representan vectores en 2D.

Se calcula la distancia entre cada vector y todos los restantes, tomados dos a dos: (X_1, X_5) con (X_2, X_6) ; (X_1, X_5) con (X_3, X_7) , y así sucesivamente. Se obtienen así las distancias d_1, d_2, \dots, d_n estimadas a dE_2 (Fig. 24).

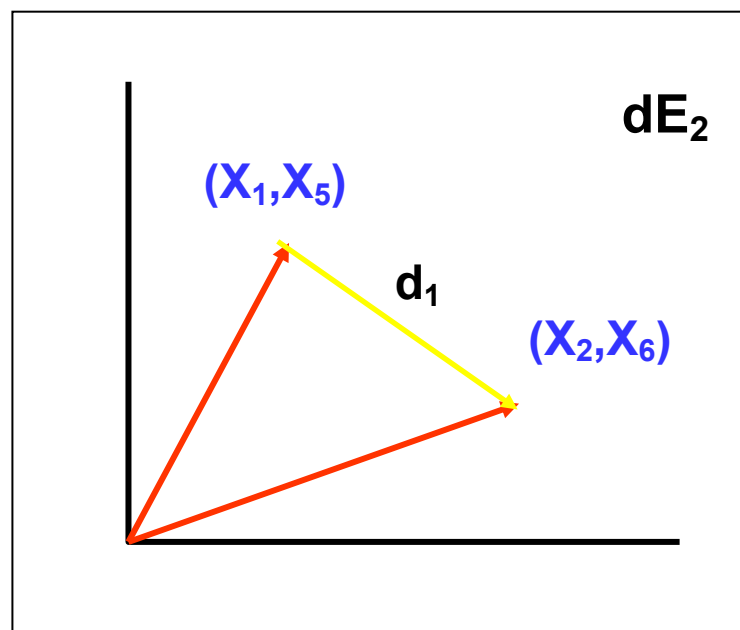


Figura 24. Distancia d_1 entre dos vectores que representan respectivamente a los pares de puntos (X_1, X_5) y (X_2, X_6) en dE_2 .

Se cogen ahora tripletes espaciados por $\tau = 4$, trabajando a dE_3 . Se calcula la distancia en dE_3 cogiendo cada triplete y operando con los demás tomados dos a dos. Se obtiene así otro conjunto de distancias $d'1, d'2, \dots, d'n$ (Fig. 25).

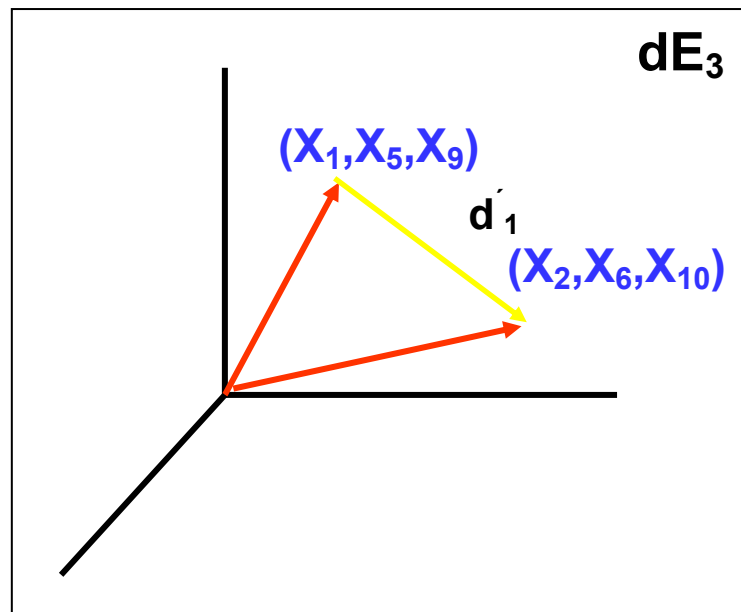


Figura 25. Distancia d'_1 entre dos vectores que representan respectivamente a los triplete de puntos (X_1, X_5, X_9) y (X_2, X_6, X_{10}) en dE_3 .

Se repite la misma operación para dE_4 (cuadruptes), dE_5 (quintupes), hasta dE_{15} . Se obtiene al final para cada dE un conjunto de distancias $\{d_i\}$ entre los puntos del atractor, de tal modo que $0 \leq \{d_i\} \leq r$, siendo $r < R_A$ (tamaño del atractor), para $R_A =$ error cuadrático medio de los datos en relación al valor medio del atractor. El valor r , es el radio de la esfera en la cual consideramos la probabilidad de que aparezcan puntos del atractor.

Con los conjuntos de distancias $\{d_i\}$, se construye para cada dE un histograma acumulativo, cuyos límites inferior y superior son 0 y r , las distancias d_i quedan agrupadas en clases de 0 a r . La curva que une todos los valores de la frecuencia de cada clase del histograma de distancias es la integral de correlación $C(2, r)$ para una dimensión dE determinada (Fig. 26).

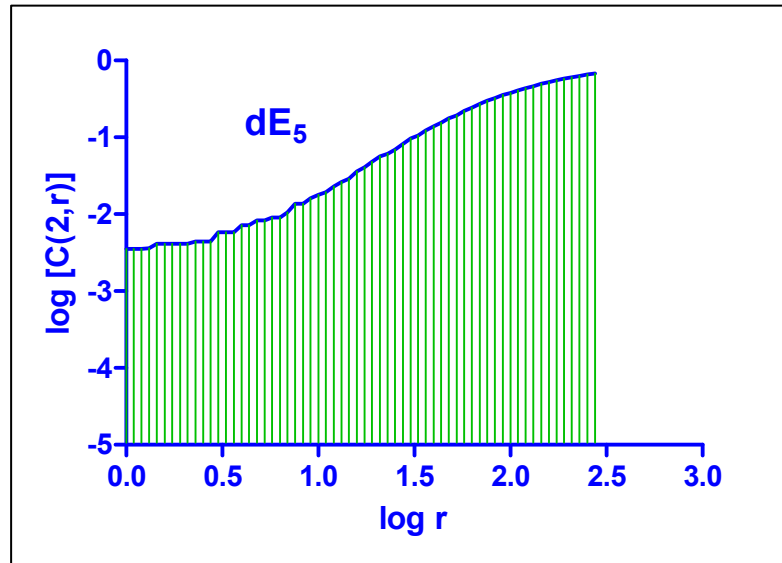


Figura 26. Histograma acumulativo de los conjuntos de distancias $\{d_i\}$ en dE_5 . Los intervalos de 0 a r se representan en logaritmos, $\log r$. La curva en trazo azul que une todos los valores de la frecuencia de cada clase del histograma de distancias es la integral de correlación $C(2,r)$.

Como se expresa en la Figura 27, se pueden representar las distintas curvas obtenidas de dE_1 a dE_{15} .

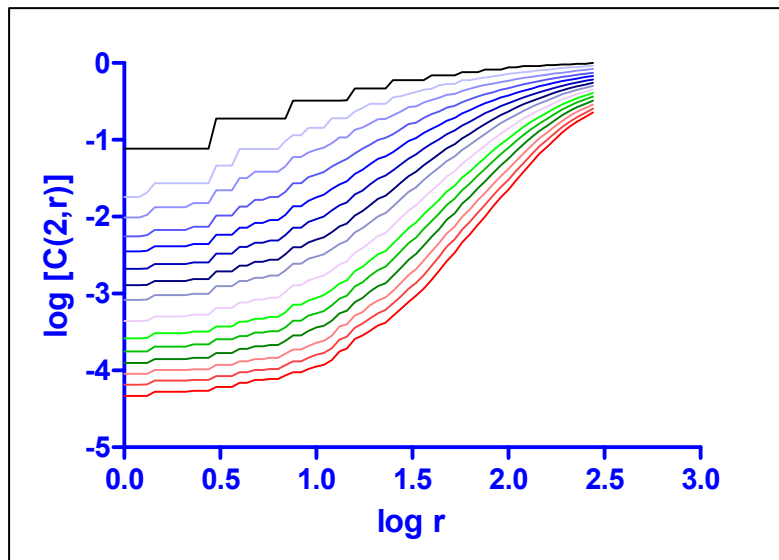


Figura 27. Gráfica que representa la familia de curvas $C(2,r)$ para las dimensiones de inclusión de 1 a 15 (curva en trazo negro, $dE=1$, curva más inferior, en trazo rojo, $dE = 15$).

La pendiente de la porción lineal de cada curva corresponde a:

$$D_2 = \lim_{r \rightarrow 0} \{ \log [C(2,r)] / \log r \}$$

Es decir, la pendiente de la región lineal de $C(2,r)$ es la dimensión de correlación D_2 (Abarbanel 1996). Se observa que a partir de una determinada dE , las regiones lineales de $C(2,r)$ se hacen paralelas (Fig. 27), D_2 se hace invariante a partir de esa dE , es decir, la probabilidad de que aparezcan puntos del atractor a una distancia $\leq r$ se hace constante.

Si se representan las D_2 en función de dE_i , se observa que para el caos de baja dimensión, D_2 converge para una dE determinada (Fig. 28).

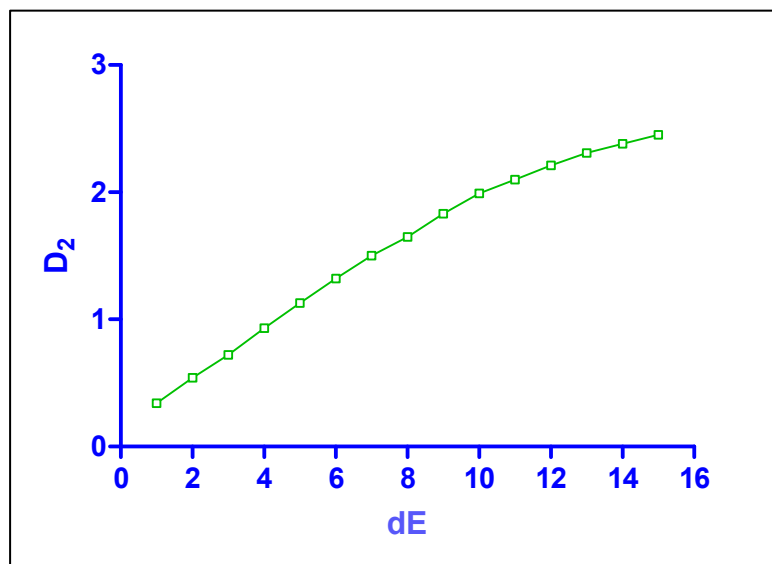


Figura 28. Representación de los diversos valores de D_2 en función de dE en el caso de un proceso de caos determinista, se observa que la curva tiende a aplanarse por encima de $dE = 12$.

Sin embargo, para el caos de alta dimensión (procesos estocásticos), D_2 crece en función de dE , sin alcanzar un valor constante (Fig. 29).

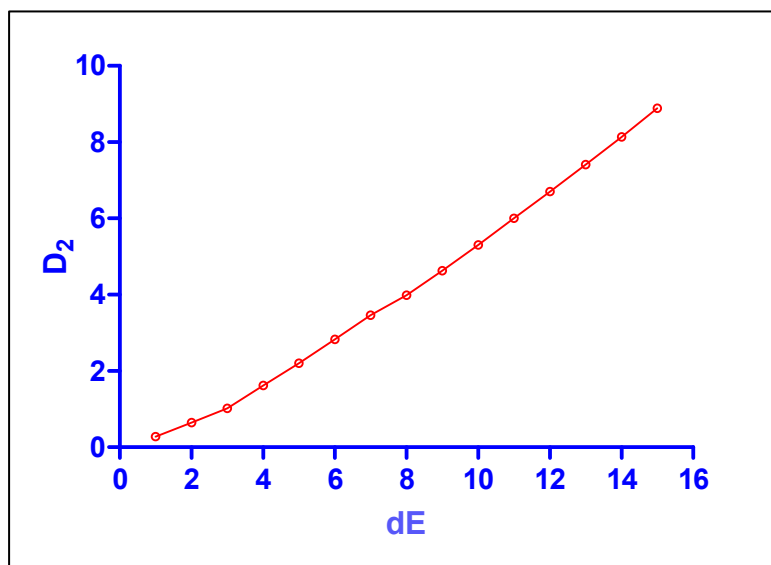


Figura 29. Representación de los diversos valores de D_2 en función de dE en el caso de un proceso estocástico, se observa que la curva crece indefinidamente con la dimensión de inclusión.

En la práctica, la estimación de D_2 se efectuó del modo siguiente: primero, se obtuvieron los valores de D_2 para cada dimensión de inclusión dE en el rango de 1 a 15. Una vez construida la gráfica de los valores de D_2 en función de dE (Fig. 28), se ajustó la curva resultante mediante análisis de regresión no lineal, comprobándose que en todos los casos, los valores se ajustaban de modo significativo ($p < 0.05$) a una curva uniexponencial de la forma $Y = Y_{\max} \cdot (1 - e^{-kx})$, donde $Y_{\max} \equiv D_2$ (global).

También se determinaron los valores de D_2 para la dimensión de inclusión óptima dE estimada por el método FNN en los grupos control, HBP y adenocarcinoma. A este valor de la dimensión de correlación lo denominaremos $D_2(dE)$.

4.4. Test para discriminar caos determinístico de ruido autocorrelado

El ruido autocorrelado puede mostrar un comportamiento similar al del caos determinístico en relación con los patrones obtenidos por aplicación de las herramientas de análisis no lineal descritas más arriba (Mattfeldt 1997). Para determinar si los datos obtenidos en el material de estudio corresponden a la existencia de una auténtica estructura fractal determinística o son más bien debidos a artefactos producidos por la presencia de un ruido con autocorrelaciones, se empleará el método de los datos subrogados (Theiler et al. 1992).

4.4.1. Método de los datos subrogados

Se trata de determinar si la serie espacial de V_V Factor-VIII de los vasos prostáticos constituye un sistema en el que existe un caos de baja dimensión caracterizado por parámetros como la D_2 o, si más bien, la secuencia de valores de V_V Factor-VIII tiene una disposición que origina una información puramente estocástica.

Para ello se simula una serie de datos, con parámetros (media, desviación) idénticos a la serie de datos reales, pero con una secuencia espacial enteramente al azar, estos son los datos subrogados.

Se construyeron conjuntos de datos subrogados para cada serie espacial en cada grupo de estudio mediante la simulación de una serie de igual longitud (serie subrogada) aleatorizando la secuencia de la serie original (Fig. 30). Estas series subrogadas preservan las media y varianza de la serie real pero aleatorizan el orden de los valores individuales de los datos (Theiler et al. 1992).

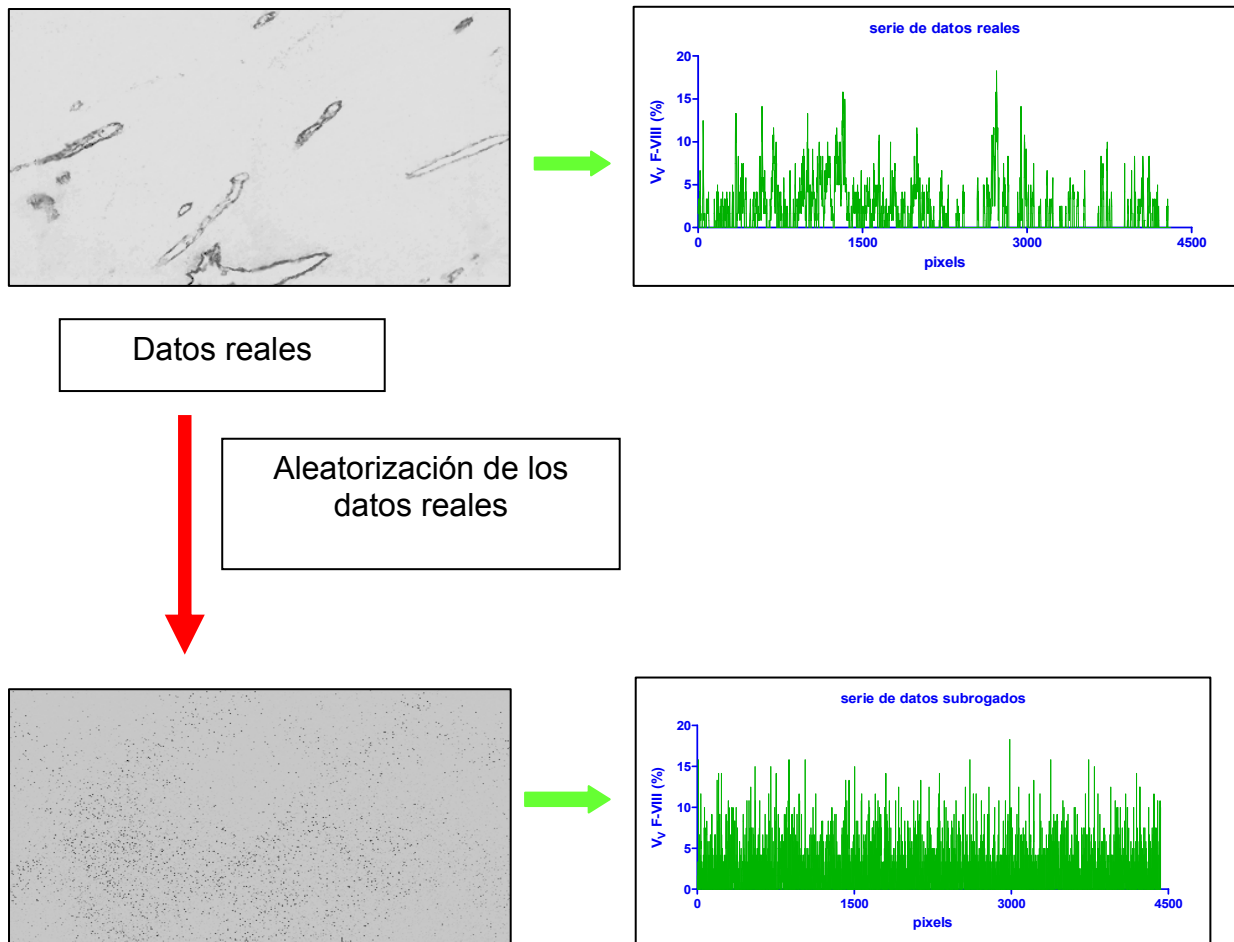


Figura 30. Imagen de un fragmento de una serie con vasos inmunoteñidos para Factor-VIII (Datos reales), a su derecha se indica la gráfica de los valores V_V Factor-VIII a lo largo de un eje longitudinal medido en pixels, se observa el trazado irregular, con frecuentes variaciones de la V_V a lo largo de la serie espacial. La serie se aleatoriza (Aleatorización de los datos reales), se muestra una imagen en la que la aleatorización conlleva a la homogeneización de las estructuras inmunoteñidas con la “destrucción” de la estructura histológica, ésto se manifiesta en la gráfica respectiva por la uniformidad del trazado de la V_V a lo largo de la serie, obsérvese que los valores promedio de la V_V no cambian en comparación con los de la serie real, sin embargo el trazado se asemeja al que produciría un ruido uniforme.

Simulaciones repetidas de las series (5 series subrogadas para cada serie real) posibilitan una prueba de comportamiento caótico estimando a continuación la D_2 tanto de las series reales como de las series subrogadas (Fig. 31).

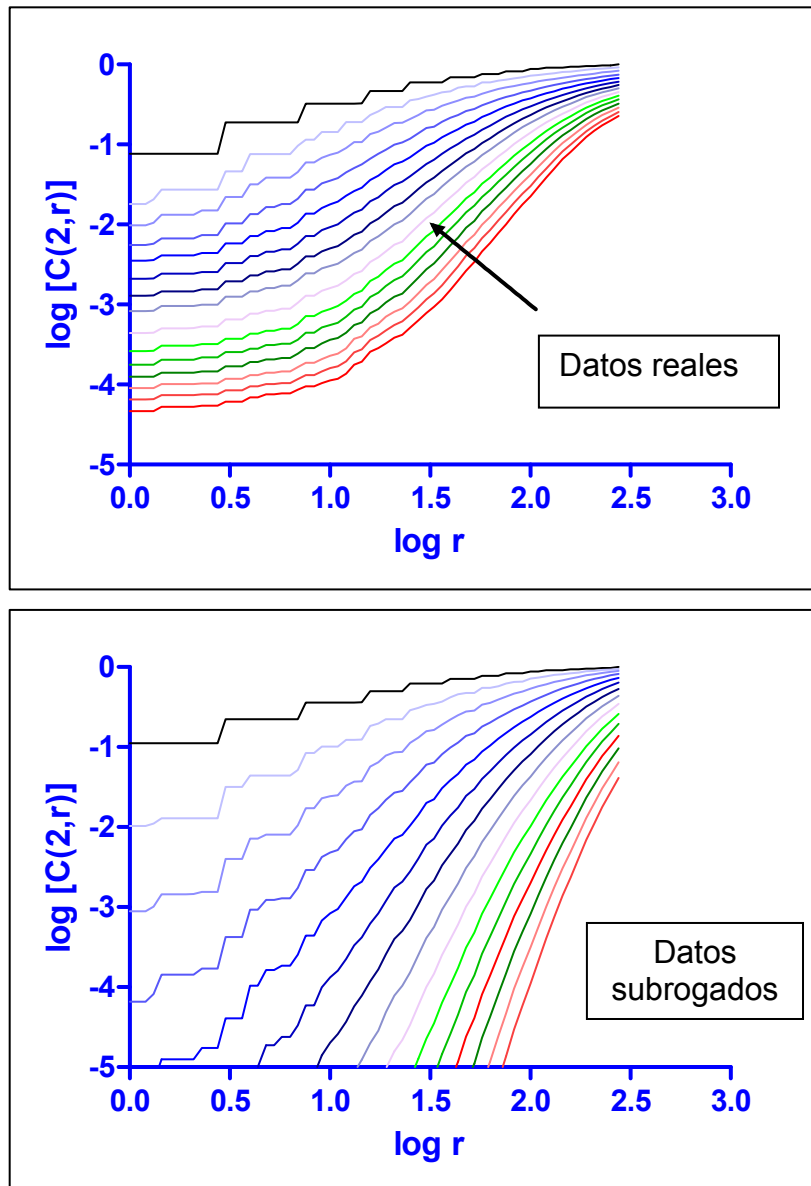


Figura 31. En la gráfica superior se expresa la colección de curvas integrales de correlación de datos reales para el intervalo de dimensiones de inclusión de 1 a 15. Se observa que a partir de dE_9 (flecha), existe una región de las curvas en la que se rectifican y se hacen paralelas. En la gráfica de abajo se expresa la colección de $C(2,r)$ de los datos subrogados construidos a partir de los reales de la gráfica superior, también en el intervalo de dE de 1 a 15. Los trazados no se hacen paralelos a ninguna dE .

Se estima la D_2 de los datos subrogados y se comprueba si difiere significativamente de la D_2 de los datos reales. Si los datos auténticos proceden

realmente de un atractor caótico, su dimensión de correlación debe de estar por debajo de una cierta fracción de los valores D_2 de los datos subrogados, para la misma dimensión global de inclusión dE (por ejemplo deben de ser menores que el 95% de los valores D_2 subrogados con una significación de $p < 0.05$), de modo que se aceptaría la hipótesis nula de los valores subrogados si los valores reales se encuentran incluidos en ese 95% (Skinner et al. 1994; Mattfeldt 1997) (Fig. 32). Por tanto, si no difieren los parámetros dimensionales de datos reales y subrogados, se puede afirmar que la estructura de la secuencia real no obedece a una dinámica de caos determinista sino a una situación estocástica.

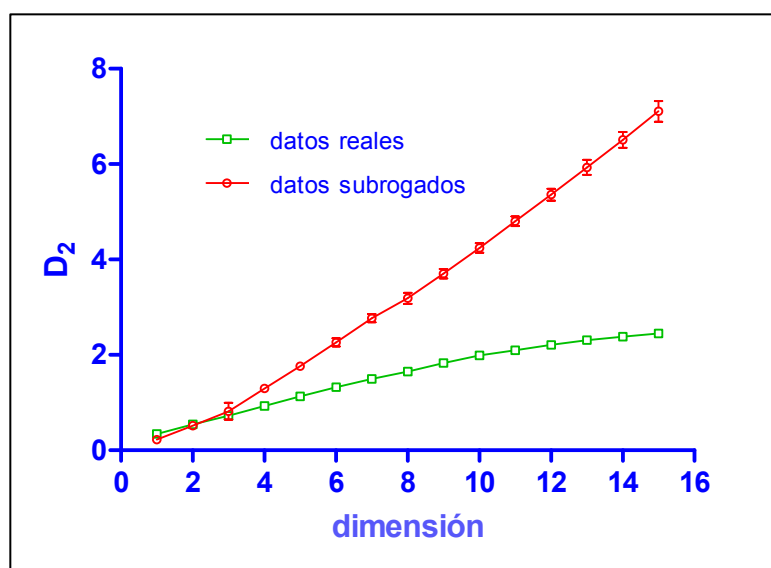


Figura 32. Comparación de las gráficas de D_2 en función de dE para datos reales y subrogados. Las barras de error de los datos subrogados indican unos intervalos de confianza del 95%. Se observa que, salvo para dimensiones muy bajas (1 a 3), los valores de D_2 de los datos reales se sitúan ampliamente por debajo de la zona del intervalo de confianza de los subrogados. Se puede afirmar que la diferencia entre unos y otros es significativa para $p < 0.05$.

4.5. Correlaciones de largo rango en series espaciales (método DFA)

Otro abordaje metodológico relevante consiste en determinar si en una serie espacial (fracciones de volumen inmunoteñidas para Factor-VIII en los vasos prostáticos) existen valores correlacionados, aunque se encuentren muy distantes unos de otros (correlación de largo rango). Estas correlaciones indican que la serie no tiene una escala característica y que puede ser multifractal (Peng et al. 1994). Para este análisis se utilizará el método DFA (Detrended Fluctuations Analysis) o análisis de las fluctuaciones no sesgadas (Peng et al. 1995).

Se parte de las series espaciales de la fracción de volumen (V_V) de píxeles pertenecientes al componente vascular inmunoteñido para Factor VIII, expresado como porcentaje sobre el espacio de referencia (espacio de poro + perfiles vasculares inmunoteñidos) para todas la N columnas ortogonales al eje orientador de la tira (Fig. 33).

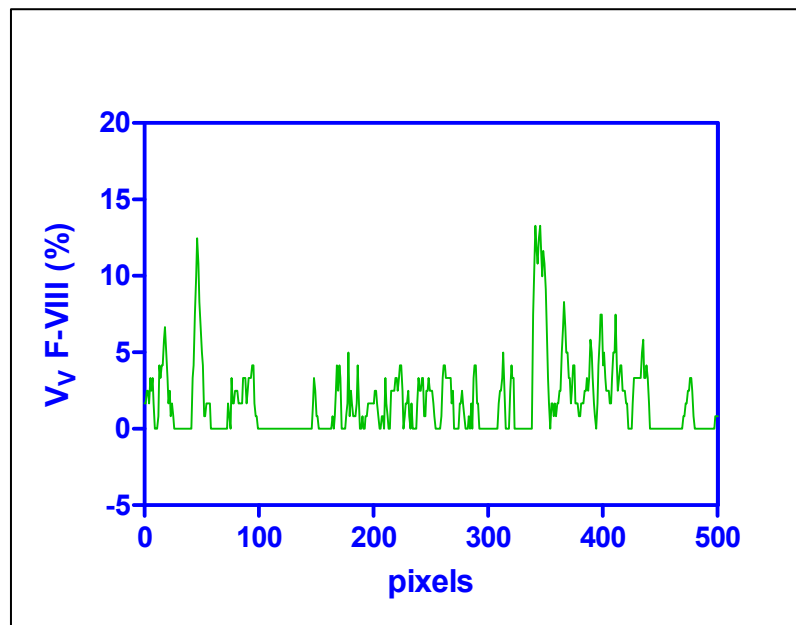


Figura 33. Ejemplo de un corto segmento (500 píxeles) de una serie espacial de V_V F-VIII

La serie es dividida en cajas de igual longitud, n (píxeles). En cada caja de longitud n se ajustan los puntos contenidos en la misma a una recta de regresión según el método de mínimos cuadrados (Fig. 34).

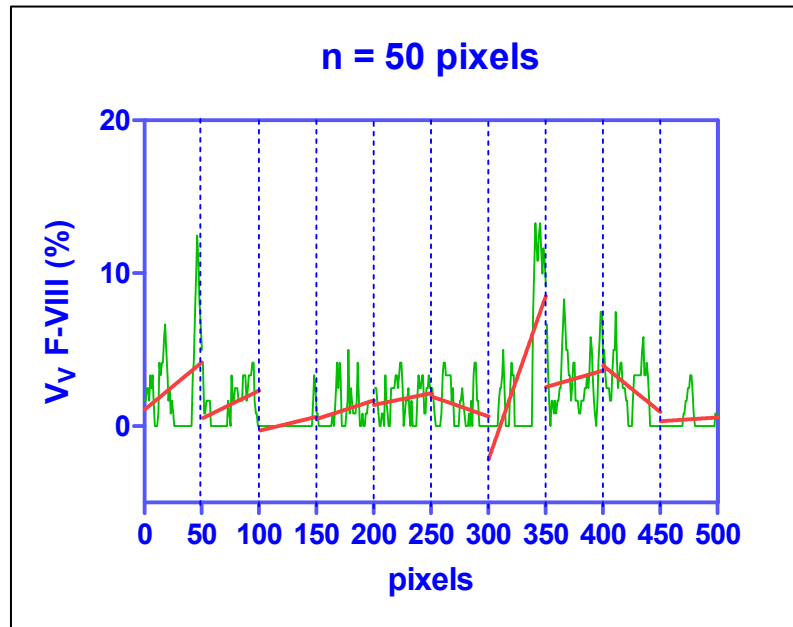


Figura 34. Serie de la figura anterior dividida en columnas de 50 píxeles de ancho. Para cada columna se ajustan los puntos de la serie a un recta de regresión (trazos rojos), por el método de mínimos cuadrados.

La tendencia local en cada caja se define como:

$$y_l(n) = |y(n) - y(t)|$$

donde $y(n)$ es la ordenada del punto original e $y(t)$ la del punto sobre la recta de regresión (Fig. 35)

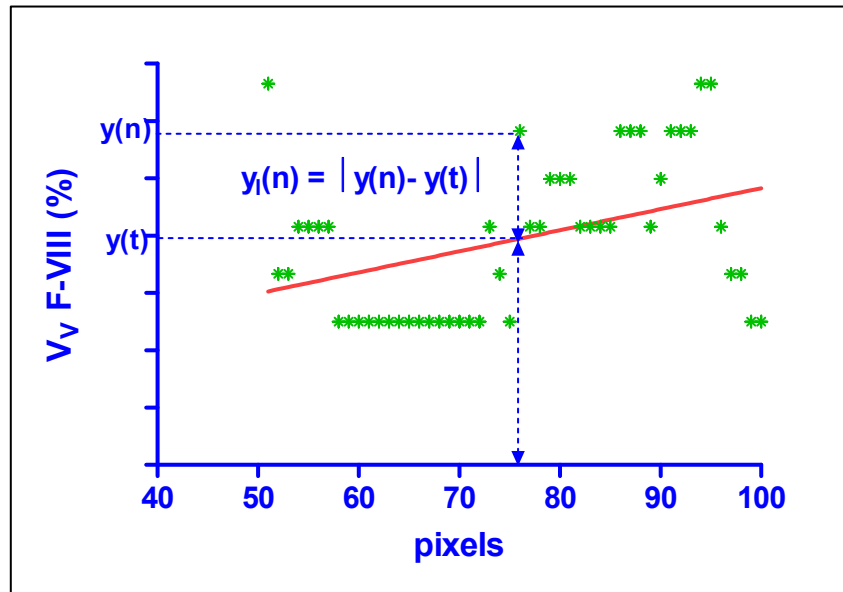


Figura 35. Mayor detalle de la gráfica anterior donde se observan los puntos y la correspondiente recta de regresión en la columna que vá de los píxeles 50 a 100. Se indica también el valor de la tendencia local $y_1(n)$ (ver texto).

Se calcula la media de $y_1(n)$ sobre todos los puntos de la caja y su respectiva varianza. A continuación se estima el promedio de las varianzas para todas las cajas de un tamaño l : $F_d(l)$. Se repiten los pasos hasta aquí descritos variando el tamaño n de la caja (Fig. 36).

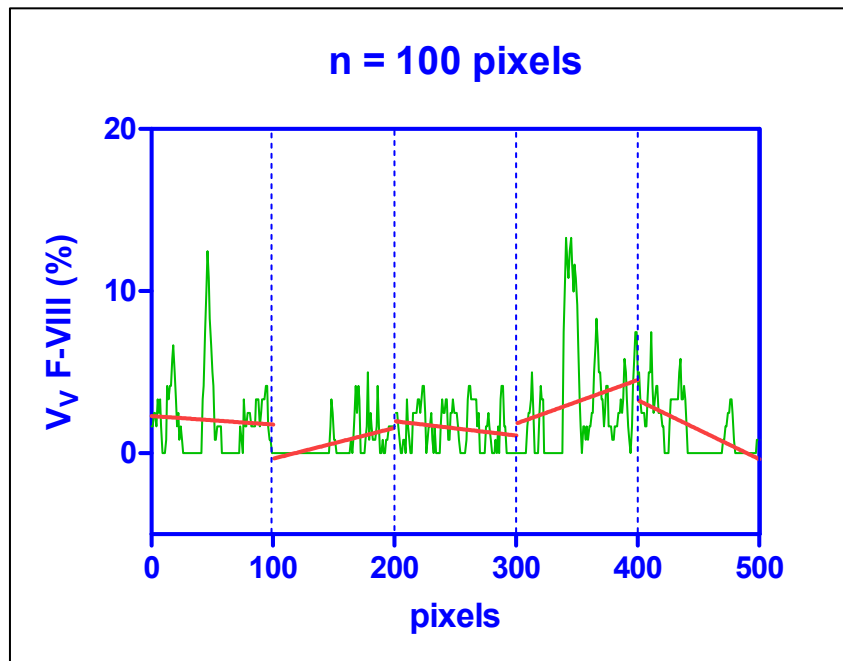


Figura 36. La misma serie de figuras anteriores dividida en columnas de 100 píxeles de ancho. Para cada columna se ajustan los puntos de la serie a un recta de regresión (trazos rojos), por el método de mínimos cuadrados.

Se obtiene una serie de varianzas $F_d(l_i)$ siendo l el tamaño de la caja (50, 100, 150, etc., píxeles). Observándose que las $F_d(l_i)$ escalan con respecto a l de la forma:

$$F_d(l) \sim l^\alpha$$

Si se representa $\log [F_d(l)]$ en función de $\log [l]$, se obtiene una recta de regresión cuya pendiente es α (coeficiente de Hurst). Las correlaciones de largo rango vienen dadas por $\alpha \approx 1.00$; si $\alpha \approx 0.5$, no existen correlaciones de largo rango (Goldberger et al. 2002) (Fig. 37).

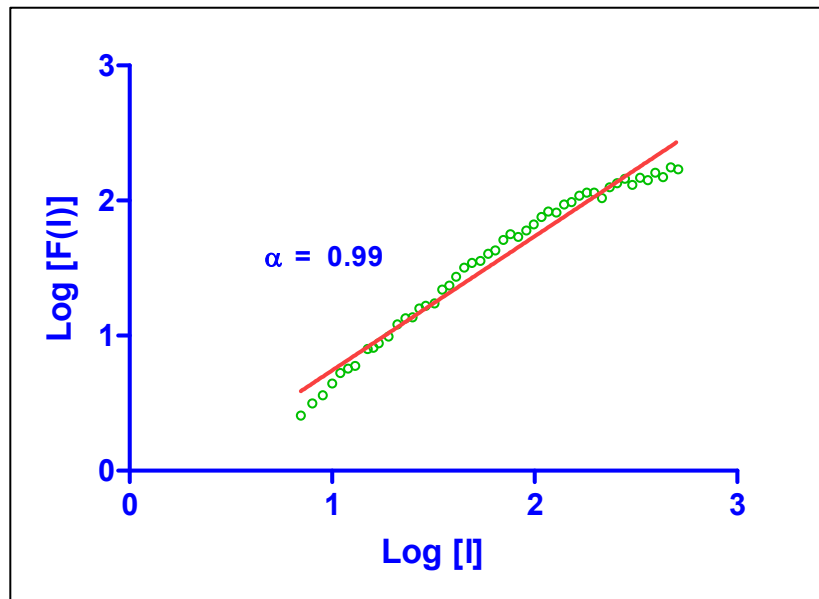


Figura 37. Representación de $F_d(l)$ en función de l , gráfico log-log. Los puntos resultantes se ajustan a una recta de regresión cuya pendiente es $\alpha = 0.99$, esta pendiente se denomina coeficiente de Hurst, e indica la presencia de correlaciones de largo rango en la serie de datos al tener un valor muy próximo a 1.

Un modo de contrastar el coeficiente α de una serie de datos, consiste en aplicar el análisis DFA a la serie real y a un conjunto de series de datos subrogados. Si para los datos reales, $\alpha_1 \approx 1.00$ y para los subrogados $\alpha_2 \approx 0.50$ y además α_1 y α_2 difieren significativamente, se puede asegurar que la serie real tiene correlaciones a larga distancia (Fig. 38).

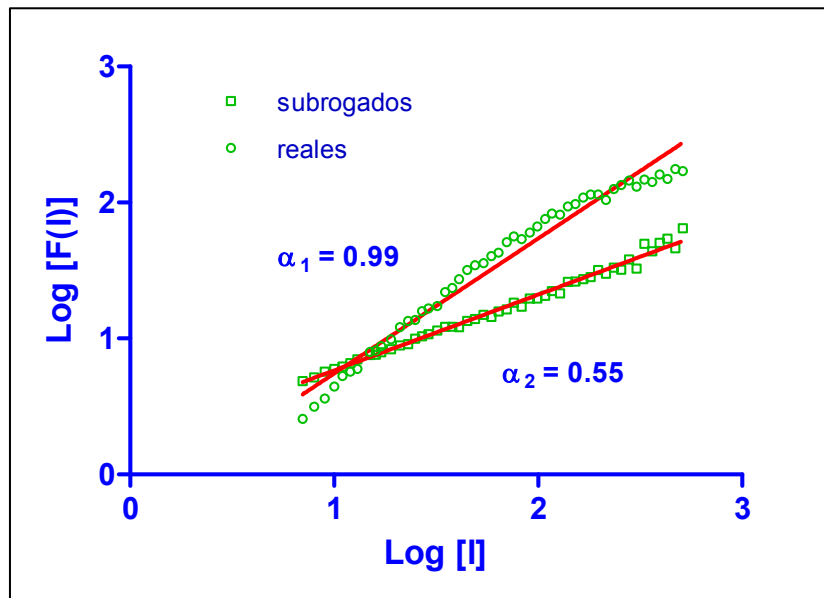


Figura 38. Comparación del análisis DFA para una serie de datos reales y sus subrogados. Se observa que el coeficiente de Hurst para la serie subrogada (α_2) es próximo a 0.5 y significativamente menor que el de la serie real (α_1). Se deduce que las correlaciones de largo rango de la serie real son relevantes.

4.6. Controles negativos. Series totalmente aleatorias

El método de las series subrogadas permite hacer comparaciones entre los datos reales y los mismos datos cuya secuencia se ha aleatorizado. Otro tipo de control negativo se consigue construyendo una serie artificial totalmente aleatoria (serie de números al azar distribuidos uniformemente sobre un eje X) pudiéndola comparar con la serie real para verificar si esta última sigue o no un modelo no lineal.

Se produjeron series de ruido uniforme (u-noise) de longitud similar a las series espaciales reales y con unos rangos y valores medios del atractor también semejantes a los de las series reales. Para ello se empleó el programa “matrchaos” (M. Rosenstein, Canton MA, USA) que permite construir series de ruido uniforme con parámetros prefijados mediante la generación de números aleatorios distribuidos a lo largo del eje X simulando así una serie espacial (Fig. 39).

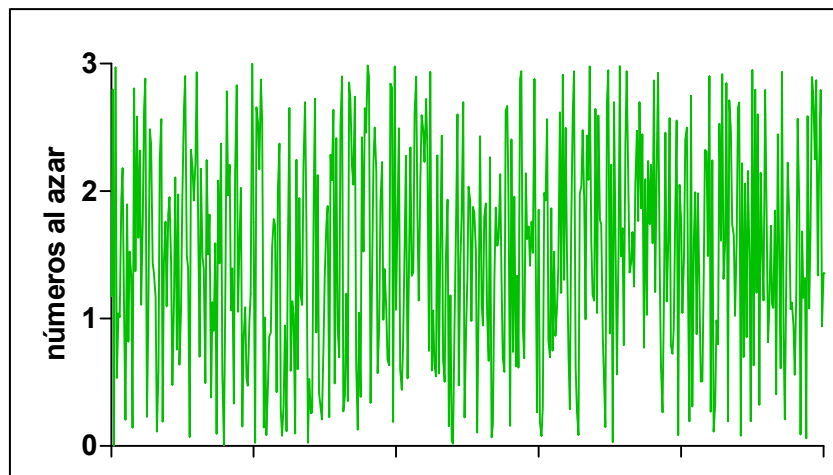


Figura 39. Serie de números al azar situados sobre un eje longitudinal, constituyen un ejemplo de ruido uniforme (u-noise), se trata de datos puramente estocásticos (caos de alta dimensión).

Las series de u-noise se tratan de modo análogo a las series espaciales objeto de estudio: estimación de D_2 , coeficiente α , etc. Los resultados deberán manifestar la existencia de caos de alta dimensión: no convergencia de D_2 y $\alpha \approx 0.5$.

4.7. Patrones fractales del lecho vascular

4.7.1. Dimensión fractal (Box counting)

La estimación de dimensiones fractales por “box counting” se efectúa mediante la superposición sobre la imagen problema de diversas retículas de tamaño decreciente (tamaño de caja) y el subsiguiente contaje para cada retícula del número de cajas que contienen píxeles de la imagen (las cajas con píxeles corresponden al número de partes de la imagen) (Smith, Jr. et al. 1996). A continuación, se recopilan los datos para cada caja de cada retícula (el tamaño de retícula puede ser especificado por el usuario o calculado automáticamente). El proceso se esquematiza en la Figura 40:

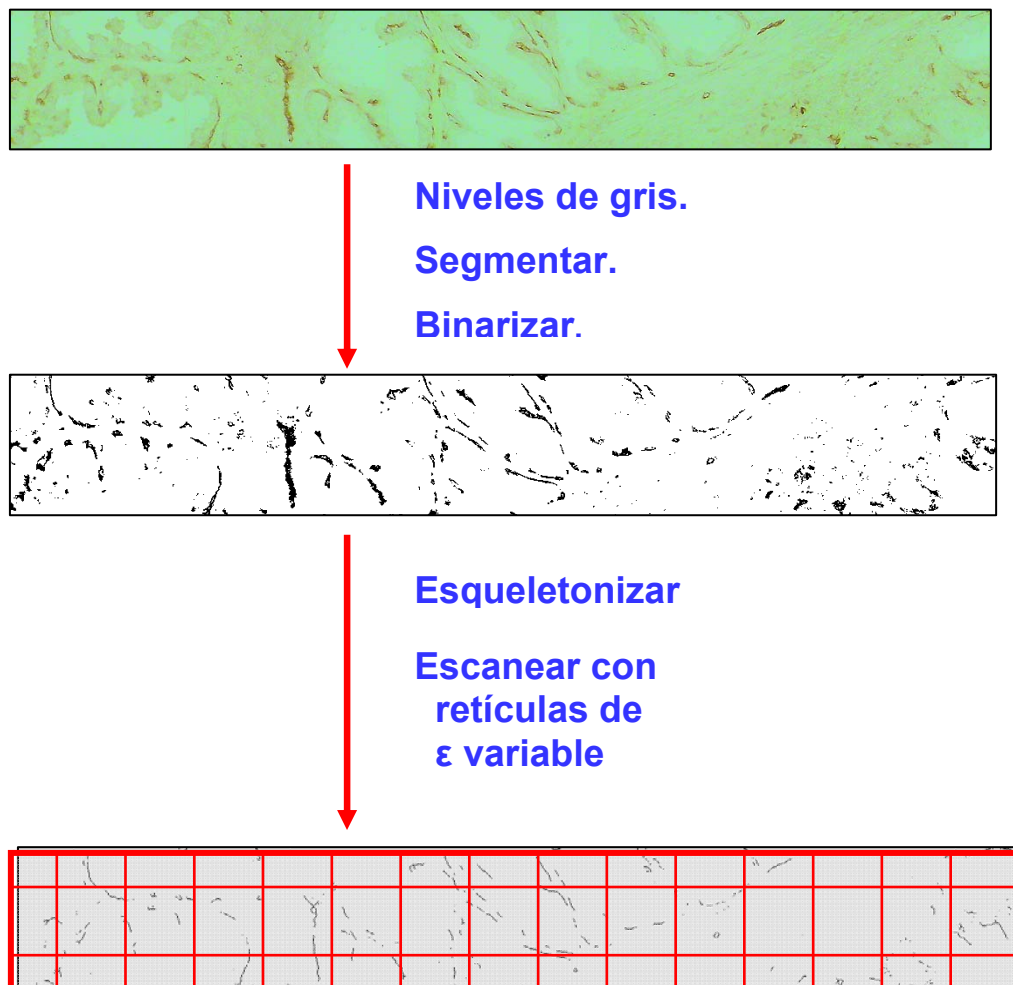


Figura 40. Procesamiento de una serie inmunoteñida para Factor-VIII para la obtención de dimensión fractal por box counting. La imagen se segmenta y binariza y a continuación se esqueletoniza para obtener elementos lineales de 1 píxel de espesor. A la imagen así procesada se la superponen retículas de tamaño o escala (ϵ) variable, en las que se cuenta el número de píxeles.

La dimensión fractal por box counting (D_B), a menudo identificada con la dimensión de Hausdorff, es el valor absoluto de la pendiente de la recta de regresión representada en una gráfica log-log, entre el tamaño de caja (escala) y el número de cajas ocupadas por píxeles de la estructura escaneada (Fig. 41). Según la terminología multifractal (Takayasu 1990), D_B equivale a D_0 , donde D_0 es la dimensión fractal para el momento $q = 0$, también denominada dimensión de capacidad.

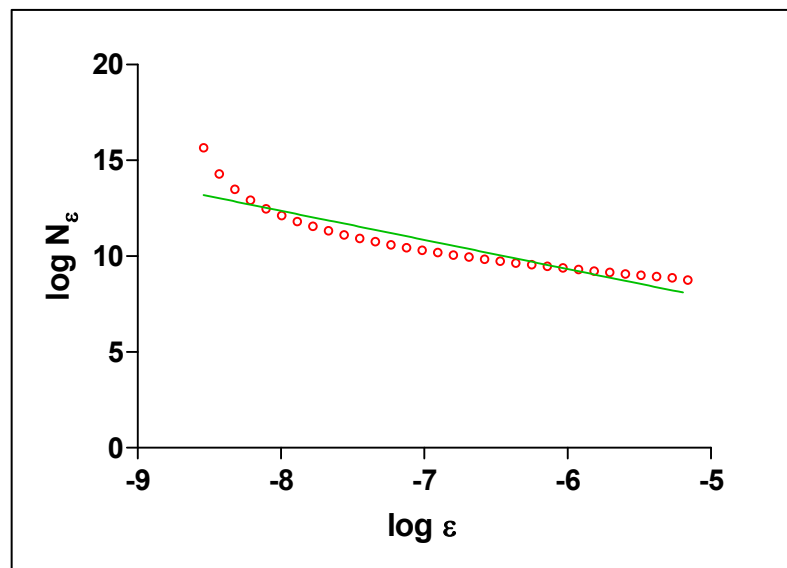


Figura 41. Gráfica Log-Log que muestra el ajuste a una recta de regresión de la correlación entre el número de retículas ocupadas por píxeles en cada escala (N_ε) y la respectiva escala (ε). La pendiente de esta recta estima la D_0 .

D_0 será igual al límite negativo del cociente entre el log del número de cajas a una cierta escala y el log de esa escala: $D_0 = -\lim[\log N_\varepsilon / \log \varepsilon]$ (Smith, Jr. et al. 1996).

4.7.2. Lacunaridad

La lacunaridad (Λ) hace referencia a la cantidad de espacios vacíos (textura visual), presentes en una imagen (Plotnick et al. 1996). Se considera Λ como una estimación de la heterogeneidad o invarianza traslacional o rotacional en una imagen. La medida de Λ es un complemento a las dimensiones fractales en la caracterización de patrones extraídos de imágenes digitales.

La lacunaridad se calcula como la variación de la densidad de píxeles para diferentes tamaños de caja, empleando el coeficiente de variación (CV) de la distribución de píxeles: se cuenta primeramente el número de píxeles para cada caja superpuesta sobre la imagen a una escala ε durante el proceso de box counting. Luego, para cada ε , se calcula el CV^2 a partir de la desviación estándar (σ) y la media (μ) del número de píxeles por caja: $\Lambda_\varepsilon = (\sigma/\mu_\varepsilon)^2$

4.8. Espectro multifractal del lecho vascular

Las señales monofractales son homogéneas, en el sentido de que presentan las mismas propiedades de escala a través de toda la señal. En contraposición, los multifractales son estructuras que presentan múltiples reglas de escalado en vez de una única escala global (Mandelbrot 1997; Reljin and Reljin 2002).

Los monofractales pueden ser indexados por un exponente global de Hölder (H) (Halsey et al. 1986) mientras que las señales multifractales, pueden descomponerse en muchos subconjuntos caracterizados por diferentes exponentes locales de Hölder (h), que cuantifican el comportamiento local y singular y que se relacionan con el escalado local de la serie temporal (o espacial). Así, las señales multifractales requieren muchos exponentes para la plena caracterización de sus propiedades de escala (Ivanov et al. 1999). La distribución de la microvascularización en la próstata es lo suficientemente compleja para que su patrón estructural pueda presentar múltiples reglas de escalado en lugar de una única escala global. Es decir, el estudio de los microvasos sería susceptible de ser abordado mediante el análisis multifractal

Las propiedades estadísticas de los diferentes subconjuntos caracterizados por los diversos exponentes h pueden ser cuantificadas por la función $D(h)$, donde $D(h_0)$ es la dimensión fractal del subconjunto de la serie temporal (o espacial) caracterizada por un exponente local de Hölder h_0 . El exponente local h se puede evaluar mediante la obtención del módulo de los valores máximos de una transformada wavelet (WT) aplicada a cada punto de la serie (Muzy et al. 1993). A continuación se estima el escalado de la función de partición $Z_q(a)$, definida como la suma de las q potencias de los máximos locales de los coeficientes del módulo de la WT a una determinada escala a . Para escalas pequeñas, $Z_q(a) \approx a^{\tau(q)}$. Los exponentes $\tau(q)$ pueden revelar diversos aspectos de la dinámica de la serie. Las señales monofractales manifiestan un espectro $\tau(q)$ lineal. Para las señales multifractales, $\tau(q)$ es una función no lineal.

4.9. Análisis multifractal mediante wavelets.

La transformada continua wavelet (WT) es una técnica matemática introducida en el análisis de señales al principio de la década de los 80 (Arneodo et al. 2008). Las WT han sido consideradas desde hace tiempo como un “microscopio matemático” bien adaptado para revelar la jerarquía que gobierna la distribución espacial de singularidades en las medidas multifractales (Goldberger et al. 2002).

La WT es una herramienta de análisis espacio-escala que consiste en señales de tipo wavelet construidas a partir de una función única, la wavelet analizadora ψ , mediante traslaciones y dilataciones. La WT de una función real f es definida como sigue, donde x_0 es el parámetro de espacio y a (>0) el de escala:

$$T_{\psi}[f](x_0, a) = \frac{1}{a} \int_{-\infty}^{+\infty} f(x) \psi\left(\frac{x - x_0}{a}\right) dx$$

En el presente caso, la función f sobre la que se aplica la transformación WT, T_{ψ} , es la serie espacial donde V_V Factor-VIII = f (píxeles). A efectos del análisis de la regularidad de una función, no es preciso considerar todo el conjunto de la WT, basta concentrarse sobre el esqueleto de la WT definido por los máximos de su módulo (WTMM). Éstos se definen, para cada escala a , como los máximos locales de $|T_{\psi}[f](x, a)|$ considerada como función de x .

Los WTMM se disponen sobre curvas conectadas (líneas de máximos) en el semiplano espacio-escala (o tiempo-escala). Se puede definir $\mathcal{L}(a_0)$ como el conjunto de todas las líneas de máximos que existen a escala a_0 y que contienen máximos para cualquier escala $a \leq a_0$ (Fig. 42).

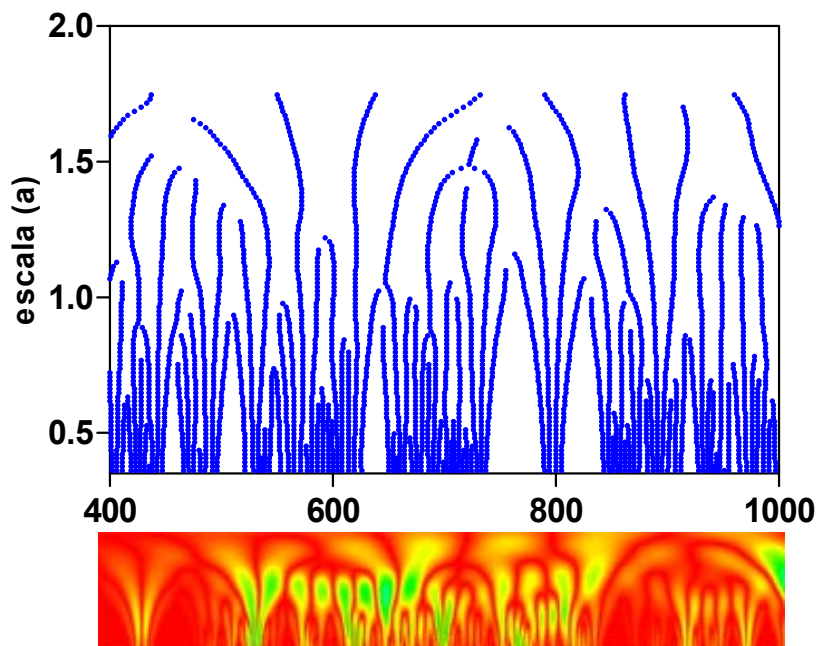


Figura 42. En la porción superior de la imagen se observa la gráfica de las líneas de máximos, $\mathcal{L}(a_0)$, de una transformada wavelet de una serie espacial de V_V Factor-VIII, el eje de abscisas expresa los píxeles ocupados por la serie espacial y el de ordenadas las diversas escalas consideradas (a). En la porción inferior de la imagen se muestra el análisis WT en código de colores. Los ejes X e Y representan las mismas magnitudes (espacio y escala) que la gráfica. Los colores más brillantes indican valores mayores de la amplitud de las wavelets, que se corresponden con mayores fluctuaciones de los valores de la V_V para una escala y en una localización determinadas.

La fuerza de una singularidad de una función f en el punto x_0 viene dada por el exponente de Hölder $h(x_0)$. Se puede probar fácilmente que el comportamiento local de f es reflejado por una WT que se comporta localmente como:

$$T_\psi[f](x_0, a) \sim a^{h(x_0)}$$

Por tanto se puede extraer el exponente $h(x_0)$ como la pendiente de una gráfica log-log de la amplitud de la WT contra la escala a .

A continuación se estima el escalado de la función de partición $Z(q,a)$, definida como la suma de las q potencias de los máximos locales de los coeficientes del módulo de la WT a escala a . Para escalas pequeñas, $Z(q,a) \approx a^{\tau(q)}$.

Los exponentes $\tau(q)$ pueden revelar diversos aspectos de la dinámica de la serie temporal. Como se indicó antes, las señales monofractales manifiestan un espectro $\tau(q)$ lineal, siendo: $\tau(q) = qH - 1$, donde H es el exponente global de Hölder.

Para las señales multifractales, $\tau(q)$ es una función no lineal. La dimensión fractal $D(h)$, indicada más arriba, se relaciona con $\tau(q)$ a través de la transformada de Legendre: $D(h) = qh - \tau(q)$.

Se puede representar gráficamente $D(h)$ como función de h . La gráfica es una parábola que indica el espectro multifractal. Cuanto mayor es la multifractalidad, la parábola es más amplia. Para los monofractales la gráfica colapsa en una singularidad (un solo punto).

A título de ejemplo, en la Figura 43 se representa el espectro de singularidad para la frecuencia cardíaca (Ivanov et al. 1999). En el caso de sujetos normales y de pacientes con insuficiencia cardíaca, se observa que en los casos patológicos la multifractalidad disminuye notablemente. La insuficiencia cardíaca grave muestra un rango mucho más estrecho de valores de h , con dimensiones fractales distintas de cero, lo que indica la pérdida de complejidad multifractal con una enfermedad potencialmente mortal.

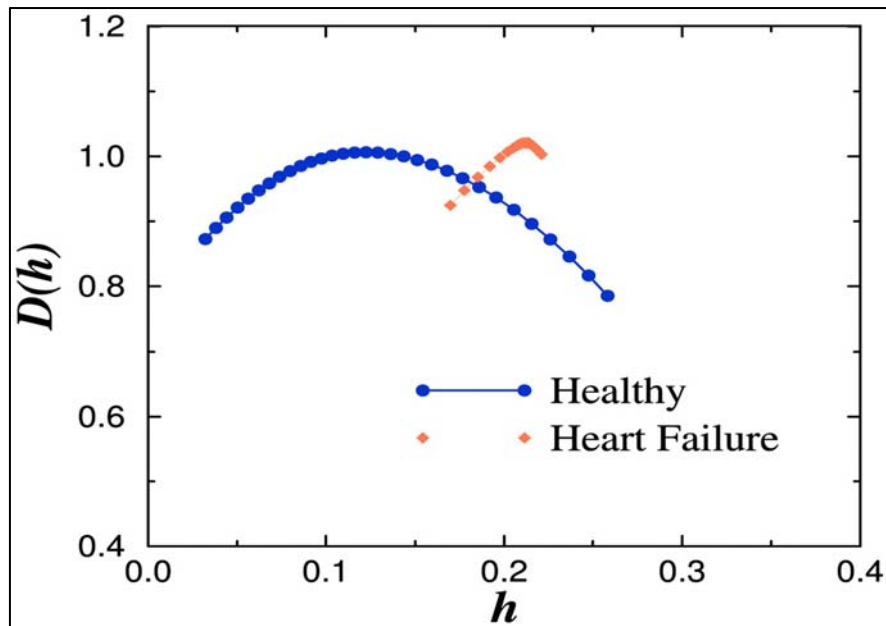


Figura 43. Espectro de singularidad de la frecuencia cardíaca en corazón normal y patológico. La función $D(h)$ mide la dimensión fractal del subconjunto de la señal caracterizado por un exponente local de Hölder h . Es de destacar el amplio rango de valores h con dimensiones fractales distintas de cero para el corazón sano, lo que indica la existencia de una dinámica multifractal. A la inversa, los datos de un paciente con insuficiencia cardíaca muestran un rango más estrecho de valores h con dimensiones fractales distintas de cero, indicando pérdida de complejidad multifractal (tomado de Goldberger A L et al. PNAS 2002;99:2466-2472).

5. HERRAMIENTAS UTILIZADAS

5.1. Análisis lineal (estereología)

La estimación de los parámetros estereológicos (L_V , $rdif$, dvm y V_V Factor-VIII) se efectuó utilizando un microscopio Olympus equipado con un objetivo de 20x y a un aumento final de 300x empleando el software estereológico CAST-GRID (Interactivision, Silkeborg, Denmark).

5.2. Análisis no lineal

1.- Se utilizó el software CSPW (Applied Nonlinear Sciences, LLC, Del Mar, CA, USA) para analizar tanto los datos reales como los subrogados. Este programa consiste en una colección de algoritmos que permiten la estimación de la función de autocorrelación y del espectro de potencias, AMI, τ_{opt} , dimensiones de inclusión y reconstrucción de atractores.

2.- El software Matrchaos (M. Rosenstein, Canton, MA, USA) se empleó para la estimación de las dimensiones de correlación (D_2), la generación de series de datos subrogados y la elaboración de series de ruido uniforme como controles negativos (Rosenstein et al. 1993).

3.- Se utilizó el software DFA obtenido de Physionet (Goldberger et al. 2000) para la estimación del coeficiente α o de Hurst, para el estudio de las correlaciones de largo rango tanto en los datos reales como en las series subrogadas.

4.- El programa FracLac (Karperien, A., FracLac for ImageJ, version 2.5) se ha utilizado para la estimación de D_0 por box counting y de la lacunaridad.

5.- Para el análisis multifractal se ha utilizado el software "multifractal" obtenido de Physionet (Goldberger et al. 2000).

6. RESUMEN DE LOS PARÁMETROS UTILIZADOS

En las Tablas 1 y 2 se expresan de modo resumido las herramientas lineales y no lineales empleadas en los distintos grupos utilizados en el presente estudio.

Tabla 1

casos	zona	orientación	L_V	rdif	dvm	V_V Factor VIII
CTR	ZT	X	+	+	+	+
		Y	+	+	+	+
		Z	+	+	+	+
	ZP	X	+	+	+	+
		Y	+	+	+	+
		Z	+	+	+	+
	ZC	X	+	+	+	+
		Y	+	+	+	+
		Z	+	+	+	+
	IUR		+	+	+	+
HBP		+	+	+	+	
Ca		+	+	+	+	

Tabla resumen de los parámetros estereológicos lineales estimados en controles (CTR), hiperplasia benigna de próstata (HBP) y carcinoma prostático (Ca). Para el grupo CTR se indican: las zonas prostáticas estudiadas (ZT, ZP y ZC), la próstata entera muestreada al azar de modo isotrópico y uniforme (IUR) y las orientaciones (X, Y, Z). Se estimaron: densidad de longitud de microvasos: L_V ; radio de difusión vascular: rdif; diámetro vascular medio: dvm; fracción de volumen del estroma ocupado por inmunorreactividad para Factor-VIII (V_V Factor VIII). Las casillas marcadas con + indican que en ese caso se estimó el parámetro correspondiente.

Tabla 2

casos	zona	orientación	dE	τ_{opt}	D_2 (global)	D_2 (dE)	α	D_0	Λ	$\tau(q)$	D(h)
CTR	ZT	X real	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		X subrogado	+	+	-	-	+	-	-	+	+
		Y real	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Y subrogado	+	+	-	-	+	-	-	+	+
		Z real	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Z subrogado	+	+	-	-	+	-	-	+	+
	ZP	X real	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		X subrogado	+	+	-	-	+	-	-	+	+
		Y real	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Y subrogado	+	+	-	-	+	-	-	+	+
		Z real	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Z subrogado	+	+	-	-	+	-	-	+	+
	ZC	X real	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		X subrogado	+	+	-	-	+	-	-	+	+
		Y real	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Y subrogado	+	+	-	-	+	-	-	+	+
		Z real	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		Z subrogado	+	+	-	-	+	-	-	+	+
IUR	real	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	subrogado	+	+	-	-	+	-	-	+	+	
HBP	real	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	subrogado	+	+	-	-	+	-	-	+	+	
Ca	real	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	subrogado	+	+	-	-	+	-	-	+	+	
u-noise		real	+	+	-	-	+	-	-	+	+

Tabla resumen de los parámetros no lineales estimados en controles (CTR), hiperplasia benigna de próstata (HBP), carcinoma prostático (Ca) y ruido uniforme (u-noise). Para el grupo CTR se indican: las zonas prostáticas estudiadas (ZT, ZP y ZC), la próstata entera muestreada al azar de modo isotrópico y uniforme (IUR) y las orientaciones (X, Y, Z). En todos los grupos las estimaciones se efectuaron tanto en los datos reales como en los subrogados. Se estimaron: dimensión global de inclusión: dE; retardo óptimo: τ_{opt} ; dimensión de correlación global: D_2 (global); dimensión de correlación local a la dE óptima: $D_2(dE)$; coeficiente de Hurst: α ; dimensión fractal por box counting: D_0 ; lacunaridad Λ ; espectro multifractal: $\tau(q)$; espectro de singularidad: D(h). Las casillas marcadas con + indican que en ese caso se estimó el parámetro correspondiente. En las series subrogadas y en las de u-noise no se estimaron D_2 (global), $D_2(dE)$, D_0 y Λ porque no se produjo convergencia a valores constantes de dichos parámetros.

7. COMPARACIONES ESTADÍSTICAS

En los controles se compararon los parámetros estimados (lineales y no lineales) en las tres regiones de la próstata normal (ZT, ZC y ZP), en las tres orientaciones prefijadas (X, Y, Z) para cada región y en los cortes IUR.

Los resultados obtenidos en HBP y carcinoma se compararon con la ZT y la ZP de los controles, habida cuenta de que la HBP se origina exclusivamente en la ZT, y el carcinoma se localiza en un 90% de los casos en ZP.

Los resultados de todos los grupos fueron comparados con las series de ruido construidas como controles negativos.

La comparación entre datos reales y datos subrogados tanto en controles como en casos patológicos, se efectuó mediante el análisis de intervalos de confianza (CI = 95%).

Para la realización de comparaciones estadísticas, los parámetros obtenidos para cada serie espacial analizada se promediaron sobre el total de campos, cortes y casos en cada grupo. Se obtuvo la media \pm SD para cada parámetro estudiado y las diferencias en el grupo control entre zonas y orientaciones fueron evaluadas por ANOVA. La comparación entre cada par de medias fue realizada empleando el test de Student-Newman-Keuls. Para la comparación entre controles y grupos patológicos (ZT con HBP, ZP con Ca y HBP con Ca) se utilizó el test de la t de Student. El nivel de significación para todas las comparaciones fue $p < 0.05$.

Los test estadísticos se efectuaron mediante el programa SPSS versión 9.0 (SPSS Inc., Chicago, ILL, USA) y las gráficas se elaboraron con el software Prism 5.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

8. FOTOGRAFÍA

Las imágenes se captaron con el programa DP Controller 2.1.1.183 (Olympus Co., USA) y su procesamiento se efectuó con Adobe Photoshop CS, versión 8.0.1 (Adobe Systems Inc., San José, CA, USA).

RESULTADOS

1. RESULTADOS CUALITATIVOS

Se observa inmunorreactividad para Factor-VIII en vasos sanguíneos, en todas las localizaciones de la próstata normal, independientemente del calibre, (Fig. 44 a). Los vasos inmunoteñidos forman un denso plexo en torno a la uretra prostática (Fig. 44 b) y se distribuyen en el estroma de todas las zonas (Fig. 44 c).

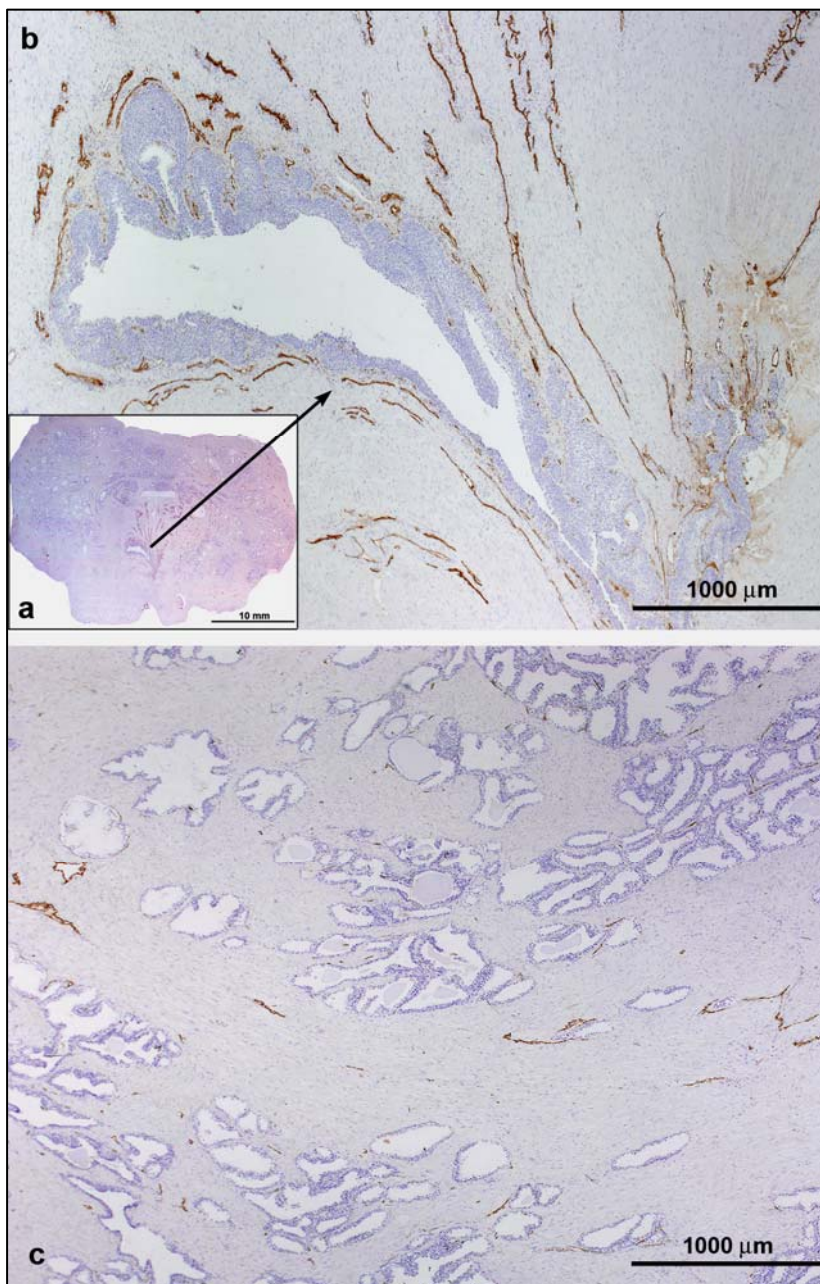


Figura 44. a) Sección transversal de próstata normal, se observa una panorámica de la inmunotinción vascular para Factor-VIII. b) Mayor detalle de la imagen anterior. Se detecta un denso plexo periuretral de vasos inmunorreactivos para Factor-VIII. c) Estroma prostático a la misma magnificación que la imagen anterior. Se visualizan vasos inmunoteñidos para Factor-VIII a nivel del estroma.

En todas las zonas de la próstata normal (ZT, ZP y ZC) se visualizan microvasos inmunorreactivos para Factor-VIII, tanto a nivel periacinar, como en localizaciones estromales más alejadas del epitelio, aunque parecen más abundantes los vasos periacinarios (Fig. 45 a-d). Con frecuencia los microvasos muestran la luz colapsada (Fig. 45 a) aunque ocasionalmente aparecen más dilatados (Fig. 45 c).

Cuando se compara ZT con HBP, se aprecia en HBP una mayor frecuencia de vasos dilatados, tanto periacinarios como estromales (Fig. 46 a,b). Los vasos inmunorreactivos para Factor VIII observados en las próstatas hiperplásicas no manifiestan rasgos morfológicos que los diferencien de los observados en la zona de transición de la próstata normal (Fig. 46 c,d).

Al comparar ZP con Ca, se detecta en Ca una mayor frecuencia de vasos alejados de los acini (Fig. 47 a,b). Salvo por esa circunstancia no se observan cambios morfológicos significativos en los vasos del carcinoma en comparación con los vasos de la zona periférica de la glándula normal.

Si se compara HBP con Ca, se observa así mismo una mayor frecuencia de vasos periacinarios en HBP (Fig. 48 a-e). También parece que los vasos del carcinoma son algo más irregulares y dilatados que los detectados en HBP (Fig. 48 c,e).

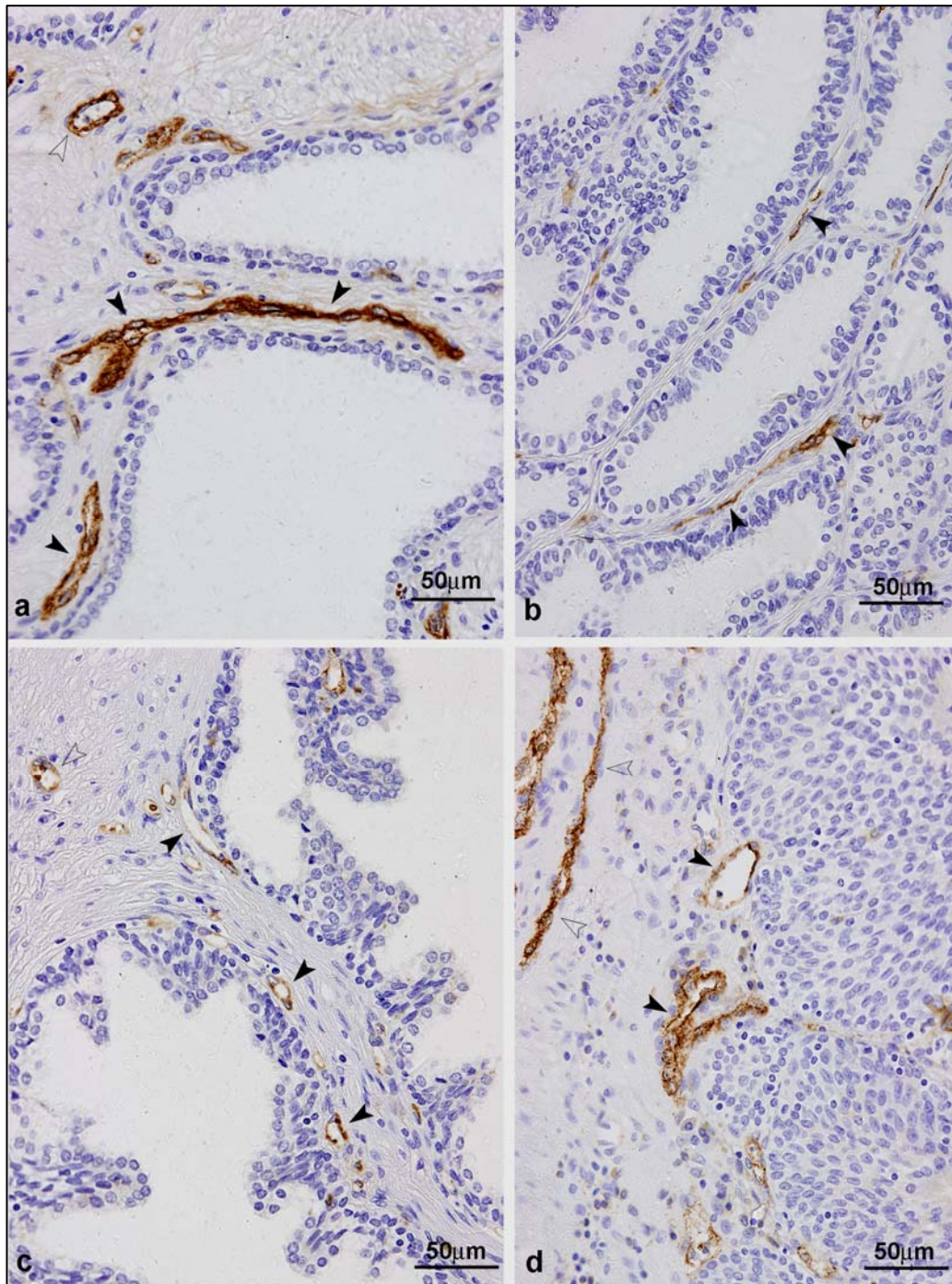


Figura 45. Prostata normal inmunotefida para Factor-VIII. **a)** Zona de transición. Se detectan microvasos periacinares (cabezas de flecha llenas) y estromales (cabeza de flecha vacía). Los primeros muestran la luz colapsada. **b)** Zona periférica, donde se muestran abundantes vasos periacinares (cabezas de flecha llenas). **c)** Zona central con abundantes vasos periacinares de luz dilatada (cabezas de flecha llenas) y alguno estromal (cabeza de flecha vacía). **d)** Región periuretral de la zona de transición. Se visualizan tanto vasos que tocan la basal del epitelio de la uretra (cabezas de flecha llena), como vasos en el estroma más alejado del epitelio (cabezas de flecha vacías).

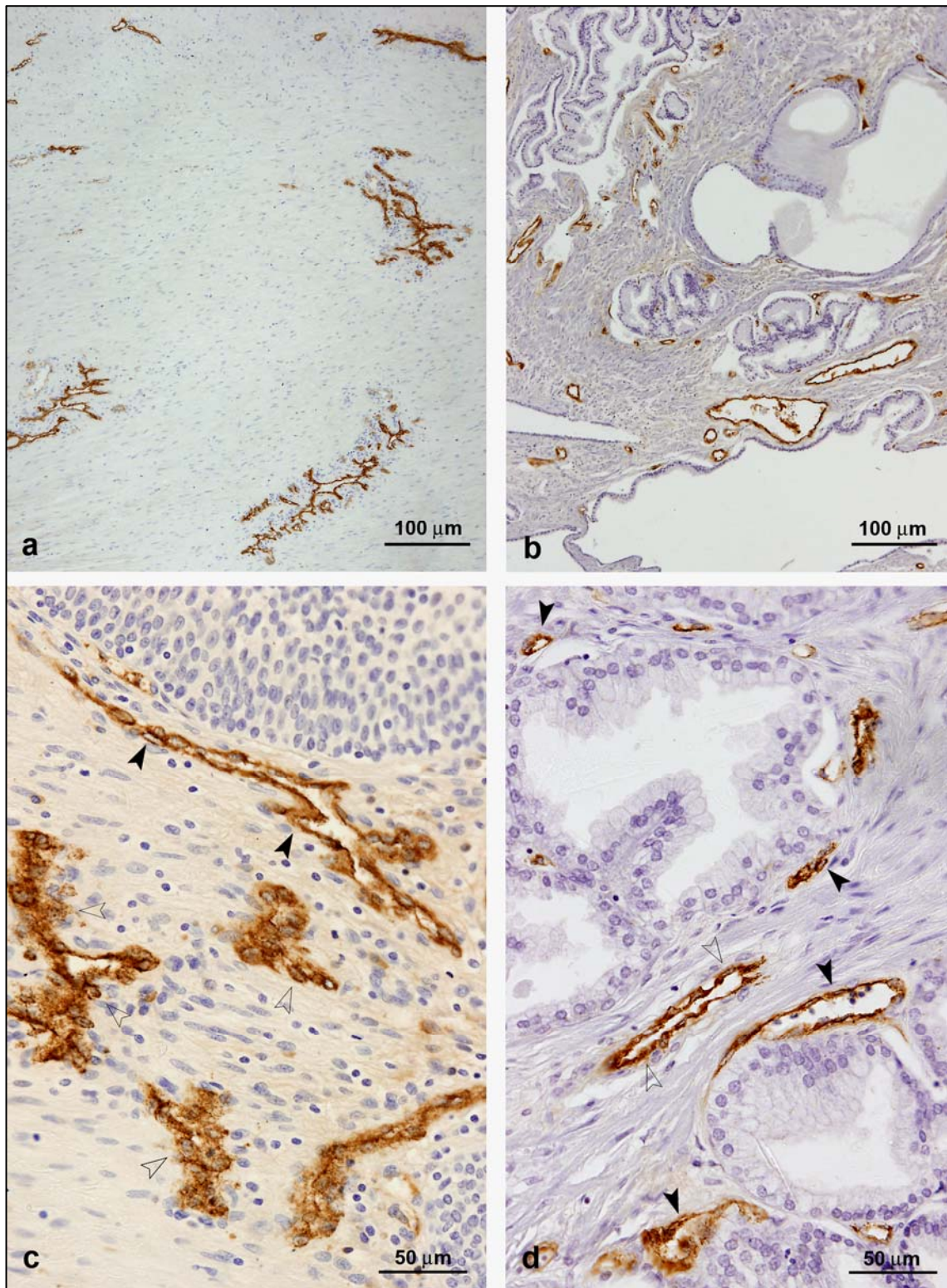


Figura 46. ZT y HBP inmunoteñidas para Factor-VIII. **a)** Zona de transición. Se detectan microvasos estromales colapsados. **b)** HBP, donde se muestran abundantes vasos dilatados periacinares y estromales. **c)** Mayor detalle de región periuretral de ZT, se observan vasos próximos al epitelio (cabezas de flecha llenas) y estromales (cabezas de flecha vacías). **d)** Mayor detalle de HBP. Se visualizan tanto vasos que tocan la basal de los acini (cabezas de flecha llena), como vasos en el estroma más alejado del epitelio (cabezas de flecha vacías) con diversos grados de dilatación.

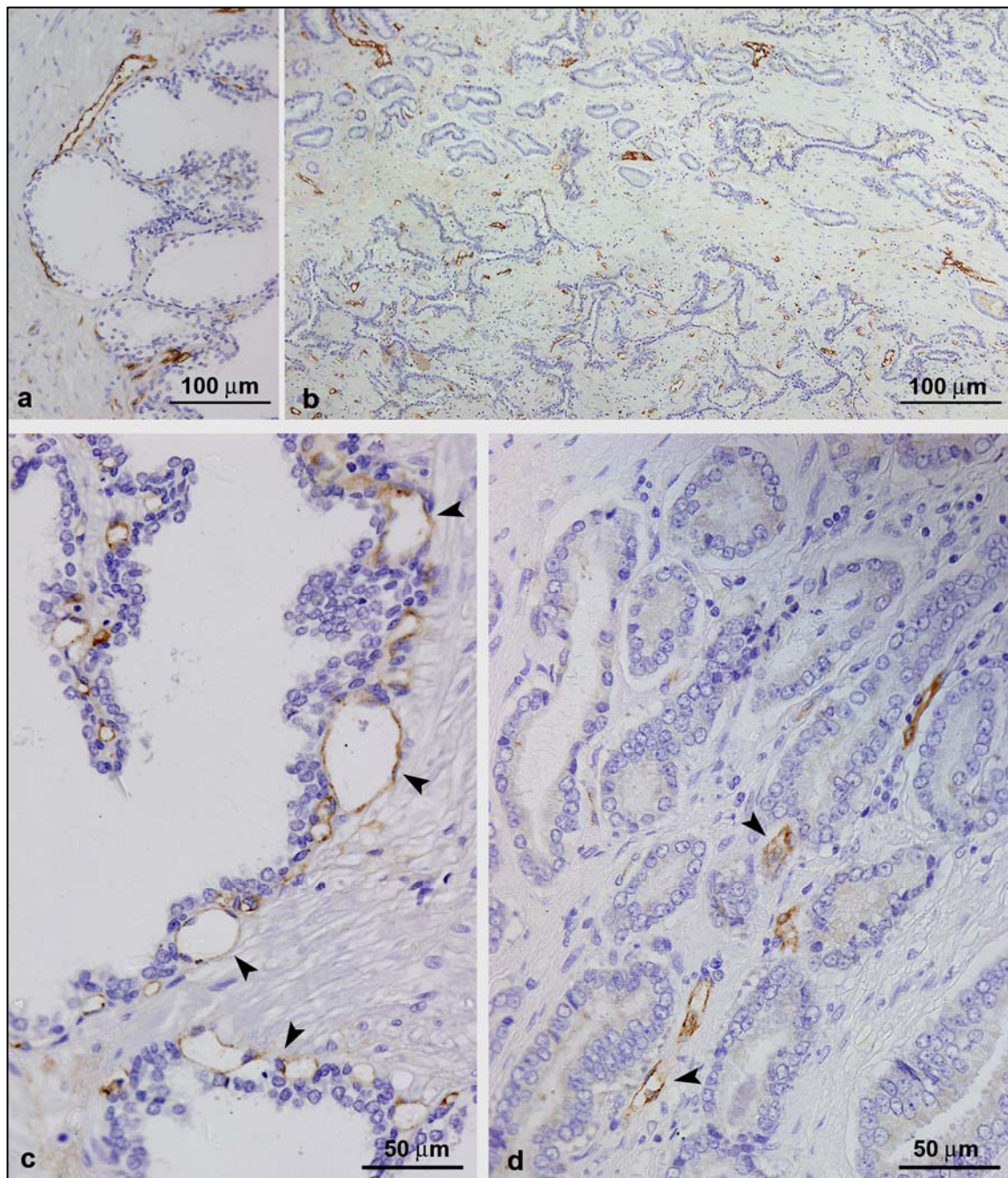


Figura 47. ZP y Ca inmunotefidos para Factor-VIII. **a)** Zona periférica. Se detectan microvasos periacinares moderadamente dilatados. **b)** Ca, donde se muestran frecuentes vasos estromales y muy escasos en la proximidad de las glándulas cancerosas. **c)** Mayor detalle de acini de ZP con vasos dilatados pegados a la basal glandular (cabezas de flecha llenas). **d)** Mayor detalle de Ca. Se visualizan vasos más alejados de los acini (cabezas de flecha llenas) que en el tejido no tumoral de ZP.

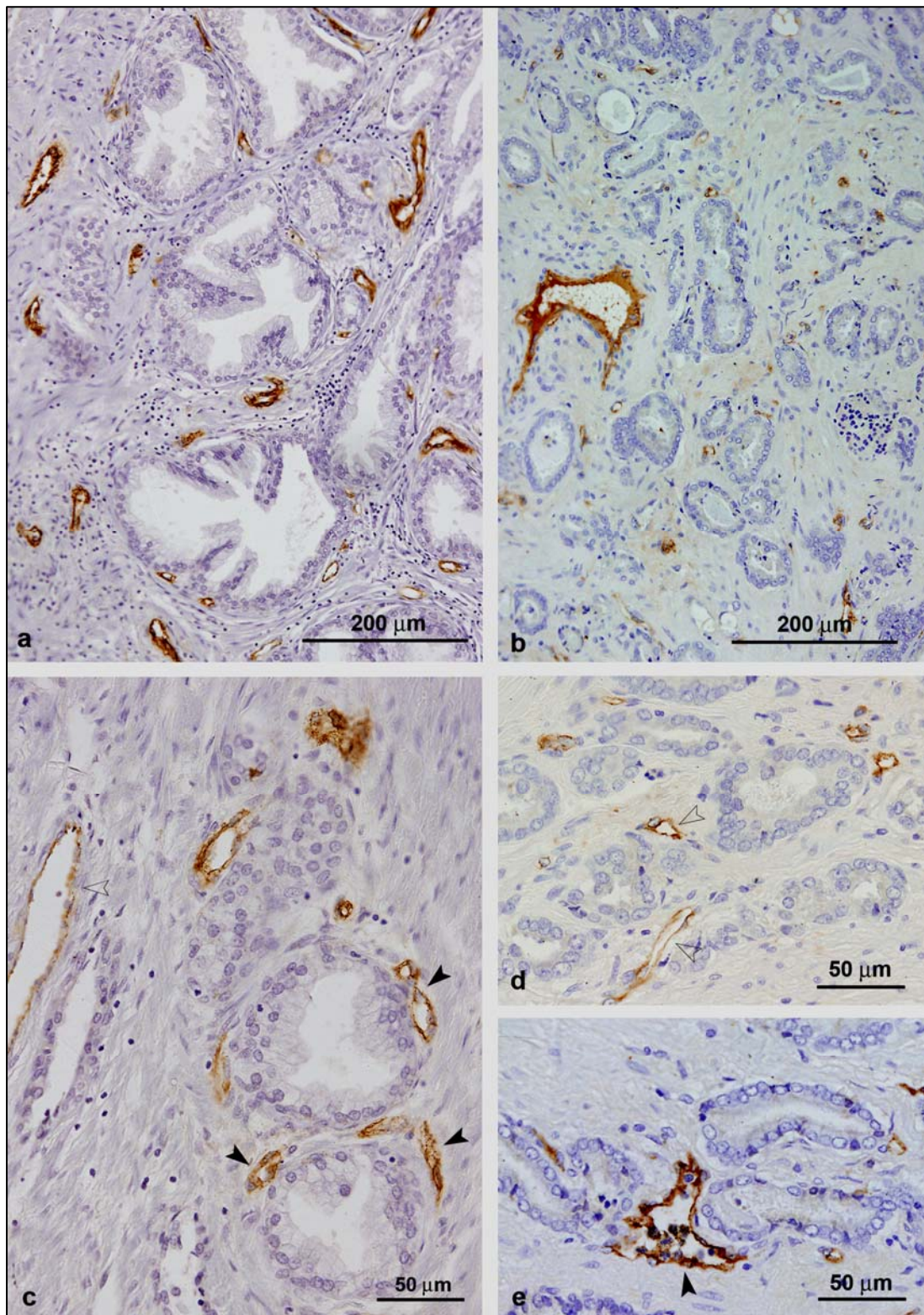


Figura 48. HBP y Ca inmunoteñidos para Factor-VIII. **a)** HBP. Se detectan microvasos periacinares y estromales. **b)** Ca, donde se muestran vasos preferentemente alejados de los acini cancerosos. **c)** Mayor detalle de acini de HBP con vasos dilatados pegados a la basal glandular (cabezas de flecha llenas), también se observan vasos estromales (cabeza de flecha vacía). **d)** Mayor detalle de Ca. Se visualizan vasos alejados de los acini (cabezas de flecha vacías). **e)** Vaso dilatado e irregular (cabeza de flecha llena) en contacto con acini tumorales en un caso de Ca.

2. RESULTADOS CUANTITATIVOS ESTEREOOLÓGICOS

2.1. Isotropía y comparación regional de la estimación de L_V en próstata control

No se detectan diferencias significativas en la L_V entre las zonas de la próstata normal (Fig. 49 a). Así mismo no se observan diferencias significativas de la L_V en relación con la orientación espacial (Fig. 49 b).

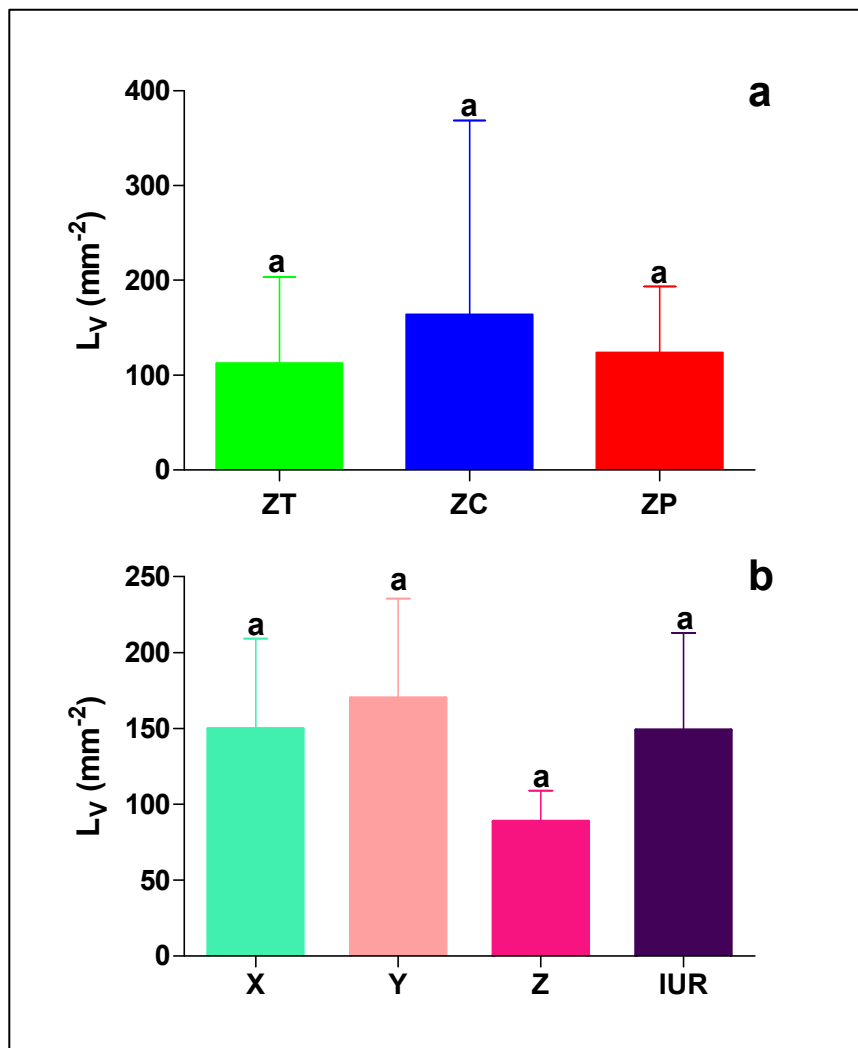


Figura 49. Diagrama de barras expresando los valores medios de la densidad de longitud de microvaso (L_V). **a)** En zona de transición (ZT), zona central (ZC) y zona periférica (ZP) de la próstata normal. **b)** En las tres orientaciones estudiadas (X, Y, Z) y en secciones IUR de la próstata normal. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación, letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos analizados; letras idénticas, ausencia de significación.

2.2. Isotropía y comparación regional de las estimaciones de dvm y rdif en próstata control

No se detectan diferencias significativas en el diámetro vascular medio (dvm) entre las zonas de la próstata normal (Fig. 50 a). Así mismo no se observan diferencias significativas en el dvm con respecto a la orientación espacial (Fig. 50 b).

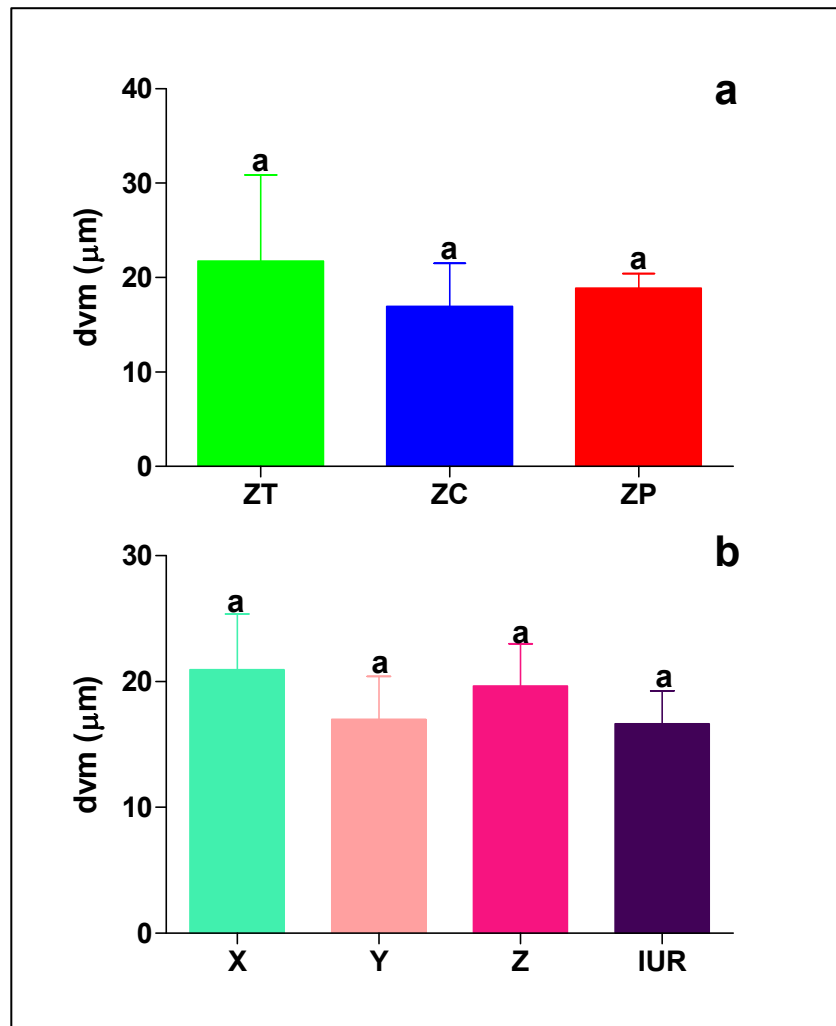


Figura 50. Diagrama de barras expresando los valores medios del diámetro vascular medio (dvm). **a)** En zona de transición (ZT), zona central (ZC) y zona periférica (ZP) de la próstata normal. **b)** En las tres orientaciones estudiadas (X, Y, Z) y en secciones IUR de la próstata normal. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación, letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos analizados; letras idénticas, ausencia de significación.

No se detectan diferencias significativas en el radio de difusión vascular (rdif) entre las zonas de la próstata normal (Fig. 51 a). Tampoco se observan diferencias significativas en el rdif con respecto a la orientación espacial (Fig. 51 b).

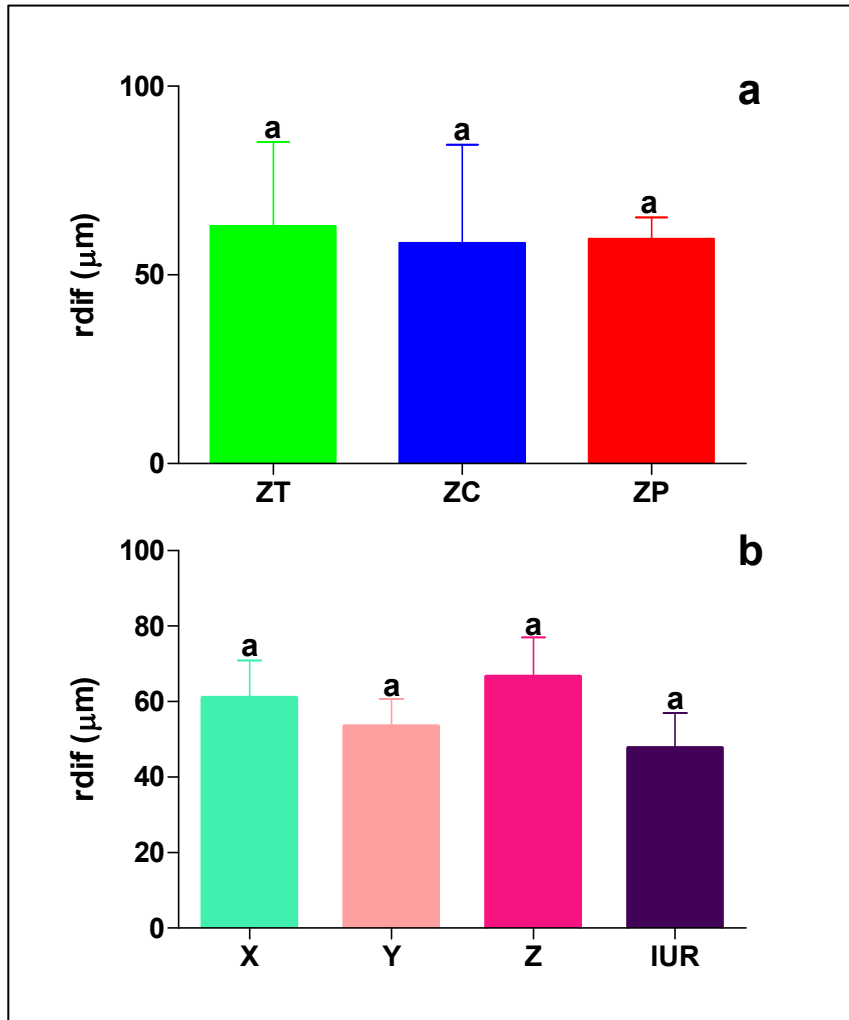


Figura 51. Diagrama de barras expresando los valores medios del radio de difusión vascular (rdif). **a)** En zona de transición (ZT), zona central (ZC) y zona periférica (ZP) de la próstata normal. **b)** En las tres orientaciones estudiadas (X, Y, Z) y en secciones IUR de la próstata normal. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación, letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos analizados; letras idénticas, ausencia de significación.

2.3. Isotropía y comparación regional de la estimación de V_V Factor-VIII en próstata control

No se detectan diferencias significativas en la fracción de volumen para el Factor-VIII (V_V Factor-VIII) entre las zonas de la próstata normal (Fig. 52 a). Tampoco se observan diferencias significativas en V_V Factor-VIII con respecto a la orientación espacial (Fig. 52 b).

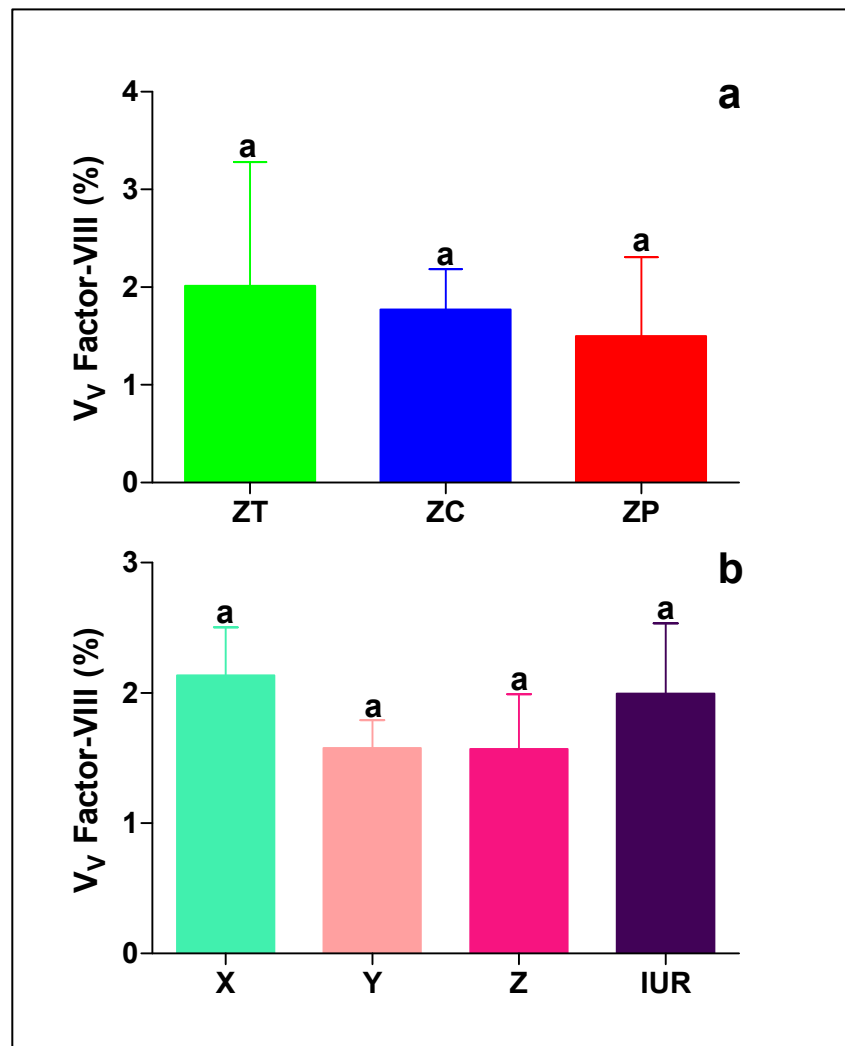


Figura 52. Diagrama de barras expresando los valores medios de la fracción de volumen para el Factor-VIII (V_V Factor-VIII). **a)** En zona de transición (ZT), zona central (ZC) y zona periférica (ZP) de la próstata normal. **b)** En las tres orientaciones estudiadas (X, Y, Z) y en secciones IUR de la próstata normal. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación, letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos analizados; letras idénticas, ausencia de significación.

2.4. Comparación de la estimación de L_V en próstata control, HBP y carcinoma

En ZT no se observan diferencias significativas en la estimación de L_V con relación a los valores observados en HBP (Fig. 53 a). Sin embargo la L_V en el grupo Ca es significativamente mayor que en ZP (Fig. 53 b). Tampoco se observan diferencias significativas de la L_V al comparar HBP con Ca (Fig. 53 c).

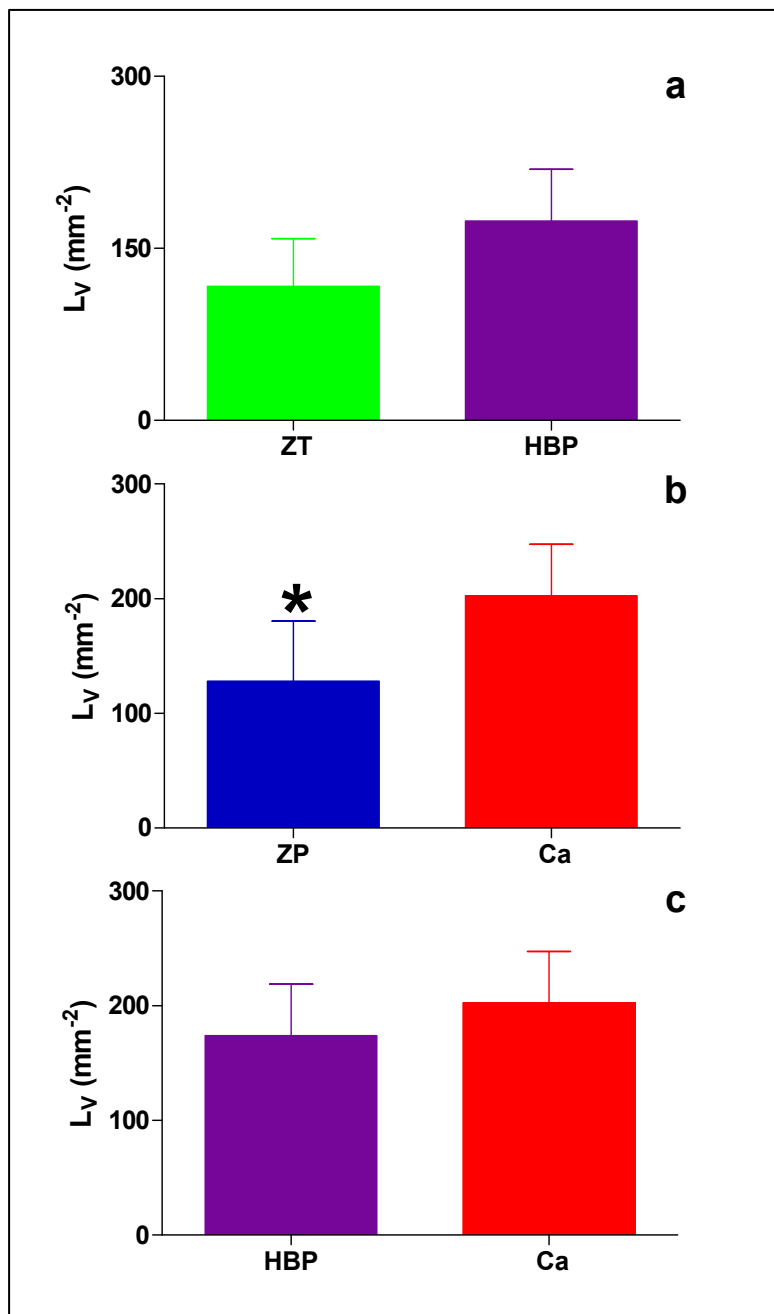


Figura 53. Diagrama de barras expresando los valores medios de la densidad de longitud de microvaso (L_V); al comparar: **a)** Zona de transición (ZT) con hiperplasia prostática benigna (HBP). **b)** Zona periférica (ZP) con carcinoma (Ca) y **c)** HBP con Ca. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. El asterisco indica diferencia significativa.

2.5. Comparación de las estimaciones de dvm y rdif en próstata control, HBP y carcinoma

El diámetro vascular medio (dvm) no presenta diferencias significativas al comparar controles (ZT y ZP) con casos patológicos (HBP y Ca). (Fig. 54 a-c).

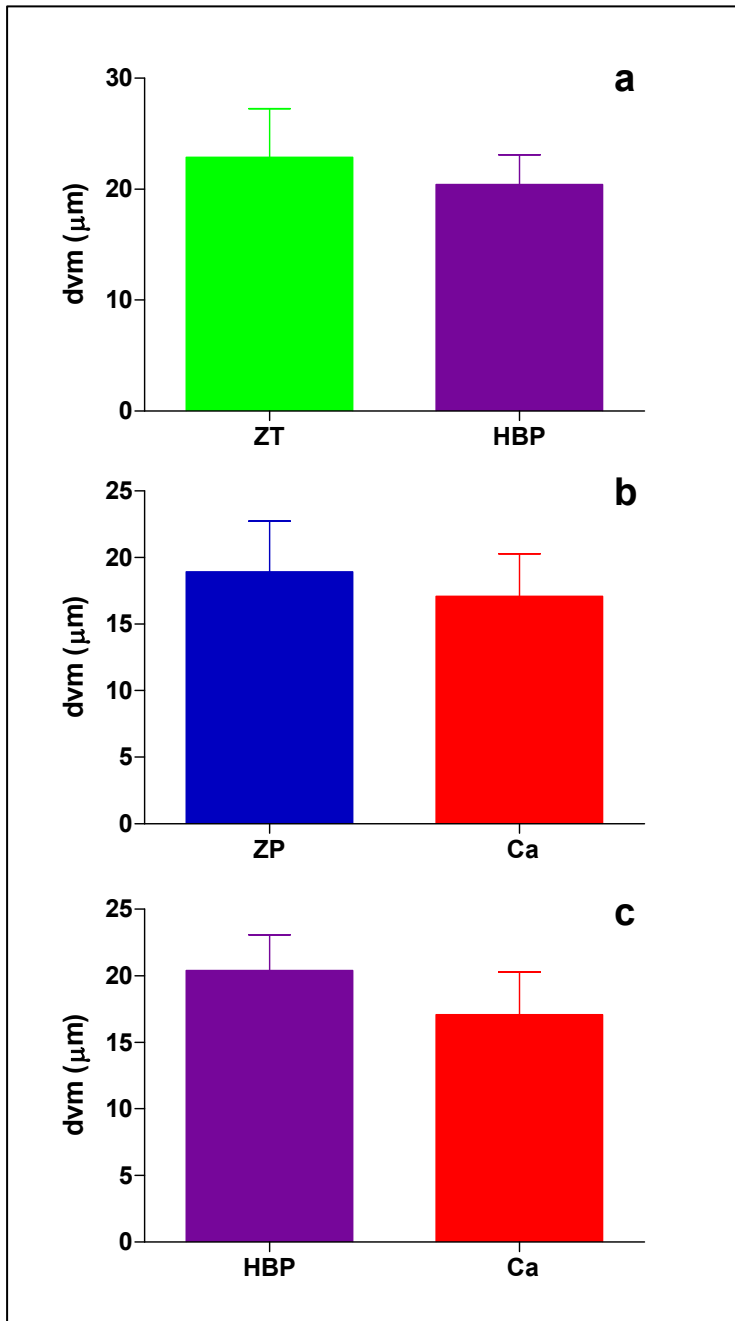


Figura 54. Diagrama de barras expresando los valores medios del diámetro vascular medio (dvm); al comparar: **a)** Zona de transición (ZT) con hiperplasia prostática benigna (HBP). **b)** Zona periférica (ZP) con carcinoma (Ca) y **c)** HBP con Ca. Las barras de error indican la desviación estándar de la media.

El radio de difusión vascular (rdif) es significativamente menor en HBP y Ca al compararlo con ZT y ZP, respectivamente (Fig. 55 a,b). Sin embargo no se observan diferencias significativas en el rdif cuando se compara HBP con Ca (Fig. 55 c).

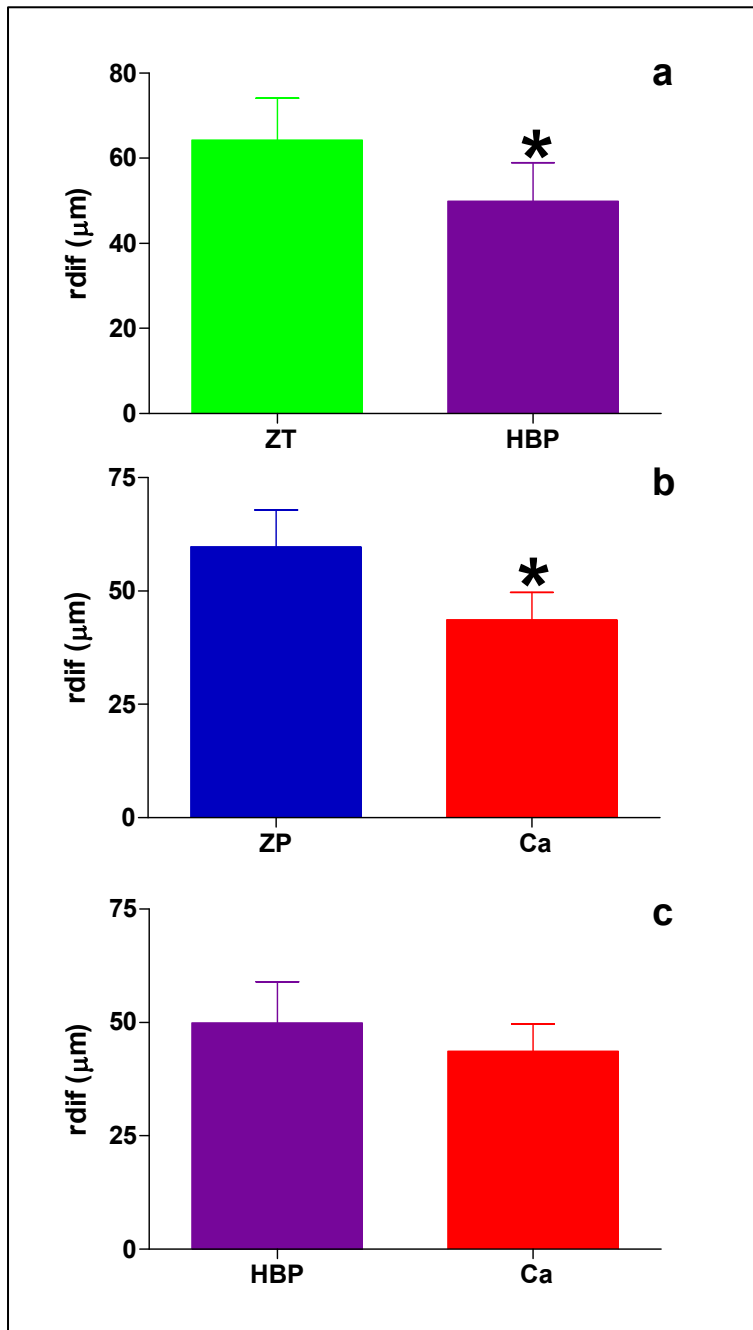


Figura 55. Diagrama de barras expresando los valores medios del radio de difusión vascular (rdif); al comparar: **a)** Zona de transición (ZT) con hiperplasia prostática benigna (HBP). **b)** Zona periférica (ZP) con carcinoma (Ca) y **c)** HBP con Ca. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Los asteriscos indican diferencias significativas.

2.6. Comparación de la estimación de V_V Factor-VIII en próstata control , HBP y carcinoma

La fracción de volumen de Factor VIII (V_V Factor-VIII) no presenta diferencias significativas al comparar controles (ZT y ZP) con casos patológicos (HBP y Ca). (Fig. 56 a-c).

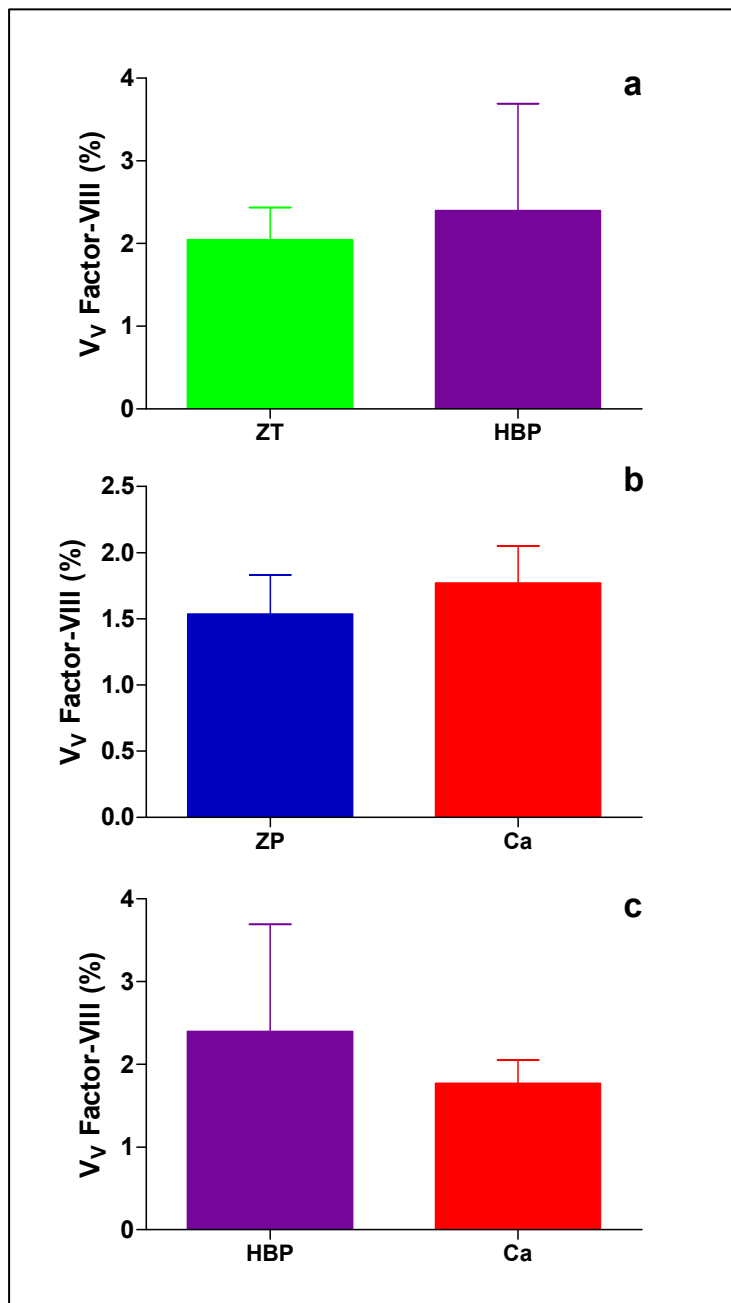


Figura 56. Diagrama de barras expresando los valores medios de la fracción de volumen de Factor VIII (V_V Factor VIII); al comparar: **a)** Zona de transición (ZT) con hiperplasia prostática benigna (HBP). **b)** Zona periférica (ZP) con carcinoma (Ca) y **c)** HBP con Ca. Las barras de error indican la desviación estándar de la media.

3. RESULTADOS CUANTITATIVOS NO LINEALES

3.1. Adquisición de datos

Las tiras de imágenes fueron construidas como se indicó en la sección de Material y Métodos (Fig. 57). En la Figura 58 se muestra un ejemplo de tiras de imágenes de los grupos CTR, HBP y Ca junto con las imágenes binarizadas y la serie de datos correspondiente.

Las series de datos de próstata normal no muestran diferencias en su trazado en relación con la zona prostática. Los trazados son irregulares y aparentemente erráticos. Los datos subrogados manifiestan más uniformidad de la secuencia, sin cambios en los valores medios y las desviaciones en comparación con los datos reales. Las series artificiales de datos (u-noise) tienen una morfología uniforme como corresponde al ruido blanco (Figs. 59-61).

Las series de datos de los grupos patológicos, tanto HBP como Ca, no muestran diferencias evidentes cuando se las comparan con las series procedentes del grupo CTR. También los trazados son irregulares y heterogéneos (Figs. 62, 63).

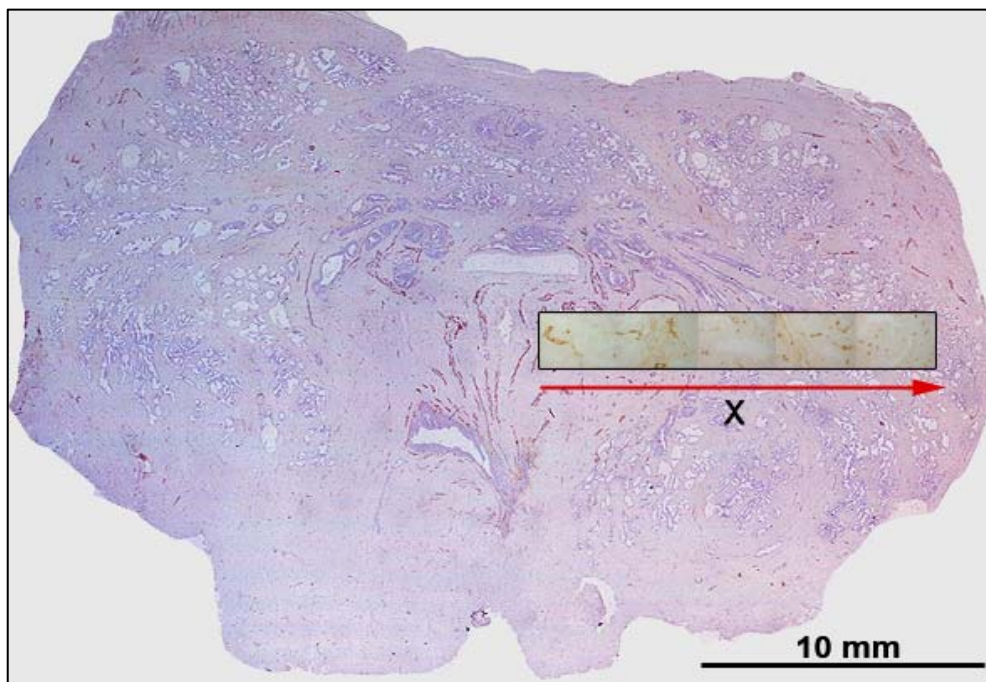


Figura 57. En la imagen, correspondiente a un caso del grupo CTR, se muestra (recuadro) una tira de cuadrats captados en ZT, según el eje orientador X (flecha).

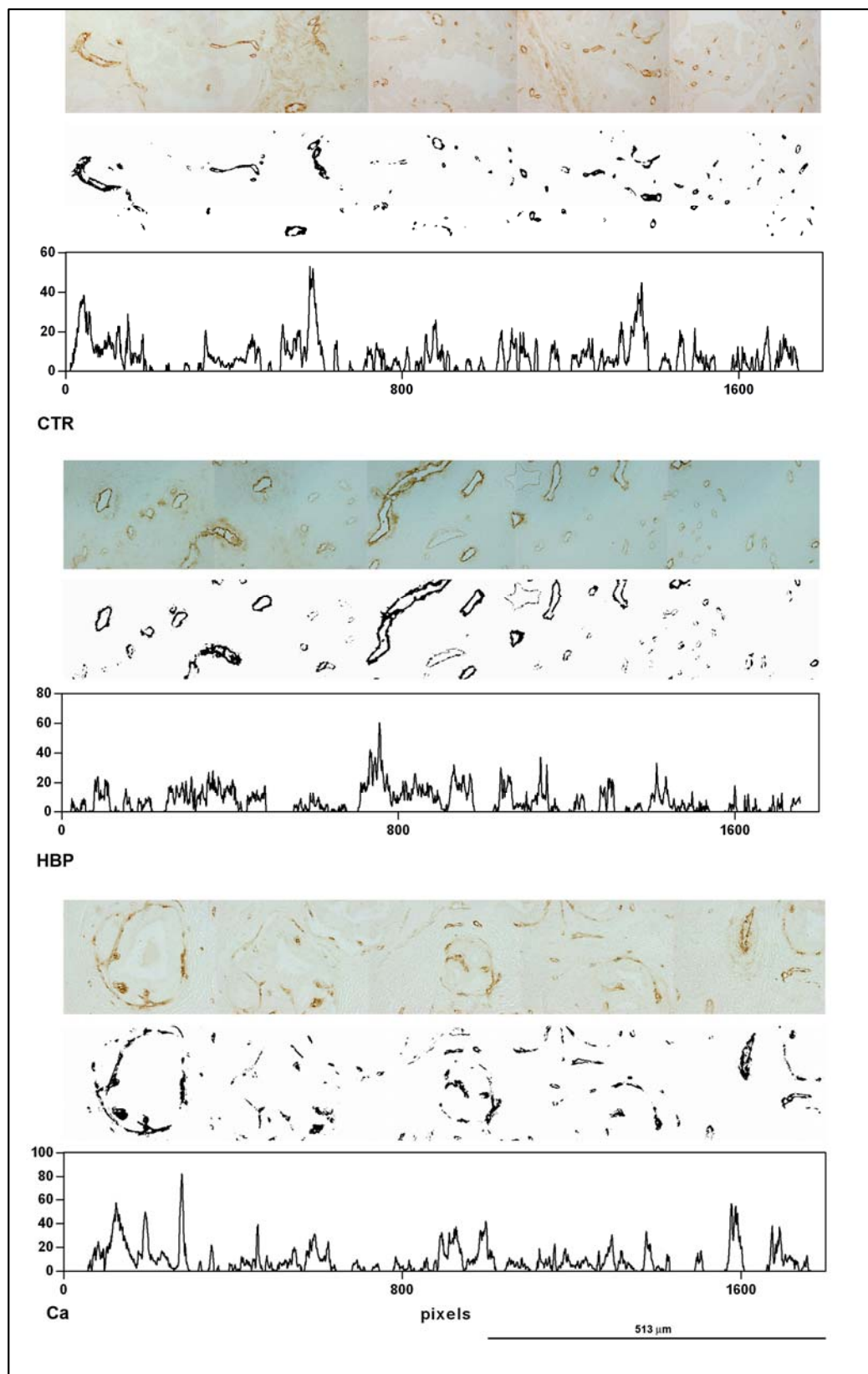


Figura 58. Tiras de imágenes correspondientes a un caso de cada grupo (CTR, HBP, Ca). Se acompañan de las imágenes binarizadas correspondientes y de las gráficas de los valores de V_v Factor-VIII estimados a lo largo del eje orientador de la tira (eje X). La escala situada en el borde inferior derecho expresa la equivalencia en μm de los píxeles indicados en el eje X.

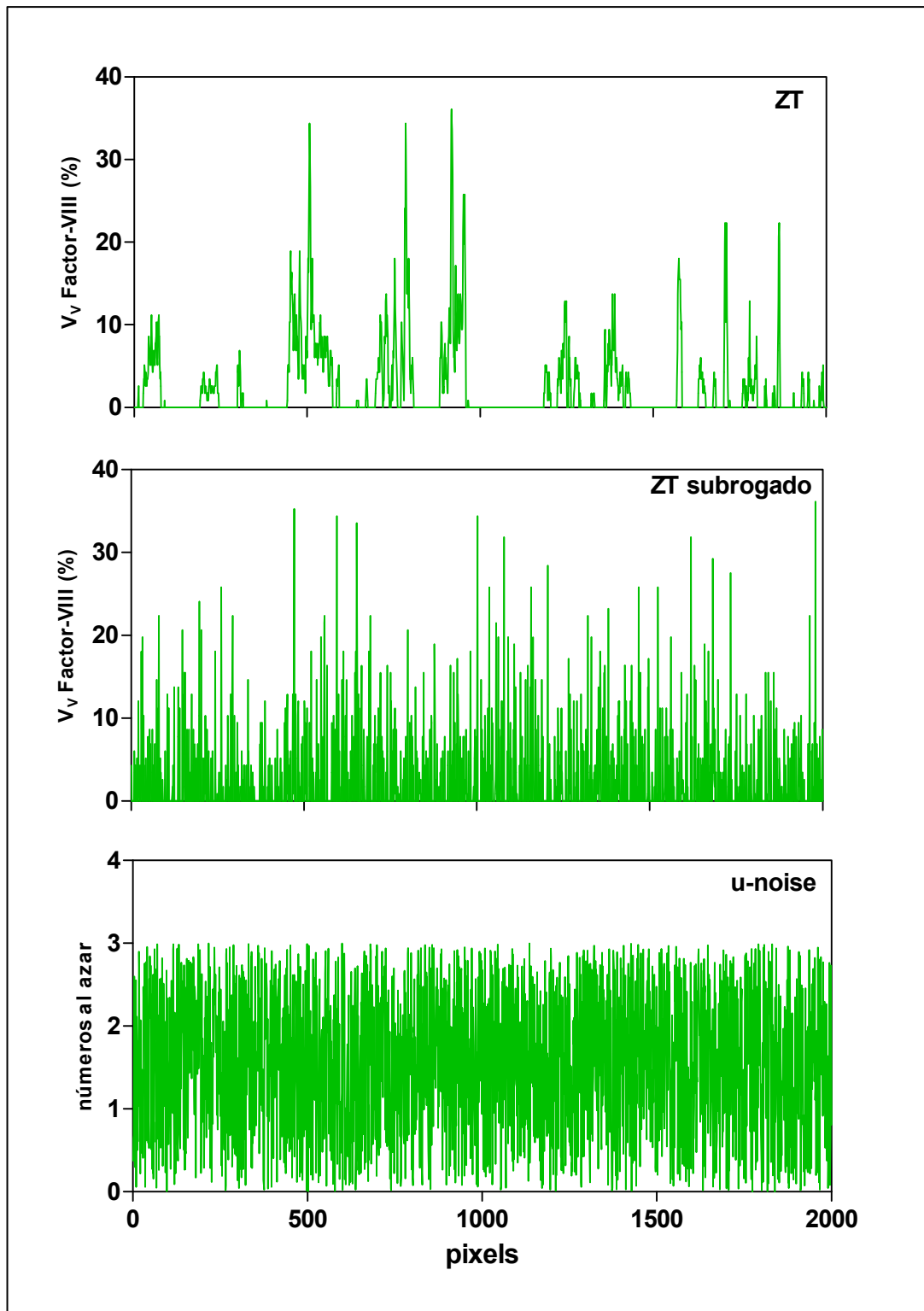


Figura 59. ZT) Gráfica que expresa la variación de la V_v Factor-VIII, a lo largo del eje orientador de la tira de imagen captada en la zona de transición de próstata normal. **ZT subrogado)** Gráfica de los datos subrogados construidos a partir de los valores reales de la gráfica anterior. **U-noise)** Serie artificial de ruido blanco (números al azar distribuidos a lo largo de un eje). En todas las series se indican sólo los 2000 primeros valores.

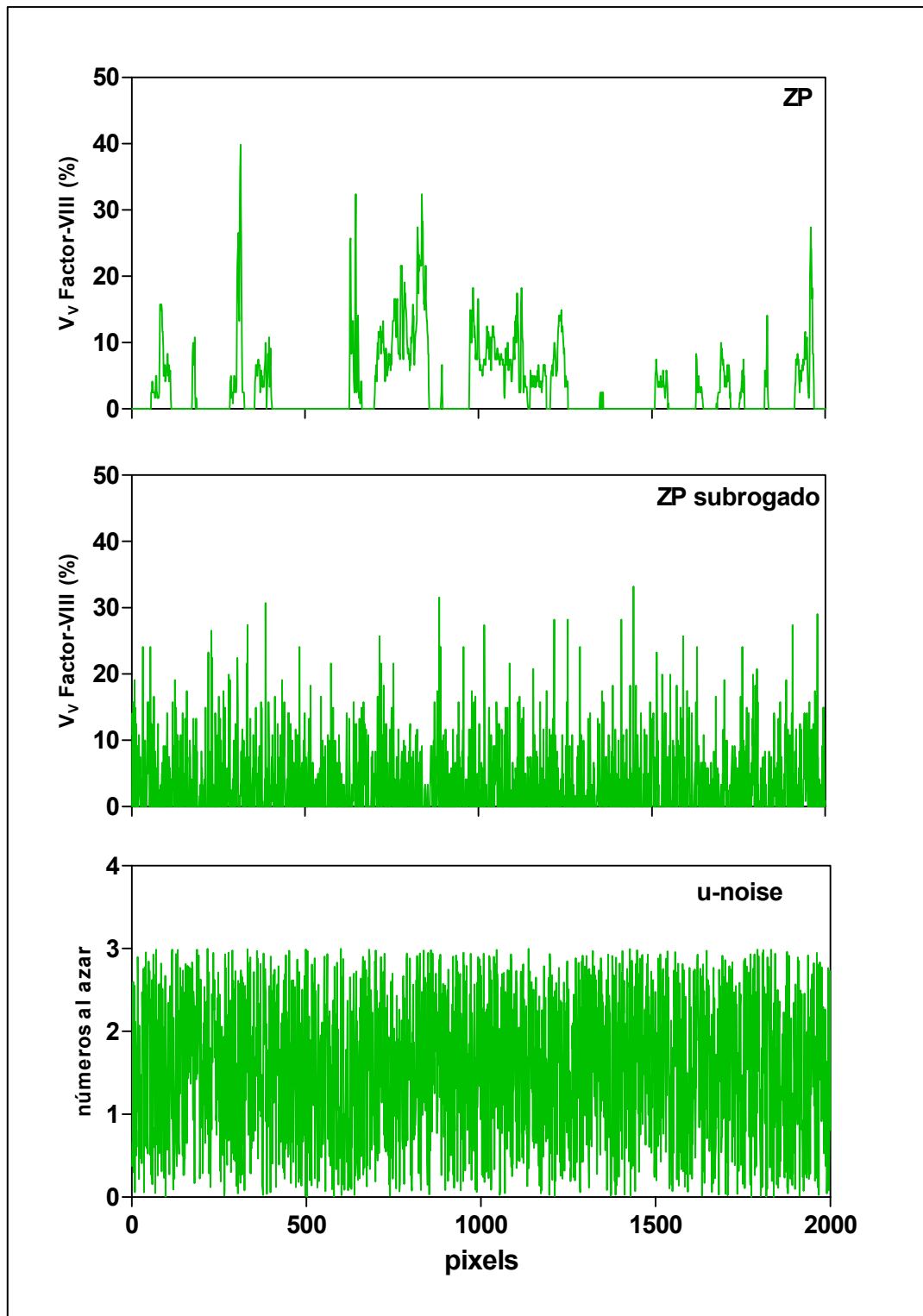


Figura 60. **ZP)** Gráfica que expresa la variación de la V_v Factor-VIII, a lo largo del eje orientador de la tira de imagen captada en la zona periférica de próstata normal. **ZP subrogado)** Gráfica de los datos subrogados construidos a partir de los valores reales de la gráfica anterior. **U-noise)** Serie artificial de ruido blanco (números al azar distribuidos a lo largo de un eje). En todas las series se indican sólo los 2000 primeros valores.

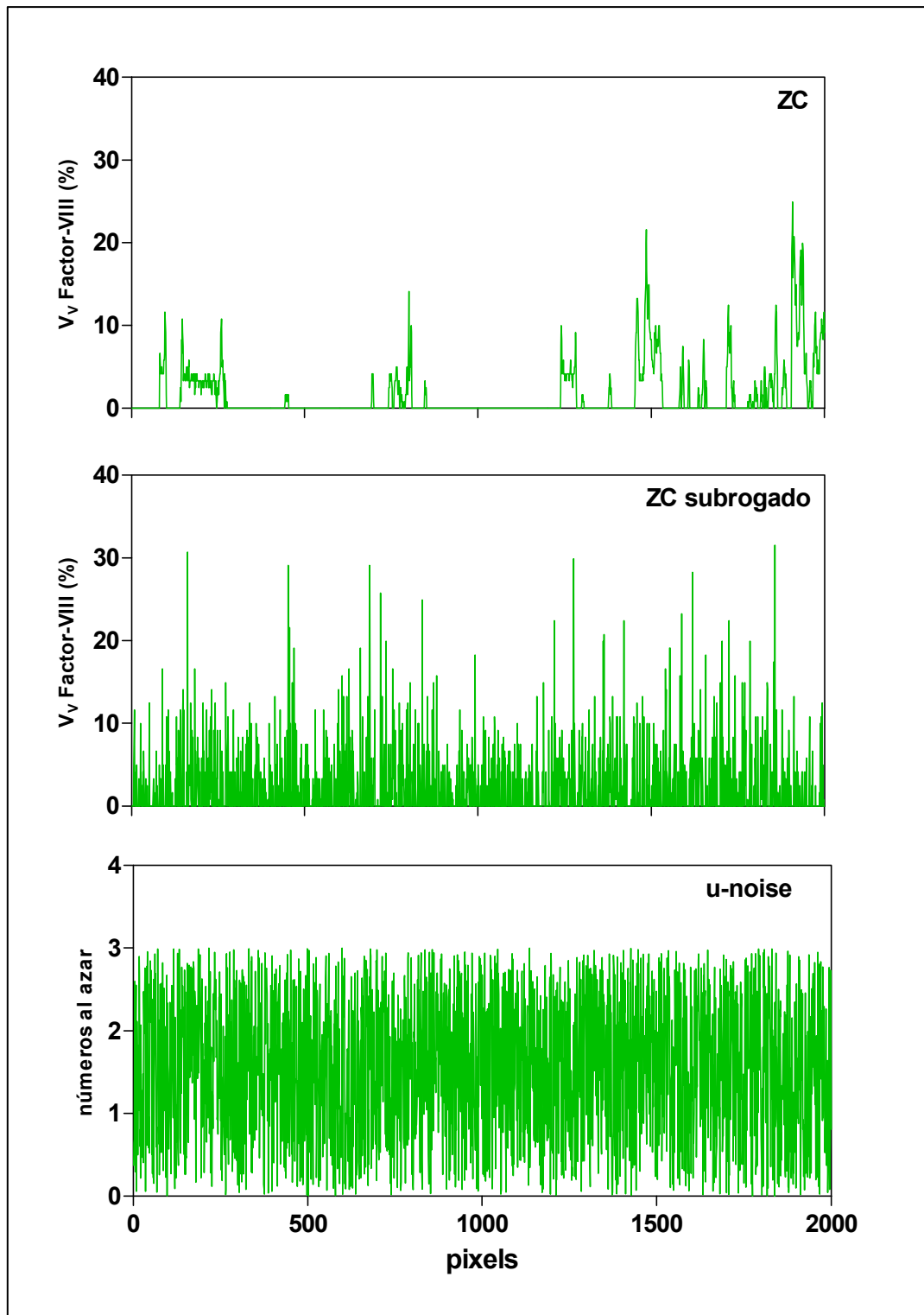


Figura 61. ZC) Gráfica que expresa la variación de la V_v Factor-VIII, a lo largo del eje orientador de la tira de imagen captada en la zona central de próstata normal. **ZC subrogado)** Gráfica de los datos subrogados construidos a partir de los valores reales de la gráfica anterior. **U-noise)** Serie artificial de ruido blanco (números al azar distribuidos a lo largo de un eje). En todas las series se indican sólo los 2000 primeros valores.

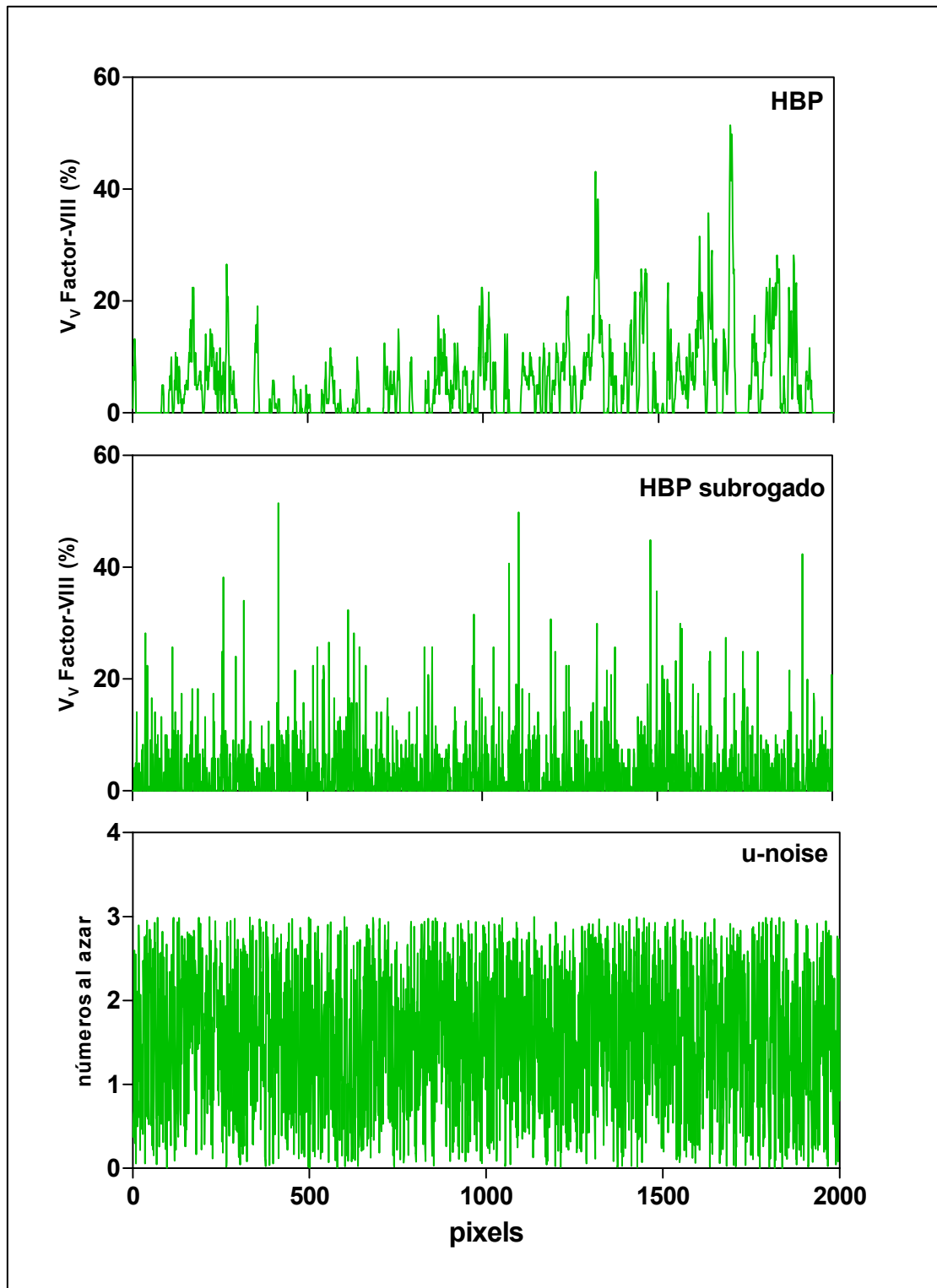


Figura 62. HBP) Gráfica que expresa la variación de la V_v Factor-VIII, a lo largo del eje orientador de la tira de imagen captada en un caso de hiperplasia prostática benigna. **HBP subrogado)** Gráfica de los datos subrogados contruidos a partir de los valores reales de la gráfica anterior. **U-noise)** Serie artificial de ruido blanco (números al azar distribuidos a lo largo de un eje). En todas las series se indican sólo los 2000 primeros valores.

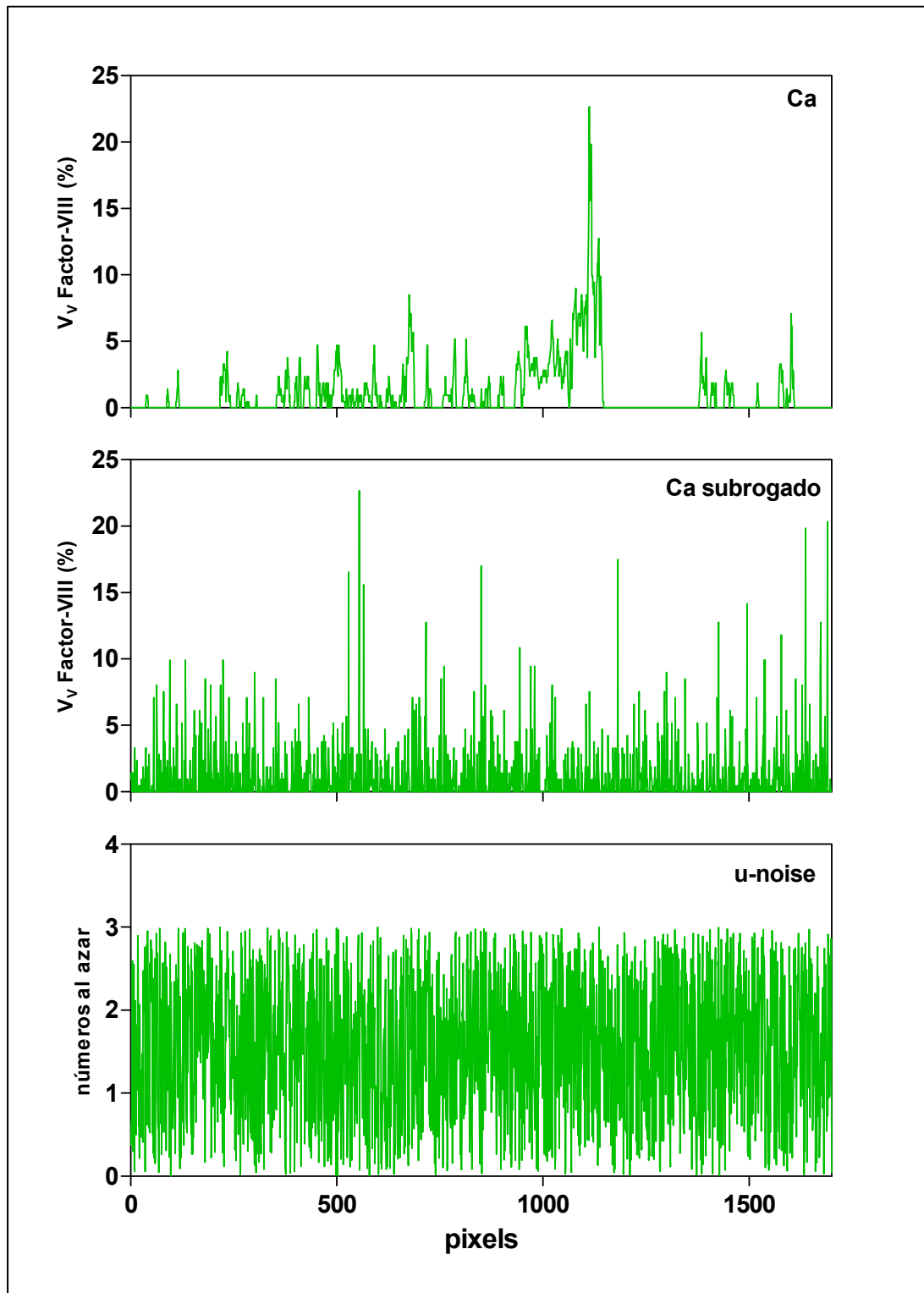


Figura 63. **Ca)** Gráfica que expresa la variación de la V_v Factor-VIII, a lo largo del eje orientador de la tira de imagen captada en un caso de carcinoma. **Ca subrogado)** Gráfica de los datos subrogados construidos a partir de los valores reales de la gráfica anterior. **U-noise)** Serie artificial de ruido blanco (números al azar distribuidos a lo largo de un eje). En todas las series se indican sólo los 2000 primeros valores.

3.2. Reconstrucción del espacio de fase

Los parámetros necesarios para la reconstrucción del espacio de fase del atractor: retardo óptimo (τ_{opt}) y dimensión global de inclusión (dE) se expresan para todos los grupos estudiados en la Tabla 3.

Tabla 3

casos	τ_{opt}	dE
ZT	3 (1-7)	6 (4-13)
ZP	4 (1-9)	8 (5-13)
ZC	4 (1-9)	7 (5-13)
IUR	3 (2-4)	7 (5-9)
HBP	4 (1-8)	7 (6-10)
Ca	3 (2-6)	7 (3-11)
u-noise	3 (3-4)	4 (2-4)

Estimaciones del retardo óptimo (τ_{opt}) y de la dimensión global de inclusión (dE), en grupos control (ZT, ZP, ZC,IUR), HBP, Ca y en series de ruido uniforme (u-noise). Los valores vienen expresados por la mediana y el rango (entre paréntesis).

Usando los parámetros indicados se reconstruyeron los atractores en 3 dimensiones, para las diversas zonas de la próstata del grupo CTR, y para los casos patológicos (HBP, Ca). En la Figura 64 se muestra un ejemplo de atractores de ZT, ZP, HBP y Ca. Tanto en controles como en casos patológicos, la geometría del atractor en 3D es similar, observándose un núcleo de órbitas muy enmarañadas y compactas en el cuadrante superior derecho del espacio de fase, correspondiente a la región visitada más frecuentemente por los tripletes de puntos agrupados según el τ_{opt} , mientras que en el resto del espacio las órbitas son más laxas. En ZT, las órbitas aparecen en general más laxamente dispuestas que en ZP, HBP y Ca (Fig. 64).

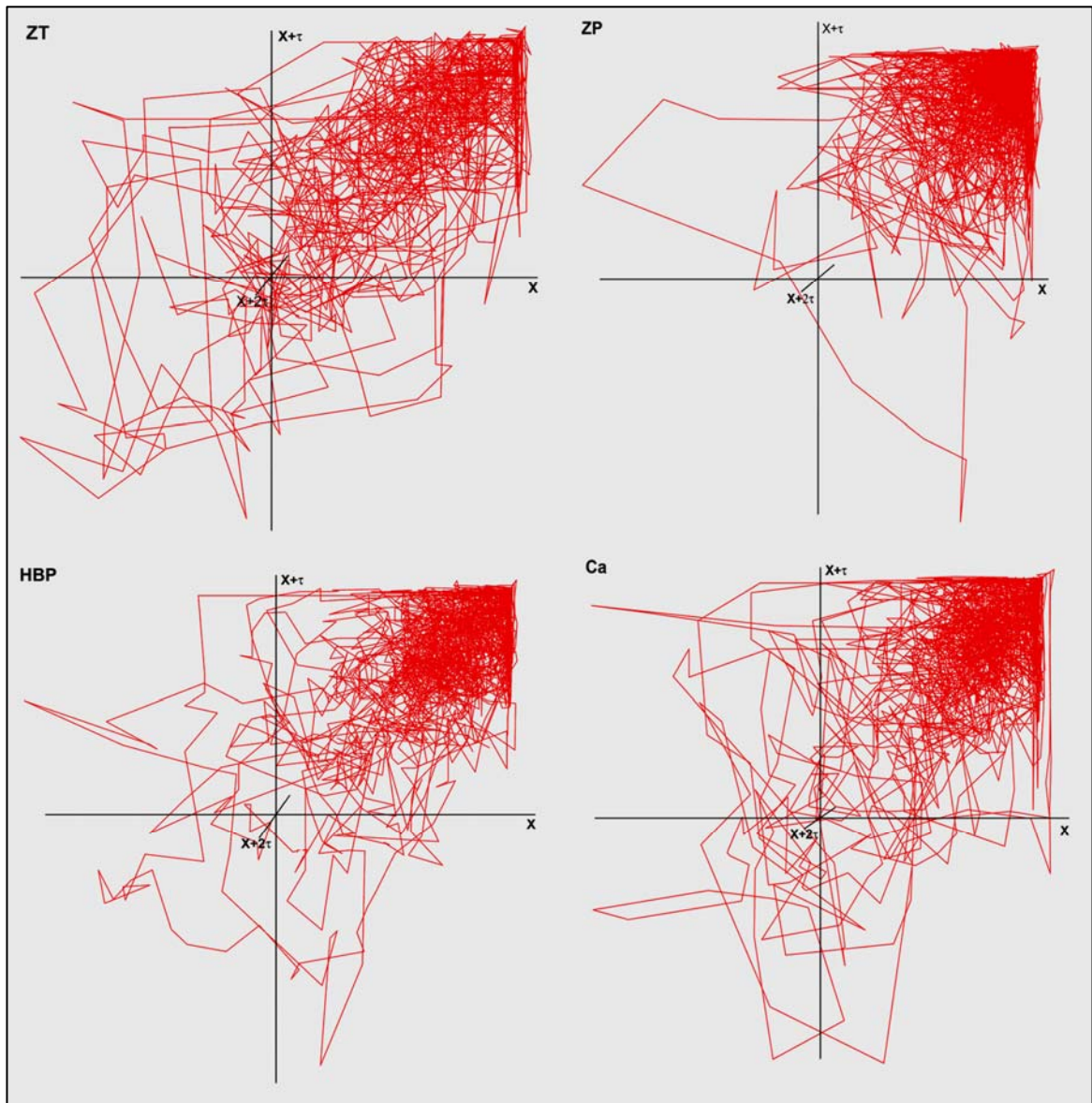


Figura 64. Reconstrucción de los atractores en 3 dimensiones para un caso de ZT, ZP, HBP y Ca respectivamente. En todos los casos se observa una gran densidad de órbitas en la región correspondiente al cuadrante superior derecho del espacio de fase. En ZT las órbitas muestran una disposición más laxa que en el resto de los casos y la zona más compacta se distribuye de modo más difuso que en los restantes atractores.

En la Figura 65 se representa un atractor de ZP, comparándolo con el reconstruido a partir de los datos subrogados y con el procedente de una serie de ruido blanco. La estructura del atractor de datos subrogados, aunque su geometría general se asemeja a la del procedente de los datos reales, muestra una gran homogeneización de las órbitas.

El atractor de los datos de ruido blanco manifiesta una completa homogeneización de su estructura orbital.

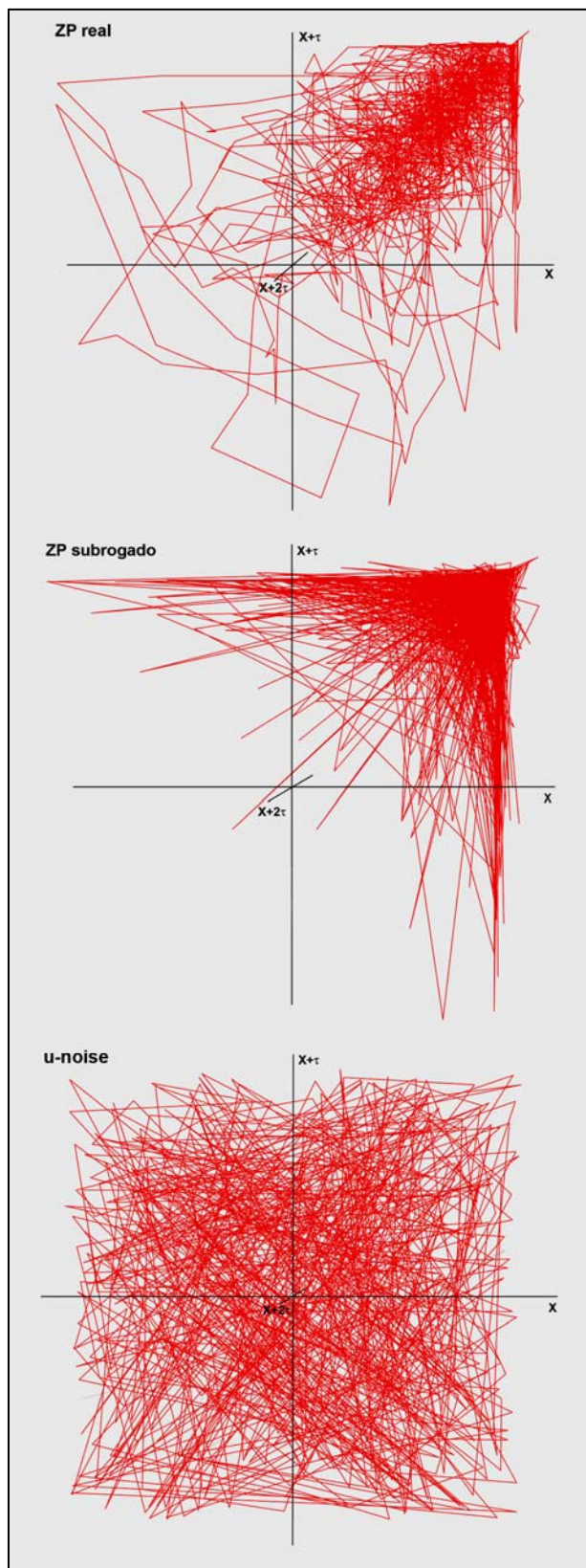


Figura 65. Reconstrucción de los atractores en 3 dimensiones para un caso de ZP (**ZP real**), sus correspondientes datos subrogados (**ZP subrogado**) y una serie de ruido blanco (**u-noise**). El atractor de ZP subrogado muestra órbitas muy densas y homogéneas pero con una geometría que recuerda a el de ZP real, mientras que el de u-noise manifiesta una completa desestructuración y homogeneidad.

3.3. Isotropía y comparación regional de la estimación de la dimensión de correlación (D_2) en próstata control

Para los cortes IUR y para todas las orientaciones (X, Y, Z) estudiadas en las tres zonas prostáticas (ZT, ZP, ZC) se observa que D_2 crece en función de la dimensión de inclusión, tendiendo a converger para $dE \approx 8$. En todos los casos los datos subrogados muestran un incremento significativo de D_2 en relación con los valores para las series reales a partir de $dE = 4$. Estos resultados se muestran en las Figuras 66-69.

El conjunto de dimensiones D_2 para las 15 dimensiones de inclusión analizadas no muestra diferencias significativas ni en relación con la zona, ni con la orientación (Fig. 70).

La estimación tanto de la dimensión de correlación global (D_2 global), como de la dimensión de correlación a la dE óptima (D_2 dE) no muestra diferencias significativas entre las zonas prostáticas estudiadas ni entre las orientaciones analizadas (Figs. 71, 72).

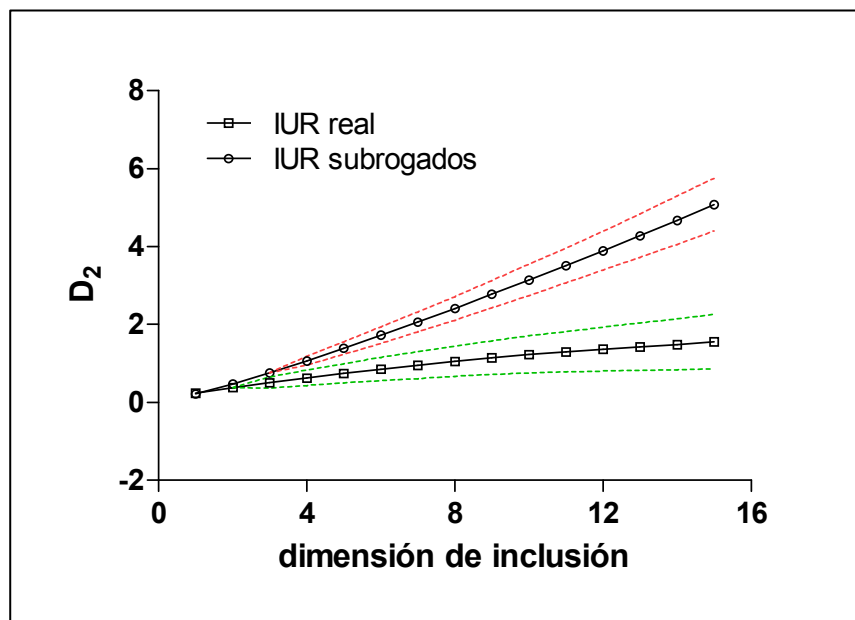


Figura 66. Gráfica de la variación de D_2 en función de la dimensión de inclusión (dE) en cortes IUR, datos reales y subrogados. Se observa la convergencia de la D_2 para los datos reales y la no convergencia de los datos subrogados. La diferencia entre ambas curvas es significativa a partir de $dE = 4$. Las líneas de trazo discontinuo representan los intervalos de confianza del 95%.

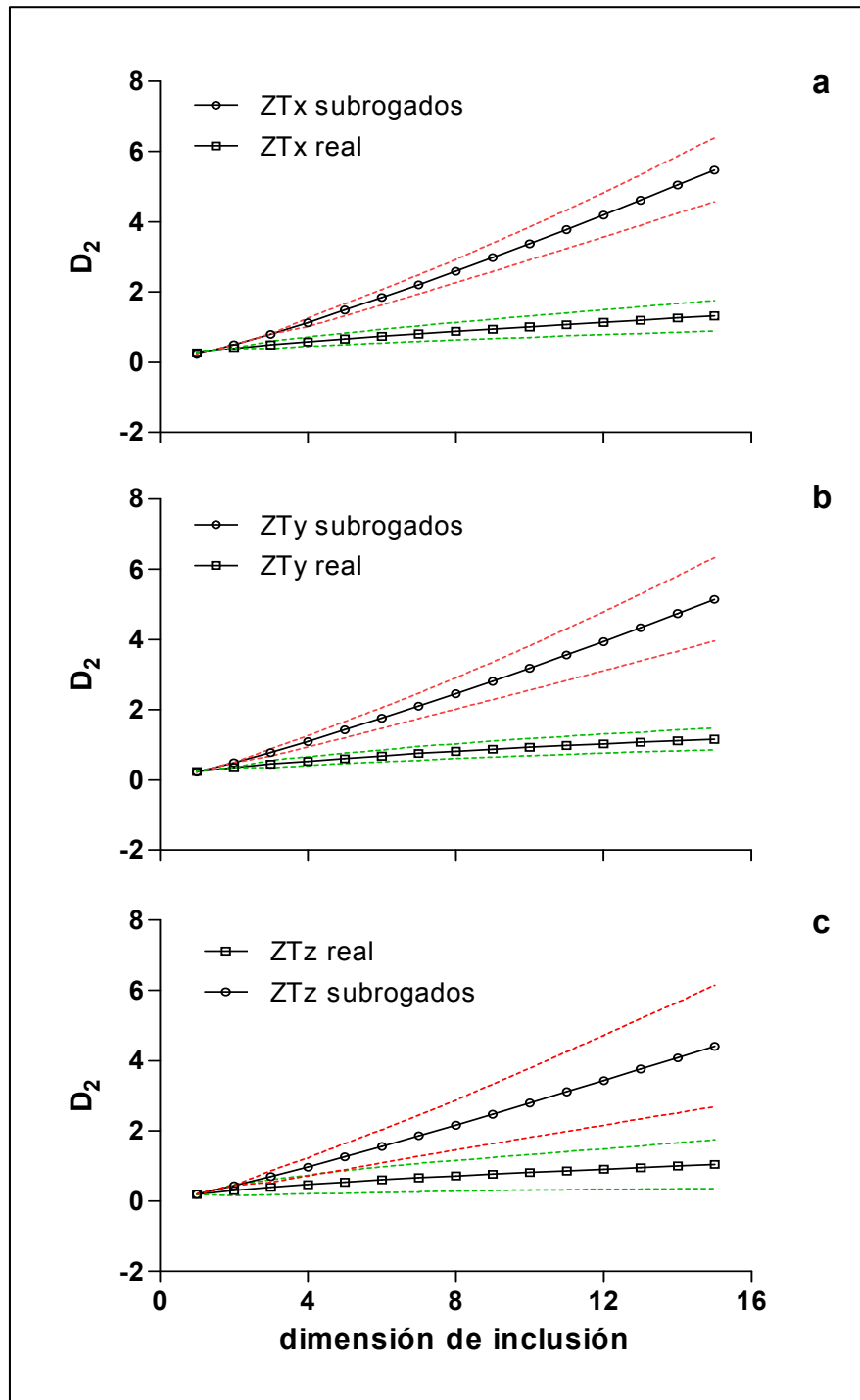


Figura 67. Gráfica de la variación de D_2 en función de la dimensión de inclusión (dE) para la zona de transición (ZT) en las orientaciones X (a); Y (b); Z (c), datos reales y subrogados. Se observa la convergencia de la D_2 para los datos reales y la no convergencia de los datos subrogados. La diferencia entre ambas curvas es significativa a partir de $dE = 4$. Las líneas de trazo discontinuo representan los intervalos de confianza del 95%.

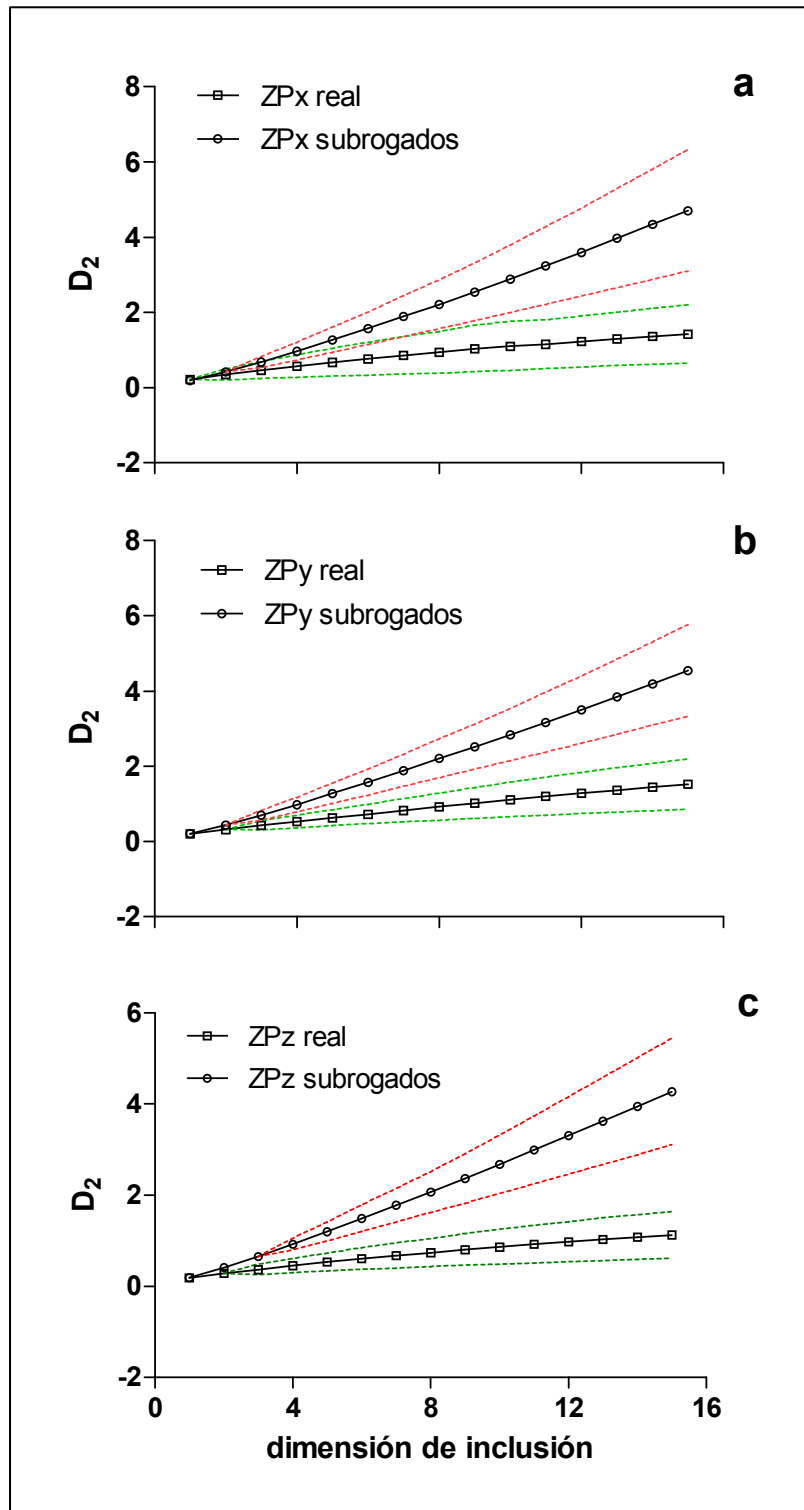


Figura 68. Gráfica de la variación de D_2 en función de la dimensión de inclusión (dE) para la zona periférica (ZP) en las orientaciones X (a); Y (b); Z (c), datos reales y subrogados. Se observa la convergencia de la D_2 para los datos reales y la no convergencia de los datos subrogados. La diferencia entre ambas curvas es significativa a partir de $dE = 4$. Las líneas de trazo discontinuo representan los intervalos de confianza del 95%.

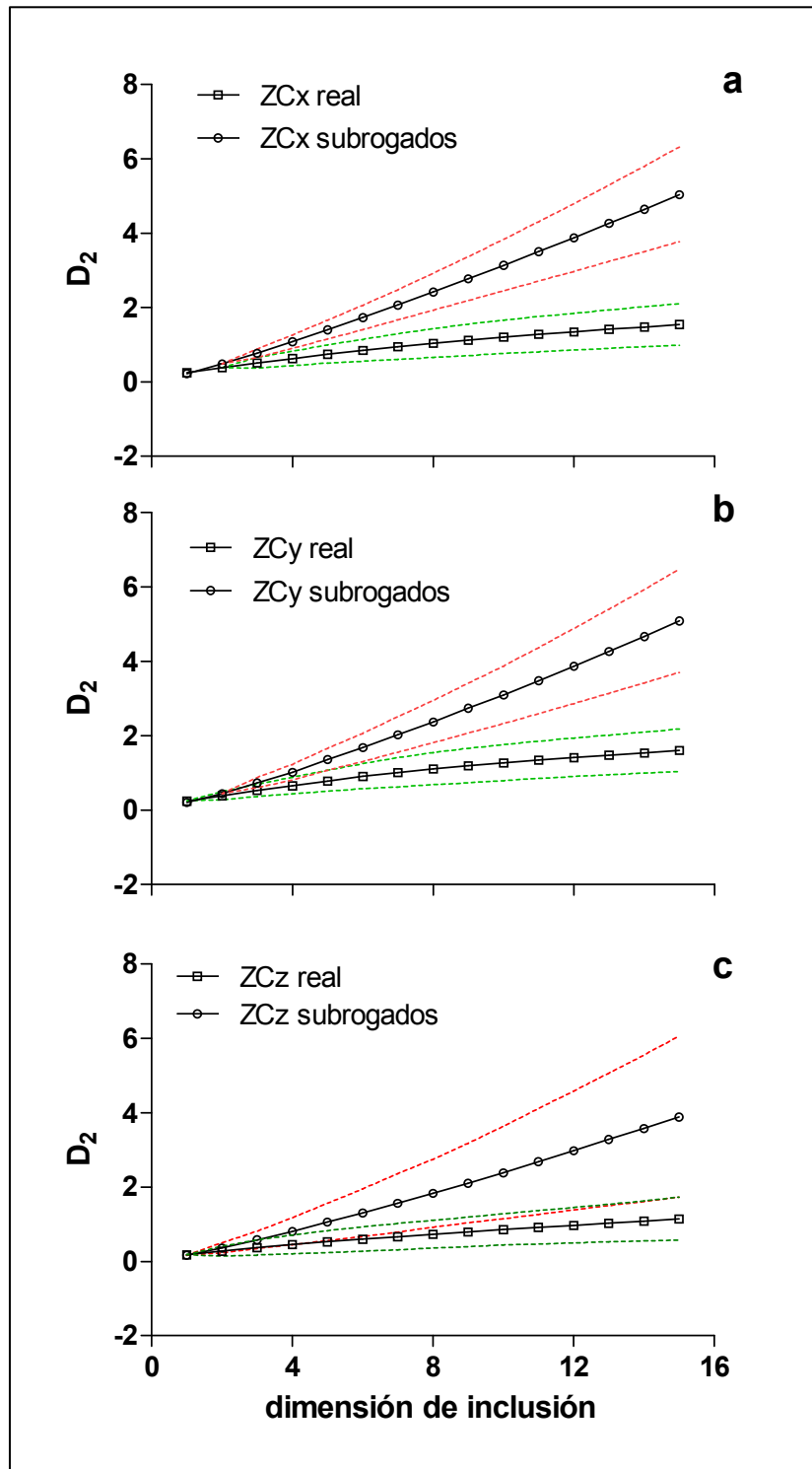


Figura 69. Gráfica de la variación de D_2 en función de la dimensión de inclusión (dE) para la zona central (ZC) en las orientaciones X (a); Y (b); Z (c), datos reales y subrogados. Se observa la convergencia de la D_2 para los datos reales y la no convergencia de los datos subrogados. La diferencia entre ambas curvas es significativa a partir de $dE = 4$. Las líneas de trazo discontinuo representan los intervalos de confianza del 95%.

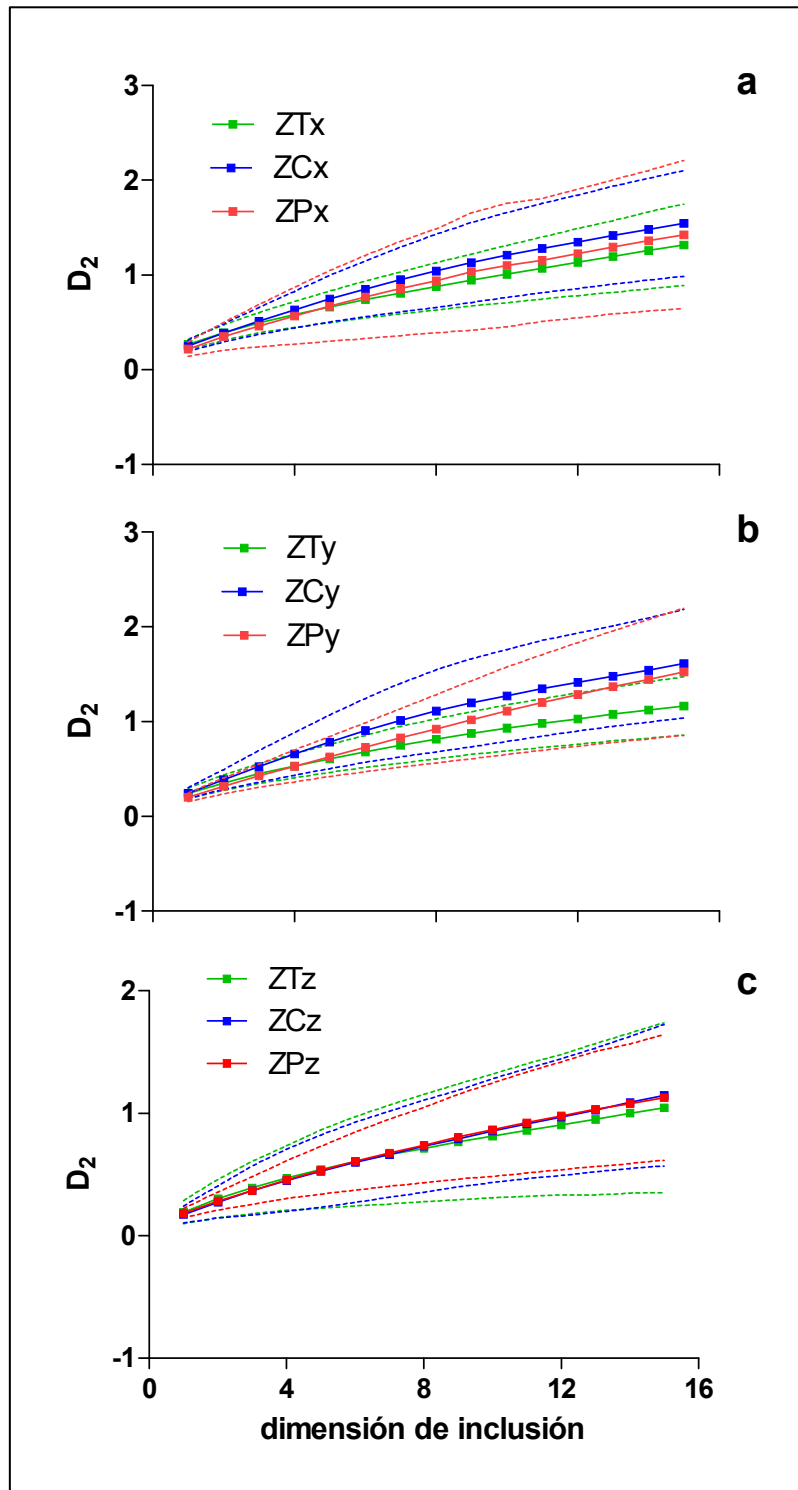


Figura 70. Gráfica de la variación de D_2 en función de la dimensión de inclusión (dE) comparando zonas y orientaciones. **a)** ZT, ZP y ZC en el eje X. **b)** ZT, ZP y ZC en el eje Y. **c)** ZT, ZP y ZC en el eje Z, No se observan diferencias significativas para ninguna dE entre las tres orientaciones y las zonas. Las líneas de trazo discontinuo representan los intervalos de confianza del 95%.

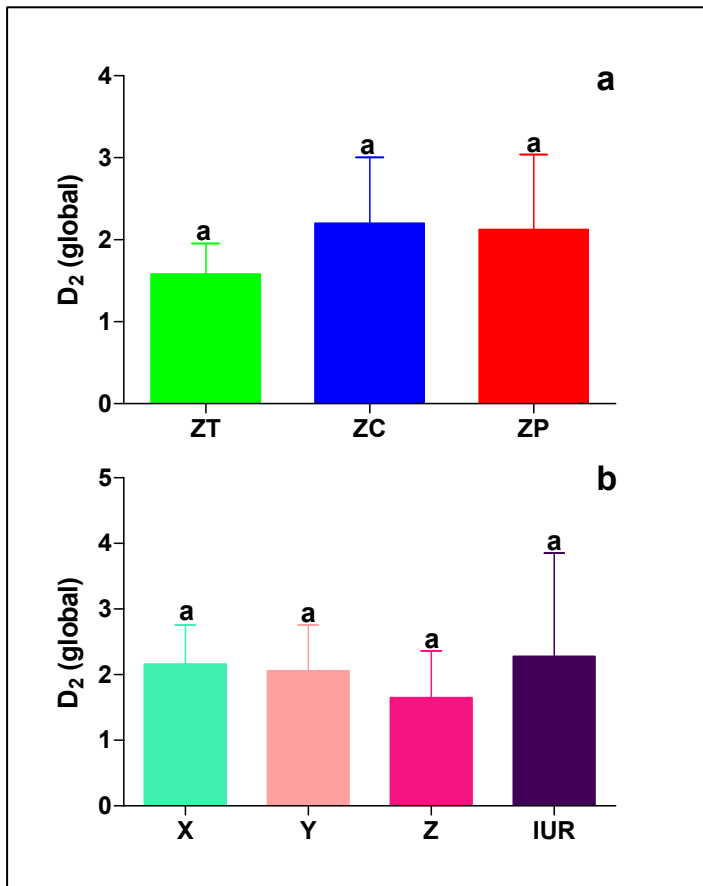


Figura 71. (a) Diagrama de barras expresando los valores medios de D_2 (global) en zona de transición (ZT), zona central (ZC) y zona periférica (ZP) de la próstata normal. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. (b) Diagrama de barras expresando los valores medios de D_2 (global) según los ejes X, Y, Z y orientación IUR en la próstata normal. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación, letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos analizados, letras idénticas, ausencia de significación.

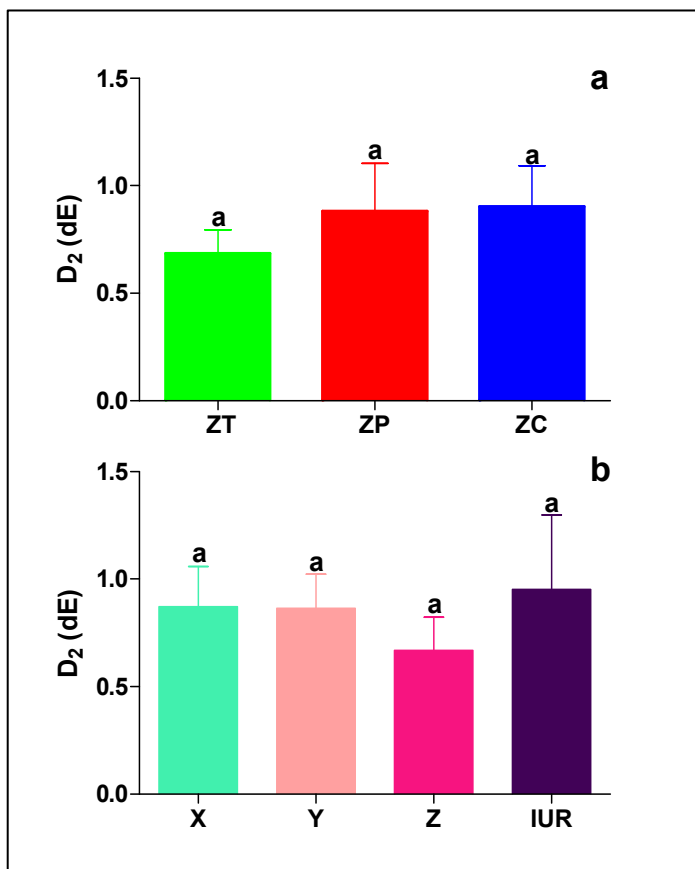


Figura 72. (a) Diagrama de barras expresando los valores medios de D_2 a la dE óptima, D_2 (dE), en zona de transición (ZT), zona central (ZC) y zona periférica (ZP) de la próstata normal. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. (b) Diagrama de barras expresando los valores medios de D_2 (dE) según los ejes X, Y, Z y orientación IUR en la próstata normal. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación, letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos analizados, letras idénticas, ausencia de significación.

3.4. Comparación de la estimación de D_2 controles, HBP y carcinoma

Al igual que lo descrito en ZT, en la hiperplasia prostática benigna se observa que D_2 crece en función de la dimensión de inclusión, tendiendo a converger para $dE \approx 8$. Los datos subrogados de HBP muestran un incremento significativo de D_2 en relación con los valores para las series reales a partir de $dE = 4$. Estos resultados se muestran en la Figura 73 a, b. Cuando se compara ZT con HBP (Fig. 73 c) se observa que los datos de HBP muestran un incremento significativo de D_2 en relación con los valores para las series de ZT a partir de $dE = 8$.

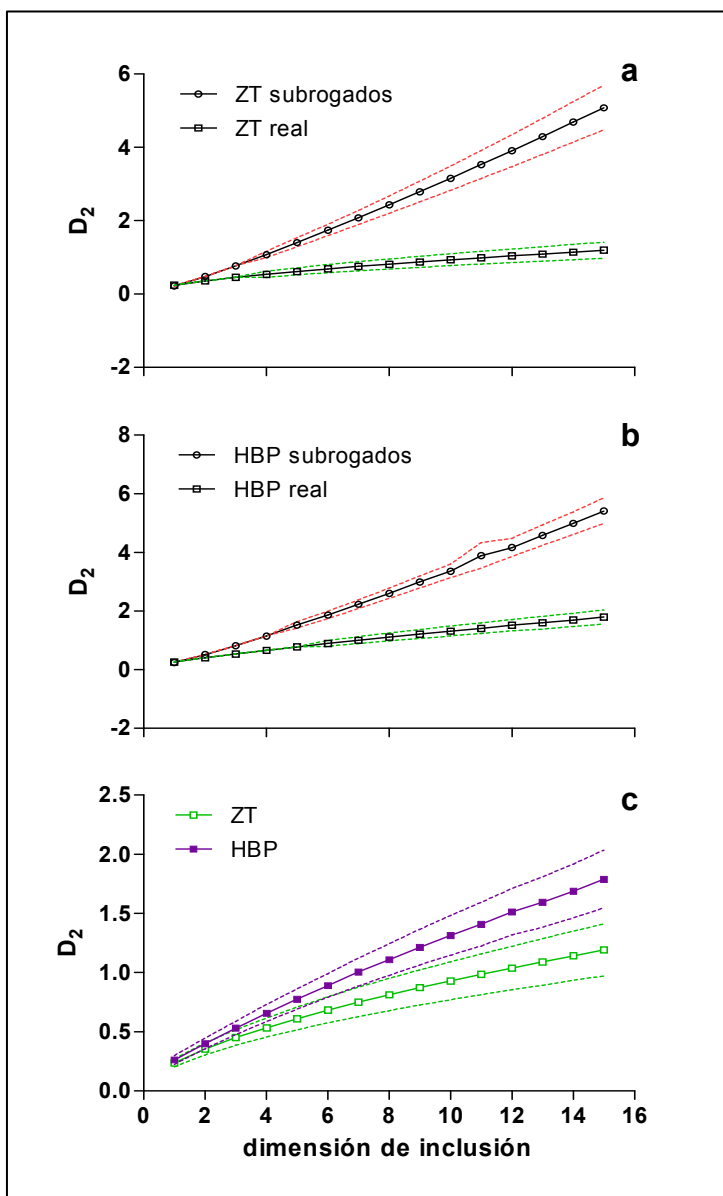


Figura 73. Gráfica de la variación de D_2 en función de la dimensión de inclusión (dE) para ZT y HBP. **a)** datos reales y subrogados de ZT. **b)** datos reales y subrogados de HBP. **c)** Comparación entre ZT y HBP, la diferencia entre ambas curvas es significativa a partir de $dE = 8$. Las líneas de trazo discontinuo representan los intervalos de confianza del 95%.

En el carcinoma, del mismo modo que en ZP, se observa que D_2 crece en función de la dimensión de inclusión, tendiendo a converger para $dE \approx 8$. Los datos subrogados de Ca muestran un incremento significativo de D_2 en relación con los valores para las series reales a partir de $dE = 4$. Estos resultados se muestran en la Figura 74 a, b. Cuando se compara ZP con Ca (Fig. 74 c) se observa que los datos de Ca muestran un incremento significativo de D_2 en relación con los valores para las series de ZP en el rango estudiado de dE .

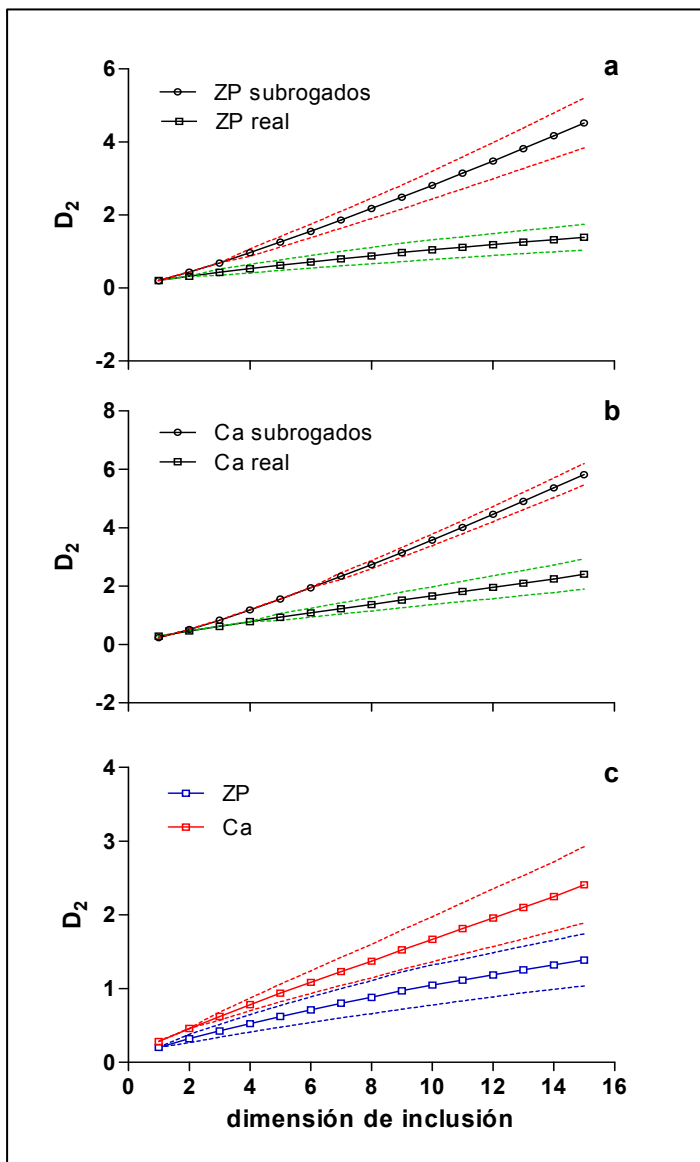


Figura 74. Gráfica de la variación de D_2 en función de la dimensión de inclusión (dE) para ZP y Ca. **a)** datos reales y subrogados de ZP. **b)** datos reales y subrogados de Ca. **c)** Comparación entre ZP y Ca, la diferencia entre ambas curvas es significativa en todo el rango de dE (1-15). Las líneas de trazo discontinuo representan los intervalos de confianza del 95%.

El conjunto de dimensiones D_2 para las 15 dimensiones de inclusión analizadas manifiesta una casi superposición de las curvas para ZT y ZP, mientras que la curva para Ca muestra los valores más altos, siendo la de HBP intermedia entre Ca y ZP (Fig. 75).

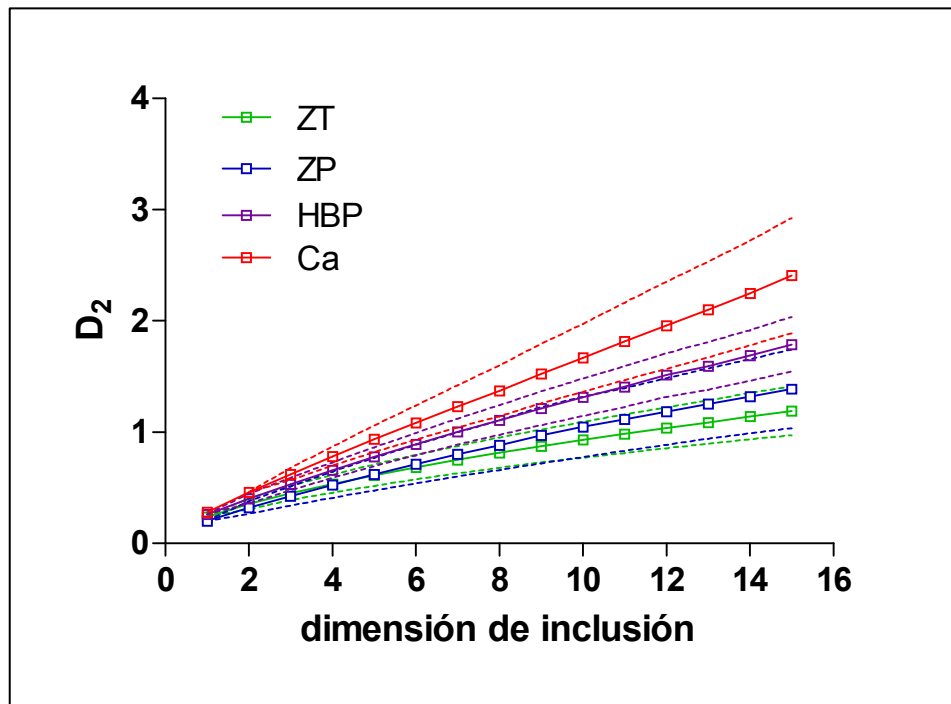


Figura 75. Gráfica de la variación de D_2 en función de la dimensión de inclusión (dE) para ZT, ZP, HBP y Ca. La diferencia entre las curvas de ZT y ZP no es significativa. La curva de Ca muestra los valores más altos, mientras que la de HBP es intermedia entre la de Ca y los controles. Las líneas de trazo discontinuo representan los intervalos de confianza del 95%.

Tanto la dimensión de correlación global (D_2 global), como la dimensión de correlación a la dE óptima (D_2 dE) es significativamente mayor en Ca que en el resto de los grupos. Por otro lado no se observan diferencias significativas entre HBP, ZT y ZP (Fig. 76).

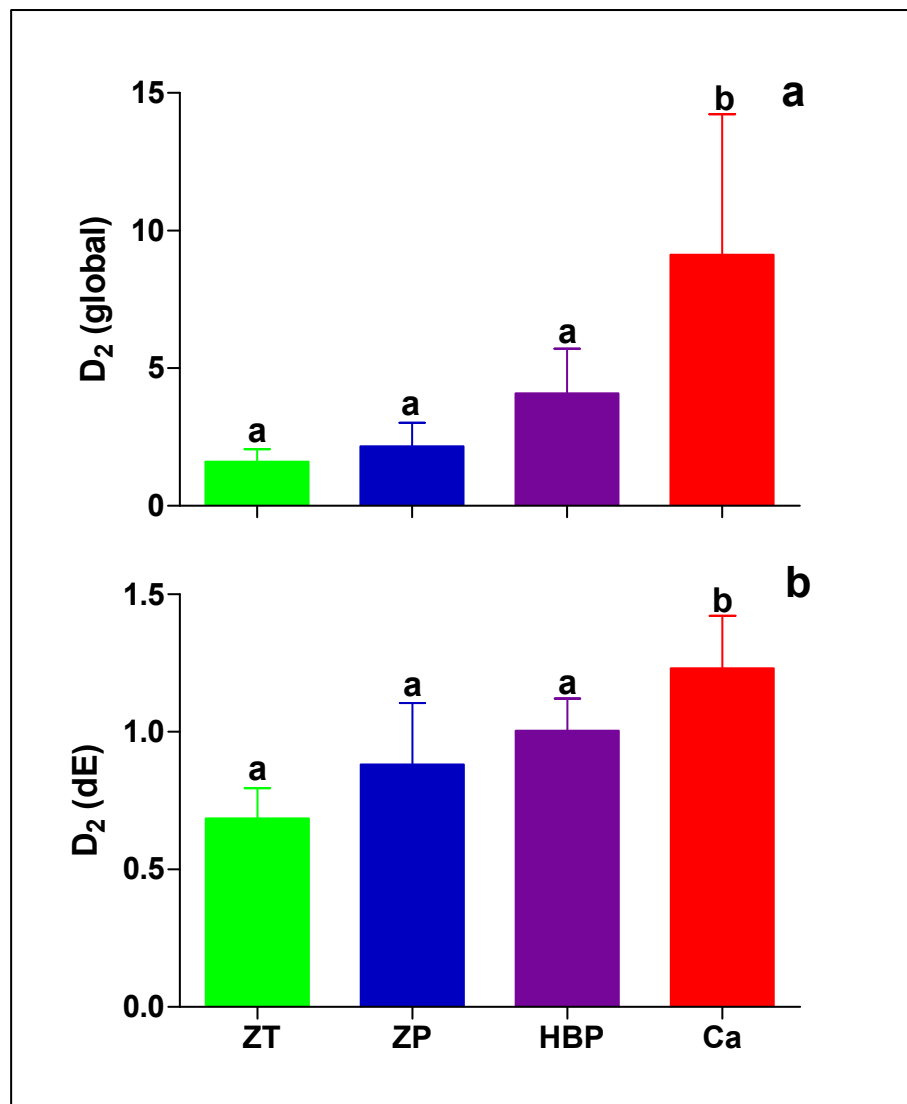


Figura 76. (a) Diagrama de barras expresando los valores medios de D_2 (global), en zona de transición (ZT), zona periférica (ZP), HBP y Ca. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. **(b)** Diagrama de barras expresando los valores medios de D_2 a la dE óptima, D_2 (dE), en ZT, ZP, HBP y Ca. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación, letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos analizados, letras idénticas, ausencia de significación.

3.5. Isotropía y comparación regional de las estimaciones del coeficiente de Hurst (α) en próstata control

En todas las regiones de la próstata normal y para las tres direcciones del espacio, el exponente α de la serie de datos reales alcanza valores ≈ 1 mientras que las series subrogadas muestran que $\alpha \approx 0.5$, siendo la diferencia significativa (Fig. 77).

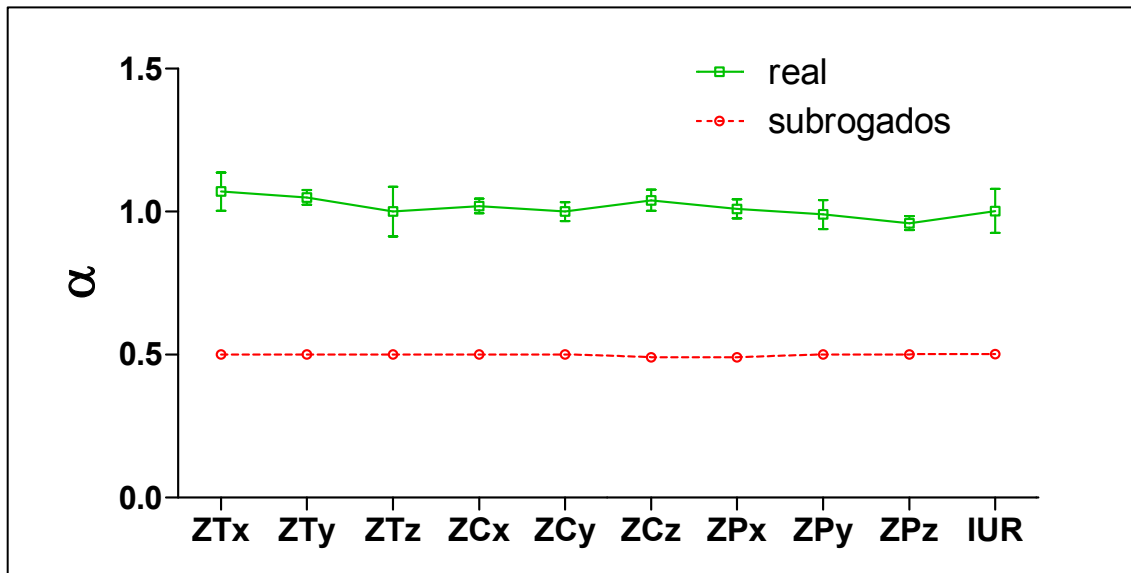


Figura 77. Exponente α de datos reales (verde) y subrogados (rojo) para las tres zonas prostáticas (ZT, ZC y ZP) y en todas las orientaciones (X, Y, Z, IUR). Las barras de error indican un intervalo de confianza del 95%.

Se detecta una disminución significativa de α en zona periférica cuando se compara con zona de transición, los valores de α en ZC son intermedios entre los de ZT y ZP (Fig. 78 a). No hay diferencias significativas para dicho exponente en relación con las tres orientaciones del espacio y la orientación isotrópica al azar (IUR) (Fig. 78 b).

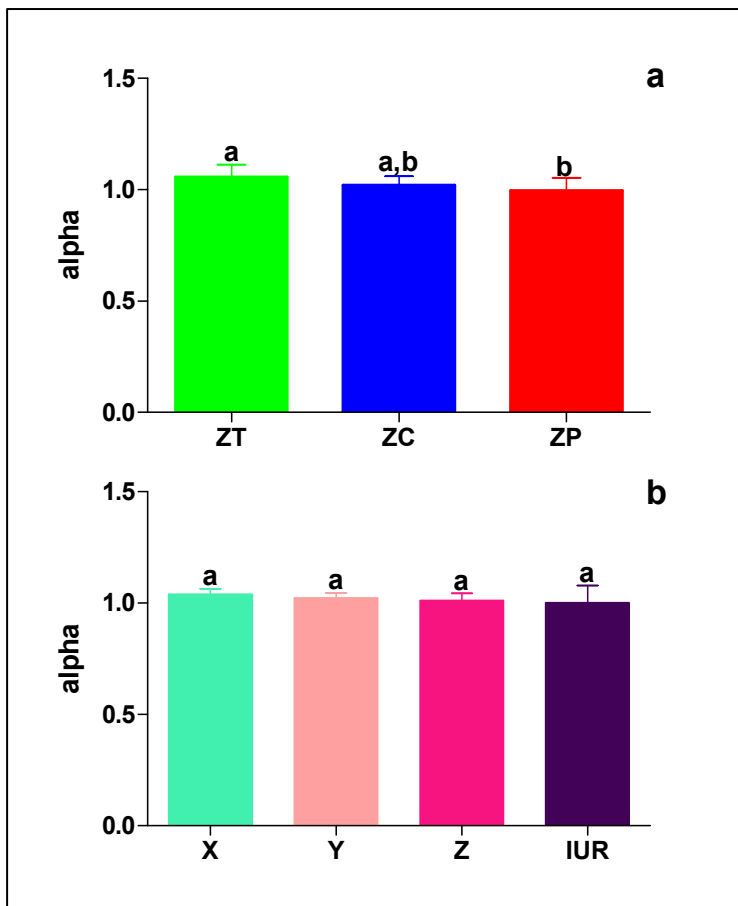


Figura 78. (a) Diagrama de barras expresando los valores medios de α en zona de transición (ZT), zona central (ZC) y zona periférica (ZP) de la próstata normal. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. **(b)** Diagrama de barras expresando los valores medios de α según los ejes X, Y, Z y orientación IUR en la próstata normal. Las barras de error indican la desviación estándar de la media.

Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación, letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos analizados, letras idénticas, ausencia de significación.

3.6. Comparación de las estimaciones del coeficiente de Hurst (α) en próstata control, HBP y carcinoma

Aunque, en todos los casos, el exponente α se sitúa en torno a 1.00, es significativamente más bajo en ZP, HBP y Ca que en ZT. Entre ZP, HBP y Ca no se observan diferencias significativas (Fig. 79).

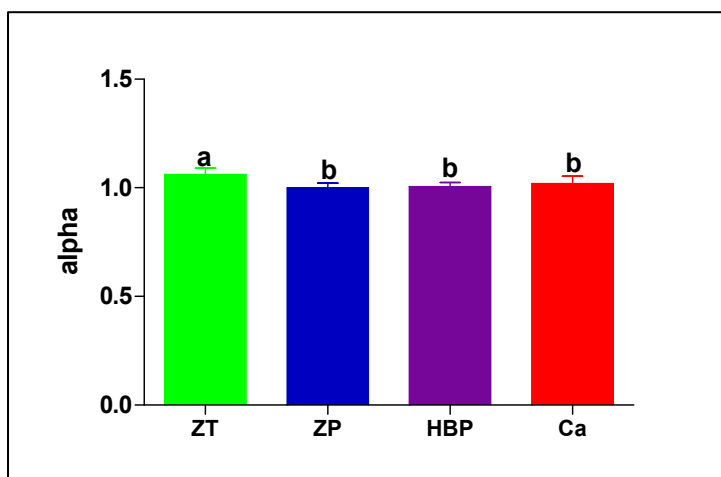


Figura 79. Diagrama de barras expresando los valores medios de α en ZT, ZP, HBP y Ca. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación, letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos analizados, letras idénticas, ausencia de significación.

3.7. Controles negativos. D_2 y coeficiente α de series totalmente aleatorias (ruido blanco) en comparación con datos reales (normales y patológicos)

Las series de ruido blanco generadas como controles negativos manifiestan ausencia de convergencia para D_2 en un intervalo amplio de dimensiones de inclusión (de 1 a 15). Además la curva de D_2 en función de dE de esas series difiere significativamente de la curva similar de casos reales para valores de dE entre 3 y 15 (Fig. 80).

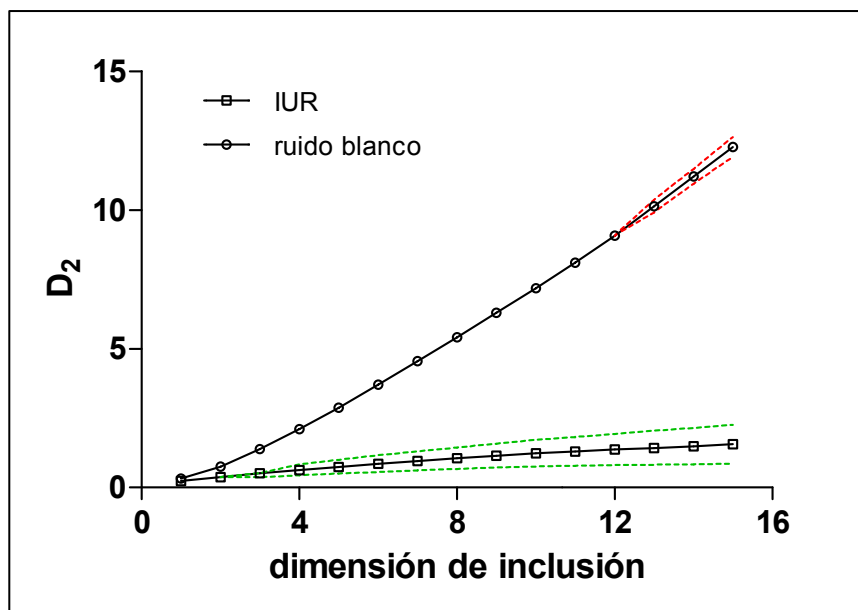


Figura 80. Gráfica de la variación de D_2 en función de la dimensión de inclusión (dE) para ruido blanco y casos reales con orientación IUR. Se observa la convergencia de la D_2 para los datos reales y la no convergencia de los datos procedentes de series de ruido blanco. La diferencia entre ambas curvas es significativa a partir de $dE \approx 3$. Las líneas de trazo discontinuo representan los intervalos de confianza del 95%.

De modo similar, el exponente α de las series de ruido blanco tiene valores en torno a 0.5, con diferencias significativas en relación a los valores de α para datos reales. El comportamiento de α en las series de ruido blanco con relación a los datos reales es similar al detectado en las series de datos subrogados (Fig. 81).

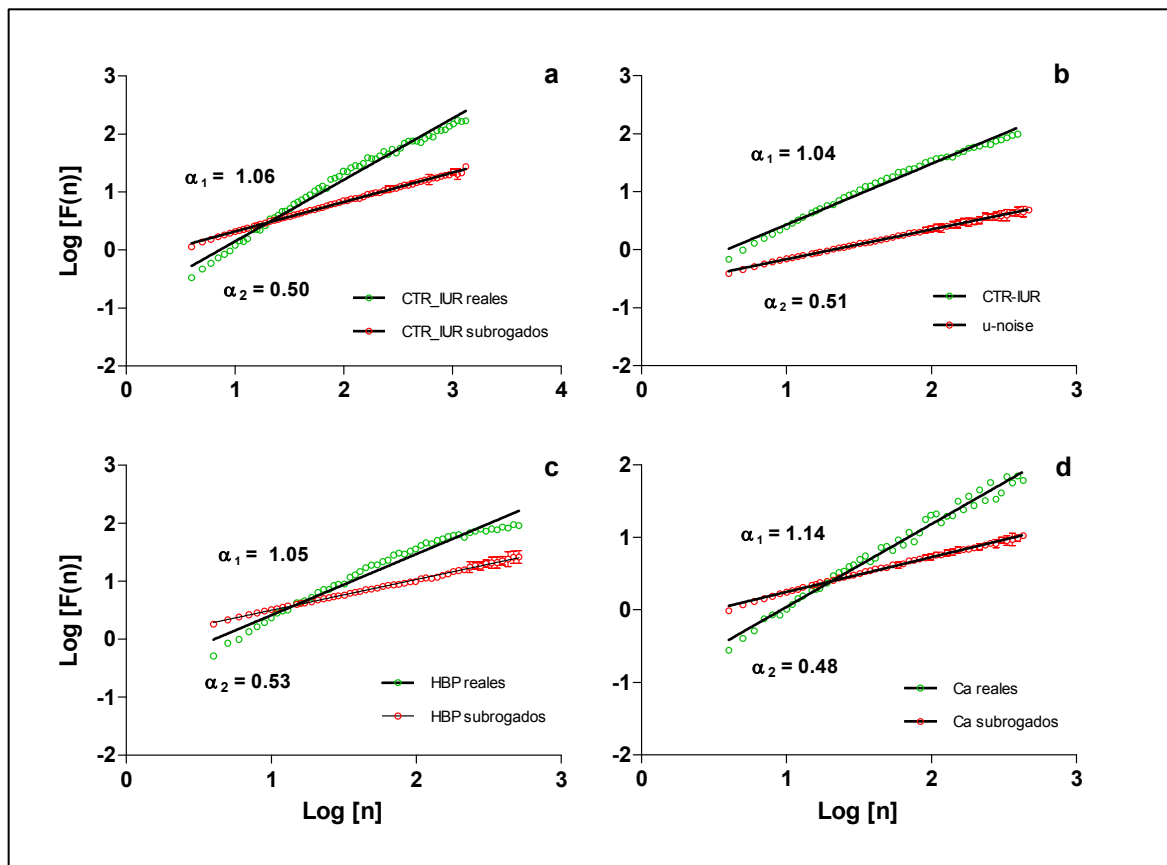


Figura 81. Método DFA; rectas de regresión de $\text{Log}[F(n)]$ en función de $\text{Log}[n]$. **a)** Casos reales con orientación IUR y su correspondiente serie subrogada. **b)** Ruido blanco (u-noise) y casos reales con orientación IUR. **c)** Casos de HBP y su correspondiente serie subrogada. **d)** Casos de Ca y su correspondiente serie subrogada. En todos los casos, la pendiente de la recta de los datos reales ($\alpha_1 \approx 1.00$) difiere significativamente de la pendiente para los datos subrogados o de ruido blanco ($\alpha_2 \approx 0.51$). Las líneas barras de error representan los intervalos de confianza del 95%.

3.8. Isotropía y comparación regional de las estimaciones de la dimensión fractal por “box counting” (D_0) y de la lacunaridad (Λ) en próstata control

No se detectan diferencias significativas en la estimación de D_0 cuando se comparan entre sí las zonas de la próstata normal. Así mismo, la D_0 no muestra cambios significativos en relación con las tres orientaciones X, Y, Z y la orientación isotrópica al azar (IUR) (Fig. 82).

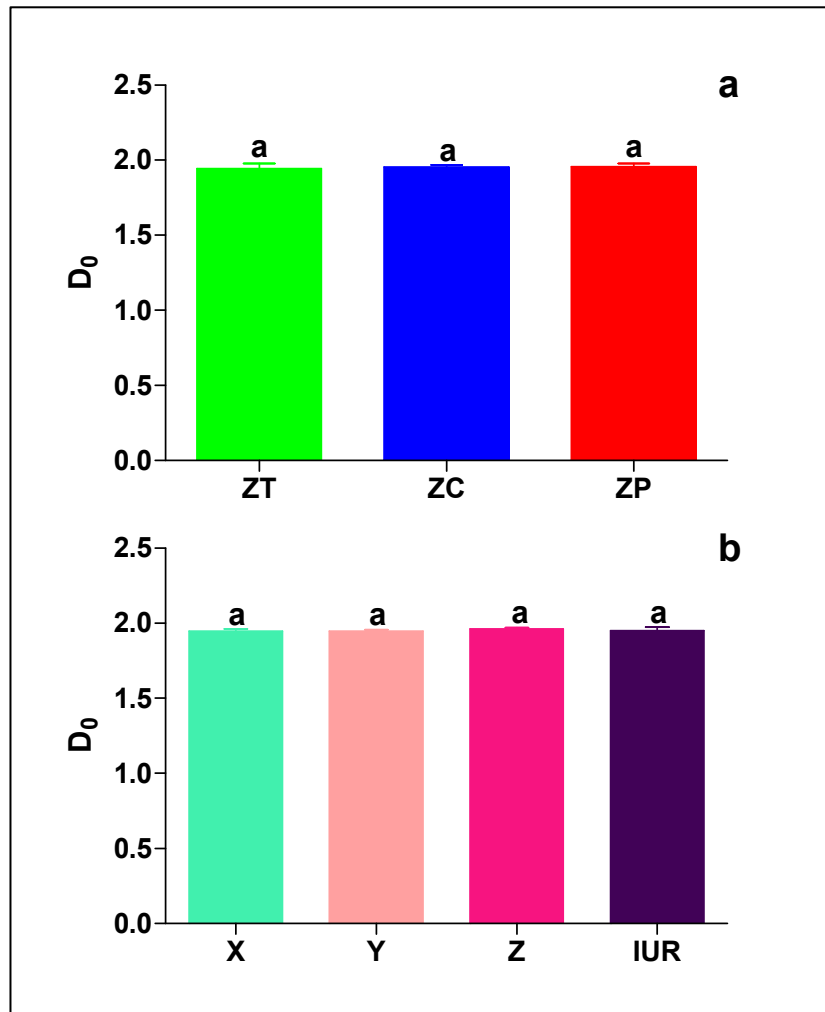


Figura 82. (a) Diagrama de barras expresando los valores medios de D_0 en zona de transición (ZT), zona central (ZC) y zona periférica (ZP) de la próstata normal. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. **(b)** Diagrama de barras expresando los valores medios de D_0 según los ejes X, Y, Z y orientación IUR en la próstata normal. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación, letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos analizados, letras idénticas, ausencia de significación.

En cuanto a la estimación de Λ , se observa que éste parámetro no manifiesta diferencias significativas ni en relación la zona prostática, ni con la orientación (Fig.83).

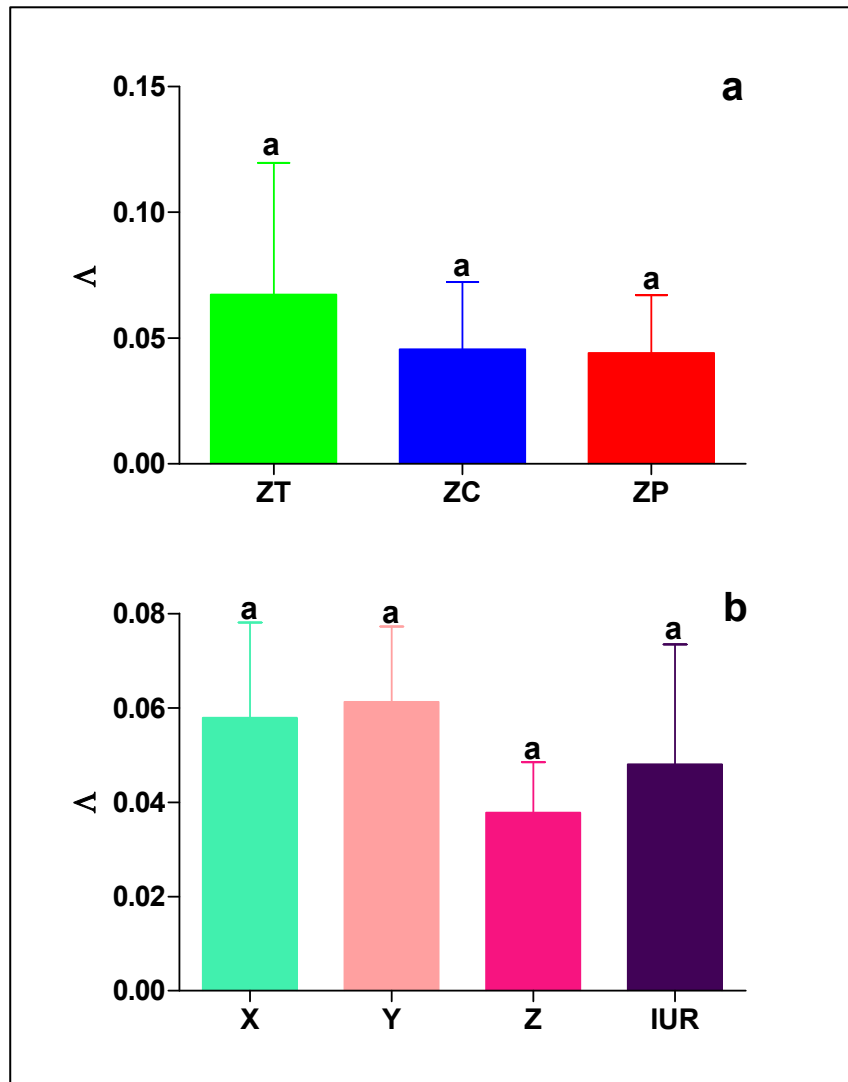


Figura 83. (a) Diagrama de barras expresando los valores medios de Δ en zona de transición (ZT), zona central (ZC) y zona periférica (ZP) de la próstata normal. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. **(b)** Diagrama de barras expresando los valores medios de Δ según los ejes X, Y, Z y orientación IUR en la próstata normal. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación, letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos analizados, letras idénticas, ausencia de significación.

3.9. Estimación de D_0 y Λ en próstata control, HBP y carcinoma

La dimensión fractal por box counting (D_0) es significativamente menor en los casos de adenocarcinoma que en los controles (ZT y ZP) y en HBP. Además la D_0 en ZT, ZP y HBP no muestra diferencias significativas (Fig. 84 a). Por el contrario la lacunaridad (Λ) es significativamente mayor en el adenocarcinoma que en ZT, ZP y HBP. Una vez más, éstas dos zonas y HBP no muestran diferencias significativas en relación con Λ (Fig. 84 b).

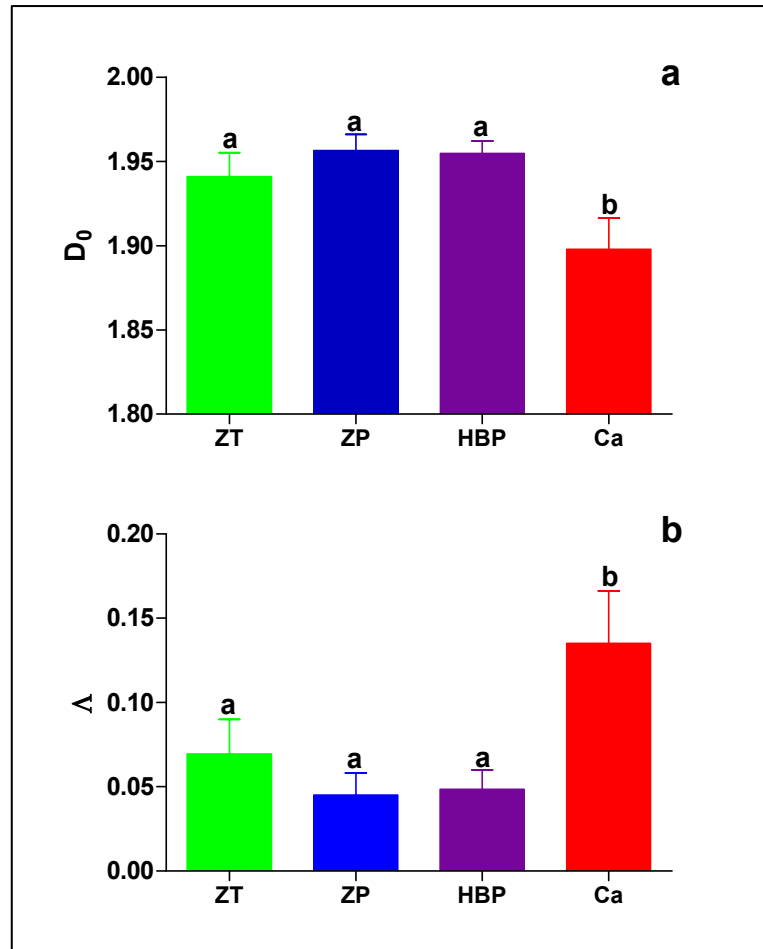


Figura 84. (a) Diagrama de barras expresando los valores medios de D_0 en zona de transición (ZT), zona periférica (ZP), HBP y Ca. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. **(b)** Diagrama de barras expresando los valores medios de Λ en zona de transición (ZT), zona periférica (ZP), HBP y Ca. Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Las letras situadas sobre las barras de error manifiestan la significación, letras diferentes indican la existencia de diferencias significativas entre los grupos analizados, letras idénticas, ausencia de significación.

3.10. Comparación de las estimaciones de D_0 y D_2 en próstata control, HBP y carcinoma

En todas las zonas de la próstata normal (ZT, ZP, ZC) se observa que D_2 a la dE óptima es significativamente menor que D_0 (Fig. 85).

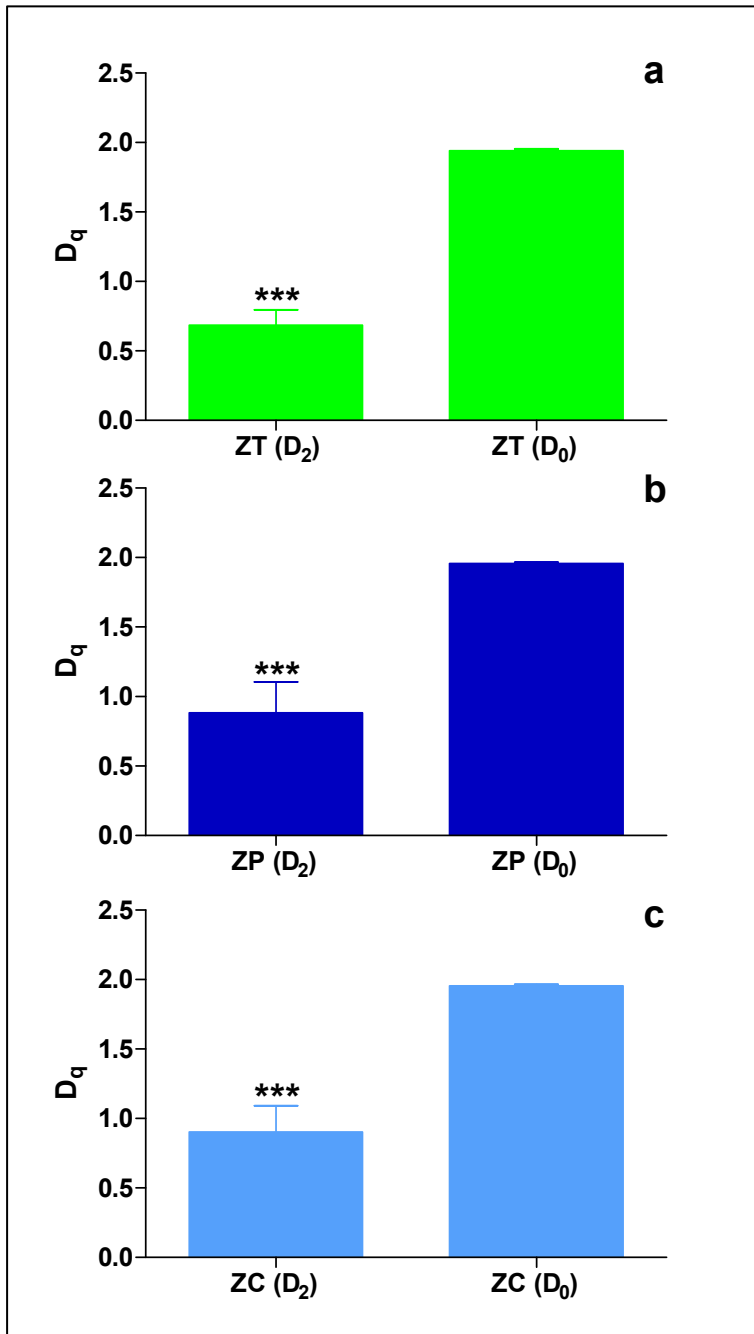


Figura 85. Diagramas de barras expresando los valores medios de D_2 y de D_0 en: **a)** zona de transición (ZT); **b)** zona periférica (ZP); **c)** zona central (ZC). Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Los asteriscos indican que las diferencias entre D_2 y D_0 son altamente significativas,

Así mismo, tanto para HBP como para Ca, D_2 a la dE óptima es significativamente menor que D_0 (Fig. 86).

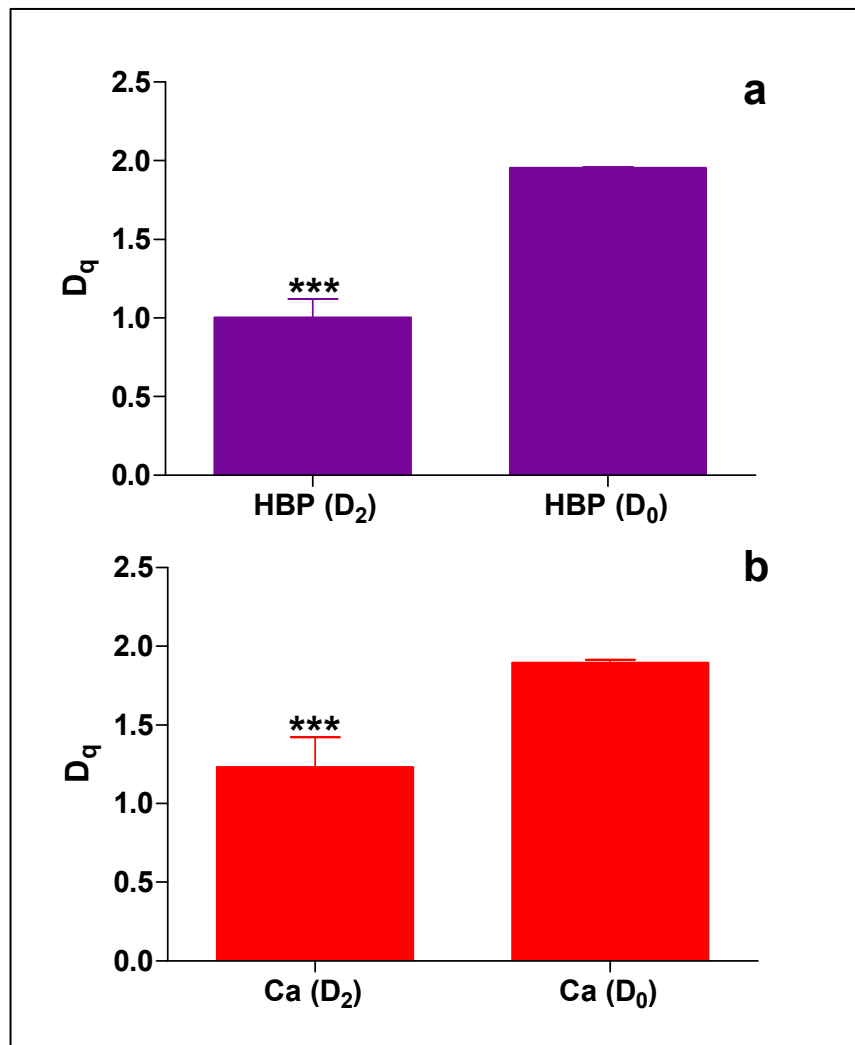


Figura 86. Diagramas de barras expresando los valores medios de D_2 y de D_0 en: **a)** Hiperplasia prostática benigna (HBP); **b)** Carcinoma (Ca). Las barras de error indican la desviación estándar de la media. Los asteriscos indican que las diferencias entre D_2 y D_0 son altamente significativas,

4. ESTRUCTURA MULTIFRACTAL DEL LECHO MICROVASCULAR

4.1. Transformadas wavelet de series espaciales inmunoteñidas para Factor-VIII en próstata control, HBP y Ca

Cuando se aplica la transformación WT a series espaciales de tejido prostático que muestran los cambios de V_V Factor-VIII de los microvasos a lo largo de un eje prefijado, se observa que, tanto en las próstatas normales (en cualquier zona) como en las patológicas (HBP y Ca), la amplitud de la wavelet fluctúa en relación con la localización espacial y con la escala considerada, detectándose bifurcaciones y correlaciones a medio y largo rango que sugieren la naturaleza multifractal de la estructura inmunoteñida (Figs. 86-88). Las transformadas de series de datos subrogados muestran una simplificación de las fluctuaciones WT de espacio-escala que se traducen en una disminución de la complejidad de la bifurcaciones y de la magnitud del rango de las correlaciones (Fig. 89).

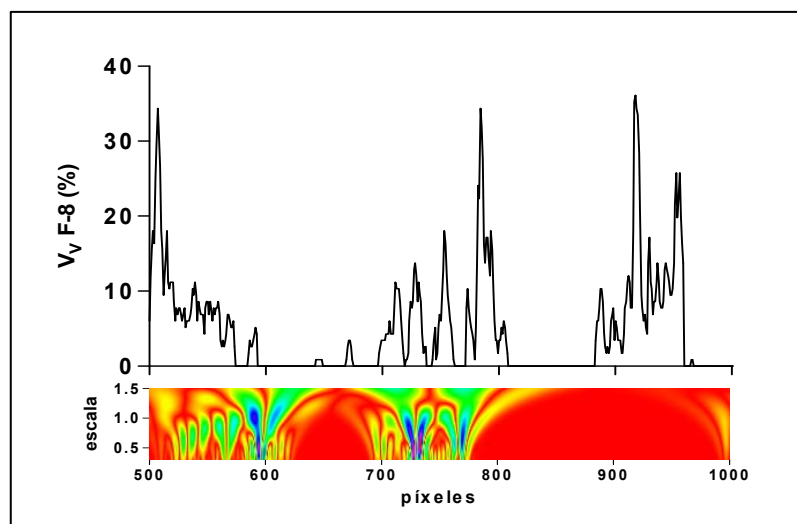


Figura 86. En la porción superior de la imagen se observa la gráfica de una serie espacial de V_V Factor-VIII en ZT. El eje de abscisas expresa los píxeles ocupados por la serie y el de ordenadas los valores de la V_V . En la porción inferior de la imagen se muestra el análisis WT en código de colores. El eje X representa la misma magnitud (espacio) que la gráfica. El eje Y muestra las diversas escalas consideradas. Los colores más brillantes indican valores mayores de la amplitud de las wavelets, que se corresponden con mayores fluctuaciones de los valores de la V_V para una escala y en una localización determinadas. Se detectan bifurcaciones y conexiones (arcos de >200 píxeles).

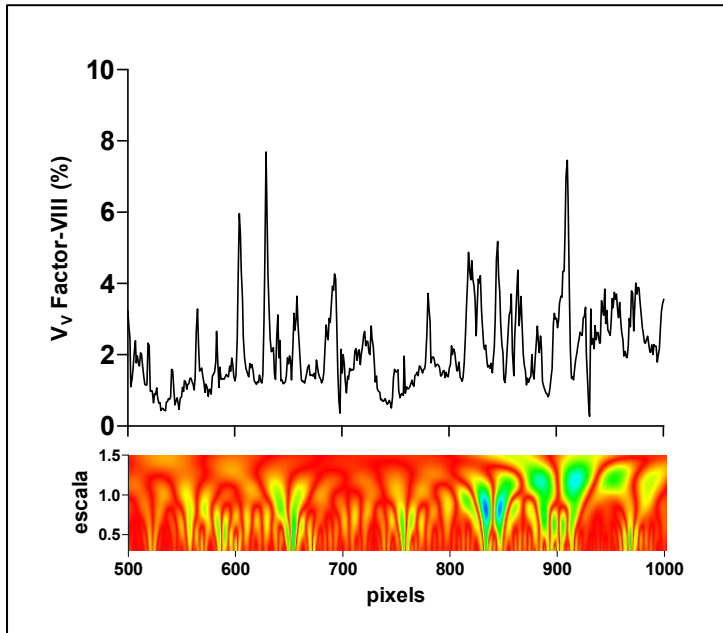


Figura 87. La misma información que se indica en la Figura 85, pero para una serie espacial de HBP

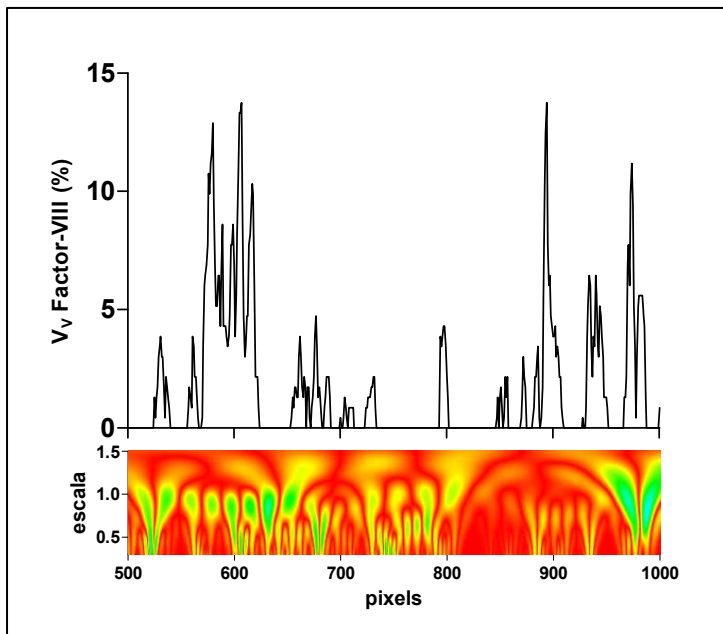


Figura 88. La misma información que se indica en las figuras anteriores, pero para una serie espacial de Ca.

En las transformadas de series de ruido blanco, se observa lo descrito para los datos subrogados pero de modo mucho más acentuado y uniforme (Fig. 90).

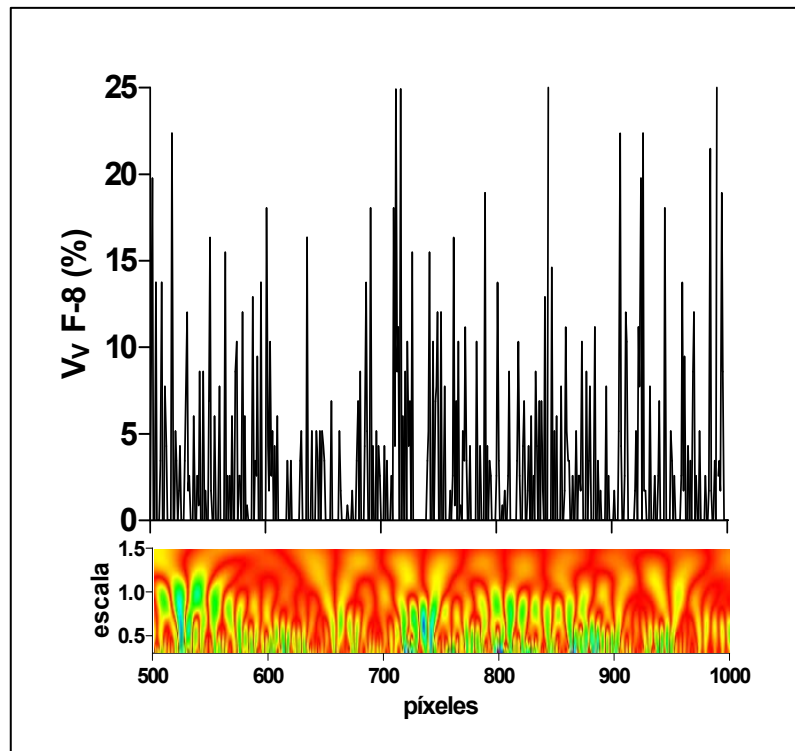


Figura 89. En la porción superior de la imagen se observa la gráfica de datos subrogados construida a partir de una serie espacial de V_V Factor-VIII en ZT. El eje de abscisas expresa los píxeles ocupados por la serie subrogada y el de ordenadas los valores de la V_V . En la porción inferior de la imagen se muestra el análisis WT en código de colores. El eje X representa la misma magnitud (espacio) que la gráfica. El eje Y muestra las diversas escalas consideradas. Los colores más brillantes indican valores mayores de la amplitud de las wavelets, que se corresponden con mayores fluctuaciones de los valores de la V_V para una escala y en una localización determinadas. Se detectan una pérdida del tamaño y amplitud de las bifurcaciones y conexiones sugiriendo que la randomización de los datos subrogados destruye la naturaleza multifractal y las correlaciones de largo rango.

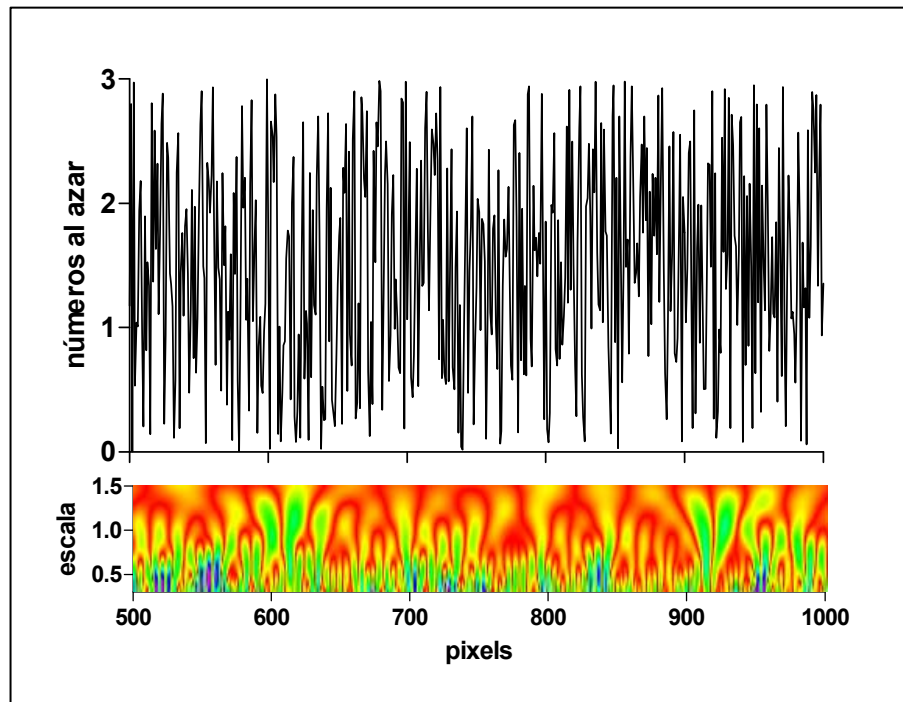


Figura 90. En la porción superior de la imagen se observa la gráfica de una serie de ruido blanco construida por la distribución de números al azar a lo largo del eje de ordenadas. El eje de ordenadas expresa los valores de los números al azar. En la porción inferior de la imagen se muestra el análisis WT en código de colores. El eje X representa la misma magnitud (espacio) que la gráfica. El eje Y muestra las diversas escalas consideradas. Los colores más brillantes indican valores mayores de la amplitud de las wavelets, que se corresponden con mayores fluctuaciones de los valores de la serie para una escala y en una localización determinadas. Se detectan una pérdida del tamaño y amplitud de las bifurcaciones y conexiones sugiriendo ausencia de naturaleza multifractal y de correlaciones de largo rango.

4.2. Comparación de las estimaciones del espectro multifractal $\tau(q)$ en próstata control, HBP y Ca

Cuando se compara la gráfica de los valores $\tau(q)$ en función de los momentos Q , para las distintas zonas prostáticas y sus correspondientes series subrogadas, se detecta que los casos reales muestran un espectro $\tau(q)$ no lineal sin cambios significativos entre las zonas. Los datos subrogados muestran un espectro $\tau(q)$ lineal, lo que indica pérdida de multifractalidad (Fig. 91 a).

Así mismo cuando comparamos el espectro $\tau(q)$ de los casos HBP con el obtenido para ZT, o el del grupo Ca con el obtenido para ZP, se demuestra el carácter no lineal de $\tau(q)$ tanto para HBP como para Ca, no mostrando ambos diferencias significativas con los espectros multifractales de ZT y ZP respectivamente. Como sucede con los controles los datos subrogados de HBP y Ca muestran un espectro $\tau(q)$ lineal (Fig. 91 b,c).

En todos los casos, las series de ruido blanco (u-noise) muestran un espectro $\tau(q)$ lineal (Fig.91 a-c).

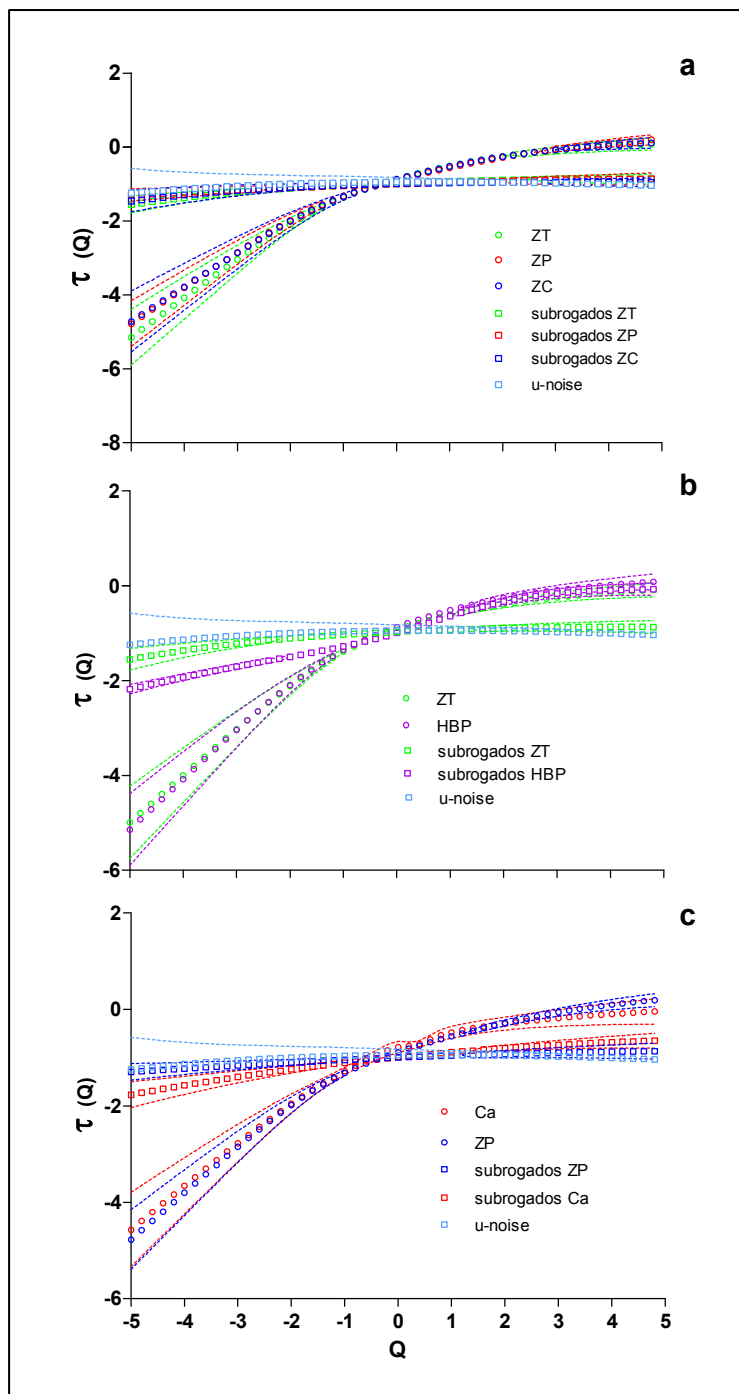


Figura 91. a) Estimación de $\tau(q)$ en función de los momentos Q , para series espaciales de microvasos en ZT, ZP, ZC, U-noise y sus correspondientes subrogados. Las curvas de las distintas zonas prostáticas no muestran diferencias significativas. **b)** Estimación de $\tau(q)$ en función de los momentos Q , para series espaciales de microvasos en ZT, HBP, U-noise y sus correspondientes subrogados. Las curvas de ZT y HBP no muestran diferencias significativas. **c)** Estimación de $\tau(q)$ en función de los momentos Q , para series espaciales de microvasos en ZP, Ca, U-noise y sus correspondientes subrogados. Las curvas de ZP y Ca no muestran diferencias significativas. Las líneas de trazo discontinuo indican los intervalos de confianza del 95%.

4.3. Estimaciones del espectro de singularidad $D(h)$ en próstata control

Al estudiar la gráfica del espectro de singularidad $D(h)$ en función de los exponentes de Hölder (h) se muestra que, para todas las zonas de la próstata normal, adopta la forma de una parábola de ramas amplias. Sin embargo la subrogación de los datos produce un colapso de la función disminuyendo considerablemente la amplitud de la parábola (Fig. 92).

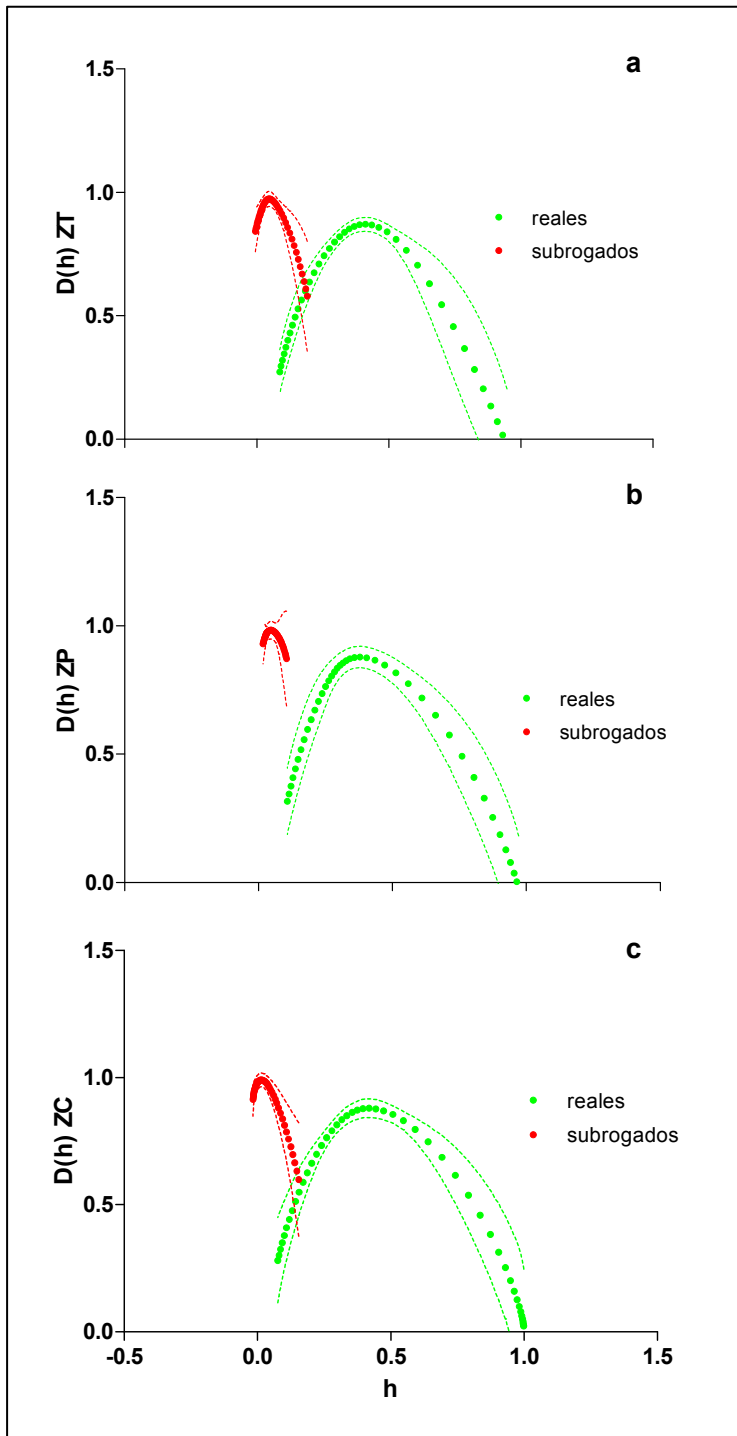


Figura 92. Estimación de $D(h)$ en función de los exponentes de Hölder h , para series espaciales de microvasos en **a)** ZT; **b)** ZP; **c)** ZC. En cada gráfica se muestran sus correspondientes subrogados. La curva de los valores reales es una parábola de ramas amplias indicativa de multifractalidad. La curva de los datos subrogados pierde amplitud, lo que sugiere pérdida de carácter multifractal. Las líneas de trazo discontinuo indican los intervalos de confianza del 95% para cada curva.

Cuando se comparan los espectros de singularidad de las tres zonas prostáticas, no se detectan diferencias significativas. El espectro de singularidad de las series de ruido blanco consiste en una parábola con una amplitud de sus ramas considerablemente disminuida y similar a la de los datos subrogados (Fig. 93).

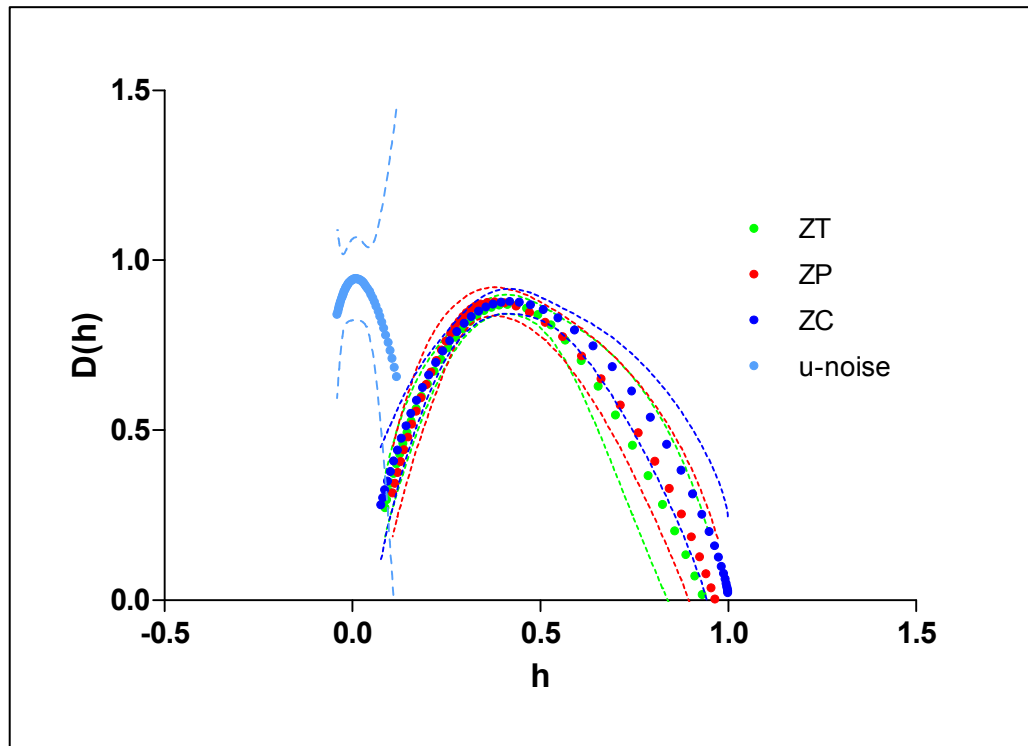


Figura 93. Estimación de $D(h)$ en función de los exponentes de Hölder h , para los microvasos de las tres zonas prostáticas. También se muestra la $D(h)$ de series de ruido blanco (u-noise). Las líneas de trazo discontinuo indican los intervalos de confianza del 95% para cada curva.

4.4. Estimaciones del espectro de singularidad $D(h)$ en próstata control, HBP y Ca

Al estudiar la gráfica del espectro de singularidad $D(h)$ en función de los exponentes de Hölder (h) se muestra que al igual que en los controles, tanto en HBP como en Ca adopta la forma de una parábola de ramas amplias. Sin embargo la subrogación de los datos produce un colapso de la función disminuyendo considerablemente la amplitud de la parábola, incluso para HBP, la parábola se reduce a una sola rama (Fig. 93 a,b).

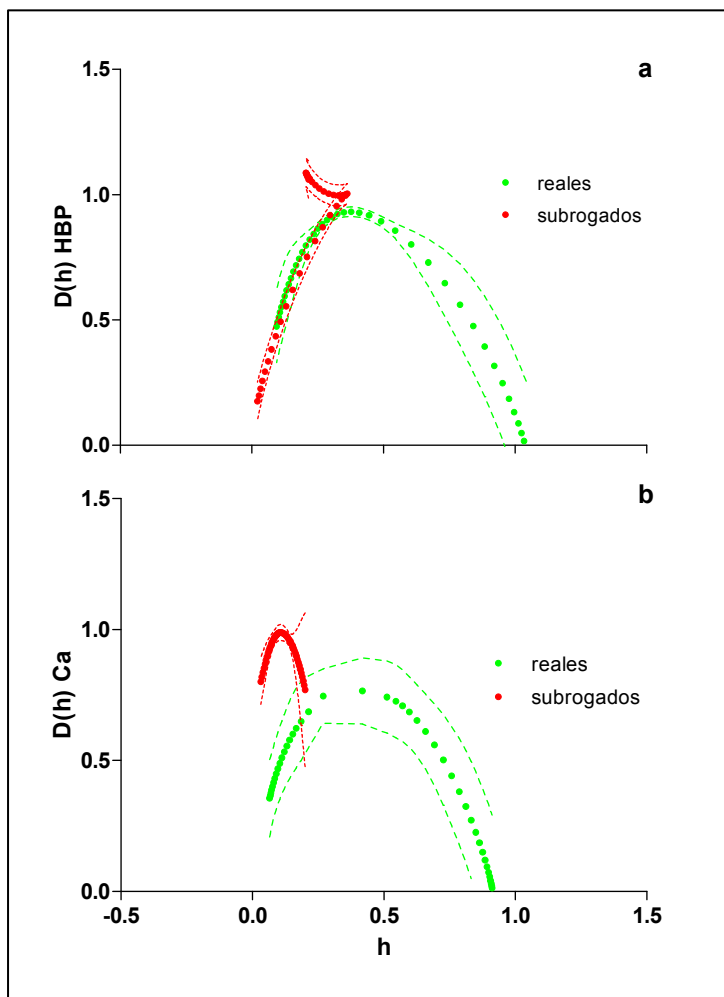


Figura 93. a) Estimación de $D(h)$ en función de los exponentes de Hölder h , para series espaciales de microvasos en HBP y sus correspondientes subrogados. **b)** Estimación de $D(h)$ en función de los exponentes de Hölder h , para series espaciales de microvasos en Ca y sus correspondientes subrogados. Las líneas de trazo discontinuo indican los intervalos de confianza del 95%.

Por otro lado, si se comparan las curvas de HBP y Ca con sus controles correspondientes (ZT y ZP), no se observan diferencias significativas. El espectro de singularidad de las series de ruido blanco consiste en una parábola con una amplitud de sus ramas considerablemente disminuida y similar a la de los datos subrogados (Fig. 94 a,b).

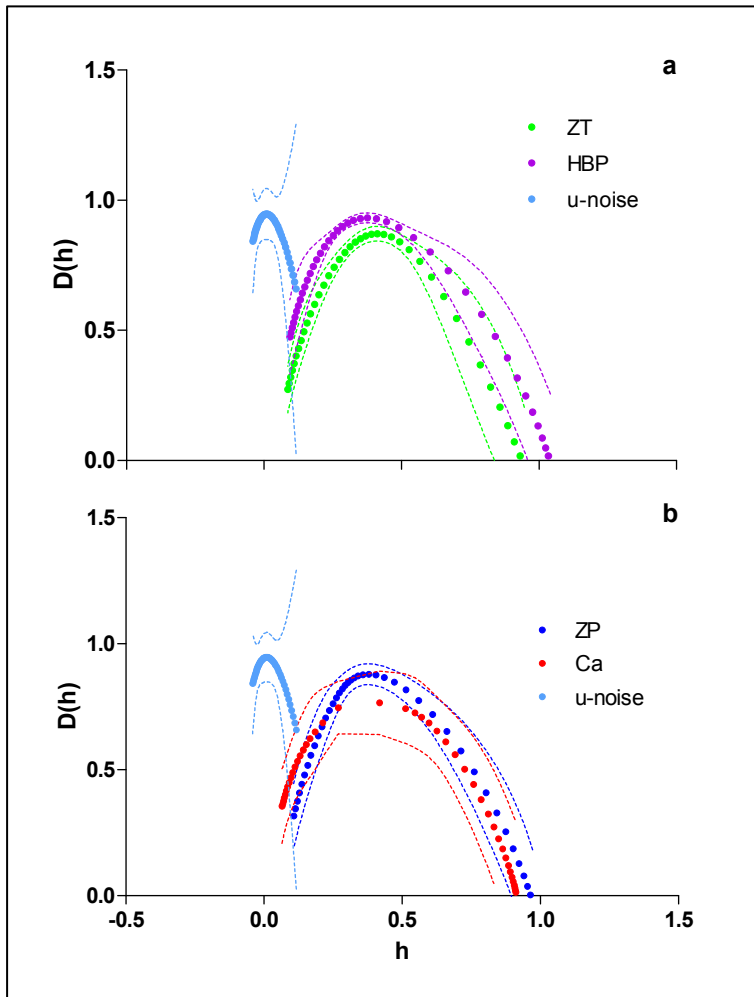


Figura 94. a) Estimación de $D(h)$ en función de los exponentes de Hölder h , para series espaciales de microvasos en HBP, ZT y u-noise. **b)** Estimación de $D(h)$ en función de los exponentes de Hölder h , para series espaciales de microvasos en Ca, ZP y u-noise. Las líneas de trazo discontinuo indican los intervalos de confianza del 95%.

DISCUSIÓN

HALLAZGOS CUALITATIVOS

Las características morfológicas, la histología y la inmunorreactividad endotelial para el Factor-VIII de los microvasos no presentan diferencias cualitativas reseñables cuando se comparan las zonas de la próstata normal entre sí, con la HBP y con el adenocarcinoma. Únicamente se observa una discreta dilatación luminal en los microvasos de HBP, algo más llamativa en el adenocarcinoma. Además, y corroborando lo descrito por otros autores (Montironi et al. 1993) parece que los microvasos periacinares en el adenocarcinoma están más alejados de la membrana basal epitelial que sus homólogos en HBP y tejido normal.

ESTEREOLOGÍA

Para entender el significado de los resultados de cuantificación lineal de la microvascularización prostática en distintas situaciones, normales y patológicas hemos de tener presentes conceptos ya comentados a lo largo de este trabajo. Sabemos que la estereología es una metodología capaz de cuantificar estructuras espaciales, generalmente tridimensionales, empleando fórmulas basadas en las relaciones entre cantidades observadas en dos dimensiones y parámetros tridimensionales. Estas técnicas proporcionan información no sesgada y objetiva (Howard and Reed 2005b). En la bibliografía se destacan estudios que indican un incremento de la microvascularización en HBP (Doll et al. 2001), pero esto no ha sido demostrado con métodos estereológicos rigurosos (Deering et al. 1995).

Por otro lado existen estudios que relacionan el incremento de la densidad vascular con fenotipos tumorales agresivos (Folkman 1992; Weidner et al. 1993; O'Brien and Harris 1995; Montironi et al. 1996) pero la mayor parte de ellos no presentan una base estereológica consistente. En el presente trabajo se arrojan nuevas luces sobre la magnitud de la microvascularización prostática y sus posibles

cambios, mediante el empleo de estimadores estereológicos cuya fiabilidad ha sido bien contrastada en la bibliografía (Mattfeldt et al. 2006; Santamaría et al. 2009).

Originariamente para cuantificar la microvascularización se ha usado un estimador denominado “densidad de microvaso” (microvessel density: MVD) (Bigler et al. 1993; Weidner 1993; Weidner et al. 1993; Deering et al. 1995); empleado con profusión en diversos estudios (Bigler et al. 1993; Deering et al. 1995; Lekas et al. 2006). Sin embargo, a la luz de otros estudios (Mattfeldt et al. 2006; Santamaría et al. 2009) y de los hallazgos del presente trabajo, la estimación estereológica de longitud de microvaso por unidad de volumen del espacio de referencia (L_V) es claramente preferible a la MVD, y esto, por dos razones fundamentales:

- a) La MVD intenta cuantificar el número de vasos por unidad de área, sin embargo, estrictamente hablando, no se puede contar vasos en secciones (planos bidimensionales) pues los vasos son estructuras lineales que “habitan” en un espacio tridimensional, por lo tanto la MVD no contabiliza realmente vasos sino perfiles o secciones vasculares, y así, dos secciones del mismo vaso, lo suficientemente próximas podrían interpretarse erróneamente como dos vasos distintos.
- b) La densidad de longitud (L_V) de una estructura lineal tridimensional registrada en un plano 2D se expresa como: $2 \bullet$ (número de perfiles cortados/área de la sección) (Mattfeldt et al. 2006). Por tanto, como el número de perfiles cortados por unidad de área de sección es la MVD, se concluye que la L_V es igual al doble de la MVD, en consecuencia, cuando se intenta estimar la cantidad de microvasos mediante la MVD se estaría subestimando el tamaño del lecho microvascular con un sesgo del 50% (Santamaría et al. 2009).

Según se ha observado en el presente estudio, confirmando lo descrito por otros autores (Santamaria et al. 2007b), la longitud relativa de microvasos, es decir la longitud de microvasos por unidad de volumen de estroma prostático (L_V) no muestra diferencias significativas entre las zonas de McNeal. Es sabido sin embargo que en la próstata normal, la longitud absoluta de microvasos es significativamente mayor en ZP que en ZT y ZC (Santamaria et al. 2007b). Esto nos indica que, en términos absolutos, el tamaño del lecho microvascular de la próstata normal crece en función del tamaño de la zona que se considera, pues ZP

representa aproximadamente el 75% del volumen de una próstata normal, mientras que la densidad microvascular se mantiene similar en las tres zonas prostáticas.

Cuando se considera la orientación de la próstata en el espacio, tampoco se detectan diferencias significativas en la L_v microvascular a lo largo de los tres ejes espaciales (X, Y, Z), podemos concluir que la distribución de los microvasos en la próstata normal es isotrópica.

A pesar de lo sugerido por algunos autores (Doll et al. 2001) no hemos detectado en la HBP un incremento del lecho vascular en términos relativos de densidad de longitud, en comparación con la zona de transición de la próstata normal. Es bastante probable que en términos absolutos la longitud de microvaso sea mucho mayor en la HBP que en ZT, ya que el volumen del adenoma prostático es habitualmente mucho mayor que el volumen de la zona de transición (McNeal 1997).

Sin embargo, los vasos del adenocarcinoma son significativamente más largos por unidad de volumen que los de la ZP, corroborando lo descrito en otros estudios (Mattfeldt et al. 2006; Santamaría et al. 2009); esto podría explicarse por la neoformación vascular propia de los procesos tumorales, y estaría relacionado con el aumento de angiogénesis en el cáncer y las lesiones preinvasivas indicado por varios autores (Sinha et al. 2004; Condon 2005; Padhani et al. 2005; Pallares et al. 2006; Kong et al. 2007; Delves et al. 2007).

Aun así no está claro como se agranda el lecho microvascular en los casos de cáncer más que en los controles, sin un aumento significativo de la proliferación endotelial de los vasos tumorales (Santamaría et al. 2009). Varios autores también indican la ausencia de relación entre la proliferación endotelial y el aumento de densidad de los microvasos en cáncer de mama y de próstata (Fox et al. 1993; Vartanian and Weidner 1994; Vartanian and Weidner 1995). Una posible disminución de la actividad apoptótica para el endotelio de cáncer de próstata podría explicar el aumento de la longitud de los microvasos sin proliferación endotelial adicional. Se sabe que la apoptosis de una proporción relativamente pequeña de las células endoteliales es suficiente para mediar en una disminución significativa en la densidad de los microvasos (Dong et al. 2007). La resistencia a la apoptosis en el

cáncer ha sido documentada por varios autores, quienes encontraron disminución de los niveles de las enzimas relacionadas con la apoptosis, las caspasas 1 y 3, en el epitelio del tumor (Winter et al. 2001). La elongación de los microvasos del cáncer podría explicarse por la migración de las células endoteliales (Grizzi et al. 2005) y la remodelación de los componentes de la membrana basal capilar (Carmeliet 2003). La disminución de la cantidad de células endoteliales por unidad de longitud de los microvasos junto con el aumento de la elongación de la microvascularización podría crear huecos entre las células endoteliales y, con ello, vasos con predisposición al goteo de sangre a través de sus paredes según lo sugerido por otros autores (Hashizume et al. 2000).

Además la HBP puede que también cuente con un cierto grado de crecimiento vascular, razón por la que no existen diferencias significativas entre la L_V del carcinoma y la L_V de la HBP, aunque no lo suficiente como para encontrar diferencias significativas con la L_V de los microvasos de la zona de transición de la próstata normal.

No existen diferencias entre el d_{vm} de las entidades patológicas y no patológicas por lo que asumimos que, y en base a los resultados de nuestro estudio, los vasos de la próstata normal, HBP y carcinoma prostático tienen un calibre similar. En contraposición existen trabajos en los que se afirma que el calibre de los vasos del cáncer es mayor que los de la próstata normal y la HBP (Montironi et al. 1996).

No se detectan diferencias significativas en el d_{vm} a lo largo de los tres ejes espaciales (X, Y, Z), podemos concluir que también este parámetro, al igual que L_V , es isotrópico en la próstata normal.

Si tenemos en cuenta que el radio de difusión microvascular ($rdif$) es el radio de un cilindro virtual de tejido prostático asignado a un capilar (Santamaría et al. 2009) entendemos que cuanto mayor sea el $rdif$ tanto mayor espacio habrá entre los capilares del estroma prostático. No se han detectado diferencias significativas en el $rdif$ entre las distintas regiones de la próstata normal. Tampoco se detectan diferencias significativas en el $rdif$ a lo largo de los tres ejes espaciales (X, Y, Z), podemos concluir que también este parámetro es isotrópico en la próstata normal.

Sin embargo si que existen diferencias significativas entre el rdif del carcinoma y el de la ZP y el rdif de la HBP y el de la ZT. Posiblemente el hecho de que los vasos del carcinoma sean de mayor longitud relativa que los de la próstata normal obligue a que su disposición en el espacio determine que distintos tramos de un mismo vaso se encuentren lo suficientemente próximos entre si como para que el volumen de tejido asignado alrededor de cada tramo de ese vaso sea menor y en consecuencia su rdif también sea menor; es decir, tanto mas denso será el ovillo de vasos que se forme cuanto mas largos sean estos y por tanto habrá menos espacio entre vasos.

La HBP tiene una L_V mayor que la de la próstata normal, no lo suficientemente grande como para ser significativamente mayor pero tal vez si lo suficiente como para que la longitud de sus vasos haga que estos se dispongan tan próximos como para que el rdif de la HBP sea significativamente menor que el de la próstata normal.

Por otro lado no existen diferencias entre el rdif de la HBP y el del carcinoma pero si es ligeramente mayor el rdif de la HBP que el del carcinoma, como corresponde al hecho de que los vasos del carcinoma sean mas largos con, consecuentemente, “ovillos vasculares” mas enmarañados, con tramos vasculares mas próximos entre si.

La fracción de volumen del estroma ocupada por Factor-VIII nos indica la cantidad de citoplasma de células endoteliales que expresa Factor-VIII en un determinado volumen de tejido. Como no encontramos diferencias entre la V_V Factor-VIII de las distintas entidades, patológicas y no patológicas, asumimos que no existen mas células endoteliales por unidad de volumen en unas entidades que en otras. Sin embargo, la V_V no es un buen parámetro para interpretar si existen mas o menos vasos en una entidad que en otra pues tan sólo considera la cantidad de células inmunoteñidas por Factor-VIII en un volumen determinado de tejido. Al igual que los restantes parámetros estereológicos, la V_V Factor-VIII manifiesta una distribución isotrópica en las tres zonas de la próstata normal.

Aunque no existen diferencias significativas en la V_V Factor-VIII entre HBP y el carcinoma si parece que este parámetro es ligeramente mayor en la hiperplasia

que en el cáncer con lo que podemos entender que podría darse una concentración de células endoteliales por unidad de volumen ligeramente mayor en HBP que en carcinoma, tal vez a expensas de ese fenómeno de migración de células endoteliales en el cáncer a la que se ha hecho referencia más arriba.

El hecho de la conservación de la isotropía en todos los parámetros estereológicos lineales considerados en este estudio, permite sacar una consecuencia de interés metodológico: a la hora de la estimación de dichos parámetros, no habría que diseñar metodologías de muestreo especialmente dirigidas para asegurar la misma probabilidad de muestreo en las tres direcciones del espacio (secciones IUR, por ejemplo). Esto es de sobra conocido en relación con la fracción de volumen, que es de suyo isotrópica, sin embargo para los parámetros lineales como la longitud de microvaso, la anisotropía no se puede asumir directamente (Howard and Reed 2005a).

ESTUDIOS NO LINEALES

El valor que toma la V_V Factor-VIII de los vasos de cada región de la próstata normal, de la HBP y del carcinoma a lo largo de una dirección espacial predeterminada (ejes X, Y, Z) se ha representado en forma de series espaciales de datos.

Todas estas series, independientemente de su origen (zona próstatica, HBP, carcinoma) parecen a simple vista irregulares y aperiódicas. Tal vez si se comparan entre si, las series de la HBP parecen la menos irregulares. Sin embargo, está claro que cuando se compara cada una de estas series con las de sus subrogados se aprecia la diferencia. Las series de los subrogados son menos irregulares, más homogéneas, que las de sus correspondientes datos reales.

Si comparamos las series reales con las series de datos simulados de “ruido blanco” comprobamos que estas últimas son aún menos irregulares, incluso que las de los datos subrogados. Los datos subrogados no son más que datos reales (que preservan los datos estadísticos reales: media y varianza) pero secuenciados al

azar. Los datos de “ruido blanco” son números elegidos al azar (con unos rangos similares a los valores reales de V_V) dispuestos de forma aleatoria. Cuanto más influye el azar en la creación de las series simuladas, más como es lógico en las de ruido blanco que en los subrogados, tanto más regular y homogénea es la representación de la serie a lo largo de una dirección del espacio. Por lo que cuanto más diversa sea la morfología de la serie real de la de las simuladas, menos participará el azar en la disposición de los datos de las series reales.

Del estudio cualitativo de las series espaciales se deduce la imposibilidad de inferir diferencias entre las zonas prostáticas normales o entre próstata normal y patológica, dada la similitud de dichas series en todos los casos. La escasez de información que se extrae del simple análisis cualitativo de las series espaciales, se ha reseñado en multitud de análisis no lineales de otras series espacio-temporales, como las series de frecuencia cardiaca en sujetos normales y con insuficiencia cardiaca (Goldberger et al. 2002) y no implica la inexistencia de información subyacente que se puede evidenciar con el posterior estudio no lineal de la serie, por ejemplo con la reconstrucción de atractores y la estimación de la dimensión de correlación (Theiler 1990).

Si comparamos la disposición de las órbitas de los atractores de los datos reales, los de los subrogados y el ruido blanco se aprecian diferencias con los reconstruidos a partir de las series de ruido blanco, cuyas órbitas se encuentran distribuidas más uniformemente a lo largo del espacio, como se corresponde con el hecho de que los datos que originan estos atractores no tienen relación entre sí, por tratarse de valores simulados dispuestos aleatoriamente.

La reconstrucción de atractores muestra las correlaciones entre puntos de la serie espacial alejados entre sí tras aplicar un “retardo” (τ_{opt}) determinado. Las zonas del atractor más pobladas indican la presencia de tripletes de valores de la serie espacial correlacionados entre sí.

Los atractores de las series control, HBP y adenocarcinoma presentan una geometría definida (piramidal o triédrica), no existiendo diferencias entre las zonas de la próstata normal ni entre próstata normal y patológica. La morfología observada

en nuestros atractores muestra una mayor regularidad geométrica que la de los atractores descritos en el cáncer de mama y la mastopatía (Mattfeldt 1997) y se asemejan discretamente a los de algunos modelos matemáticos de geometría caótica. Concretamente y de modo sorprendente a un “Kamtorus”, este fractal es la resultante de diversos esfuerzos por encontrar una respuesta a la pregunta sobre la estabilidad del sistema solar. Su nombre proviene del matemático ruso A.N. Kolmogorov, que desarrolló una teoría que predice la forma y estabilidad de las órbitas de los planetas. Esta teoría fue confirmada independientemente por un estudiante de Kolmogorov, V. I. Arnold y por el matemático alemán J. Moser, (de ahí el nombre, KAM: Kolmogorov, Arnold, Moser) (Chierchia and Mather 2010).

Esta morfología se conserva parcialmente en los subrogados y se pierde por completo en el ruido blanco. En la estructura del atractor se observan unas zonas más densamente pobladas que otras. Las regiones densas están frecuentadas por abundantes órbitas, esto implica que los tripletes de puntos localizados en esas zonas se correlacionan entre sí aunque provengan de segmentos alejados de la serie espacial, lo que sugiere la presencia de correlaciones de largo rango (mayor complejidad).

El carácter más homogéneo de los datos simulados (subrogados y ruido blanco) manifiesta la ruptura de las correlaciones espaciales debido a la aleatorización de los datos y la transformación de un proceso caótico determinista en otro puramente estocástico (Mattfeldt 1997).

La dimensión de correlación, D_2 , es una dimensión fractal (Theiler 1990; Skinner et al. 1994; Abarbanel 1996) asociada con el atractor y estima la probabilidad de que dos puntos del espacio de fase estén separados por una distancia menor o igual que el radio del atractor, siendo éste el error cuadrático medio de los datos en relación con su valor medio (Mattfeldt 1997). D_2 estima la complejidad de los plegamientos de las órbitas del atractor, en definitiva, la cuantía y complicación de las correlaciones de medio y largo rango que se establecen entre los puntos de la serie espacial.

En sistemas determinísticos, la dimensión de correlación converge a un valor constante cuando crece la dimensión de inclusión (dE) mientras que en sistemas estocásticos se eleva indefinidamente según incrementa dE (Mattfeldt 1997; Buchler and Kandrup 1997).

En nuestros casos (próstata normal, HBP y carcinoma), la curva que representa a D_2 en función de dE converge para una dE determinada. No se detectan diferencias en relación con la zona prostática o con la orientación, se puede decir que la D_2 es isotrópica. Todo esto indica que la microvascularización no es un proceso estocástico sino que obedece a una dinámica de caos determinista, los vasos no se distribuyen al azar sino en base a un patrón subyacente a fenómenos de angiogénesis, como se ha constatado en estudios previos (Santamaria et al. 2009) y en otros lechos vasculares (Gaudio et al. 2005). El patrón de convergencia de D_2 es similar tanto para la D_2 global, como para la D_2 local (estimada para la dimensión global de inclusión óptima)

El comportamiento de la D_2 en función de la dE en HBP es comparable a lo indicado para la próstata normal. Sin embargo la D_2 del carcinoma, en comparación con los controles y la hiperplasia converge más tarde y tiene mayor pendiente, por tanto su comportamiento se acerca más a lo característico de un proceso estocástico (Mattfeldt 1997). Es interesante señalar, que, si bien la D_2 global para la HBP no muestra diferencias significativas con su homóloga para los controles, cuando se considera toda la curva de D_2 , el perfil para HBP siempre está significativamente por encima del perfil para ZT y por debajo del perfil para el cáncer. Esto puede sugerir que el patrón microvascular de una entidad benigna como es la hiperplasia no es estrictamente normal sino que muestra una cierta similitud con el observado en el cáncer.

En todos los casos, las series simuladas (de datos subrogados y ruido blanco), muestran una ausencia de convergencia de D_2 en todo el rango estudiado de dE . Estando el conjunto global de la curva de D_2 significativamente por encima de su equivalente para los datos reales. Esto permite corroborar la naturaleza determinística de la microvascularización en contraposición de la naturaleza estocástica de los datos simulados (Theiler et al. 1992).

El método DFA nos permite descubrir si en una serie espacial aparentemente irregular (V_V Factor-VIII a lo largo de un eje prefijado) existen valores correlacionados aunque se encuentren muy distantes unos de otros; es decir, si existen correlaciones de largo rango.

La presencia de estas correlaciones indican que la serie en cuestión no tiene una escala única y puede ser multifractal (Peng et al. 1994). Las correlaciones de largo rango en series espaciales vienen definidas por coeficientes alfa próximos a 1, mientras que la ausencia de las mismas se definen por alfa en torno a 0.5 (Goldberger et al. 2002).

Los coeficientes α de los datos reales en todos los casos estudiados se aproximan a 1 mientras que el α de sus subrogados se aproxima a 0.5 lo que vuelve a demostrar el carácter determinista de las series reales con una distribución regida por un patrón. Sin embargo al comparar el alfa de los datos reales se aprecian diferencias significativas entre el de ZT con el de ZP, HBP y carcinoma. Esto puede que no tenga significado funcional, pues en todos los casos α se aproxima a 1 y difiere por encima de los intervalos de confianza de los datos reales y subrogados (Peng et al. 1995).

Las estructuras fractales han sido ampliamente descritas en la literatura científica (Gleick 1988; Stewart 1989) y el concepto de geometría fractal aparece en numerosas citas a partir del trabajo de Mandelbrot, "The Fractal Geometry of Nature" (Mandelbrot 1997). La principal característica de una estructura fractal es la autosimilaridad, definida como invarianza de escala para determinadas propiedades geométricas de la estructura (Losa and Nonnenmacher 1996; Cross 1997).

Desde el punto de vista matemático se han elaborado herramientas para caracterizar a los objetos fractales (Steinhaus 1954; Maling 1968; Hakanson 1978), pero fue Benoit Mandelbrot quien sugirió la dimensión fractal como solución al problema de la medida de estos objetos fractales (Mandelbrot 1997). Existe una gran variedad de dimensiones fractales y de modos de estimarlas, con frecuente confusión en cuanto a la terminología utilizada (Falconer 1990; Mandelbrot 2006).

En el presente estudio se ha empleado la dimensión por box-counting, D_B , (recuento de cajas) usada ampliamente en el cálculo de dimensiones fractales de datos biológicos (Falconer 1990; Peitgen et al. 1991; Gulick 1992; Hall and Wood 1993; Mandelbrot 1997). La D_B es equivalente a la denominada dimensión de capacidad, D_0 , según la terminología multifractal. Como ya se indicó en la sección de Material y Métodos y se ha mostrado en los resultados, siempre se utiliza la notación D_0 para tratar de la dimensión por box counting.

Existen fractales diseñados matemáticamente como el triángulo de Sierpinski, o la curva de Koch, entre otros muchos; también encontramos objetos con propiedades fractales en la naturaleza (Weibel 1991; McGuire 1991; Briggs 1992; Mandelbrot 1997). Mandelbrot consideró el límite de la costa de varios países como estructura fractal potencial. Dentro del campo de la medicina también se ha considerado la geometría fractal para analizar o caracterizar a determinadas estructuras como: citología cervical exfoliativa (Macaulay and Palcic 1990), neuronas y células gliales (Smith, Jr. et al. 1989; Smith, Jr. and Behar 1994), patrones de crecimiento microbiano (Obert et al. 1990), patrones de crecimiento de úlceras corneales causados por herpes simple (Landini et al. 1992), estudio de la interfase tumor-estroma en lesiones malignas y premalignas de la mucosa oral (Landini and Rippin 1993), las membranas de diferentes tipos de células como linfocitos humanos, eritrocitos humanos, células epiteliales de riñón de rata (Keough et al. 1991), regeneración hepática (Ng and Iannaccone 1992), pulmón (Rigaut et al. 1983) y un largo etcétera.

En relación con el presente estudio, es de particular interés señalar que también se han realizado investigaciones sobre la dimensión fractal de vasos sanguíneos, por ejemplo, en arterias de mediano calibre (Cross et al. 1993); en microvasos, en relación con fenómenos de angiogénesis (Daxer 1993; Grizzi et al. 2005), sugiriendo que el estudio de las propiedades fractales de la neovascularización puede arrojar nuevas luces sobre el comportamiento de los vasos neoformados en diversas patologías.

El presente estudio analiza las posibles características fractales de la microvascularización de la próstata normal, HBP y cáncer de próstata mediante el cálculo de la dimensión de capacidad (D_0). La D_0 de los microvasos de las distintas zonas de la próstata normal, HBP y cáncer de próstata es siempre superior a su dimensión topológica por lo que se asume que la microvascularización prostática, tanto normal como patológica adopta un patrón fractal y que por tanto existe autosimilaridad para un rango de escala.

No se han detectado diferencias significativas para D_0 entre las distintas regiones de la próstata normal. Tampoco se detectan diferencias significativas para D_0 a lo largo de los tres ejes espaciales (X, Y, Z), podemos concluir que también este parámetro es isotrópico en la próstata normal.

Sin embargo sí existen diferencias significativas entre la D_0 del cáncer y la de la próstata control y la HBP siendo menor para los microvasos del carcinoma. Esto llama la atención, ya que como se ha señalado con anterioridad, la dimensión de correlación (D_2) muestra un comportamiento opuesto, siendo significativamente mayor en el cáncer. Hay que tener en cuenta que D_2 da cuenta de la complejidad de la distribución de la fracción de volumen ocupada por los vasos, estimada globalmente tras la reconstrucción de un atractor, mientras que D_0 detecta la complejidad local y puramente geométrica de la ramificación vascular, por tanto, conceptual y metodológicamente D_2 y D_0 no son equivalentes. Los valores de la dimensión de capacidad en el cáncer sugieren que los vasos del cáncer de próstata son más sencillos desde el punto de vista geométrico que los vasos de HBP o los normales, manifestando menos detalles conforme se incrementa la escala, se trata de vasos mas simples, posiblemente con un eje longitudinal mas recto y no tan ramificados. Lo cual ya ha sido consignado por otros autores (Montironi et al. 1996) utilizando metodología cuantitativa convencional. Además, nuestros resultados concuerdan con lo descrito por otros autores (Gaudio et al. 2005), que señalan una menor complejidad en microvasos patológicos (sinusoides hepaticos en la cirrosis) en comparación con los sinusoides del hígado normal.

Si bien D_0 y D_2 no se identifican, si que se encuentran íntimamente relacionadas, se trata de dos componentes del espectro multifractal. Como ya se

indicó en Material y Métodos, los objetos multifractales no se pueden caracterizar por una dimensión fractal única, ya que su fractalidad varía dependiendo de la escala a la que son observados, por tanto se precisa un conjunto de dimensiones fractales (D_q) para el estudio de la irregularidad de dichos objetos (Ivanov et al. 1999).

El hecho de que en el presente trabajo se demuestre de modo consistente que D_0 y D_2 son cantidades diferentes, tanto en casos control como en HBP y cáncer, sugiere el carácter multifractal de los microvasos prostáticos tanto normales como patológicos. Además, se observa que en todos los casos, D_0 es significativamente mayor que D_2 lo que concuerda con lo descrito en la literatura acerca de las diferencias entre la dimensión de correlación y la de capacidad dentro del espectro multifractal (Takayasu 1990).

La lacunaridad (Λ) estima la heterogeneidad en la distribución de estructuras en una imagen (Smith, Jr. et al. 1996; Plotnick et al. 1996). No se han detectado diferencias significativas para Λ entre las distintas regiones de la próstata normal. Tampoco se observan diferencias significativas para Λ a lo largo de los tres ejes espaciales (X, Y, Z), podemos concluir que este parámetro se comporta isotrópicamente en la próstata normal.

No se muestran diferencias significativas entre la Λ de los vasos de la próstata control y de la HBP. Sin embargo si existen diferencias significativas entre la lacunaridad del cáncer y la de los grupos restantes, siendo mayor para los microvasos del carcinoma. Esto se puede interpretar en el sentido de que los vasos tumorales muestran, a pesar de su mayor simplicidad (menor D_0), una distribución en el espacio más heterogénea que los vasos de una entidad benigna como la HBP o de la próstata normal, lo que concuerda con lo descrito por otros autores acerca de distribución de la neovascularización en el carcinoma de próstata (Mattfeldt et al. 2006; Santamaria et al. 2011).

La presencia de correlaciones de largo rango (coeficiente alfa en torno a 1) detectada en nuestro estudio, tanto en la próstata normal, como en la patológica sugieren una estructura multifractal para los microvasos (Peng et al. 1994). Además,

el que $D_0 \neq D_2$ indica la existencia de un conjunto D_q de dimensiones fractales y es conocido que los multifractales presentan múltiples reglas de escalado con dimensiones distintas para cada escala (Reljin and Reljin 2002). La aplicación del análisis de transformadas wavelet (WT) a nuestras series espaciales ha revelado una evidente estructura multifractal para la microvascularización prostática tanto en los casos controles como en HBP y carcinoma.

Los resultados obtenidos nos indican que conforme varía la escala a analizar, fluctúa la V_V F-VIII de las series espaciales, presentando éstas múltiples reglas de escalado, se concluye por tanto que la microvascularización de todos los grupos analizados pueden ser considerada multifractal (Goldberger et al. 2002).

Por el contrario, las series subrogadas de todas estas entidades, muestran WT en las que el código de colores tiene un comportamiento periódico, uniforme, extendiéndose cada color prácticamente igual a lo largo del eje de escala; todo esto indica una pérdida de complejidad, la V_V F-VIII no fluctúa a medida que varía la escala no manifestándose “comportamiento multiescala”, es decir la subrogación de los datos (su secuenciación al azar) causa, como era de esperar, la pérdida de la multifractalidad. Además, en las series de ruido blanco la uniformidad de la imagen en código de colores de WT es aún mayor pues sus datos por definición representan un grado de complejidad aún menor, ya que han sido construidas totalmente al azar.

El espectro multifractal, $\tau(q)$, es no lineal tanto en las distintas zonas de la próstata control, como en HBP y en el carcinoma; no existiendo diferencias significativas entre los tres grupos lo que indica que la multifractalidad presente en los vasos de la próstata normal no cambia con la patología, tanto benigna como maligna.

La distribución del espectro de singularidad, $D(h)$, corresponde, como era de esperar a una parábola de ramas amplias, tanto en las tres zonas de la próstata normal, como en la hiperplasia y en el cáncer. No existen diferencias ni entre las zonas prostáticas, ni en relación con los casos patológicos, lo que corrobora lo indicado en el párrafo anterior para $\tau(q)$. Como es lógico $\tau(q)$ se lineariza para las

series subrogadas y de ruido blanco y la parábola de $D(h)$ tiende a colapsarse, por la pérdida de multifractalidad en las series simuladas.

Del presente análisis, se concluye, primero, que la estructura multifractal de la microvascularización de la próstata no muestra diferencias zonales y que la patología prostática no produce cambios en dicha estructura, al contrario de lo observado en otras patologías, evidentemente muy diversas del objeto de nuestro estudio, como las alteraciones del espectro multifractal de la frecuencia cardiaca en la insuficiencia cardiaca manifestadas en una tendencia a la monofractalidad de la señal (Goldberger et al. 2002).

CONCLUSIONES

1. En la próstata normal no existen diferencias regionales significativas tanto para las estimaciones estereológicas como para los parámetros no lineales de los microvasos.
2. La distribución de la microvascularización prostática es isotrópica tanto desde el punto de vista de las estimaciones estereológicas como con relación a los parámetros no lineales.
3. Se confirma en el cáncer prostático una tendencia al incremento de la longitud de microvaso por unidad de volumen con respecto a los controles y HBP.
4. El lecho microvascular evidenciado por la inmunexpresión de Factor-VIII, muestra una estructura caótico-determinista tanto en próstata normal, como en la HBP y el adenocarcinoma prostático.
5. La microvascularización del cáncer de próstata muestra un incremento de la heterogeneidad y del nivel de caos determinista evidenciado por un aumento significativo de la dimensión de correlación y de la lacunaridad con relación a HBP y la próstata normal.
6. La magnitud del caos determinista de los microvasos en la patología prostática benigna (HBP) es intermedia entre la detectada en el cáncer y en próstata normal.
7. la dimensión fractal D_0 es menor en el cáncer que en HBP y próstata normal, lo que indica una menor complejidad en las ramificaciones de los vasos del adenocarcinoma.

8. Las correlaciones espaciales de largo rango evidenciadas por el coeficiente de Hurst son isotrópicas y se conservan tanto en los vasos normales como en los de HBP y el carcinoma prostático.

9. La estructura del lecho microvascular prostático es multifractal. La multifractalidad se conserva con los cambios patológicos, tanto benignos (HBP) como malignos (adenocarcinoma).

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abarbanel HDI. (1996). Analysis of observed chaotic data. Springer Verlag. New York.
- Alcaraz A, Hammerer P, Tubaro A, Schroder FH, Castro R. (2009). Is there evidence of a relationship between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer? Findings of a literature review. *Eur Urol.* 55: 864-873.
- Algaba F. (1993). Bases morfológicas del desarrollo de la hiperplasia prostática. *Patología.* 26: 113-119.
- Algaba F, Trias I. (1995). Neuroendocrine cells in the morphogenesis of prostatic pathology. *Arch Esp Urol.* 48: 217-222.
- Ali M, Johnson IP, Hobson J, Mohammadi B, Khan F. (2004). Anatomy of the pelvic plexus and innervation of the prostate gland. *Clin Anat.* 17: 123-129.
- Angelsen A, Falkmer S, Sandvik AK, Waldum HL. (1999). Pre- and postnatal testosterone administration induces proliferative epithelial lesions with neuroendocrine differentiation in the dorsal lobe of the rat prostate. *Prostate.* 40: 65-75.
- Arneodo A, Audit B, Kestener P, Roux S. (2008). Wavelet-based multifractal analysis. *Scholarpedia.* 3: 4103.
- Aumuller G. (1991). Postnatal development of the prostate. *Bull Assoc Anat (Nancy).* 75: 39-42.
- Baddeley A, Vedel Jensen E. (2005). Geometrical Identities. In: Baddeley A, Vedel Jensen E (eds.). *Stereology for statisticians.* Chapman & Hall. Boca Raton. 87-109.
- Baird DT, Galbraith A, Fraser IS, Newsam JE. (1973). The concentration of oestrone and oestradiol-17 in spermatic venous blood in man. *J Endocrinol.* 57: 285-288.
- Baird DT, Uno A, Melby JC. (1969). Adrenal secretion of androgens and oestrogens. *J Endocrinol.* 45: 135-136.
- Barry MJ. (1990). Epidemiology and natural history of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am.* 17: 495-507.
- Bartke A. (2004). Prolactin in the male: 25 years later. *J Androl.* 25: 661-666.
- Bartsch G. (1977). Stereology, a new quantitative morphological approach to study prostatic function and disease. *Eur Urol.* 3: 85-95.
- Bartsch G, Frick J, Ruegg I, Bucher M, Holliger O, Oberholzer M, Rohr HP. (1979). Electron microscopic stereological analysis of the normal human prostate and of benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 122: 481-486.

- Bartsch G, Keen F, Daxenbichler G, Marth C, Margreiter R, Brungger A, Sutter T, Rohr HP. (1987). Correlation of biochemical (receptors, endogenous tissue hormones) and quantitative morphologic (stereologic) findings in normal and hyperplastic human prostates. *J Urol.* 137: 559-564.
- Begun FP, Story MT, Hopp KA, Shapiro E, Lawson RK. (1995). Regional concentration of basic fibroblast growth factor in normal and benign hyperplastic human prostates. *J Urol.* 153: 839-843.
- Ben Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW. (1996). Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev.* 17: 639-669.
- Benoit G, Merlaud L, Meduri G, Moukarzel M, Quillard J, Ledroux M, Giuliano F, Jardin A. (1994). Anatomy of the prostatic nerves. *Surg Radiol Anat.* 16: 23-29.
- Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. (1984b). The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol.* 132: 474-479.
- Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. (1984d). The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol.* 132: 474-479.
- Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. (1984c). The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol.* 132: 474-479.
- Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL. (1984a). The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol.* 132: 474-479.
- Bigler SA, Deering RE, Brawer MK. (1993). Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum Pathol.* 24: 220-226.
- Birkhoff JD. (1983). Natural history of benign prostatic hypertrophy. In: Hinman F (eds.). *Benign prostatic hypertrophy.* Springer Verlag. New York. 5-14.
- Bocking A, Kiehn J, Heinzl-Wach M. (1982). Combined histologic grading of prostatic carcinoma. *Cancer.* 50: 288-294.
- Bonkhoff H, Wernert N, Dhom G, Remberger K. (1991). Relation of endocrine-paracrine cells to cell proliferation in normal, hyperplastic, and neoplastic human prostate. *Prostate.* 19: 91-98.
- Borras J, Marcos-Gragera R, Torres A, Espinas JA. (2008). Analysis of cancer incidence, survival and mortality according to the main tumoral localizations, 1985-2019: prostate cancer. *Med Clin (Barc).* 131 Suppl 1: 63-66.
- Brawn PN, Ayala AG, Von Eschenbach AC, Hussey DH, Johnson DE. (1982). Histologic grading study of prostate adenocarcinoma: the development of a new system and comparison with other methods--a preliminary study. *Cancer.* 49: 525-532.
- Briggs J. (1992). *Fractals: The Patterns of Chaos.* Thames and Hudson Ltd. London.

- Buchler JR, Kandrup H. (1997). Nonlinear signal and image analysis. Annals of the New York Academy of Sciences. New York.
- Burgos Rodríguez R, Chicharro Molero JA. (1993). Hiperplasia Benigna de Próstata. In: Jiménez Cruz JF, Rioja Sanz LA (eds.). Tratado de Urología. Barcelona: Ed. J.R. Prous. J.r. Prous. Barcelona. 1035-1050.
- Burkilt HG, Young B, Heath JW. (1996). Histología Funcional Wheater: texto y atlas en color. Churchill-Livingstone. London.
- Bushman W. (2009). Etiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. Urol Clin North Am. 36: 403-15, v.
- Cabo Tamargo JA, Lopez-Muniz A, Bengoechea GE, Vega Alvarez JA, Perez CA. (1985). Microscopic innervation of the prostate (I): Distal vegetative formation. Arch Esp Urol. 38: 231-241.
- Carmeliet P. (2003). Angiogenesis in health and disease. Nat Med. 9: 653-660.
- Chapple CR, Crowe R, Gilpin SA, Gosling J, Burnstock G. (1991). The innervation of the human prostate gland--the changes associated with benign enlargement. J Urol. 146: 1637-1644.
- Chierchia L, Mather JN. (2010). Kolmogorov-Arnold-Moser Theory. Scholarpedia. 5: 2123.
- Cockett AT, di Sant'Agnese PA, Gopinath P, Schoen SR, Abrahamsson PA. (1993). Relationship of neuroendocrine cells of prostate and serotonin to benign prostatic hyperplasia. Urology. 42: 512-519.
- Coffey DS. (1988). Androgen action and the sex accessory tissues. In: Knobil E Neil JD (eds.). The physiology of reproduction. Raven Press. New York.
- Colombel M, Vacherot F, Diez SG, Fontaine E, Buttyan R, Chopin D. (1998). Zonal variation of apoptosis and proliferation in the normal prostate and in benign prostatic hyperplasia. Br J Urol. 82: 380-385.
- Condon MS. (2005). The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. Semin Cancer Biol. 15: 132-137.
- Couillet P, Elphick C, Repaux D. (1987). Nature of spatial chaos. Phys Rev Lett. 58: 431-434.
- Cross SS. (1997). Fractals in pathology. J Pathol. 182: 1-8.
- Cross SS, Cotton DW. (1994). Chaos and antichaos in pathology. Hum Pathol. 25: 630-637.
- Cross SS, Start RD, Silcocks PB, Bull AD, Cotton DW, Underwood JC. (1993). Quantitation of the renal arterial tree by fractal analysis. J Pathol. 170: 479-484.
- Crowe R, Chapple CR, Burnstock G. (1991). The human prostate gland: a histochemical and immunohistochemical study of neuropeptides, serotonin,

- dopamine beta-hydroxylase and acetylcholinesterase in autonomic nerves and ganglia. *Br J Urol.* 68: 53-61.
- Cunha GR, Chung LW. (1981). Stromal-epithelial interactions--I. Induction of prostatic phenotype in urothelium of testicular feminized (Tfm/y) mice. *J Steroid Biochem.* 14: 1317-1324.
- Cunha GR, Chung LW, Shannon JM, Taguchi O, Fujii H. (1983). Hormone-induced morphogenesis and growth: role of mesenchymal-epithelial interactions. *Recent Prog Horm Res.* 39: 559-598.
- Cunha GR, Donjacour AA, Sugimura Y. (1986). Stromal-epithelial interactions and heterogeneity of proliferative activity within the prostate. *Biochem Cell Biol.* 64: 608-614.
- D'Amore PA. (1992). Capillary growth: a two-cell system. *Semin Cancer Biol.* 3: 49-56.
- Davey HM, Davey CL, Woodward AM, Edmonds AN, Lee AW, Kell DB. (1996). Oscillatory, stochastic and chaotic growth rate fluctuations in permissively controlled yeast cultures. *Biosystems.* 39: 43-61.
- Daxer A. (1993). The fractal geometry of proliferative diabetic retinopathy: implications for the diagnosis and the process of retinal vasculogenesis. *Curr Eye Res.* 12: 1103-1109.
- Deering RE, Bigler SA, Brown M, Brawer MK. (1995). Microvasculature in benign prostatic hyperplasia. *Prostate.* 26: 111-115.
- Delves GH, Stewart AB, Cooper AJ, Lwaleed BA. (2007). Prostatasomes, angiogenesis, and tissue factor. *Semin Thromb Hemost.* 33: 75-79.
- Di Silverio F, D'Eramo G, Flammia GP, Caponera M, Frascaro E, Buscarini M, Mariani M, Sciarra A. (1993). Pathology of BPH. *Minerva Urol Nefrol.* 45: 135-142.
- Dodd JG, Kreis C, Sheppard PC, Hamel A, Matusik RJ. (1986). Effect of androgens on mRNA for a secretory protein of rat dorsolateral prostate and seminal vesicles. *Mol Cell Endocrinol.* 47: 191-200.
- Doll JA, Reiher FK, Crawford SE, Pins MR, Campbell SC, Bouck NP. (2001). Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate. *Prostate.* 49: 293-305.
- Dong Z, Zeitlin BD, Song W, Sun Q, Karl E, Spencer DM, Jain HV, Jackson T, Nunez G, Nor JE. (2007). Level of endothelial cell apoptosis required for a significant decrease in microvessel density. *Exp Cell Res.* 313: 3645-3657.
- Elbert T, Ray WJ, Kowalik ZJ, Skinner JE, Graf KE, Birbaumer N. (1994). Chaos and physiology: deterministic chaos in excitable cell assemblies. *Physiol Rev.* 74: 1-47.
- Falconer K. (1990). *Fractal Geometry: Mathematical Foundations and Applications.* John Wiley & Sons. Chichester.

- Fawcett DW, Raviola E. (1994). Bloom and Fawcett, a textbook of histology. Chapman and Hall. London, New York.
- Ficarra V, Novara G, Artibani W, Cestari A, Galfano A, Graefen M, Guazzoni G, Guillonneau B, Menon M, Montorsi F, Patel V, Rassweiler J, Van PH. (2009). Retropubic, laparoscopic, and robot-assisted radical prostatectomy: a systematic review and cumulative analysis of comparative studies. *Eur Urol.* 55: 1037-1063.
- Fitzpatrick JM. (2006). The natural history of benign prostatic hyperplasia. *BJU Int.* 97 Suppl 2: 3-6.
- Folkman J. (1992). The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol.* 3: 65-71.
- Fox SB, Gatter KC, Bicknell R, Going JJ, Stanton P, Cooke TG, Harris AL. (1993). Relationship of endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer. *Cancer Res.* 53: 4161-4163.
- Frick J, Aulitzky W. (1991). Physiology of the prostate. *Infection.* 19 Suppl 3: S115-S118.
- Froehner M. (2010). Age and prostate cancer survival. *JAMA.* 303: 33-34.
- Gaeta JF, Asirwatham JE, Miller G, Murphy GP. (1980). Histologic grading of primary prostatic cancer: a new approach to an old problem. *J Urol.* 123: 689-693.
- Gaeta JF, Englander LC, Murphy GP. (1986). Comparative evaluation of National Prostatic Cancer Treatment Group and Gleason systems for pathologic grading of primary prostatic cancer. *Urology.* 27: 306-308.
- Gaudio E, Chaberek S, Montella A, Pannarale L, Morini S, Novelli G, Borghese F, Conte D, Ostrowski K. (2005). Fractal and Fourier analysis of the hepatic sinusoidal network in normal and cirrhotic rat liver. *J Anat.* 207: 107-115.
- George FW, Peterson KG. (1988). 5 alpha-dihydrotestosterone formation is necessary for embryogenesis of the rat prostate. *Endocrinology.* 122: 1159-1164.
- Gkonos PJ, Krongrad A, Roos BA. (1995). Neuroendocrine peptides in the prostate. *Urol Res.* 23: 81-87.
- Gleason DF. (1966). Classification of prostatic carcinomas. *Cancer Chemother Rep.* 50: 125-128.
- Gleick J. (1988). *Chaos.* Sphere Books. London.
- Goffin V, Binart N, Touraine P, Kelly PA. (2002). Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu Rev Physiol.* 64: 47-67.
- Goldberger AL, Amaral LA, Glass L, Hausdorff JM, Ivanov PC, Mark RG, Mietus JE, Moody GB, Peng CK, Stanley HE. (2000). PhysioBank, PhysioToolkit, and PhysioNet: components of a new research resource for complex physiologic signals. *Circulation.* 101: E215-E220.

- Goldberger AL, Amaral LA, Hausdorff JM, Ivanov PC, Peng CK, Stanley HE. (2002). Fractal dynamics in physiology: alterations with disease and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99 Suppl 1: 2466-2472.
- Granado S., Saa C., Quintas A. (2006). Epidemiological situation of prostate cancer in Spain. *Actas Urol Esp*. 30: 574-582.
- Grizzi F, Russo C, Colombo P, Franceschini B, Frezza EE, Cobos E, Chiriva-Internati M. (2005). Quantitative evaluation and modeling of two-dimensional neovascular network complexity: the surface fractal dimension. *BMC Cancer*. 5: 14.
- Gu J, Polak JM, Probert L, Islam KN, Marangos PJ, Mina S, Adrian TE, McGregor GP, O'Shaughnessy DJ, Bloom SR. (1983). Peptidergic innervation of the human male genital tract. *J Urol*. 130: 386-391.
- Guess HA. (2001). Benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Epidemiol Rev*. 23: 152-158.
- Gulick D. (1992). *Encounters with Chaos*. Mc Graw-Hill. New York.
- Hakanson L. (1978). The length of closed geomorphic lines. *Mathematical Geology*. 10: 141-167.
- Hall P, Wood A. (1993). On the Performance of Box-Counting Estimators of Fractal Dimension. *Biometrika*. 80: 246-252.
- Halsey TC, Jensen MH, Kadanoff LP, Procaccia I, I, Shraiman BI. (1986). Fractal measures and their singularities: The characterization of strange sets. *Phys Rev A*. 33: 1141-1151.
- Harkonen P. (2003). Paracrine prolactin may cause prostatic problems. *Endocrinology*. 144: 2266-2268.
- Harriss DR, Savill J. (1995). Apoptosis and the prostate. *Br J Urol*. 75 Suppl 1: 27-33.
- Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM. (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*. 156: 1363-1380.
- Hayashi N, Cunha GR, Parker M. (1993). Permissive and instructive induction of adult rodent prostatic epithelium by heterotypic urogenital sinus mesenchyme. *Epithelial Cell Biol*. 2: 66-78.
- Heffernan MS. (1996). Comparative effects of microcurrent stimulation on EEG spectrum and correlation dimension. *Integr Physiol Behav Sci*. 31: 202-209.
- Heinzer H, Steuber T. (2009). Prostate cancer in the elderly. *Urol Oncol*. 27: 668-672.
- Herranz AF, Arias FF, Arrizabalaga MM, Calahorra Fernandez FJ, Carballido RJ, Diz RR, Herrero Payo JA, Llorente AC, Martin Martinez JC, Martinez-Pineiro LL, Minguéz MR, Moreno SJ, Rodríguez AA, Tamayo Ruiz JC, Turo AJ. (2003). The

- prostate cancer in the community of Madrid in 2000 I.- Incidence. *Actas Urol Esp.* 27: 323-334.
- Hinman F. (1994). *Atlas of Urologic Surgery*. Philadelphia.
- Ho KC, Quarmby VE, French FS, Wilson EM. (1992). Molecular cloning of rat prostate transglutaminase complementary DNA. The major androgen-regulated protein DP1 of rat dorsal prostate and coagulating gland. *J Biol Chem.* 267: 12660-12667.
- Hokfelt T. (1991). Neuropeptides in perspective: the last ten years. *Neuron.* 7: 867-879.
- Holtgrewe HL. (1995). Economic issues and the management of benign prostatic hyperplasia. *Urology.* 46: 23-25.
- Howard CV, Reed MG. (2005a). Length estimation. In: Howard CV, Reed MG (eds.). *Unbiased Stereology: three-dimensional measurement in microscopy.* 2 Edition. Bios Scientific Publishers. Oxford. 119-125.
- Howard CV, Reed MG. (2005b). *Unbiased Stereology: three-dimensional measurement in microscopy.* Bios Scientific Publishers. Oxford.
- Hunter DJ, Berra-Unamuno A, Martin-Gordo A. (1996). Prevalence of urinary symptoms and other urological conditions in Spanish men 50 years old or older. *J Urol.* 155: 1965-1970.
- Ivanov PC, Amaral LA, Goldberger AL, Havlin S, Rosenblum MG, Struzik ZR, Stanley HE. (1999). Multifractality in human heartbeat dynamics. *Nature.* 399: 461-465.
- Jen PY, Dixon JS. (1995). Development of peptide-containing nerves in the human fetal prostate gland. *J Anat.* 187 (Pt 1): 169-179.
- Jen PY, Dixon JS, Gearhart JP, Gosling JA. (1996). Nitric oxide synthase and tyrosine hydroxylase are colocalized in nerves supplying the postnatal human male genitourinary organs. *J Urol.* 155: 1117-1121.
- Keipes M, Ries F, Dicato M. (1993). Of the British coastline and the interest of fractals in medicine. *Biomed Pharmacother.* 47: 409-415.
- Kennel MB, Brown R, Abarbanel HD. (1992). Determining embedding dimension for phase-space reconstruction using a geometrical construction. *Phys Rev A.* 45: 3403-3411.
- Keough KM, Hyam P, Pink DA, Quinn B. (1991). Cell surfaces and fractal dimensions. *J Microsc.* 163: 95-99.
- Kepper ME, Keast JR. (1995). Immunohistochemical properties and spinal connections of pelvic autonomic neurons that innervate the rat prostate gland. *Cell Tissue Res.* 281: 533-542.
- Kinbara H, Cunha GR. (1996). Ductal heterogeneity in rat dorsal-lateral prostate. *Prostate.* 28: 58-64.

- Kirby RS. (1992). The clinical assessment of benign prostatic hyperplasia. *Cancer*. 70: 284-290.
- Koch HP, Zacek H. (1991). Fractals also in pharmacokinetics? *Pharmazie*. 46: 870-871.
- Kong D, Li Y, Wang Z, Banerjee S, Sarkar FH. (2007). Inhibition of angiogenesis and invasion by 3,3'-diindolylmethane is mediated by the nuclear factor-kappaB downstream target genes MMP-9 and uPA that regulated bioavailability of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res*. 67: 3310-3319.
- Kurimoto S, Moriyama N, Hamada K, Kawabe K. (1998). Evaluation of histological structure and its effect on the distribution of alpha1-adrenoceptors in human benign prostatic hyperplasia. *Br J Urol*. 81: 388-393.
- Laczko I, Hudson DL, Freeman A, Feneley MR, Masters JR. (2005). Comparison of the zones of the human prostate with the seminal vesicle: morphology, immunohistochemistry, and cell kinetics. *Prostate*. 62: 260-266.
- Landini G, Mission GP, Murray PI. (1992). Fractal properties of herpes simplex dendritic keratitis. *Cornea*. 11: 510-514.
- Landini G, Rippin JW. (1993). Fractal dimensions of the epithelial-connective tissue interfaces in premalignant and malignant epithelial lesions of the floor of the mouth. *Anal Quant Cytol Histol*. 15: 144-149.
- Leav I, Merk FB, Lee KF, Loda M, Mandoki M, McNeal JE, Ho SM. (1999). Prolactin receptor expression in the developing human prostate and in hyperplastic, dysplastic, and neoplastic lesions. *Am J Pathol*. 154: 863-870.
- Leissner KH, Tisell LE. (1979). The weight of the human prostate. *Scand J Urol Nephrol*. 13: 137-142.
- Lekas A, Lazaris AC, Deliveliotis C, Chrisofos M, Zoubouli C, Lapas D, Papatomas T, Fokitis I, Nakopoulou L. (2006). The expression of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and angiogenesis markers in hyperplastic and malignant prostate tissue. *Anticancer Res*. 26: 2989-2993.
- Lipsett MB. (1970). Steroid secretion by the human testis. In: Rosemberg EPC (eds.). *The human testis*. Publ Plenum Press. New Yor. 407-421.
- Losa GA, Nonnenmacher TF. (1996). Self-similarity and fractal irregularity in pathologic tissues. *Mod Pathol*. 9: 174-182.
- Macaulay C, Palcic B. (1990). Fractal Texture Features Based on Optical-Density Surface-Area - Use in Image-Analysis of Cervical Cells. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*. 12: 394-398.
- Maling DM. (1968). How long is a piece of string? *Cartographic Journal*. 5: 147-156.
- Mandelbrot B. (1997). *La geometría fractal de la naturaleza*. Tusquets. Barcelona.

- Mandelbrot B. (2006). Los objetos fractales. Forma, azar y dimensión. Tusquets. Barcelona.
- Martin R, Fraile B, Peinado F, Arenas MI, Elices M, Alonso L, Paniagua R, Martin JJ, Santamaria L. (2000). Immunohistochemical localization of protein gene product 9.5, ubiquitin, and neuropeptide Y immunoreactivities in epithelial and neuroendocrine cells from normal and hyperplastic human prostate. *J Histochem Cytochem.* 48: 1121-1130.
- Mattfeldt T. (1997). Nonlinear deterministic analysis of tissue texture: a stereological study on mastopathic and mammary cancer tissue using chaos theory. *J Microsc.* 185: 47-66.
- Mattfeldt T, Eckel S, Fleischer F, Schmidt V. (2006). Statistical analysis of reduced pair correlation functions of capillaries in the prostate gland. *J Microsc.* 223: 107-119.
- Mattfeldt T, Frey H, Rose C. (1993a). Second-order stereology of benign and malignant alterations of the human mammary gland. *J Microsc.* 171: 143-151.
- Mattfeldt T, Schmidt V, Reepschlager D, Rose C, Frey H. (1996). Centred contact density functions for the statistical analysis of random sets. A stereological study on benign and malignant glandular tissue using image analysis. *J Microsc.* 183: 158-169.
- Mattfeldt T, Vogel U, Gottfried HW, Frey H. (1993b). Second-order stereology of prostatic adenocarcinoma and normal prostatic tissue. *Acta Stereol.* 12: 203-208.
- Matusik RJ, Kreis C, McNicol P, Sweetland R, Mullin C, Fleming WH, Dodd JG. (1986). Regulation of prostatic genes: role of androgens and zinc in gene expression. *Biochem Cell Biol.* 64: 601-607.
- McGuire M. (1991). *An Eye for Fractals*. Addison-Wesley. Redwood City.
- McNeal JE. (1981). The zonal anatomy of the prostate. *Prostate.* 2: 35-49.
- McNeal JE. (1984). Anatomy of the prostate and morphogenesis of BPH. *Prog Clin Biol Res.* 145: 27-53.
- McNeal JE. (1997). Prostate. In: Sternberg SS (eds.). *Histology for pathologists*. 2 Edition. Lippincott Raven Publishers. Philadelphia. 997-1017.
- McVary KT, McKenna KE, Lee C. (1998). Prostate innervation. *Prostate Suppl.* 8: 2-13.
- Montironi R, Diamanti L, Thompson D, Bartels HG, Bartels PH. (1996). Analysis of the capillary architecture in the precursors of prostate cancer: recent findings and new concepts. *Eur Urol.* 30: 191-200.
- Montironi R, Galluzzi CM, Diamanti L, Taborro R, Scarpelli M, Pisani E. (1993). Prostatic intra-epithelial neoplasia. Qualitative and quantitative analyses of the blood capillary architecture on thin tissue sections. *Pathol Res Pract.* 189: 542-548.

- Moriyama N, Hamada K, Takanashi M, Kurimoto S, Kimura K, Inagaki O. (1994). Evaluation of alpha-1-adrenoceptor subtypes in human hypertrophied prostate using [3H]YM617, an alpha-1-selective antagonist. *Acta Histochem Cytochem.* 27: 219-225.
- Mostofi FK. (1975). Grading of prostatic carcinoma. *Cancer Chemother Rep.* 59: 111-117.
- Mottet N, Costa P, Bali JP. (1999). Autonomic nervous system and prostatic physiology. Specific features of the alpha-adrenergic system. *Prog Urol.* 9: 26-36.
- Muntzing J. (1971). The androgenic action of adrenal implants in the ventral prostate of adult, castrated, and oestrogen-treated rats. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 30: 203-207.
- Murphy GP, Whitmore WF, Jr. (1979). A report of the workshops on the current status of the histologic grading of prostate cancer. *Cancer.* 44: 1490-1494.
- Muzy JF, Bacry E, Arneodo A. (1993). Multifractal formalism for fractal signals: The structure-function approach versus the wavelet-transform modulus-maxima method. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics.* 47: 875-884.
- Narayan P. (1992). Neoplasias de la próstata. In: McAninch JW (eds.). *Smith's general urology.* Appleton and Lange.
- Nemeth JA, Lee C. (1996). Prostatic ductal system in rats: regional variation in stromal organization. *Prostate.* 28: 124-128.
- Ng YK, Iannaccone PM. (1992). Fractal geometry of mosaic pattern demonstrates liver regeneration is a self-similar process. *Dev Biol.* 151: 419-430.
- Nichols JM, Nichols JD. (2001). Attractor reconstruction for non-linear systems: a methodological note. *Math Biosci.* 171: 21-32.
- O'Brien TS, Harris AL. (1995). Angiogenesis in urological malignancy. *Br J Urol.* 76: 675-682.
- Obert M, Pfeifer P, Sernetz M. (1990). Microbial growth patterns described by fractal geometry. *J Bacteriol.* 172: 1180-1185.
- Oesterling JE. (1991). The origin and development of benign prostatic hyperplasia. An age-dependent process. *J Androl.* 12: 348-355.
- Padhani AR, Harvey CJ, Cosgrove DO. (2005). Angiogenesis imaging in the management of prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol.* 2: 596-607.
- Pallares J, Rojo F, Iriarte J, Morote J, Armadans LI, de T, I. (2006). Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. *Histol Histopathol.* 21: 857-865.

- Partin AW, Oesterling JE, Epstein JI, Horton R, Walsh PC. (1991). Influence of age and endocrine factors on the volume of benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 145: 405-409.
- Peinado-Ibarra, F. (1998). La hiperplasia benigna de próstata: estudio estereológico e inmunohistoquímico de la proliferación y el número de células, el volumen de los compartimentos prostáticos y la expresión de TGFB1. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Medicina. Madrid.
- Peitgen HO, Henriques JM, Penedo LF. (1991). *Fractals in the Fundamental and Applied Sciences.* Elsevier Science Publishers.
- Peng CK, Buldyrev SV, Havlin S, Simons M, Stanley HE, Goldberger AL. (1994). Mosaic organization of DNA nucleotides. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics.* 49: 1685-1689.
- Peng CK, Havlin S, Stanley HE, Goldberger AL. (1995). Quantification of scaling exponents and crossover phenomena in nonstationary heartbeat time series. *Chaos.* 5: 82-87.
- Pennefather JN, Lau WA, Mitchelson F, Ventura S. (2000). The autonomic and sensory innervation of the smooth muscle of the prostate gland: a review of pharmacological and histological studies. *J Auton Pharmacol.* 20: 193-206.
- Plotnick RE, Gardner RH, Hargrove WW, Prestegard K, Perlmutter M. (1996). Lacunarity analysis: A general technique for the analysis of spatial patterns. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics.* 53: 5461-5468.
- Polak JM, Bloom SR. (1983). Regulatory peptides: key factors in the control of bodily functions. *Br Med J (Clin Res Ed).* 286: 1461-1466.
- Powell MS, Li R, Dai H, Sayeeduddin M, Wheeler TM, Ayala GE. (2005). Neuroanatomy of the normal prostate. *Prostate.* 65: 52-57.
- Rasband WS, Bright DS. (1995). NIH image: a public domain image processing program for the Macintosh. *Microbeam Anal.* 4: 137-149.
- Reljin IS, Reljin BD. (2002). Fractal geometry and multifractals in analyzing and processing medical data and images. *Archive of Oncology.* 10: 283-293.
- Revelos K, Petraki C, Scorilas A, Stefanakis S, Malovrouvas D, Alevizopoulos N, Kanellis G, Halapas A, Koutsilieris M. (2007). Correlation of androgen receptor status, neuroendocrine differentiation and angiogenesis with time-to-biochemical failure after radical prostatectomy in clinically localized prostate cancer. *Anticancer Res.* 27: 3651-3660.
- Rigaut JP, Berggren P, Robertson B. (1983). Resolution-dependence of stereological estimations: Interpretation, with a new fractal concept, of automated image analyser-obtained results on lung sections. *Acta Stereol.* 2: 121-124.
- Rioja L, Sanz JI, Gil MJ, Allepuz CA. (1993). Carcinoma de próstata. In: Jiménez JF, Rioja LA (eds.). *Tratado de urología.* J.r. Prous. Barcelona. 1205-1235.

- Robert M, Costa P, Bressolle F, Mottet N, Navratil H. (1995). Percentage area density of epithelial and mesenchymal components in benign prostatic hyperplasia: comparison of results between single biopsy, multiple biopsies and multiple tissue specimens. *Br J Urol.* 75: 317-324.
- Rogers CS. (2009). Prostate cancer screening and surveillance. *JAMA.* 302: 1529-1530.
- Rosenstein MT, Collins JJ, De Luca CJ. (1993). A practical method for calculating largest Lyapunov exponents from small data sets. *Physica D.* 65: 117-134.
- Santamaria L, Ingelmo I, Alonso L, Pozuelo JM, Rodriguez R. (2007a). Neuroendocrine cells and peptidergic innervation in human and rat prostate. In: Beck F, Clascá F, Frotscher M, Haines DE, Korf HW, Marani E, Putz R, Sano Y, Schiebler TH (eds.). *Advances in anatomy embryology and cell biology.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. New York.
- Santamaria L, Ingelmo I, Codesal J, Teba F, Herranz LM, Martin R, Alonso L. (2007b). Histophysiology of normal human prostate and seminal vesicles. In: Arenas MI, Lobo M (eds.). *Reviews on basic andrology.* Research Signpost. Kerala. 91-136.
- Santamaria L, Ingelmo I, Ruiz J, Codesal J, Alonso R, Teba F, Herranz LM, Martín R. (2009). Stereological and nonlinear study of distribution, isotropy, and size of microvascular bed in normal prostate and prostate adenocarcinoma. Conference Proceeding. The 10th European Congress of ISS. Milan, 2009.
- Santamaria L, Ingelmo I, Ruiz J, Teba F. (2011). Study of the distribution of microvessels in normal and pathologic prostate using an information-based similarity analysis. *J Microsc.* 243: 303-314.
- Santamaría L, Ingelmo I, Ruiz J, Teba F, Herranz LM, Montalban G, Martin R, Codesal J, Pozuelo JM, Rodriguez R, Arriazu R. (2009). Stereological Estimate of the Length of Microvessels and the Number. Proliferation and Apoptosis of Endothelial Cells in Prostate Cancer. *The Open Prostate Cancer Journal.* 2: 46-53.
- Santamaria L, Martin R, Martin JJ, Alonso L. (2002). Stereologic estimation of the number of neuroendocrine cells in normal human prostate detected by immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 10: 275-281.
- Santamaria L, Terenghi G, Curtis J, de Blaquiére GE, Pereira JH, Turk JL, Polak JM. (1994). Denatured muscle grafts for nerve repair in an experimental model of nerve damage in leprosy. 2. Recovery of peripheral peptide-containing nerves assessed by quantitative immunohistochemical study. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 62: 64-74.
- Sedivy R, Windischberger C. (1998). Fractal analysis of a breast carcinoma--presentation of a modern morphometric method. *Wien Med Wochenschr.* 148: 335-337.
- Sinha AA, Quast BJ, Reddy PK, Lall V, Wilson MJ, Qian J, Bostwick DG. (2004). Microvessel density as a molecular marker for identifying high-grade prostatic

- intraepithelial neoplasia precursors to prostate cancer. *Exp Mol Pathol.* 77: 153-159.
- Skinner JE. (1994). Low-dimensional chaos in biological systems. *Biotechnology (N Y)*. 12: 596-600.
- Skinner JE, Molnar M, Tomberg C. (1994). The point correlation dimension: performance with nonstationary surrogate data and noise. *Integr Physiol Behav Sci.* 29: 217-234.
- Skinner JE, Molnar M, Vybiral T, Mitra M. (1992). Application of chaos theory to biology and medicine. *Integr Physiol Behav Sci.* 27: 39-53.
- Smith TG, Jr., Behar TN. (1994). Comparative fractal analysis of cultured glia derived from optic nerve and brain demonstrate different rates of morphological differentiation. *Brain Res.* 634: 181-190.
- Smith TG, Jr., Lange GD, Marks WB. (1996). Fractal methods and results in cellular morphology--dimensions, lacunarity and multifractals. *J Neurosci Methods.* 69: 123-136.
- Smith TG, Jr., Marks WB, Lange GD, Sheriff WH, Jr., Neale EA. (1989). A fractal analysis of cell images. *J Neurosci Methods.* 27: 173-180.
- Srinivasan G, Campbell E, Bashirelahi N. (1995). Androgen, estrogen, and progesterone receptors in normal and aging prostates. *Microsc Res Tech.* 30: 293-304.
- Steinhaus H. (1954). Length, shape and area. *Colloquia Mathematica.* 3: 1-13.
- Sterio DC. (1984). The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc.* 134 (Pt 2): 127-136.
- Stewart I. (1989). *Does God play dice?. The new mathematics of chaos.* Penguin Books Ltd.
- Strogatz SH. (2000). *Non Linear Dynamics and Chaos.* Perseus Press. Cambridge.
- Tainio H. (1995). Peptidergic innervation of the human prostate, seminal vesicle and vas deferens. *Acta Histochem.* 97: 113-119.
- Takayasu H. (1990). *Fractals in the physical sciences.* Manchester University Press. Manchester, New York.
- Tanagho EA. (1982). Embriologic development of the urinary tract. In: AUA Update series. American Urological Association. 1-8.
- Tenniswood M. (1986). Role of epithelial-stromal interactions in the control of gene expression in the prostate: an hypothesis. *Prostate.* 9: 375-385.
- Theiler J. (1990). Estimating the fractal dimension of chaotic time series. *The Lincoln Lab J.* 3: 63-85.

- Theiler J, Eubank S, Longtin A, Galdrikian B, Farmer JD. (1992). Testing for nonlinearity in time series: the method of surrogate data. *Physica D*. 58: 77-94.
- Tindall DJ, Chang CH, Lobl TJ, Rowley DR. (1984). Molecular properties of the androgen receptor in rat ventral prostate. *Ann N Y Acad Sci*. 438: 39-53.
- Untergasser G, Rumpold H, Plas E, Witkowski M, Berger P. (2001). Seminal plasma factors induce in vitro PRL secretion in smooth muscle cells of the human prostate. *J Clin Endocrinol Metab*. 86: 5577-5584.
- Vaalasti A, Alho AM, Tainio H, Hervonen A. (1986). The effect of sympathetic denervation with 6-hydroxydopamine on the ventral prostate of the rat. *Acta Histochem*. 79: 49-54.
- Vartanian RK, Weidner N. (1994). Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *Am J Pathol*. 144: 1188-1194.
- Vartanian RK, Weidner N. (1995). Endothelial cell proliferation in prostatic carcinoma and prostatic hyperplasia: correlation with Gleason's score, microvessel density, and epithelial cell proliferation. *Lab Invest*. 73: 844-850.
- Ventura S, Pennefather J, Mitchelson F. (2002). Cholinergic innervation and function in the prostate gland. *Pharmacol Ther*. 94: 93-112.
- Waliszewski P, Molski M, Konarski J. (1998). On the holistic approach in cellular and cancer biology: nonlinearity, complexity, and quasi-determinism of the dynamic cellular network. *J Surg Oncol*. 68: 70-78.
- Walsh PC, Retik AB, Vaughan ED, Wein AJ, Kavoussi LR, Novick AC, Partin AW, Peters CA. (2002). *Campbell's urology*. W. B. Saunders. Philadelphia.
- Wang JM, McKenna KE, Lee C. (1991a). Determination of prostatic secretion in rats: effect of neurotransmitters and testosterone. *Prostate*. 18: 289-301.
- Wang JM, McKenna KE, McVary KT, Lee C. (1991b). Requirement of innervation for maintenance of structural and functional integrity in the rat prostate. *Biol Reprod*. 44: 1171-1176.
- Weibel ER. (1991). *Fractal Geometry - A Design Principle for Living Organisms*. *American Journal of Physiology*. 261: L361-L369.
- Weidner N. (1993). Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Semin Diagn Pathol*. 10: 302-313.
- Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. (1993). Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol*. 143: 401-409.
- Wells TS, Bukowinski AT, Smith TC, Smith B, Dennis LK, Chu LK, Gray GC, Ryan MA. (2009). Racial differences in prostate cancer risk remain among US servicemen with equal access to care. *Prostate*

- Wennbo H, Kindblom J, Isaksson OG, Tornell J. (1997). Transgenic mice overexpressing the prolactin gene develop dramatic enlargement of the prostate gland. *Endocrinology*. 138: 4410-4415.
- Wilson JD. (1996). Andrógenos. In: Hardman JG, Limbird LE, Goodman & Gilman A (eds.). *Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9 (en castellano) Edition. McGraw-Hill Interamericana. México. 1531-1549.
- Winter RN, Kramer A, Borkowski A, Kyprianou N. (2001). Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. *Cancer Res*. 61: 1227-1232.
- Witte LP, Chapple CR, de la Rosette JJ, Michel MC. (2008). Cholinergic innervation and muscarinic receptors in the human prostate. *Eur Urol*. 54: 326-334.
- Zhang T, Johns EJ. (1998). Chaotic characteristics of renal nerve peak interval sequence in normotensive and hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 25: 896-903.

PUBLICACIONES RELACIONADAS

Stereological Estimate of the Length of Microvessels and the Number, Proliferation and Apoptosis of Endothelial Cells in Prostate Cancer

Luis Santamaría^{1,*}, Ildefonso Ingelmo², Jesús Ruiz³, Fernando Teba⁴, Luis M. Herranz⁴, Guillermo Montalbán¹, Rocío Martín⁵, Javier Codesal¹, José M. Pozuelo⁶, Rosario Rodríguez⁶ and Riánsares Arriazu⁶

¹Department of Anatomy, Histology, and Neuroscience. School of Medicine, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain; ²Department of Anesthesiology. Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain; ³Department of Anesthesiology. Hospital Primero de Octubre, Madrid, Spain; ⁴Department of Surgery (Urology). Hospital de La Princesa, School of Medicine, Autonomous University of Madrid, Spain; ⁵Department of Pathology. Hospital N. Sr. Sonsoles, Ávila, Spain and ⁶Department of Histology, School of Medicine, San Pablo University, CEU, Madrid, Spain

Abstract: Abnormal angiogenesis is a critical feature of many diseases, including cancers and their precursors. Although the association between prostate carcinogenesis and changes in microvascular architecture is well known, these changes are not well-documented from a quantitative point of view. The present work deals with stereological estimates of the number of quiescent and proliferative endothelial cells, and microvessel length in normal and prostate cancer tissues. Unbiased stereological measurements of numerical densities of proliferating cell nuclear antigen immunostained cells, non-proliferating endothelial cells, caspase 3 immunoreactive endothelial cells, and relative length (length density) of microvessels, were performed in control and cancer specimens. There were no changes in either proliferation or apoptosis in carcinoma endothelial cells. A decrease of endothelial cell density, together with an increase of microvessel length density, were detected in prostate cancer specimens.

Therefore, the following conclusions can be drawn: a) The increase of angiogenic activity in prostate carcinogenesis leads to an increment of the microvascular length; b) The amount of endothelial cells per vascular length decreases in prostate cancer; c) There is no decrease of endothelial apoptosis in cancer microvessels. d) The increase of the length density of microvessels in prostate cancer is not directly associated to an enhancement of the endothelial proliferation; and e) The blood supply of epithelium was similar in both cancerous and normal prostate.

Key Words: Angiogenesis, prostate cancer, endothelium, microvascular length, cell proliferation, endothelial apoptosis, stereology.

INTRODUCTION

The scientific world is currently dedicating attention to the prostate because of the increase of incidence and prevalence of prostate pathology, either benign or malignant. There are a great number of biological factors intervening in the establishment, development, and progression of malignant proliferative prostatic pathology [1]. A relevant factor is vascularization, given the influence that the microvascular environment exerts on the growth of prostatic carcinoma [2]. The number of cells in a certain cellular population is the end point resulting from the equilibrium between proliferation and programmed death. The endothelium is the main component of microvessels and plays an important role in the establishment of the size and architecture of the microvascular bed [3]. It seems interesting to quantitate the final amount of endothelial cells and their rates of proliferation and apoptosis, in order to obtain better knowledge of the

dynamism of this cell population in both normal and tumoral conditions.

Caspases are fundamental components of the mammalian apoptotic machinery. Caspase 3 is a prototypical enzyme that becomes activated in a wide variety of tissues during apoptosis [4]. On the other hand, there is evidence of a loss of caspase 3 protein expression in prostate cancer [5]. The quantification of immunoeexpression of caspase 3 might constitute a reliable method for measuring apoptotic activity in prostate cancer.

Alternately, angiogenesis is basically defined as the process leading to the formation of new blood vessels and is essential for normal growth and development [6]. In normal adults, active angiogenesis occurs infrequently [3]. Abnormal angiogenesis is a critical feature of many diseases, including cancers and their precursors [7, 8].

Focusing on the prostate, there are a number of reports concerning neovascularity and invasive cancer which, on the whole, suggest a link between increased vascular density and an aggressive tumor phenotype [9-12]. Scarce rigorous stereological assessment has been performed regarding this

*Address correspondence to this author at the Department of Anatomy, Histology, and Neuroscience, School of Medicine, Autonomous University of Madrid, C/Arzobispo Morcillo 2, 28029-Madrid, Spain; Tel: 34-914975367; Fax: 34-914975353; E-mail: luis.santamaria@uam.es

matter [13], as most of the studies concerning quantification of microvessels employ microvessel density (MVD), or counting of the number of microvessel profiles [13-16]. Currently, MVD is not consistently defined and it seemed interesting to evaluate microvasculature by unbiased stereologic tools, such as length density (L_V) (defined as the length of microvessels per unit of volume of tissue) [17], to obtain more accurate and rigorous measurements.

The present study deals with the stereologic estimation of L_V for microvessels in cancer and normal prostate specimens, to confirm the hypothesis that the increase of angiogenic activity in prostate carcinogenesis leads to an increment of microvascular length [18], and to ascertain if this increment is related to an enhancement of endothelial proliferation in tumoral microvessels [19]. Proliferating and non-proliferating endothelial cells, as well as apoptotic endothelial cells, were counted in order to correlate the size of the microvascular bed with the growth of the endothelial population in normal and cancerous prostate.

MATERIALS AND METHODOLOGY

Materials

Thirty prostate specimens were collected at La Princesa Hospital (Madrid, Spain). The first 15 (CTR group) were from healthy subjects without endocrine or reproductive pathology, deceased in traffic accidents, and eligible as donors for transplant: adults, age (mean \pm SD): 33 ± 8.5 ; range: 20-47 years. The remaining 15 were surgical specimens (radical prostatectomy) from patients diagnosed with prostate carcinoma (CA group): age (mean \pm SD): 70 ± 10 ; range: 56 to 85 years. In all these cases, the diagnosis of carcinoma was previously confirmed by histopathology. Eleven of the cancer cases had a Gleason score of 7 (3+4), and the rest had a Gleason score of 6 (3+3). The CA cases were without prior neoadjuvant hormonal therapy.

All ethical requirements were carried out in order to obtain the prostatic tissue either at the moment of the multi-organ extraction for transplant (CTR group) or at surgery (CA group). Immediately after extraction, the specimens were weighed and their fresh volume was obtained by water displacement. All the specimens were fixed in 10% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4, for 24 hrs.

Sampling Protocol

After fixation, the specimens from both the CTR and CA groups were thoroughly sectioned into 2-mm-thick slices, performed by isotropic uniform random sampling (IUR sections) [20], to assure an isotropic encounter between the tissue and the probe for estimation of the microvessel length [21].

Immunohistochemistry

All the IUR sampled slices were then processed by paraffin embedding. The paraffin blocks were exhaustively sectioned into five- μ m-thick sections (for routine hematoxylin-eosin), alternating with 10- μ m-thick sections (for stereological measurements). Two types of double immunostainings were performed in order to (a) visualize the endothelial nuclei immunoreactive to proliferating cell nuclear antigen

(PCNA) together with the microvascular structure immunoreactive to Von Willebrand factor (Factor VIII related antigen) [13], and b) to show simultaneously the endothelial cells immunostained to caspase 3 and the microvessels immunostained to Factor VIII. At least ten randomly selected slides per specimen groups (five for PCNA plus Factor VIII, and five for caspase 3 plus Factor VIII) were immunostained in the CTR and CA groups. Deparaffinized and rehydrated tissue sections were treated for 30 min with hydrogen peroxide 0.3% in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 to block endogenous peroxidase. Mouse monoclonal and rabbit polyclonal antibodies were used as primary antibodies.

To detect PCNA immunoreactivity, sections were incubated with a monoclonal anti-PCNA antibody (Biomedica, Foster City, CA, USA) diluted at 1:200. To detect caspase 3 immunoreactivity, a monoclonal anti-caspase 3 antibody (Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA) diluted at 1:50 was employed. Pretreatment of sections by heat in citrate buffer pH 6.0 (using a pressure cooker) [22] was performed to enhance both immunostainings. The primary antisera were diluted in PBS pH 7.4 containing 1% bovine serum albumin (BSA) plus 0.1% sodium azide. Incubation with primary antisera was performed overnight at 4°C.

The second antibody employed was a biotin-caproyl-anti-mouse immunoglobulin (Biomedica), diluted at 1:400 in PBS containing 1% BSA without sodium azide, and incubated for 30 min at room temperature. Thereafter, sections were incubated with a streptavidin-biotin-peroxidase complex (Biomedica). The immunostaining reaction product (in brown) was developed using 0.1 g diaminobenzidine (DAB) (3,3',4,4'-Tetraminobiphenyl, Sigma, St Louis, USA) in 200 mL of PBS, plus 40 μ L hydrogen peroxide.

Afterwards, the sections immunostained to PCNA and to caspase 3 were again processed for immunostaining to Factor VIII. A polyclonal antibody (Sigma), diluted at 1:1000 in PBS pH 7.4 containing 1% bovine serum albumin (BSA) plus 0.1% sodium azide was employed. The second antibody used was a biotin-caproyl-anti-rabbit immunoglobulin (Biomedica). Thereafter, sections were incubated with a streptavidin-alkaline phosphatase complex (Biomedica). The immunostaining reaction product (in blue) was developed using the BCIP/NBT substrate kit (Zymed, San Francisco, CA, USA). The antisera diluents and incubation protocols for immunostaining to Factor VIII were identical to protocol for PCNA or caspase 3.

After immunoreactions, sections were counter-stained with Harris hematoxylin. All slides were dehydrated in ethanol and mounted in a synthetic resin (Depex, Serva, Heidelberg, Germany). The specificity of the immunohistochemical procedures was checked by incubation of sections with non-immune serum instead of the primary antibodies.

Quantitative Methods

The numerical density (N_V) of endothelial cells (cell number per unit of volume of reference space) was estimated for both PCNA immunoreactive (N_V PCNA positive) and PCNA negative nuclei (N_V PCNA negative), employing the optical disector, an unbiased stereological method, [23] using the Cast-Grid program (Stereology Software Package, Silkeborg, Denmark).

In the case of immunostaining for caspase 3, the N_V of both endothelial cells, with and without cytoplasmic immunoreactivity for caspase 3, was estimated with the same procedure as that employed in PCNA sections. The counting unit was the nucleus of either caspase 3 positive or negative cells. The reference space for estimating the numerical densities was that occupied by the stroma of the prostate.

In order to measure the volume of the reference space, the number of disector frames with the upper-right corner hitting the stromal tissue (n) was registered. The total volume of the reference space was $\Sigma V_{dis} = n \cdot V_{dis}$. V_{dis} = area of the disector frame ($1,482 \mu m^2$), multiplied by the distance between the two focal planes chosen for determining the disector volume in the tissue section ($5 \mu m$). This distance was measured by means of a microcator (Heidenhain: Traunreut, Germany) connected to the Z displacement of the microscope stage.

As the material was embedded in paraffin, it showed significant shrinkage. Therefore, a shrinkage factor (FrV), i.e., the ratio between fresh volume, calculated by water displacement and the volume after paraffin embedding, measured by the Cavalieri estimator [21] (FrV = 1.21), was obtained and introduced into the formula for calculation of N_V . The formula then employed to estimate N_V was:

$N_V = \Sigma Q_d^- / \Sigma V_{dis} \cdot FrV$; where Q_d^- was the number of nuclei eligible for counting, according to the Sterio convention [23].

The total N_V of endothelial cells was calculated as $N_V \text{ total} = N_V \text{ (PCNA negative + PCNA positive)}$. The labeling index of PCNA (LIpcna) for endothelial cells was expressed as the ratio $N_V \text{ PCNA positive} / N_V \text{ total}$. The labeling index of caspase 3 (LICaspase 3) for endothelial cells was expressed as the ratio $N_V \text{ caspase 3 positive} / N_V \text{ total}$.

For all practical purposes, biological microstructures such as capillaries, tubules and axons can be regarded as linear features, whose most important stereological attribute is their length density (L_V). The L_V of microvessels, i.e., length of microvessels per unit of volume of prostate tissue, was evaluated in both the CTR and CA groups. Moreover, in order to assure that the measurements were not biased by age, L_V estimates were also performed in prostate areas from the CA group that were carcinoma-free (peri-tumoral zone: PTZ) and compared with those obtained for the CTR group. The stromal compartment was considered a reference space. The vascular profiles immunostained to Factor VIII, eligible for counting, were those sampled by the disector frame and fulfilling the Sterio convention. The L_V of microvessels was calculated by the formula:

$L_V = (2 \times \Sigma Q^-) / \Sigma A \cdot FrA$, where Q^- = number of eligible immunopositive vascular profiles and ΣA = stromal area sampled, i.e., area of disector frame ($1,482 \mu m^2$), multiplied by the number of selected frames (those with the upper-right corner hitting the stromal tissue). In addition, the total number of frames superimposed onto the fields was also registered in order to obtain the total area (stroma plus epithelium).

An areal shrinkage factor was introduced in the denominator of the formula for calculation of L_V . This factor (FrA) was obtained according to the expression $FrA = FrV / FrL$,

where FrL was the linear shrinkage factor, i.e., the ratio between a linear element measured in the fresh tissue and a linear element estimated on a section from paraffin embedded material, $FrA = 1.18$.

Vascular length density with respect to epithelial volume (L_{epV}) was also considered. This parameter was calculated by the formula:

$L_{epV} = (2 \times \Sigma Q^-) / \Sigma A_{ep} \cdot FrA$, where Q^- = number of immunopositive vascular profiles and ΣA_{ep} = epithelial area sampled, that is, equal to total area – stromal area.

Furthermore, the number of endothelial cells per millimeter of length of microvessel (N_L) was calculated to total endothelial nuclei: $N_L = N_V \text{ total (endothelium)} / L_V \text{ microvessels}$.

A parameter derived from L_V , average microvessel diameter (AMD), was also calculated by the formula:

$$AMD = 2 \cdot 10^3 \sqrt{\frac{V_{V \text{ vasc}}}{V_{V \text{ stroma}} \cdot \pi \cdot L_V}}$$

where $V_V \text{ vasc}$ is the volume fraction occupied by the microvessels, and $V_V \text{ stroma}$, the volume fraction occupied by the prostate stroma. AMD was expressed in μm . Both $V_V \text{ vasc}$ and $V_V \text{ stroma}$ were calculated, counting the points hitting either the vascular, stromal or reference area, (the stroma for $V_V \text{ vasc}$, and the total tissue for $V_V \text{ stroma}$), using the CAST-GRID program.

For each parameter, the mean \pm SEM was calculated in each group. The differences between the CTR and CA groups and between the CTR and PTZ were analyzed using the Student's t test ($p < 0.05$).

The quantitative parameters (total N_V of endothelial cells, N_V PCNA- positive endothelial cells, N_V caspase 3- positive endothelial cells, $V_V \text{ vasc}$, and $V_V \text{ stroma}$) employed as intermediate estimates to obtain the final parameters (LIpcna, LICaspase 3, N_L of endothelial cells, and AMD) are shown in Table 1. Only N_L , LIpcna, LICaspase 3, L_V , L_{epV} , and AMD are shown and analyzed.

RESULTS

Microvessels immunostained to Factor VIII were observed in both the CTR and CA specimens (Fig. 1a-d). More capillaries were apparently seen in CA cases than in CTR specimens, but the amount of capillary profiles touching the basal membrane of the acini was less in CA than in CTR (Fig. 1c,d). However, a similar amount of endothelial nuclei immunoreactive to PCNA was detected in the two groups of study (Fig. 1b,c). In the CTR group, the epithelial nuclei immunostained to PCNA were seen preferently at the basal compartment of the glands (Fig. 1a,b), whereas the epithelial nuclei immunoreactive to PCNA from the CA group had no preferential localization in the tumoral epithelium (Fig. 1c,d).

In both the CTR and CA groups, caspase 3 immunoreactivity was evidenced in the cytoplasm of epithelial cells (Fig. 2). Moreover, caspase 3 immunostaining was detected in some endothelial cells in both normal and cancer specimens (Fig. 2).

Table 1. Quantitative Intermediate Measurements

	# Cases	# Total Disectors	# Stromal Disectors	# Epithelial Disectors	Epithelial Area (μm^2)	Stromal Area (μm^2)	V_v Stroma	V_v Vasc	N_v Total ($\times 10^3$)	N_v Pcn+ ($\times 10^3$)	N_v Caspase 3+ ($\times 10^3$)
CTR	15	120	84	36	54,000	124,500	0.70	0.024	133	28	9
CA	15	100	67	33	49,000	99,300	0.67	0.026	73	20	7

Measurements employed to obtain the parameters analyzed in both controls (CTR) and prostate cancer (CA) specimens. # total disectors: Average number of disectors sampled per case; # stromal disectors: Average number of disectors per case with the upper-right corner hitting the stromal tissue; #epithelial disectors: Average number of disectors per case with the upper-right corner hitting the epithelium. Epithelial area (μm^2): result of multiplying the # epithelial disectors by $1,482 \mu\text{m}^2$ (area of the disector frame). Stromal area (μm^2): result of multiplying the # stromal disectors by $1,482 \mu\text{m}^2$ (area of the disector frame). V_v stroma: volume fraction occupied by the stroma related to all the prostate tissue. V_v vasc: volume fraction occupied by the microvessels related to all the prostate tissue. N_v total: total number of endothelial cells per mm^3 of prostate stroma ($\times 10^3$). N_v pcna+: number of PCNA-positive endothelial cells per mm^3 of prostate stroma ($\times 10^3$). N_v caspase 3+: number of caspase 3 positive endothelial cells per mm^3 of prostate stroma ($\times 10^3$).

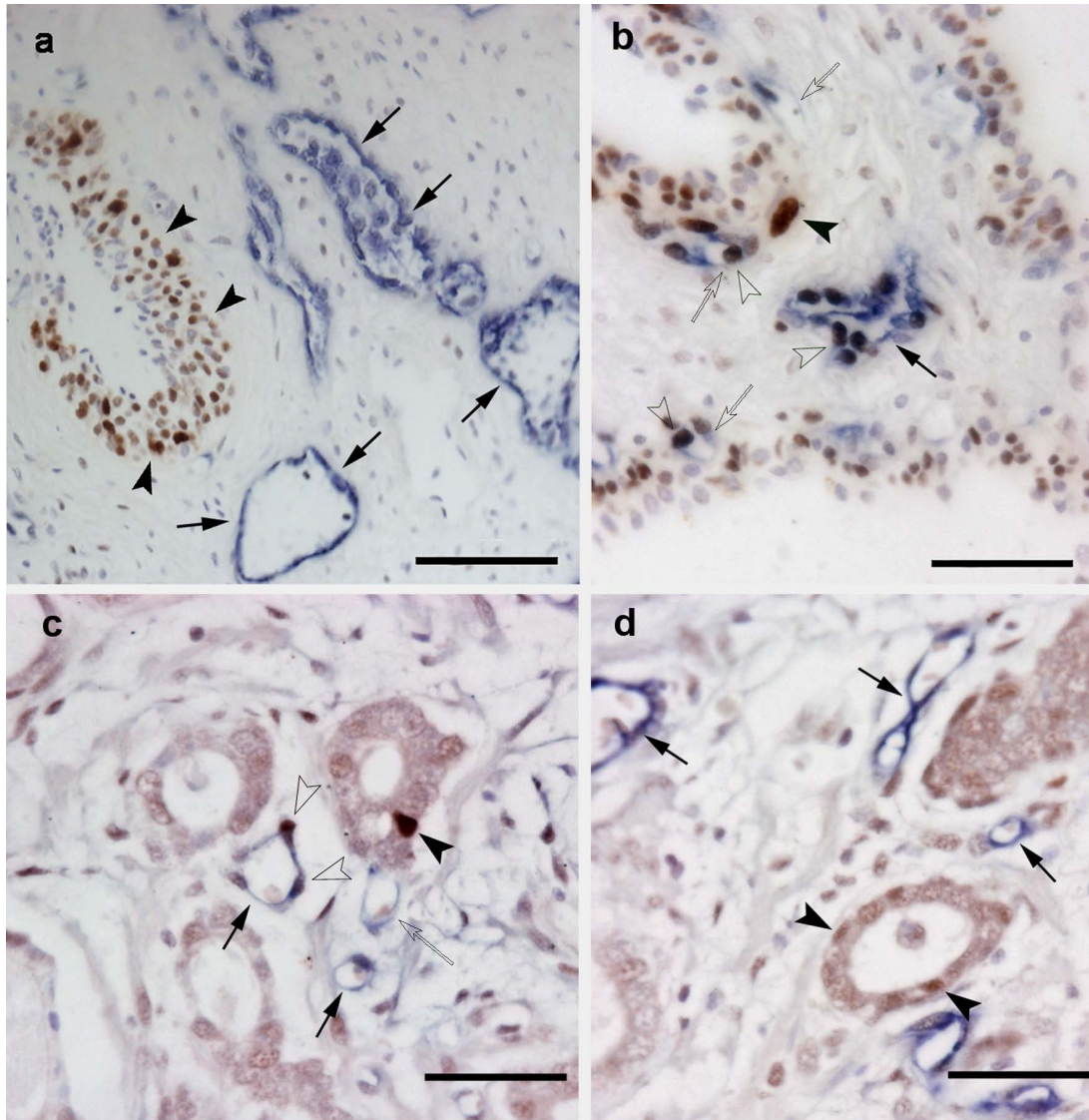


Fig. (1). Double immunostaining to PCNA and Factor VIII. **a)** Normal prostate (CTR group): a periurethral duct is seen with epithelial nuclei immunoreactive to PCNA, predominantly at basal level (arrowheads). Several microvessels immunoreactive to Factor VIII (arrows) are also seen. Calibration bar: $25 \mu\text{m}$. **b)** Normal prostate. The epithelial lining of a prostatic acinus shows abundant basal nuclei immunostained to PCNA (black arrowheads). Abundant touching capillaries, immunoreactive to Factor VIII, are seen around the acini (empty arrows). A microvessel not in contact with the acini (black arrow) is also seen. All the microvessels show some endothelial nuclei immunoreactive to PCNA (empty arrowheads). Calibration bar: $20 \mu\text{m}$. **c)** Prostate carcinoma (CA group). A nucleus immunoreactive to PCNA (black arrowhead) was detected in the epithelial lining of a tumor acinus. Several microvessels immunostained to Factor VIII (empty arrows) are also seen: only one is touching an acinus (empty arrows). Some PCNA immunostained endothelial nuclei (empty arrowheads) are observed. Calibration bar: $12 \mu\text{m}$. **d)** Epithelial nuclei immunoreactive to PCNA (black arrowheads) were observed in an image from prostate cancer. Several microvessels immunostained to Factor VIII, not touching the acini, are detected (black arrows). Calibration bar: $12 \mu\text{m}$.

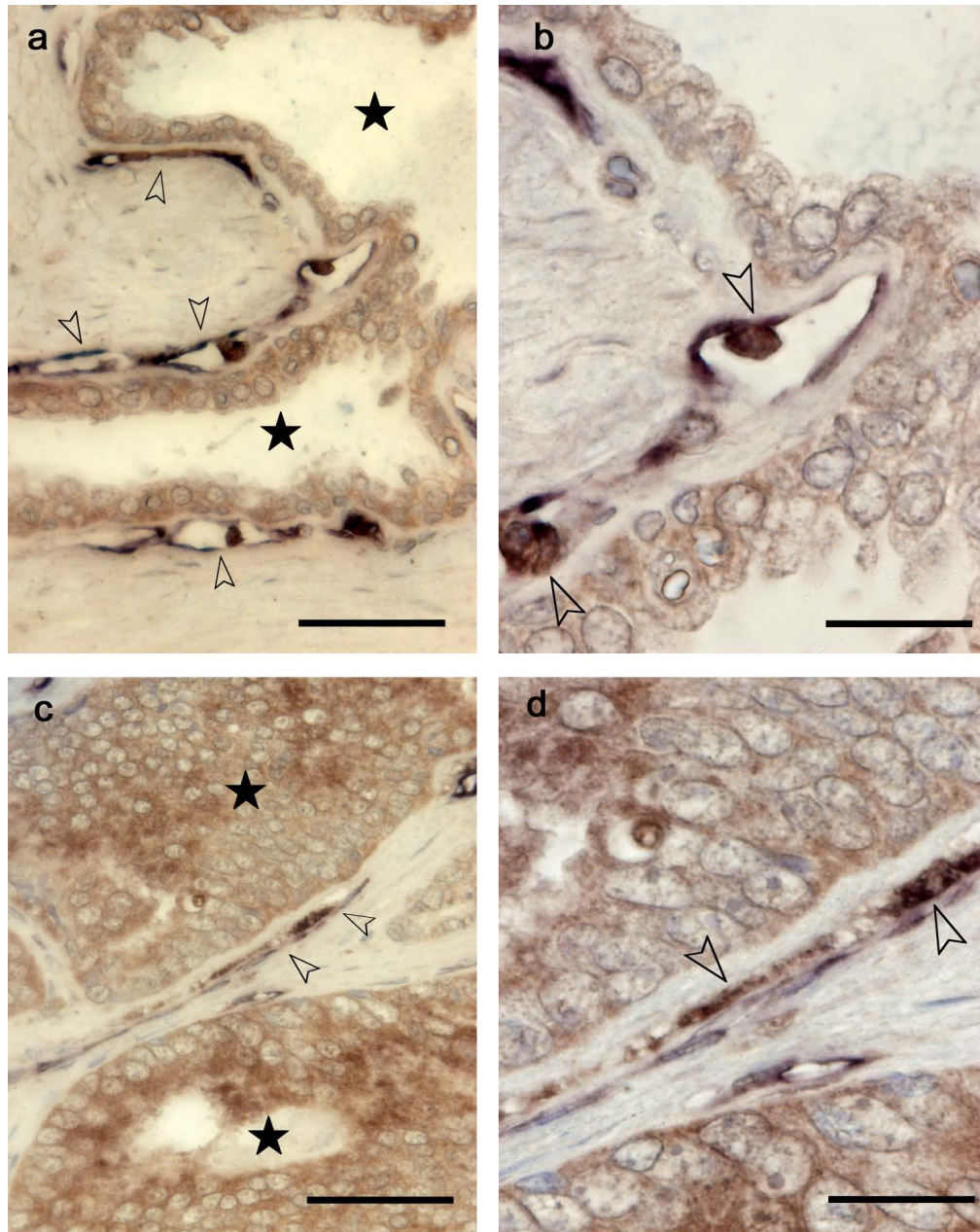


Fig. (2). Double immunostaining to caspase 3 and Factor VIII. **a**) Normal prostate (CTR group): a prostate acinus (stars) is seen with epithelial immunoreactivity to caspase 3. Several microvessels immunoreactive to Factor VIII (arrowheads) are seen surrounding the acinus. Calibration bar: 50 μm . **b**) More details from image a: Some endothelial cells show cytoplasmic immunoreactivity to caspase 3 (arrowheads). Calibration bar: 25 μm . **c**) Prostate carcinoma (CA group). The tumor epithelium shows caspase 3 immunostaining (stars). Microvessels immunostained to Factor VIII (arrowheads) are also seen. Calibration bar: 50 μm . **d**) More details from image b: Some endothelial cells show granular cytoplasmic immunoreactivity to caspase 3 (arrowheads). Calibration bar: 25 μm .

Both PCNA and the caspase 3 labeling indices (Lipcna, Lcaspase 3) did not differ significantly between the CTR and CA groups (Table 2), whereas the numerical density of endothelial cells per unit of microvessel length (N_L) decreased significantly in the CA group in comparison with the CTR group (Table 2). The density of microvessel length (L_V) was significantly increased in the CA group when compared with the CTR group (Table 2). The density of microvessel length with respect to the epithelial volume (L_{epV}) and the average microvessel diameter (AMD) did not differ significantly between the CTR and CA groups (Table 2). L_V did not show significant differences between CTR and PTZ (Fig. 3).

DISCUSSION

There is a remarkable increase in the relative length of cancer microvessels in comparison with the prostatic capillaries of the CTR group, which is in agreement with the findings of other authors [17] and might be related to the increase of angiogenesis in both cancer and preinvasive lesions indicated by several others [2, 9, 12, 18, 24, 25]. There were no significant differences in microvessel length density between young controls (CTR) and the carcinoma-free tissue from the cancer group (CA), i.e., controls of the same age as CA specimens, which excludes a possible age-dependent bias in the selection of young specimens as controls. These

Table 2. Comparison between the Quantitative Parameters Analyzed

	CTR	CA	p	Significance
LI pcna	0.22 ± 0.02	0.28 ± 0.04	0.256	NS
LI caspase 3	0.066 ± 0.014	0.093 ± 0.022	0.343	NS
N _L (x10 ³)	0.52 ± 0.09	0.30 ± 0.05	0.046	S
L _V (mm ⁻²)	103 ± 15	290 ± 61	0.0001	S
L _V ep (mm ⁻²)	26 ± 13	68 ± 20	0.097	NS
AMD (µm)	18 ± 2	14 ± 2	0.210	NS

All the quantitative parameters analyzed in both control (CTR) and prostate cancer (CA) specimens are expressed as mean ± SEM. LI pcna: PCNA labeling index for endothelial cells. LI caspase 3: Caspase 3 labeling index for endothelial cells. N_L: Number of endothelial cells x10³ per mm of microvessel length. L_V: length of microvessel per unit of volume of prostate stroma expressed in mm of microvessel per mm³ of stroma (mm⁻³). L_V ep: L_V: length of microvessel per unit of volume of prostate epithelium expressed in mm of microvessel per mm³ of epithelium (mm⁻³). AMD: Average mean diameter of microvessel expressed in µm. P: significance level for the comparison between CTR and CA groups by the Student's t test (p < 0.05). NS: not significant. S: significant.

findings agree with those obtained by other authors [17] also using the peri-tumor prostate area as a control.

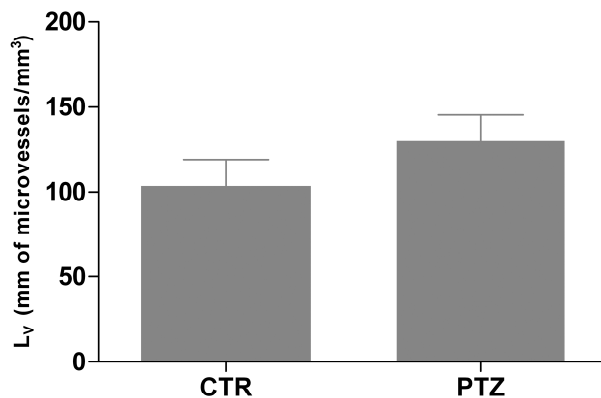


Fig. (3). Bar diagram for L_V expressed as mean ± SEM, in controls (CTR) and carcinoma-free area (PTZ) from CA group. No significant differences (p < 0.05) were observed.

Nevertheless, it is worth noting that the L_V from carcinoma-free areas in CA specimens tends to be higher than microvessel length density from CTR specimens (cases without cancer), which might be explained by the presence of local angiogenic factors secreted by cancer tissues and operating on the « normal » peri-tumor vessels. It is unclear how the microvascular bed enlarges in cancer cases more than in controls, without a significant increase of endothelial proliferation in the former. Several other authors also state the absence of relationship between endothelial proliferation and increase of microvessel density in both breast and prostate cancers [19, 26, 27]. A potential decrease of the apoptotic activity for the endothelium of prostate cancer might explain the increase of microvessel length without endothelial proliferation. It is known that the apoptosis of a relatively small proportion of endothelial cells is sufficient to mediate a significant decrease in microvessel density [28]. The resistance to apoptosis in cancer has been documented by several authors, who found decreased levels of the apoptotic-related enzymes, caspases 1 and 3, in tumor epithelium [5]. How-

ever, in the present study, the endothelial apoptosis evaluated by quantification of the labeling index of endothelial cells caspase 3- immunoreactive was not diminished in the CA group in comparison with controls. Moreover, the decrease in the numerical density of the endothelial population in cancer does not support an increase of the survival of these cells. Thus, a “dilution” effect for the population of the endothelial cells, possibly due to the increase of microvessel length without endothelial proliferation, was proposed. The elongation of the cancer microvessels might be explained by the migration of endothelial cells [29] and the remodeling of the components of the capillary basal membrane [30]. Furthermore, the decrease in the amount of endothelial cells per unit of microvessel length, together with the increase of microvessel elongation, might render openings between endothelial cells, creating leaky vessels in cancer angiogenesis, as suggested by others [31, 32].

The stereological estimate of microvessel density as the length of microvessels per unit of volume of the reference space seems more accurate and unbiased than the generic term of microvessel density (MVD), usually employed in most of the studies revised [13, 14, 33]. There are two main reasons to prefer L_V to MVD to quantify the size of the microvascular bed:

The first is that when MVD is employed, it is usual to identify MVD as the number of vessels per unit area. However, this is misleading, as it is not possible to count vessels in sections that are bidimensional planes (2D). Vessels are linear or tubular structures lying in a three dimensional space (3D). Actually, MVD estimates vessel profiles (i.e. sections of vessels), not whole vessels. In addition, when two close-lying vessel sections are counted, the most probable result is that two sections from the same vessel, but not two different vessels, are registered. On the other hand, the number of profiles registered in a 2D plane of a linear feature that “lives” in a 3D space is, in fact, an estimate of the length of the linear structure, given by the expression: 2 · (number of profiles counted) / area of the section. This is actually the length density (L_V) of the linear structure [17]. The authors using MVD to estimate “number of vessels per unit of area” are underestimating the length density, because L_V is equal to 2 · MVD.

The second reason for preferring L_V is because, in MVD measurements, a systematic error of either plus-sampling or minus-sampling is introduced, as the “edge effect” of the reference frame (i.e. the microscopic field) is not taken into account. It would be erroneous to count or include all the profiles which intersect the reference frame. It would be equally erroneous to exclude all the boundary cases and count only those profiles lying entirely inside the frame. Plus-sampling overcounts the number of profiles per unit area, and introduces a sampling bias: larger profiles are more likely to be hit by the reference frame. Minus-sampling, on the other hand, undercounts the number of profiles per unit area, and introduces a sampling bias in favor of the smaller profiles [34].

In general, there are two remedies for sampling bias: we may either change the sampling rule to eliminate the bias, or we may correct the bias by reweighing the sampled items. In this study, the Sterio sampling rule was chosen [23], i.e., the disector, which is a reference frame with two inclusion borders and two exclusion borders. A profile is included in the count if: a) it is inside of the frame and does not touch any border or b) it is inside or outside of the frame but touches any of the inclusion borders and not any of the exclusion borders.

Another source of bias in MVD counts (as implemented in the majority of the studies analyzed) is the so-called “hot-spot” sampling: selecting areas with an apparent (qualitative) greater density of profiles for counting. Some authors express a concern about this biased sampling. For example, Lissbrant *et al.*, 1997 [35] state that “another concern has been the microvessel-counting technique. Therefore, we wanted to determine if counting hotspots promotes a bias, since this requires subjective selection of the most vascularized area. Possibly, it would be more accurate to use standard stereological techniques to measure the mean intratumoral volume density of microvessels in randomly chosen fields in each section”. Why, then, in a number of studies [15, 16, 35, 36], was MVD relevant in order to quantitate angiogenesis? A possible explanation might be because the under-estimation of the vascular density resulting from the omission of factor x_2 in the formula was balanced by the over-estimation resulting from the “hotspot” sampling.

In our study, the fields for estimation of L_V were sampled by a systematic random sampling method: systematic sampling with a starting position which is random and uniformly distributed in the range of the object [34]. This method assures all of the fields scanned the same chance of being included in the measurements and is more efficient than the classic methods of uniform random sampling.

Although some authors indicate that the capillaries in prostate cancer have a wider lumen than in normal tissue [10], in the present study, no significant changes were observed in the average microvessel diameter in either group. Some authors have found that the highest proportion of microvessels near to the epithelium (touching capillaries) is seen in normal prostate, while the lowest is found in invasive adenocarcinoma [10]. This finding was also detected in the present study and could signify a poorer oxygen supply for cancer tissue than for normal prostate epithelium. However, the length density of capillaries per epithelial volume was found similar for both cancer and normal specimens, in ac-

cordance with the rarity of tumor necrosis in prostate cancer, only observed in cancers with a primary Gleason pattern of 5 [37]. This similitude of vessel-epithelium correlation between normal prostate and cancer might suggest that the angiogenetic activity in prostate cancer is low in comparison with other types of tumors, which could contribute to the mild aggressiveness accounted for in most prostate cancers [38] stated in other studies [36]. Although microvessel density was not an independent prognostic predictor, according to the studies of some authors [39], it is reasonable to expect that cancers with more microvessel density show a more aggressive tumor phenotype.

CONCLUSION

Summarizing, we conclude that: a) The increase of angiogenetic activity in prostate carcinogenesis leads to an increment of microvascular length; b) The amount of endothelial cells per vascular length decreases in prostate cancer; c) There is no decrease of endothelial apoptosis in cancer microvessels; d) The increase of the length density of microvessels in prostate cancer is not directly associated with an enhancement of endothelial proliferation; and e) The blood supply of the epithelium was similar in both the cancerous and normal prostate.

REFERENCES

- [1] American Cancer Society. Cancer Facts and Figures: Statics for 2007. Atlanta 2007.
- [2] Condon MS. The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. *Semin Cancer Biol* 2005; 15: 132-7.
- [3] D'Amore PA. Capillary growth: a two-cell system. *Semin Cancer Biol* 1992; 3: 49-56.
- [4] Woo M, Hakem R, Soengas MS, *et al.* Essential contribution of caspase 3/CPP32 to apoptosis and its associated nuclear changes. *Genes Dev* 1998; 12: 806-19.
- [5] Winter RN, Kramer A, Borkowski A, Kyprianou N. Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 1227-32.
- [6] O'Brien TS, Harris AL. Angiogenesis in urological malignancy. *Br J Urol* 1995; 76: 675-82.
- [7] Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 1992; 3: 65-71.
- [8] Montironi R, Galluzzi CM, Diamanti L, Taborro R, Scarpelli M, Pisani E. Prostatic intra-epithelial neoplasia. Qualitative and quantitative analyses of the blood capillary architecture on thin tissue sections. *Pathol Res Pract* 1993; 189: 542-8.
- [9] Kong D, Li Y, Wang Z, Banerjee S, Sarkar FH. Inhibition of angiogenesis and invasion by 3,3'-diindolylmethane is mediated by the nuclear factor-kappaB downstream target genes MMP-9 and uPA that regulated bioavailability of vascular endothelial growth factor in prostate cancer. *Cancer Res* 2007; 67: 3310-19.
- [10] Montironi R, Diamanti L, Thompson D, Bartels HG, Bartels PH. Analysis of the capillary architecture in the precursors of prostate cancer: recent findings and new concepts. *Eur Urol* 1996; 30: 191-200.
- [11] Revelos K, Petraki C, Scorilas A, *et al.* Correlation of androgen receptor status, neuroendocrine differentiation and angiogenesis with time-to-biochemical failure after radical prostatectomy in clinically localized prostate cancer. *Anticancer Res* 2007; 27: 3651-60.
- [12] Sinha AA, Quast BJ, Reddy PK, *et al.* Microvessel density as a molecular marker for identifying high-grade prostatic intraepithelial neoplasia precursors to prostate cancer. *Exp Mol Pathol* 2004; 77: 153-9.
- [13] Deering RE, Bigler SA, Brown M, Brawer MK. Microvasculature in benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 1995; 26: 111-5.
- [14] Bigler SA, Deering RE, Brawer MK. Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum Pathol* 1993; 24: 220-6.

- [15] Weidner N. Tumor angiogenesis: review of current applications in tumor prognostication. *Semin Diagn Pathol* 1993; 10: 302-13.
- [16] Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 1993; 143: 401-9.
- [17] Mattfeldt T, Eckel S, Fleischer F, Schmidt V. Statistical analysis of reduced pair correlation functions of capillaries in the prostate gland. *J Microsc* 2006; 223: 107-19.
- [18] Pallares J, Rojo F, Iriarte J, Morote J, Armadans LI, de Torres I. Study of microvessel density and the expression of the angiogenic factors VEGF, bFGF and the receptors Flt-1 and FLK-1 in benign, premalignant and malignant prostate tissues. *Histol Histopathol* 2006; 21: 857-65.
- [19] Vartanian RK, Weidner N. Endothelial cell proliferation in prostatic carcinoma and prostatic hyperplasia: correlation with Gleason's score, microvessel density and epithelial cell proliferation. *Lab Invest* 1995; 73: 844-50.
- [20] Baddeley A, Vedel Jensen E. Geometrical Probability. In: Baddeley A, Vedel JE, Eds. *Stereology for Statisticians*. Boca Raton: Chapman & Hall 2005; pp. 111-33.
- [21] Howard CV, Reed MG. *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*. 2nd ed. Oxford: Bios Scientific Publishers 2005.
- [22] Martin JJ, Martin R, Codesal J, Fraile B, Paniagua R, Santamaría L. Cadmium chloride-induced dysplastic changes in the ventral rat prostate: an immunohistochemical and quantitative study. *Prostate* 2001; 46: 11-20.
- [23] Sterio DC. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 1984; 134: 127-36.
- [24] Delves GH, Stewart AB, Cooper AJ, Lwaleed BA. Prostatosmes, angiogenesis, and tissue factor. *Semin Thromb Hemost* 2007; 33: 75-9.
- [25] Padhani AR, Harvey CJ, Cosgrove DO. Angiogenesis imaging in the management of prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol* 2005; 2: 596-607.
- [26] Fox SB, Gatter KC, Bicknell R, *et al.* Relationship of endothelial cell proliferation to tumor vascularity in human breast cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 4161-3.
- [27] Vartanian RK, Weidner N. Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *Am J Pathol* 1994; 144: 1188-94.
- [28] Dong Z, Zeitlin BD, Song W, *et al.* Level of endothelial cell apoptosis required for a significant decrease in microvessel density. *Exp Cell Res* 2007; 313: 3645-57.
- [29] Grizzi F, Russo C, Colombo P, *et al.* Quantitative evaluation and modeling of two-dimensional neovascular network complexity: the surface fractal dimension. *BMC Cancer* 2005; 5: 14.
- [30] Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 2003; 9: 653-60.
- [31] Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, *et al.* Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol* 2000; 156: 1363-80.
- [32] Terman BI, Stoletov KV. VEGF and tumor angiogenesis. *Einstein Q J Biol Med* 2001; 18: 59-66.
- [33] Lekas A, Lazaris AC, Deliveliotis C, *et al.* The expression of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and angiogenesis markers in hyperplastic and malignant prostate tissue. *Anticancer Res* 2006; 26: 2989-93.
- [34] Baddeley A, Vedel Jensen E. Overview of Modern Stereology. In: Baddeley A, Vedel JE, Eds. *Stereology for Statisticians*. Boca Raton: Chapman & Hall 2005; pp. 55-85.
- [35] Lissbrant IF, Stattin P, Damber JE, Bergh A. Vascular density is a predictor of cancer-specific survival in prostatic carcinoma. *Prostate* 1997; 33: 38-45.
- [36] Bono AV, Celato N, Cova V, Salvatore M, Chinetti S, Novario R. Microvessel density in prostate carcinoma. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2002; 5: 123-7.
- [37] Epstein JI, Allsbrook WC Jr, Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2005; 29: 1228-42.
- [38] Abbas F, Scardino PT. The natural history of clinical prostate carcinoma. *Cancer* 1997; 80: 827-33.
- [39] Arakawa A, Soh S, Chakraborty S, Scardino PT, Wheeler TM. Prognostic significance of angiogenesis in clinically localized prostate cancer (staining for Factor VIII-related antigen and CD34 Antigen). *Prostate Cancer Prostatic Dis* 1997; 1: 32-38.

Received: February 12, 2009

Revised: May 5, 2009

Accepted: May 8, 2009

© . Santamaría *et al.*; Licensee Bentham Open.This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.



Milan Research Centre for
Industrial and Applied Mathematics



Stereology and Image Analysis

ECS10 – The 10th European Congress of ISS

Editors:

V. Capasso
G. Aletti
A. Micheletti



Stereology and Image Analysis
ECS10
The 10th European Congress of ISS

Editors:

V. Capasso
G. Aletti
A. Micheletti



Editors

Vincenzo Capasso, Giacomo Aletti, Alessandra Micheletti
Department of Mathematics
University of Milano
Italy

Copyright@2009

All rights reserved. This book, or parts thereof, may not be reproduced in any form and by any means, without written permission from the Publisher.

Proceedings have been printed on the basis of manuscripts submitted by electronic form. The manuscripts of Sections 2 and 3 have been submitted to peer review by international experts in the field.

ISBN: 978-88-7488-310-3

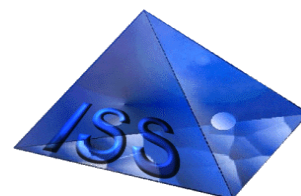
PROGETTO  LEONARDO

è una realizzazione
SOCIETÀ EDITRICE ESCULAPIO
40131 Bologna (Italy) – via U. Terracini, 30
Tel .051-6340113 – Fax 051-6341136
www.editrice-sculapio.it



ECS10

The 10th European Congress of
Stereology and Image Analysis



CD CONTENT

ROCEEDINGS

- » Invited Lectures
- » Minisymposia
- » Contributed Talks

ON REFEREED PART

- » Minisymposia
- » Contributed Talks
- » Posters

BROWSE

- By Author
- By Title

Table of Contents

- Invited Lectures
- Minisymposia
- Contributed Talks
- Posters

List of Abstracts

- Invited Lectures
- Minisymposia
- Contributed Talks
- Posters

CREDITS

SPONSORS

ORGANIZING TEAM

- International Advisory Board
- Local Committee
- Managing Team
- ISS Board

FLYER

LEGEND

- roceedings
- on Refereed Part
- PDF available
- Text only abstract

LIST OF CONTRIBUTIONS

[HOME](#) [PROCEEDINGS](#) [NON REFEREED PART](#)

INVITED LECTURES

ADVANCES ON THE PRECISION OF SEVERAL STEREOLOGICAL VOLUME ESTIMATORS

by [K. Kieu](#), [M. Mora](#)

APPLICATIONS OF STEREOLOGY AND DIGITAL IMAGE PROCESSING FOR SIMULATIONS OF REALISTIC HIGH-FIDELITY LARGE-VOLUME 3D MICROSTRUCTURES: IMPLICATIONS FOR MATERIALS DESIGN AND DEVELOPMENT

by [A. Gokhale](#)

BAYESIAN WAVELET BASED MULTIREOLUTION METHOD FOR LOCAL TOMOGRAPHY

by [K. Niinimäki](#), [S. Siltanen](#), [V. Kolehmainen](#)

DIFFUSION MR IMAGE SEGMENTATION: TOWARDS GLOBAL BRAIN CONNECTIVITY ANALYSIS

by [L. Cammoun](#), [X. Gigandet](#), [P. Hagmann](#), [R. Meuli](#), [J. Thiran](#)

EFFICIENT SIMULATION OF STABLE RANDOM FIELDS AND ITS APPLICATIONS

by [W. Karcher](#), [H. Scheffler](#), [E. Spodarev](#)

ELECTRON TOMOGRAPHY: THEORY AND APPLICATIONS, GEOMETRIES AND DISTORTION REMOVAL

by [S. Lanzavecchia](#)

GAUSSIAN PROCESSES AND CONVEX BODIES

by [R. Vitale](#)

LEARNING METHODS FOR CONTENT-BASED IMAGE ANNOTATION AND RETRIEVAL

by [L. Lo Gerfo](#), [M. Santoro](#), [A. Verri](#)

MODELLING FOAM STRUCTURES USING RANDOM TESSELLATIONS

by [C. Redenbach](#)

STEREOLOGY AND SOME ISSUES IN SPACE-TIME MODELLING

by [D. Daley](#)

STEREOLOGY OF NANOMATERIALS

by [K. Kurzydowski](#)

STEREOLOGY: OLD AND NEW

by [L. Cruz-Orive](#)

STEREOLOGY: SPANNING THE LEVELS FROM MOLECULE TO WHOLE ORGAN

by [T. Mayhew](#)

MINISYMPOSIA CONTRIBUTIONS

DESIGN-BASED STEREOLOGY APPLIED TO THE LUNG

Organizer: [D. Hyde](#)

SAMPLING STRATEGIES FOR THE LUNG

by [J. Nyengaard](#)

STEREOLOGICAL ESTIMATION OF AIRWAY AND PARENCHYMAL STRUCTURE IN DEVELOPING MONKEY LUNGS

by [D. Hyde](#), N. Tyler, L. Putney, S. Blozis, M. Avdalovic, C. Plopper

STEREOLOGICAL ASSESSMENT OF THE PULMONARY SURFACTANT SYSTEM

by [M. Ochs](#)

ESTIMATION OF GEOMETRICAL CHARACTERISTICS FROM 3D IMAGE DATA

Organizer: L. Kubinova

VARIANCES OF VOLUME, SURFACE AREA AND LENGTH ESTIMATES BY 3D VIRTUAL GRIDS

by [J. Janacek](#), L. Kubinova

CAPILLARY NETWORK IN CONTROL, DENERVATED AND REINNERVATED RAT EDL

by [I. Erzen](#), L. Kubinova, J. Janacek

APPLICATIONS OF ANISOTROPIC IMAGE FILTERS FOR COMPUTING 2D AND 3D-FIBER ORIENTATIONS

by [O. Wirjadi](#), K. Schladitz, A. Rack, T. Breuel

FIBRES

Organizers: V. Benes, D. Jeulin

ESTIMATORS OF THE INTENSITY OF STATIONARY PLANAR FIBRE PROCESSES

by A. Micheletti, [P. Rancoita](#)

STEREOLOGICAL CHALLENGES WHEN WORKING WITH HEART MUSCLE FIBRES

by [A. Bruel](#)

3D MORPHOLOGICAL MODELLING OF A RANDOM FIBROUS NETWORK

by [C. Peyrega](#), D. Jeulin, C. Delisse, J. Malvestio

3D DIRECTIONAL MATHEMATICAL MORPHOLOGY FOR ANALYSIS OF FIBER ORIENTATIONS

by [H. Altendorf](#), D. Jeulin

FRACTALS AND SELF SIMILARITY

Organizers: H. Kunze, D. La Torre, E. Vrscay

SOLVING AN INVERSE PROBLEM FOR THE HAMMERSTEIN INTEGRAL OPERATOR USING THE COLLAGE METHOD

by H. Kunze, D. La Torre, [K. Levere](#), E. Vrscay

ON ITERATED MULTIFUNCTION SYSTEMS

by [H. Kunze](#), D. La Torre, E. Vrscay

GENERALIZED FRACTAL TRANSFORMS AND SELF-SIMILAR IMAGES

by [D. La Torre](#), E. Vrscay

RANDOM IFSM WITH APPLICATIONS

by [M. Demers](#), H. Kunze, D. La Torre

TAILORED V-VARIABLE MODELS

by [U. Freiberg](#)

HISTORY OF STEREOLOGY

Organizer: I. Saxl

GRAIN SIZE MEASUREMENTS - HISTORICAL REVIEW

by [G. Vander Voort](#)

ORIGINS OF GEOMETRIC PROBABILITY AND STEREOLOGY

by [I. Saxl](#), M. Hyksova

19TH CENTURY STEREOLOGY: JOSEPH EMILE BARBIER

by [A. Kalousova](#)

IN MEMORIAM: MIROSLAV KALIŠNIK

by [I. Erzen](#)

NEUROIMAGING, FROM BASIC RESEARCH TO CLINICS

Organizers: G. Naldi, G. Frisoni

ALGORITHMS FOR IMAGE ANALYSIS IN THE CLINICAL NEUROSCIENCESby [G. Frisoni](#)**A NEW STATISTICAL APPROACH FOR THE ANALYSIS OF MULTI-SUBJECTS DIFFUSION TENSOR IMAGES: AN APPLICATION TO ALZHEIMER'S DISEASE**by [D. Giuliani](#), G. Naldi, M. Pievani, G. Frisoni**FUNCTIONAL MRI**by M. Filippi, [P. Valsasina](#)**MULTIMODAL ANALYSIS OF STRUCTURAL AND FUNCTIONAL IMAGES**by [A. Caroli](#), M. Lorenzi, G. Frisoni**NUMERICAL METHODS FOR MULTIDIMENSIONAL IMAGE ANALYSIS**

Organizers: L. Puccio, G. Iovane

A NEW CLASS OF FULL RANK FILTERS IN THE CONTEXT OF DIGITAL COLOUR IMAGE PROCESSINGby [S. Agreste](#), A. Vocaturo**QUANTITATIVE ANALYSIS OF BANDED STRUCTURES IN DUAL-PHASE STEELS**by [B. Krebs](#), A. Hazotte, L. Germain, M. Gouné**SUBCELLULAR SHAPES RECOVERY BY ENHANCEMENT AND EDGE LINKING FROM ELECTRON MICROSCOPY IMAGES**by [R. Maisano](#), G. Irrera**ASSESSING THE PRESENCE OF ICLS IN AD PATIENTS THROUGH IMAGE PROCESSING BY COMPARING T2-WEIGHTED, FLAIR AND DIR MRI SEQUENCES**by [L. Bonanno](#), P. Lanzafame, A. Celona, S. Marino, A. Baglieri, L. Puccio, P. Bramanti**GENERAL ADAPTIVE NEIGHBORHOOD-BASED MINKOWSKI MAPS FOR GRAY-TONE IMAGE ANALYSIS**by [S. Rivollier](#), J. Debayle, J. Pinoli**QUANTITATIVE AND QUALITATIVE EVALUATION OF HUMAN ENDOTHELIAL CELLS IMAGE SEGMENTATION**by [Y. Gavet](#), J. Pinoli**RANDOM TESSELLATIONS**

Organizer: W. Nagel

GIBBS VORONOÏ TESSELLATIONS WITH HARDCORE INTERACTIONS ON THE GEOMETRY OF CELLSby [D. Dereudre](#)**CAPACITY DISTRIBUTIONS IN SPATIAL STOCHASTIC MODELS FOR TELECOMMUNICATION NETWORKS**by [E. Voss](#), C. Gloaguen, V. Schmidt**ON THE SIDEDNESS OF SOME RANDOM POLYGONS**by [P. Calka](#)**HOMOGENEOUS STIT TESSELLATIONS - A STEREOLOGICAL ASPECT**by [W. Nagel](#), J. Mecke, V. Weiss**RECENT ADVANCES IN STEREOLOGY**

Organizer: L. Cruz-Orive

SYSTEMATIC SAMPLING IN 3D USING VIRTUAL TEST PROBES AND ITS APPLICATION TO SURFACE AREA AND LENGTH MEASUREMENTby [L. Kubinova](#), J. Janacek**CONFIDENCE INTERVALS IN CAVALIERI SAMPLING WITH LOCAL ERRORS**by [M. Garcia-Finana](#), S. Keller, N. Roberts**NEW ROTATIONAL FORMULAE, WITH APPLICATIONS TO STEREOLOGY**by [X. Gual-Arnau](#), L. Cruz-Orive**SPATIO-TEMPORAL MODELLING**

Organizer: M. Prokesova

MODELLING POINT PATTERNS WITH LINEAR STRUCTURESby J. Moeller, [J. Rasmussen](#)**LEVY BASED GROWTH MODELS**by [E. Jensen](#)**SEQUENTIAL SPATIAL PROCESSES FOR IMAGE ANALYSIS**by [M. Lieshout](#)**A FUZZY SET-VALUED STOCHASTIC FRAMEWORK FOR BIRTH-AND-GROWTH PROCESS. STATISTICAL ASPECTS**by [E. Bongiorno](#), G. Aletti, V. Capasso**THE BIOLOGICAL BIAS IN IMAGE ANALYSIS**

Organizer: B. Apolloni

IMAGE SEGMENTATION AND CLASSIFICATION USING SEMANTIC ANALYSISby [S. Kollias](#)**INDEPENDENT COMPONENT ANALYSIS FOR BLIND IMAGE DECONVOLUTION AND DEBLURRING**by [H. Yin](#), I. Hussain**AUTOMATIC SEGMENTATION OF MOUSE IMAGES**by G. Rando, S. Arca, [E. Casiraghi](#), P. Campedelli, A. Maggi**RECOGNITION OF DYNAMICAL TEXTURAL FEATURES IN NOCICEPTIVE RAT NEUROPHYSIOLOGICAL TRACKS**by B. Apolloni, S. Bassis, G. Biella, [A. Zippo](#)**POINT PROCESSES**

Organizer: E. Jensen

INHOMOGENEITY IN SPATIAL POINT PROCESSES - GEOMETRY VERSUS TRACTABLE ESTIMATIONby [M. Prokesova](#)**SYSTEMATIC SAMPLING WITH ERRORS IN SAMPLE LOCATIONS**by [J. Ziegel](#)**MODEL TESTS FOR STATIONARY AND INHOMOGENEOUS POINT PROCESSES BASED ON PARTITIONING**by [U. Hahn](#)**SUMMARY CHARACTERISTICS OF POINT PROCESSES BASED ON THE MEDIAL AXIS**by [M. Kiderlen](#)**QUANTIFICATION OF PODOCYTES**

Organizer: J. Nyengaard

COMPARISON OF METHODS FOR COUNTING CELLS WITHIN THE GLOMERULUSby [J. Basgen](#), S. Nicholas, J. Nyengaard**SIMPLIFICATION OF THE WEIBEL-GOMEZ METHOD FOR ESTIMATING PODOCYTE NUMBER**by [K. Lemley](#)**PODOCYTE NUMBER IN DIABETIC PATIENTS**by [K. White](#)**COUNTING PODOCYTES AND ENDOTHELIAL CELLS IN INDIVIDUAL HUMAN GLOMERULI**by [J. Bertram](#), B. McNamara, J. Li, F. Salih, W. Hoy, M. Hughson, M. Zimanyi**PODOCYTE NUMBER IN THE DEVELOPING RAT KIDNEY: FROM CAPILARY LOOP STAGE TO 24 WEEKS OF AGE**by X. Bai, [J. Basgen](#)**STEREOLOGY OF EXTREMES**

Organizer: D. Hlubinka

SHAPE EXTREMES OF RANDOM SPHEROIDS OBSERVED VIA THEIR PROFILESby [D. Hlubinka](#)**REGULARIZATION OF STEREO RADIOGRAPHIC 3D RECONSTRUCTION OF THE SPINE**by [M. Stehlik](#)**MAXIMUM SIZE PREDICTION IN WICKSELL'S CORPUSCLE PROBLEM**by [R. Takahashi](#)**THE TOPOLOGICAL VIEWPOINT IN SHAPE COMPARISON**

Organizer: M. Ferri

DISCONTINUITIES IN MULTIDIMENSIONAL SIZE FUNCTIONSby [A. Cerri](#), [P. Frosini](#)**CONTRIBUTED TALKS****3D IMAGING OF THE SOLID PHASE OF POROUS BAKERY PRODUCTS USING SYNCHROTRON X-RAY MICROTOMOGRAPHY**by [G. Dalen](#), [A. Don](#), [P. Nootenboom](#), [R. Adel](#), [E. Roijers](#)**A FIRST ATTEMPT TO FRACTAL MOSAICS**by [C. Thaele](#)**A NONLINEAR DIFFUSION MODEL WITH NON HOMOGENEOUS BOUNDARY CONDITIONS IN IMAGE RESTORATION**by [R. Aboulaich](#), [S. Boujena](#), [E. El Guarmah](#)**A STOCHASTIC SHAPE MODEL FOR FIBRES WITH AN APPLICATION TO CARBON NANOTUBES**by [S. Karkkainen](#), [J. Nyblom](#), [A. Miettinen](#), [T. Turpeinen](#), [P. Pötschke](#)**A TOOL FOR 3D DISTANCE MEASUREMENTS WITHIN THE BORDERS OF A TISSUE OF INTEREST**by [B. De Boer](#), [F. Voorbraak](#), [G. Van den Berg](#), [J. Ruijter](#)**AGE-INDUCED CHANGES IN GANGLION SIZE AND TOTAL NUMBER OF MONO AND BINUCLEATE NEURONS OF THE SUPERIOR CERVICAL GANGLION (SCG) FROM CUTIAS (DASYPROCTA AGUTI- LINNAEUS, 1766). PRELIMINARY DATA**by [F. Ladd](#), [M. Oliveira](#), [A. Ladd](#), [A. Ribeiro](#)**ALGORITHM TO DETECT NECKS IN THREE DIMENSIONAL COMPLEX STRUCTURES**by [T. Theile](#)**AN EFFICIENT ALGORITHM FOR A NEW CIRCULARITY ASSESSMENT MEASURE**by [A. Smoaca](#), [J. Becker](#), [M. Goeb](#), [D. Coltuc](#)**APPLICATION OF THE FRACTIONATOR PRINCIPLE USING VARYING SAMPLING FRACTIONS TO QUANTIFY SYNAPSES**by [B. Witgen](#), [J. Nyengaard](#), [H. Gundersen](#)**AUTOMATIC MACULA DETECTION IN HUMAN EYE FUNDUS AUTOFLUORESCENCE IMAGES: APPLICATION TO EYE DISEASE LOCALIZATION**by [A. Chaudhry](#), [C. Bellmann](#), [V. Le Tien](#), [J. Klein](#), [E. Parra-Denis](#)**CIRCUMFERENCE IN BINARY IMAGES: COMPARISON OF CONTINUOUS REPRESENTATION AND GLOBAL STEREOLOGICAL ESTIMATION METHODS**by [H. Lauschman](#), [T. Mrkvicka](#)**COMPENSATION OF ILLUMINATION INHOMOGENEITIES IN CONFOCAL LASER SCANNING MICROSCOPE (CLSM) IMAGES**by [J. Michalek](#), [M. Capek](#), [L. Kubinova](#)**COMPUTER SIMULATION OF ARBITRARY-SHAPED CEMENT GRAINS IN CONCRETE**by [H. He](#), [Z. Guo](#), [P. Stroeven](#), [M. Stroeven](#), [L. Sluys](#)**CONTROLLING THE ULTIMATE OPENING RESIDUES FOR A ROBUST DELINEATION OF FRAGMENTED ROCKS**by [S. Outal](#), [S. Beucher](#)

CORRESPONDENCES BETWEEN IMAGES OF A FRACTURE SURFACE AND MATERIAL MICROSTRUCTUREby [H. Lauschman](#), J. Kasl, P. Herviaux**CRACK RECONSTRUCTIONS BY SHAPE-BASED TECHNIQUES**by [D. Alvarez](#), O. Dorn, M. Moscoso**CURVATURE-DIRECTION PARAMETERS FOR SELF-SIMILAR FRACTALS**by [T. Rothe](#)**DESIGN-BASED STEREOLOGICAL ASSESSMENT OF MASTOCYTOMA IN DOGS. PRELIMINARY HIGHLIGHTS**by T. Costa-Casagrande, F. Ladd, S. Melo, [A. Ribeiro](#), J. Matera**DETERMINATION OF OPTIMAL LIGHTING POSITION IN VIEW OF 3D RECONSTRUCTION ERROR MINIMIZATION**by [A. Belhaoua](#), S. Kohler, E. Hirsch**DIFFERENTIAL FRAME ANALYSIS AND SELECTIVE MOTION ESTIMATION APPROACH FOR AN INTER-FRAME JPEG 2000 VIDEO CODING SYSTEM**by A. Schuchter, [A. Uhl](#)**DIGITAL ANTHROPOLOGY FOR EFFECTIVE RETRIEVAL OF THE ANTERIOR FONTANELLE**by P. Desbarats, S. Guorguieva, [R. Synave](#), H. Coqueugniot, B. Dutailly**DOMINANT DIRECTION OF NATURAL TEXTURES USING A MODIFIED HOUGH TRANSFORM APPROACH**by [F. Hamed](#)**EFFECTS OF SHORT-TERM ENRICHED ENVIRONMENT ON THE WHITE MATTER AND THE MYELINATED FIBERS IN THE WHITE MATTER OF AGED MALE RATS**by [Y. Tang](#), S. Yang, C. Li, W. Zhang, W. Lu, X. Qiu, X. Shi, L. Chen**GENERAL ADAPTIVE NEIGHBORHOOD REPRESENTATION FOR ADAPTIVE CHOQUET IMAGE FILTERING**by [J. Debayle](#), J. Pinoli**GIBBS POINT PROCESS MODELS WITH FIXED AND RANDOM EFFECTS – A BAYESIAN APPROACH**by [J. Illian](#), R. King**MODEL FOR RANDOM UNION OF INTERACTING DISCS**by [K. Helisova](#), J. Moeller**MULTISCALE SHAPE ANALYSIS OF PARTICLES IN 3D USING THE CALYPTER**by [E. Pirard](#), A. Califice, A. Leonard, M. Gregoire**MULTIVARIATE PERMUTATION SHAPE ANALYSIS WITH APPLICATION TO AORTIC VALVE MORPHOLOGY**by [C. Brombin](#), L. Salmaso, C. Villanova**N-DISTANCES AND TOMOGRAPHY**by [L. Klebanov](#)**OBJECTIVE, QUANTITATIVE AND AUTOMATIC X-RAY IMAGE ANALYSIS OF THE BONE REGENERATE IN THE ILIZAROV METHOD**by [A. Gadek-Moszczak](#), L. Wojnar**ON ESTIMATION OF BOUNDARY LENGTH AND CURVATURE DENSITIES FOR PLANAR STATIONARY RANDOM SETS**by [J. Rataj](#)**ON THE EFFICIENCY OF THE PROPORTIONATOR**by [L. Hansen](#), E. Jensen**ON THE RELATION OF BINARY AND GRAY-LEVEL MEASURES OF STRUCTURAL ANISOTROPY**by [Z. Tabor](#)**PARALLEL SHAPE DEFORMATION**by [S. Huckemann](#)

PODOCYTE AND ENDOTHELIAL CELL NUMBER IN GLOMERULI OF ADULT MALE AFRICAN AMERICANS WITH HIGH NEPHRON NUMBER

by [M. Zimanyi](#), F. Salih, B. McNamara, J. Li, M. Hughson, W. Hoy, J. Bertram

REDUCTION OF THE OSCILLATORY BEHAVIOR IN IMPLICIT PRESSURE EXPLICIT SATURATION (IMPES) FORMULATIONS FOR TRANSIENT TWO-PHASE FLOW IN BALL-AND-STICK PORE NETWORK MODELS

by J. Lux, [Y. Anguy](#)

SIZE MEASUREMENT OF BOEHMITE NANOPARTICLES BY TEM IMAGES ANALYSIS

by [M. Moreaud](#), R. Revel, D. Jeulin

SPECIFIC AREA AND MEAN SURFACE DENSITY OF INHOMOGENEOUS BOOLEAN MODELS

by [E. Villa](#)

STEREOLOGICAL EVALUATION OF M. VASTUS MEDIALIS BIOPSIES IN DOGS SUFFERING FROM DEVELOPMENTAL MEDIAL PATELLAR LUXATION. A PRELIMINARY COMMUNICATION

by A. Mortari, S. Rahal, L. Abrahão, M. Vainzof, [A. Ribeiro](#)

STUDY ON THE METHODS TO TEST AVERAGE DIAMETER OF BLOOD VESSELES IN 3D STATUS BASED ON THE 2D RANDOM SECTION AND PRINCIPLE OF STEREOLOGY

by [H. Shen](#)

SYMMETRY DETECTION FOR ROAD SIGN CLASSIFICATION

by [F. Robert-Inacio](#)

SYNCHRONIZED ANALYTICAL AND TOPOGRAPHICAL MEASUREMENTS BY COMBINING WLI AND SEM TECHNIQUES

by [O. Buchheit](#), C. Arnoult, D. Del Frari, J. Di Martino, F. Eddoumy, D. Ruch

TENSORIAL MINKOWSKI FUNCTIONALS AS SHAPE MEASURES FOR MICROSTRUCTURED AND POROUS MATERIALS

by G. Schroeder-Turk, [S. Kapfer](#), K. Mecke

THE EFFECT OF SAMPLING IN A SECTION THICKNESS ON THE ESTIMATION OF CEREBRAL VOLUME BY THE CAVALIERI PRINCIPLE USING MRI

by [M. Cankaya](#), N. Acer, A. Göktaş, M. Camurdanoğlu, O. Palancı

THE FRACTAL FORMS OF LIFE

by [G. Losa](#)

THE POISSON RAIN TESSELLATION: A MODEL OF A RANDOM TESSELLATION IN THE PLANE INDUCED BY A POISSON POINT PROCESS

by [E. Biehler](#)

THE SPATIAL ROTATOR

by [A. Rasmusson](#)

THREE DIMENSIONAL MATHEMATICAL MODELLING OF PRONUCLEI MIGRATION FOR THE MOUSE

by [S. Tapani](#), J. Udagawa, B. Plusa, M. Zernicka-Goetz, T. Lundh

TWO-SAMPLE TESTS FOR GERM-GRAIN MODELS

by [V. Benes](#), L. Klebanov, R. Lechnerova

USING MATHEMATICAL MORPHOLOGY METHODS TO DEFINE LANDSCAPE INDICATORS FROM VERY HIGH RESOLUTION IMAGES

by [C. Venard](#), E. Delaitre, Y. Callot, C. Mering

VARIANCE OF LOCAL STEREOLOGICAL VOLUME ESTIMATORS FOR DEPENDENT PARTICLES

by [Z. Pawlas](#)

VOLUME RECONSTRUCTION USING CONFOCAL MICROSCOPY IMAGES AND CORRECTION OF DEFORMATIONS BY ELASTIC REGISTRATION

by [M. Capek](#), P. Bruza, J. Janacek, L. Kubinova, L. Kocandova, P. Kneppo, R. Vagnerova

VOLUMETRIC EVALUATION OF THE BRAIN VENTRICLES IN NORMAL SUBJECTS USING MRI: A STEREOLOGICAL STUDY

by [N. Acer](#), N. Ugurlu, D. Demir, E. Unur, M. Turgut, M. Camurdanoğlu

POSTERS

A STEREOLOGICAL APPROACH ADAPTED FOR COUNTING VIRUSES AT THE SURFACE OF THE CILIATE PROTIST, PARAMECIUM BURSARIA

by [V. Yashchenko](#), O. Gavrilova, K. Jakobsen, M. Rautian

ANGIOGENESIS AND DISTANCE FUNCTION

by [S. Blacher](#), A. Noël

CHARACTERIZING LAMELLAR STRUCTURES USING IMAGE ANALYSIS AND SHAPE DESCRIPTORS: APPLICATION TO PEARLITE SPHEROIDIZATION

by [N. Nutal](#), S. Blacher, R. Cloots, B. Vertruyen

ESTIMATING OOCYTE NUMBERS IN THE OVARIES OF TELEOST FISH

by [R. Bucholtz](#), J. Andersen, H. Gundersen, J. Nyengaard, J. Tomkiewicz

EVALUATION OF THE DYNAMIC ADSORPTION OF GAS ON ACTIVE CARBON BEDS USING IN SITU X-RAY μ -TOMOGRAPHY COUPLED WITH 3D IMAGE ANALYSIS

by [S. Blacher](#), M. Almazan-Almazan, A. Leonard, P. Lodewyckx, J. Pirard

FCM TYPE-II APPROACH FOR TEXTURED IMAGE SEGMENTATION

by L. Tlig, [M. Sayadi](#), F. Fnaiech

GENETIC ANNOTATION OF ORGAN COMPARTMENTS

by [J. Ruijter](#), J. Hartman, A. Soufan, B. De Boer

IMAGE ANALYSIS OF DECORATIVE GLASS IN THAILAND

by [P. Dararutana](#)

IMAGING THE LOCAL CELL CYCLE LENGTHS DURING CARDIOGENESIS

by [A. Soufan](#), G. Van den Berg, P. De Boer, J. Ruijter

MOUSE LIVER SEGMENTATION IN MULTI-SPECTRAL MRI USING VOXEL CLASSIFICATION

by [M. Rödning](#), P. Nyman, A. Bidar, P. Hockings, M. Rudemo, F. Risse

ON SOME GEOMETRIC PROPERTIES OF THE TRAJECTORIES OF A BROWNIAN MOTION

by [O. Honzl](#)

QUANTITATIVE DESCRIPTION OF THE NANO-STRUCTURES IN 316LVM AUSTENITIC STAINLESS STEEL

by [A. Krawczynska](#), M. Lewandowska, K. Kurzydowski

SEGMENT POINT PROCESS AND ITS CHARACTERISTIC

by [M. Zikmundova](#)

STEREOLOGICAL AND NONLINEAR STUDY OF DISTRIBUTION, ISOTROPY, AND SIZE OF MICROVASCULAR BED IN NORMAL PROSTATE AND PROSTATE ADENOCARCINOMA

by [L. Santamaria](#), I. Ingelmo, J. Ruiz, J. Codesal, R. Alonso, F. Teba, L. Herranz, R. Martín

STEREOLOGICAL SURFACE AREA ESTIMATION OF THE MURINE INTESTINAL TRACT

by [C. Casteleyn](#), A. Rekecki, A. Van der Aa, W. Van den Broeck

STEREOLOGICAL VOLUME AND SURFACE AREA ESTIMATION OF THE OVINE TONSILS

by [C. Casteleyn](#), P. Simoens, W. Van den Broeck

STEREOLOGY OF THE HEART - POSTPRANDIAL HEART GROWTH IN PYTHON SNAKES

by [J. Andersen](#)

THE EFFICIENCY OF THE AUTOMATIC PHYSICAL FRACTIONATOR VERSUS THE OPTICAL FRACTIONATOR WHEN APPLIED TO VARIOUS REGIONS OF THE HUMAN HIPPOCAMPUS

by M. García-Amado, [K. Dorph-Petersen](#), H. Gundersen, J. Andersen, J. Nyengaard

THE INFLUENCE OF SORTILIN ON TRAUMATIC BRAIN INJURY IN MICE

by [G. Bennedsen](#)

THE SIZE, SHAPE AND SPATIAL DISTRIBUTION OF INTERMETALLIC PARTICLES IN 7475 ALUMINIUM ALLOY PROCESSED BY HYDROSTATIC EXTRUSION AND HIGH

PRESSURE TORSIONby K. Wawer, [M. Lewandowska](#), K. Kurzydłowski**LEGEND**

The contribution in this part should be cited as part of the
"Stereology and Image Analysis. Ecs10: Proceeding of the 10th European Conference of ISS., (V.Capasso et al. Ed.), The MIRIAM Project Series, Vol. 4, ESCULAPIO Pub. Co., Bologna, Italy, 2009".

The contribution in this part should be cited as part of the
CD-ROM of the Proceedings of The 10th European Congress of Stereology and Image Analysis (non refereed part).

[Link to PDF](#)

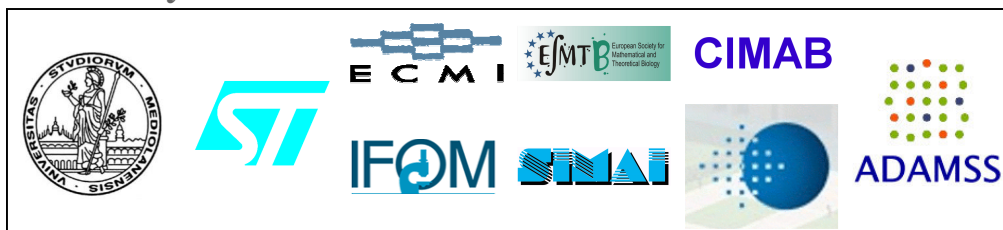
[Link to text only abstract](#)

Contact Informations**Ecs10 Manager**

Department of Mathematics
 ECS10 c/o Department of Mathematics
 Via Saldini, 50
 20133 Milano (MI)
 Italy
 Email: ecs10@mat.unimi.it

Support Contact**Ecs10 Website Manager**

Email: ecs10@mat.unimi.it

Sponsored by:

STEREOLOGICAL AND NONLINEAR STUDY OF DISTRIBUTION, ISOTROPY, AND SIZE OF MICROVASCULAR BED IN NORMAL PROSTATE AND PROSTATE ADENOCARCINOMA.

LUIS SANTAMARÍA¹, ILDEFONSO INGELMO², JESÚS RUIZ³, JAVIER CODESAL¹, RAFAEL ALONSO¹, FERNANDO TEBA⁴, LUIS M. HERRANZ⁵, ROCÍO MARTÍN⁶

¹Department of Anatomy, Histology, and Neuroscience. School of Medicine, Autonomous University of Madrid, Spain.

²Department of Anesthesiology. Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain. ³Department of Anesthesiology. Hospital Primero de

Octubre, Madrid, Spain. ⁴Department of Surgery (Urology). Hospital de La Princesa, School of Medicine, Autonomous

University of Madrid, Spain. ⁵Department of Surgery (Urology). Hospital del Henares, Madrid, Spain. ⁶Department of Pathology.

Hospital N. Sra de Sonsoles, Ávila, Spain.

email: luis.santamaria@uam.es

SANTAMARIA L ET AL: *Stereological and non-linear estimates on prostate microvessels*

ABSTRACT

The microvascular environment is essential for the growth of prostate carcinoma. Besides, the prostate microvascular bed is a good model to apply tools of nonlinear analysis in order to characterize their possible isotropic distribution in a 3D space, and the eventual changes in size and orientation or complexity in the pathological processes.

Key words: Isotropy; Fractals; Microvascular length; Stereology; Prostate cancer.

INTRODUCTION

They are a great number of biological factors intervening in the establishment, development and progression of the prostate carcinoma; a very relevant factor is vascularization, being the microvascular environment essential for the growth of prostate carcinoma (Padhani *et al.*, 2005). However, no rigorous, stereologic studies have been performed in this field. Besides, the prostate microvascular bed is a good model to apply tools of nonlinear analysis to characterize their possible isotropic distribution in 3D space, and the eventual changes in size and orientation or complexity in pathological processes.

MATERIAL AND METHODS

Tables 1 and 2. *Material and processing of the tissues*

Specimens	groups	N.cases	Age (yrs)
Normal prostate	CTR	22	33 ± 8
Prostate cancer	CA	22	75 ± 10

Fixation & embedding	sections	Immunostaining to endothelium
10% PFA 24 h paraffin	15 µm	Factor VIII

Sampling protocol. CTR group: Only the peripheral zone (PZ) was considered, because the cancer preferently arises from this region. Eleven prostates from this group (A1 subgroup) were sectioned in 2-mm-wide slices perpendiculars to the urethra; the other 11 specimens (A2 subgroup) were sectioned in slices containing as the major axis the prostatic urethra. Three slices for each of the subgroups were systematic randomly sampled from each specimen. In the CA group the sections were performed by isotropic uniform random sampling (IUR sections).

Ten strips formed by 10 immediately adjacent quadrats were explored for each section from ZP zone and from CA group. In each specimen from A1, 5 strips were sampled with their longitudinal axis perpendicular to the urethra and oriented in antero-posterior direction (Y axis), the other 5 (X axis) were sampled perpendiculars to Y axis. In A2 subgroup, 5 strips were sampled per each section with their longitudinal axis (Z axis), parallel to the urethra. The origin and sense of the three axes were at random for all the strips. The result were series of images sized 532 x 4360 pixels from both CTR and CA groups. The images were processed using the NIH Image program. A binary image was produced where the immunoreactive

tissue was shown as black and the pore space was shown as white. At each point of the long axis denoted as $t \in [1, N]$, where $N = 4360$, the fraction of pixels belonging to the immunostained microvessels expressed as a percentage over the space of reference (pore space plus immunoreactive microvascular component), was automatically recorded by the image analysis system for all the N columns orthogonal to the long axis. The resulting series of N consecutive rational numbers per visual field served as input signals for estimating microvessel correlation dimension (D_2) and lacunarity (Λ). To study if the strips analysed consisted in autocorrelated noise, the test of surrogate data was performed (Mattfeldt 1997).

In the same strips were estimated the density of vascular length (L_V), the average radius of vascular diffusion (ARVD) and the average vascular diameter (AVD). Means \pm SD were calculated for each parameter. To compare the parameters studied in the X, Y, Z orientations ANOVA was performed in CTR group. A Student t test was made to compare CTR and CA groups. The level of signification was $p < 0.05$.

RESULTS

The results are summarized in Tables 3 and 4:

Table 3. Non-linear and stereological estimates in X, Y, and Z orientations in CTR group.

Variables	X	Y	Z
D_2	$2.2^a \pm 1.5$	$2.0^a \pm 1.7$	$1.6^a \pm 1.3$
Λ	$0.05^a \pm 0.04$	$0.06^a \pm 0.03$	$0.03^a \pm 0.02$
L_V	$150^a \pm 140$	$170^a \pm 155$	$88^a \pm 41$
ARVD	$60^a \pm 25$	$54^a \pm 18$	$66^a \pm 20$
AVD	$20^a \pm 11$	$16^a \pm 8$	$19^a \pm 7$

Table 2. Non-linear and stereological estimates in CTR and CA groups.

Variables	CTR	CA
D_2	$2.1^a \pm 2.0$	$9.1^b \pm 11.0$
Λ	$0.04^a \pm 0.03$	$0.13^b \pm 0.07$
L_V	$131^a \pm 129$	$202^b \pm 100$
ARVD	$60^a \pm 20$	$43^b \pm 13$
AVD	$18^a \pm 11$	$17^a \pm 7$

The values are expressed as mean \pm SD. D_2 and Λ are adimensional. L_V indicate length of microvessel per mm^2 of prostate stroma. ARVD and AVD are expressed in μm . In Table 1, the identical superscripts affecting the means indicate that there was not significant differences among columns. In Table 2, the different superscripts affecting the means indicate significant differences between columns ($p < 0.05$).

In both groups, the estimates of mean D_2 from the original data were smaller than those obtained for the surrogate data, and the confidence bands (95%) did not overlap:

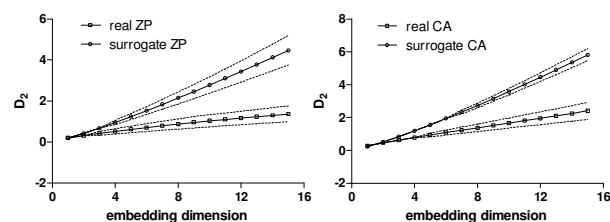


Fig. 1. Estimated correlation dimension as function of embedding dimension for ZP and CA and the corresponding surrogate data.

DISCUSSION

Isotropy has been detected for both non-linear and stereologic parameters studied in normal prostate, then, the prostate microvascular bed constitutes a 3D network without preferential directions in the space. The correlation dimension D_2 show significant differences between controls and cancer, with an increased value for CA group, and their convergence for dimensions < 15 indicated low-dimensional chaos in both controls and cancer, the tumoral condition seems to increase the fractal dimension of the microvessels. The surrogate data corroborated the hypothesis of low-dimensional chaos in the microvascular structure, because the null hypothesis of coloured noise was rejected for all the groups (Mattfeldt 1997). Low-dimensional chaos for the vascular structure could imply that growth regulation is largely deterministic and governed by a few significant variables (Mattfeldt 1997). The increase of lacunarity in cancer might be put in relation with a greater heterogeneity in the distribution and size of the tumoral microvessels. The increase of density of microvessels observed in cancer might be put in relation with an increased angiogenesis (Padhani *et al.*, 2005), in spite of the increase of L_V , the cancer has a poorer irrigation than the controls, because the ARVD in cancer was significantly decreased.

REFERENCES

- Mattfeldt T (1997). Nonlinear deterministic analysis of tissue texture: a stereological study on mastopathic and mammary cancer tissue using chaos theory. *J Microsc* 185: 47-66.
- Padhani AR, Harvey CJ, Cosgrove DO (2005). Angiogenesis imaging in the management of prostate cancer. *Nat Clin Pract Urol* 2: 596-607.

Study of the distribution of microvessels in normal and pathologic prostate using an information-based similarity analysis

L. SANTAMARÍA*, I. INGELMO†, J. RUIZ‡ & F. TEBA§

*Department of Anatomy, Histology, and Neuroscience. School of Medicine, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain

†Department of Anaesthesiology, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

‡Department of Anaesthesiology, Hospital Primero de Octubre, Madrid, Spain

§Department of Surgery (Urology), Hospital de La Princesa, School of Medicine, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain

Key words. Information-based similarity, microvessels, nonrandomness index, prostate cancer.

Summary

Categorizing biologic signals by analysis of symbolic sequences was employed in the study of prostate microvessels. The estimates of the volume fraction of the vessels immunostained to Factor-VIII was mapped to binary sequences. The distance between sequences was estimated by comparing the rank and frequency of repetitive elements. These measurements were applied to detect whether there are unique microvascular patterns for each individual, and to search for patterns describing prostate microvessels of different conditions. Normal prostate, benign prostate hyperplasia and prostate carcinoma groups were studied. All the specimens were immunostained to F-VIII and strips formed by adjacent quadrats were explored. At each point of the long axis of the strip, the V_V F-VIII was calculated. These values were processed with the information-based similarity software to estimate the dissimilarity between two space series. The following comparisons were carried out: intrasubject versus intragroup distances; intragroup distances among the groups studied and intergroup distances. The distance defined between a vessels immunostained to Factor-VIII space series and its randomized surrogate was considered as an index of the nonrandomness of the space series. These indices were compared for all the groups. We conclude that (a) The information-based similarity analysis can be adapted to vessels immunostained to Factor-VIII space series from prostate microvessels. (b) There are no unique microvascular patterns associated with each individual. (c) There are characteristic

patterns describing the microvessels from normal prostate, benign prostate hyperplasia and carcinoma. (d) This method is able to account for the differences between prostate cancer and both normal and benign prostate conditions, with respect to the microvessel patterns.

Introduction

Physiologic systems generate complex fluctuations in their output signals that reflect the underlying dynamics. Therefore, finding and analysing hidden dynamical structures of these signals are of both basic and clinical interest (Yang *et al.*, 2003). The signals generated by biological processes can be translated to symbolic sequences. Examples of biological symbolic sequences include neural spike trains, DNA codes and human language (Peng *et al.*, 2007). Most of the signals of continuous variables can be mapped to symbolic sequences while retaining essential information of the original signals. A good example is the heartbeat time series. Numerous studies have shown that a symbolic sequence representation of heart rate time series can often reveal many hidden dynamic patterns of clinical significance (Yang *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2007). Almost all of these systems are examples of temporal series, that is the variables in phase space are time dependent (Koch & Zacek, 1991; Hahn *et al.*, 1992; Elbert *et al.*, 1994; Heffernan, 1996; Zhang & Johns, 1998). Alternatively, a symbolic sequence could be primarily a by-product (biomarker) of the dynamical system that produced it. This biomarker might be, for instance, the expression of a certain protein implicated in the functionalism of this system. Therefore, categorizing biologic signals by analysis of symbolic sequences might be applied to the study of histological structures by means of the statistical evaluation

Correspondence to: Luis Santamaría, Department of Anatomy, Histology, and Neuroscience, School of Medicine, Autonomous University of Madrid, C/Arzobispo Morcillo 2, 28029-Madrid, Spain. Tel: +34-914975367; fax: +34-914975353; e-mail: luis.santamaria@uam.es

of stereological estimates for the biomarker along a line that has been placed into a higher-dimensional object. At a certain scale of resolution, estimates of the volume fraction (V_V) of tissue components expressing this protein can be studied as a function of position along lines contained in planes through three-dimensional sets, which are assumed to be stationary and isotropic (Mattfeldt *et al.*, 1993a, b, 1996, 1997).

There are a great number of biological factors intervening in the establishment, development and progression of prostate carcinoma. A highly relevant factor is vascularization, as the microvascular environment is essential for the growth of prostate carcinoma (Padhani *et al.*, 2005). Furthermore, the prostate microvascular bed is a good model in which to apply tools of nonlinear analysis to characterize eventual changes in complexity in pathological processes.

With regard to this study, prostate microvessels may be considered as binary sets in three-dimensional space, which consist basically of two parts: the vascular wall, and the total remainder: connective tissue, acinar epithelium, ductal lumina, etc. also called pore space (Mattfeldt, 1997). The blood vessels can be easily evidenced by immunostaining to the von Willebrand factor (Factor VIII related antigen; Deering *et al.*, 1995). Then, the volume fraction (V_V F-VIII; Howard & Reed, 2005) of the immunostained structure can be captured and processed by image analysis to study its nonlinear characteristics in relation to pore space, in a way similar to that performed with the epithelial component of breast cancer (Mattfeldt, 1997).

Prostate angiogenesis is a complex process, with multiple factors (angiogenesis inducing agents, antagonists and inhibitors; diffusible growth regulators; heterotypic contacts; etc.) intervening to modulate the microvascular growth under both normal and pathologic conditions (Folkman, 1992; D'Amore, 1992; O'Brien & Harris, 1995). Therefore, microvascular growth is probably driven by multiple and complex nonlinear interactions. For this type of intrinsically noisy system, it may be useful to simplify the dynamics via mapping the output to binary sequences, where the increase and decrease of the V_V F-VIII values are denoted by 1 and 0, respectively (Yang *et al.*, 2003). The resulting binary sequence retains important features of the dynamics generated by the underlying control system, but is tractable enough to be analysed as a symbolic sequence. A common observation of complex symbolic sequences is that different signals appear to exhibit different 'styles' of behaviours. This style or signature of the dynamics can often be identified by certain complex but repetitive patterns in the symbolic sequences. We are therefore interested in the following questions: (a) Can we identify relevant 'structures' of these repetitive patterns? (b) Can we quantitatively compare one style of repetitive patterns to another? (Peng *et al.*, 2007).

To address these questions, we will apply a systematic approach developed by Peng *et al.* (2007) to categorize different types of information encoded in symbolic sequences. The

traditional approach is to develop a set of indices that can characterize the dynamics and classify signals into terms of these indices. The alternative approach that we take involves pairwise comparisons of signals to calculate an abstract distance or 'dissimilarity' between the signals. In our analysis, the dissimilarity between two different symbolic sequences is measured by the comparability of the usage of repetitive patterns. Our approach is based on the concept that the information content in any symbolic sequence is primarily determined by the repetitive usage of its basic elements. The specific goal, therefore, is to quantify the distance between symbolic sequences based on statistical comparisons of the rank and frequency of repetitive elements.

We apply the distance measurement to address the following questions related to the prostate microvessel bed: (a) Are there unique microvascular patterns associated with each individual? (b) Are there characteristic patterns that describe the microvascular structures of different physiologic/pathologic states (normal vs. hyperplastic prostate or cancer prostate)?

Material and methods

Material

Thirty prostate specimens were collected at La Princesa Hospital (Madrid, Spain): 10 were from adults (CTR group), age (mean \pm SD): 33 ± 8.5 ; range: 20–47 years. All these specimens were from healthy subjects deceased in traffic accidents, without endocrine or reproductive pathology, and eligible as donors for transplant. The age of the CTR group was under 50 years old to avoid the presence of subclinical hyperplastic changes, relatively frequent above this age (McNeal, 1990). The other 10 were surgical specimens (adenomectomies) from patients diagnosed with benign prostatic hyperplasia (BPH group), age (mean \pm SD): 75 ± 10 , range: 65–85 years. The remaining 10 were surgical specimens (radical prostatectomy) from patients diagnosed with prostate carcinoma (Ca group); age (mean \pm SD): 70 ± 10 , range: 56–85 years. In all these cases, the diagnosis of carcinoma was previously confirmed by histopathology. All of the cancer cases had a Gleason score of 7 (3 + 4; Epstein *et al.*, 2005), and were without prior neoadjuvant hormonal therapy. All the ethical requirements were fulfilled to obtain the prostatic tissue either at the moment of the multiorganic extraction for transplant (CTR group) or during surgery (BPH and Ca groups). Immediately after extraction, the specimens were fixed during 1 week in 10% paraformaldehyde in PBS, pH 7.4.

Sampling protocol

After fixation, the specimens from the three groups were thoroughly sectioned into 2-mm-thick slices, performed by

isotropic uniform random sampling (IUR sections). The reason for using the IUR design was to preserve the isotropy of the microvessels (Baddeley & Vedel Jensen, 2005). Although the prostatic tissues (acini, stromal tissues) are quite isotropic, this cannot be assumed for the microvascular bed, because the vessels are linear structures.

Immunohistochemistry

All the specimens were processed for paraffin embedding. The paraffin blocks were exhaustively sectioned. Five- μm -thick sections were performed on each block. Immunostaining to the von Willebrand factor (Factor VIII related antigen; Deering *et al.*, 1995) was carried out to visualize the microvascular structure. At least five randomly selected slides per specimen were immunostained in the CTR, BPH and Ca groups. To detect Factor VIII immunoreactivity, sections were incubated with a polyclonal anti-Factor VIII antibody (Sigma, St Louis, MO, U.S.A.), diluted at 1:1000. The second antibody employed was a biotin-caproyl-anti-rabbit immunoglobulin (Biomedica, Foster City, CA, U.S.A.). Thereafter, sections were incubated with a streptavidin-biotin-peroxidase complex (Biomedica). The immunostaining reaction product was developed using diaminobenzidine (Sigma). After immunoreaction, no nuclear counter-staining was performed. All slides were dehydrated in ethanol, and mounted in a synthetic resin (Depex, Serva, Heidelberg, Germany). The specificity of the immunohistochemical procedures was checked by incubation of sections with nonimmune serum instead of the primary antibody.

Data acquisition

Five strips of an average of 20 immediately adjacent quadrats (range 10–40) were explored for each section from CTR, BPH and Ca groups. The origin and sense of the axis for each strip were chosen by systematic random sampling (Gundersen & Osterby, 1981) for all the strips. The result was a series of images from the three groups, sized, on average, 532×6400 pixels. The final magnification ($200\times$) was such that 1000 pixels represented $640 \mu\text{m}$. At that point, the strips were 4 mm long, on average. Therefore, the total length explored per section (five sections) and per case (five cases) was $4 \times 5 \times 5 = 100 \text{ mm}$ (for the cancer or BPH cases, an appreciable percentage of the maximum tumour diameter).

The images were captured using a colour video camera TK-C1480B (JVC, Japan) with a resolution of 480 TV lines attached to an Olympus microscope fitted with a motorized stage controlled by the stereologic software Cast-Grid (Stereology Software Package, Silkeborg, Denmark). This program controls the XY displacement of the microscope stage and allows the selection of fields to be studied by random systematic sampling after the input of an appropriate sampling fraction.

The strips were then mounted from the images captured, using Adobe Photoshop 8.0.1. Subsequently, the strips were processed using the public domain NIH Image program, developed at the US National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image> (Rasband & Bright, 1995). A binary image was produced where the immunoreactive tissue was shown as black and the pore space as white. The larger arteries and veins were visually identified as not microvessels and manually excluded. At each point of the long axis denoted as $t \in [1, N]$, where $N = 6400$, the fraction of pixels belonging to the immunostained microvessels expressed as a percentage over the space of reference (pore space plus immunoreactive microvascular component) was automatically recorded by the image analysis system for all the N columns orthogonal to the long axis. The resulting series of N consecutive rational numbers per visual field served as input signals for estimating the dissimilarity measurements.

Measurement of dissimilarity

The information-based similarity (IBS) software was employed to estimate the dissimilarity between two space series obtained, as described in the section of data acquisition. This method was first proposed in Yang *et al.* (2003) and was obtained from Physionet: <http://www.physionet.org>.

In brief, consider the volume densities of the microvessels immunostained to F-VIII, along a space series, $\{x_0, x_1, x_2, \dots, x_N\}$, where x_i is the i th V_V F-VIII. Each pair of successive values can be classified into one of the two states that represents a decrease or an increase in x . These two states are mapped to the symbols 0 and 1, respectively.

In this study, we map $m + 1$ successive intervals to a binary sequence of length m , called an m -bit 'word'. Each m -bit word, therefore, represents a unique pattern of fluctuations in a given space series. By shifting one data point at a time, the algorithm produces a collection of m -bit words over the whole space series. Therefore, it is plausible that the occurrence of these m -bit words reflects the underlying dynamics of the original space series. Different types of dynamics thus produce different distributions of these m -bit words.

In studies of natural languages, it has been observed that different authors have a preference for the words they use with higher frequency (Yang *et al.*, 2003). To apply this concept to symbolic sequences mapped from the V_V F-VIII space series, we count the occurrences of different words and then sort them according to descending frequency. The resulting rank-frequency distribution, therefore, represents the statistical hierarchy of symbolic words of the original space series (Zipf, 1942). For example, the first ranked word corresponds to one type of fluctuation of V_V F-VIII, which is the most frequent pattern in the space series. By contrast, the last ranked word defines the most unlikely pattern in the space series.

To define a measurement of dissimilarity between two space series, we plot the rank number of each m -bit word in the first

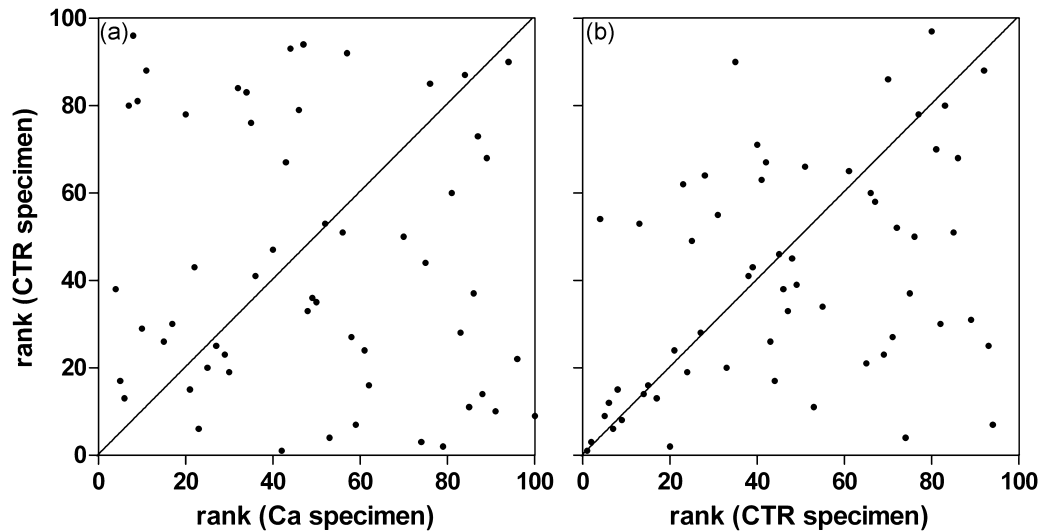


Fig. 1. Rank order comparison of two V_V F-VIII space series from two different subjects. (a) Ca against CTR specimen and (b) CTR against CTR specimen. For each word, its rank in the first space series is plotted against its rank in the second space series. The diagonal line indicates the case where the rank order of words for both space series is identical. In (a) the points are more scattered with respect to the diagonal line than in (b), because in the first image, the ranks plotted are from different groups, and in the second, from the same group.

series against that of the second series. If two space series are similar in their rank order of words, the scattered points will be located near the diagonal line (Fig. 1). Therefore, the average deviation of these scattered points away from the diagonal line is a measure of the ‘distance’ between these two space series. Greater distance indicates more dissimilarity and vice versa. The IBS software reads two text files of numbers, which are interpreted as values of two V_V F-VIII space series. Within each series, pairs of consecutive values are compared to derive a binary series, which has values that are either 1 (if the second value of the pair was greater than the first) or 0 (otherwise). A user-specified parameter, m , determines the length of ‘words’ (m -tuples) to be analysed by this program, in this case, an interval of m values between 2 and 12 (Yang *et al.*, 2003). Within each binary series, all m -tuples of consecutive values are treated as ‘words’; the function counts the occurrences of each of the 2^m possible ‘words’ and then derives the word rank order frequency (WROF) list for the series. Finally, it calculates the information-based similarity between the two WROF lists, and outputs this number. Depending on the input series and on the choice of m , the value of the index (distance) can vary between 0 (identical) and 1 (completely dissimilar).

Protocol of measurement of distances

First, we examine whether the distance for sets of the V_V F-VIII space series from the same subject in each group (CTR, BPH and Ca) is closer than that for the V_V F-VIII space series from different subjects under similar normal/pathologic states. We study pairs of V_V F-VIII space series from the same subject and measure the distance between each pair of these intrasubject

sets (intrasubject distance). We also calculate the distance between each pair of subjects who belong to the same group (intragroup distance). The mean \pm SD of the measurements obtained from intrasubject and intragroup distances were compared with a Student’s t -test ($p < 0.05$).

Next, we measure the average distance between subjects across different groups. We define the intergroup distance of groups A and B as the average distance between all pairs of subjects, where one subject is from group A and the other subject is from group B. We calculate the intergroup distances among all groups studied (CTR, BPH and Ca), as well as a group of 10 artificial space series of uncorrelated noise (u-noise group). The u-noise series were constructed using the MTRCHAOS software (Rosenstein *et al.*, 1993,1994). The intergroup distances were calculated for different word lengths, m , ranging from 2 to 12. These distances between subjects across groups were compared by ANOVA, for each m value. The comparisons between the means for all the groups were performed by the Newman–Keuls test ($p < 0.05$).

The method of phylogenetic trees was employed to classify the groups studied by the relative distances across the groups. This method is a useful tool in presenting these results, because the algorithm employed arranges different groups on a branching tree to best fit the pairwise distance measurements. The software employed was PHYLIP, version 3.69. PHYLIP (the PHYLogeny Inference Package) is a package of programs for inferring phylogenies (evolutionary trees), available free over the Internet: <http://evolution.genetics.washington.edu>, and was developed by Felsenstein (RoyChoudhury *et al.*, 2008). From this package, the Fitch–Margoliash program was applied. It provides a distance-based optimization method, that is it

searches for a tree with the smallest squared distance between the distances and their predictions from the tree.

To find out the discriminatory power of the results of the relative intragroup distances, the data were also analysed by a standard clustering algorithm, that is the K-means cluster analysis (MacQueen, 1967). The analysis was carried out in two steps: first, the number of clusters chosen was $K = 3$, assuming that the distances were able to classify the cases into three groups, namely CTR, BPH and Ca subjects. The percentage of subjects from these groups classified in all of the three clusters defined was calculated and a Pearson's χ^2 -test was employed to assess the association between groups and clusters. The second strategy was to select $K = 2$, and then, regroup CTR, and BPH cases as Type B (benign) group and Ca cases as Type M (malignant) group. The percentage of cases from Type B and Type M groups classified in all of the two clusters defined was calculated, and a Pearson's χ^2 -test was employed to assess the association between Type B or type M and cluster 1 or 2.

A further application of the rank-order distance concept is to quantify the degree of nonrandomness. To this end, we generate the surrogate space series by random shuffling of the original space series. Random shuffling of the data yields exactly the same distribution of the original V_V F-VIII sequence, but destroys the sequential ordering. These surrogate series were constructed employing the MTRCHAOS software. The distance defined between a V_V F-VIII space series and its randomized surrogate provides an index of the nonrandomness of the space series. The nonrandomness indices were calculated for different word lengths, m , ranging from 2 to 12. The differences among nonrandomness indices for CTR, BPH, Ca and u-noise groups were compared by ANOVA. Comparisons between the means for all the groups studied were performed by the Newman-Keuls test ($p < 0.05$).

Assessment of the influence of the resolution, quadrat size and orientation on the analysis of dissimilarity.

To establish the possible influence of several factors related to the manipulation of spacial series on the measurements of dissimilarity, the following controls were effected:

- (1) To assess if the changes in the resolution of images captured could modify the results, in addition to the calculations made at the magnification indicated above ($200\times$), we calculated the intergroup distances among all groups studied (CTR, BPH and Ca) at two further levels of magnification, $100\times$ and $400\times$. The comparison of all the intergroup distances for each level of magnification was performed using the confidence interval (CI = 95%).
- (2) To check the influence of the quadrat size on the results, in addition to the measurements made over image strips constructed of quadrats with a length of 320 pixels, similar measurements of the distance across the groups were made onto strips constructed with quadrats of 190 and 450 pixels. The comparison of all the intergroup distances for

each quadrat size was also performed using the confidence interval (CI = 95%).

- (3) To study the influence of orientation, two protocols were executed:
 - (i) The quadrats integrating the original sequence for the space series in all the groups studied were numbered in each series. Later, these numbers were randomly sorted, and new (scrambled) space series were constructed, ordering the quadrats according to the random sorting. The measurement of the intergroup distances was effected on the scrambled series and compared with the original ones, using the confidence interval (CI = 95%).
 - (ii) The quadrats integrating the original sequence for the space series in all the groups studied were rotated to a 90° angle and new space series were constructed with the rotated quadrats, preserving the original sequence (rotated series). Measurements of the intergroup distances were taken from the rotated series and compared with the original ones, using the confidence interval (CI = 95%).

Results

Immunohistochemistry shows immunoreactivity for F-VIII, evidencing the microvessel profiles in all the cases studied. In both normal (CTR) and pathological (BPH and Ca) groups, a preferential periglandular distribution of the microvasculature with no clear qualitative differences among groups was observed (Fig. 2a–c).

V_V F-VIII space series show complex variability in all the groups studied, with no remarkable differences among CTR, BPH and Ca specimens (Fig. 3).

The distance for subsets of the space series from the same subject is similar to that for the space series from different subjects under similar normal or pathological states. No significant differences were detected between intrasubject and intragroup distances in CTR, BPH and Ca (Table 1).

There were significant differences among the intragroup distances (including u-noise group). Fig. 4 shows that for $m = 8$, the u-noise group has the lowest intragroup distance; Ca cases evidence the greatest intragroup distance; the BPH group is near to the u-noise group and the CTR group is located between the BPH and Ca groups.

The intergroup distances among all groups (m -bit word ranging from 2 to 12) are expressed in Fig. 5. The distances between u-noise and the other groups are significantly greater than those among the CTR, BPH and Ca groups for all the m -tuples. Moreover, the distance between noise and Ca was significantly higher than the distances between noise and the CTR or BPH groups in a range from 5 to 12 m values. The distances among the CTR, BPH and Ca groups increase as m increases, but the same pattern of growth was maintained from 5 to 12 m values (Fig. 5). In Fig. 6(a), the intergroup distances for $m = 8$ are shown. The distance between u-noise and

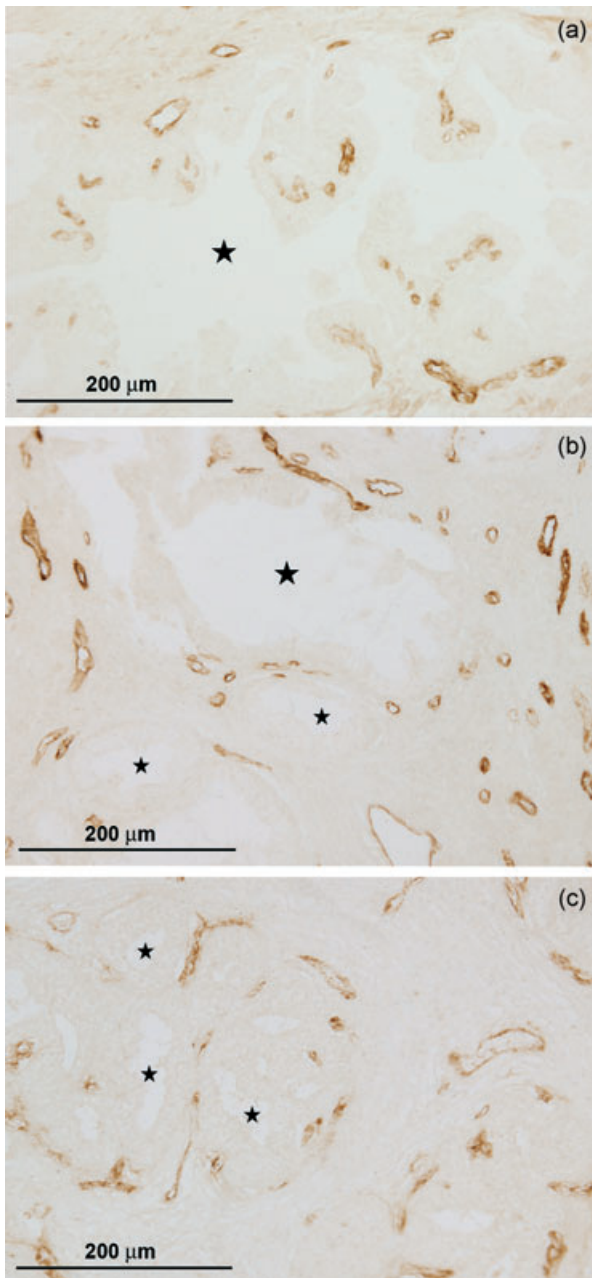


Fig. 2. Immunostaining to Factor-VIII. (a) Normal prostate tissue from a specimen of the CTR group. Most of the immunoreactive microvessels are located beneath the epithelial lining of the acinus. The star indicates the glandular lumen. (b) Image from a BPH specimen. The immunoreactive capillaries are also around the acini. The acinar lumen is marked by a star. (c) Immunostained microvessels from a cancer case. No remarkable differences are observed with regard to images a and b; the vessels are predominantly periglandular. The acinar lumina are narrower than in CTR or BPH cases (stars).

Ca cases was significantly higher than the distance between u-noise and CTR or BPH cases. Moreover, the distance between both CTR and BPH groups was significantly lower than either the CTR and Ca or BPH and Ca groups.

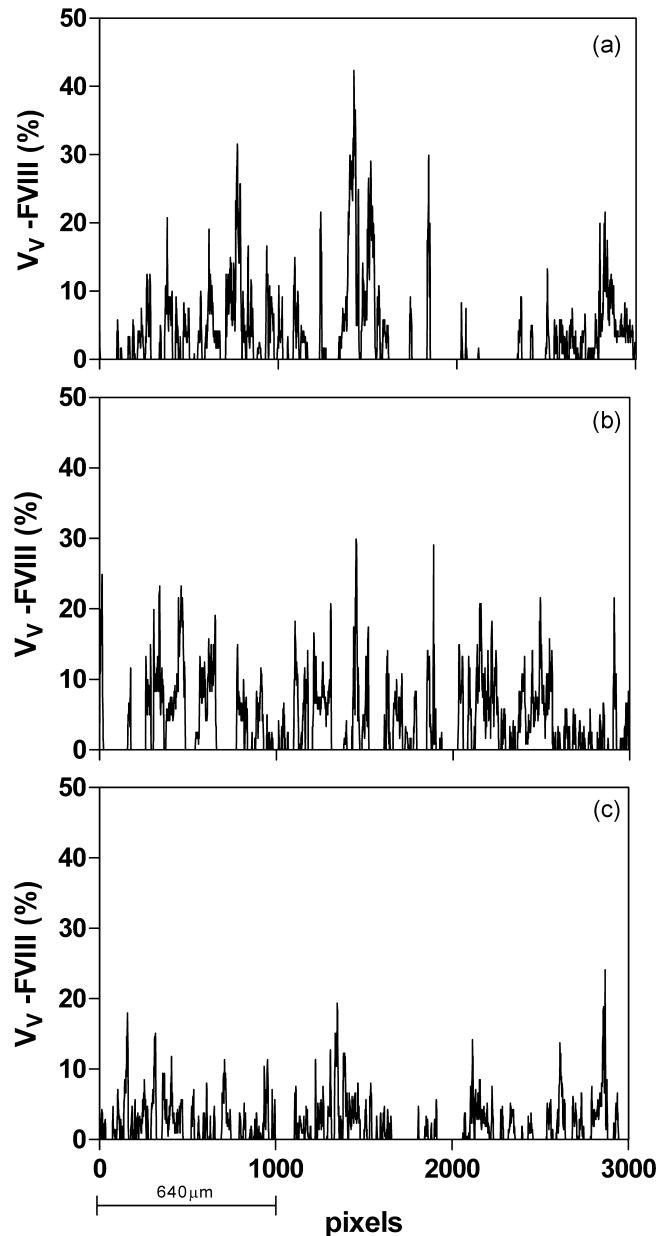


Fig. 3. Representative V_{γ} F-VIII space series for a subject from the: (a) CTR group, (b) BPH group and (c) Ca group. All the series show complex variability, with no remarkable differences among the groups. Scale in (c) indicates that 1000 pixels of the X-axis are equivalent to 640 μm .

In Fig. 6(b), we show the result of a rooted tree for the case of $m = 8$. The groups are arranged in the following order (from top to bottom, shown in Fig. 6(b)): BPH and CTR are closely related (the average distance between them is equal to 0.115), whereas the Ca group shows a greater average distance from the other two groups (0.136 and 0.127 units from the CTR and BPH groups, respectively). The artificial u-noise group has distances greater than 0.410 units from all the other groups.

Table 1. Distance measurement of 8-bit words.

Specimens	Intrasubject	Intragroup	<i>p</i>
CTR	0.124 ± 0.036	0.123 ± 0.031	0.95
BPH	0.099 ± 0.016	0.107 ± 0.016	0.14
Ca	0.133 ± 0.027	0.139 ± 0.021	0.48

The intrasubject results are average distances measured between two subset space series from the same subject. The intragroup results are the average distances between two different subjects from the same group. Values are given as mean ± standard deviation. The intrasubject distances are not significantly different from the intragroup distances in all groups (*p* > 0.05 by *t*-test).

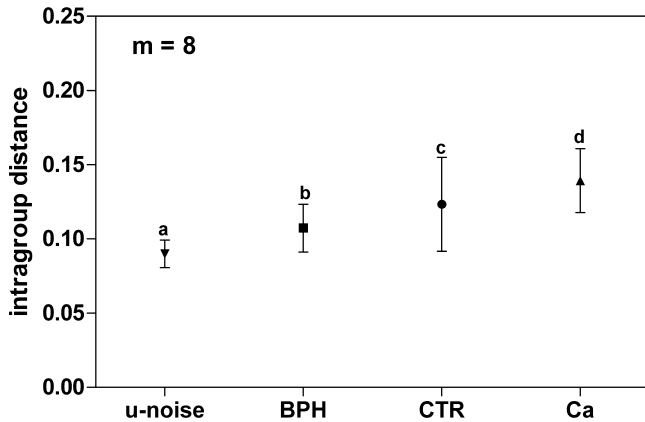


Fig. 4. Intragroup distances (*m* = 8) for u-noise, BPH, CTR and Ca cases, expressed as mean ± SD. The different letters on the error bars indicate significant differences among groups (*p* < 0.05).

The results of classification of the cases by the K-means clustering method is expressed in Tables 2 and 3. The clustering for *K* = 3 shows a significant association between groups (CTR, BPH and Ca) and clusters. The CTR cases are distributed almost uniformly among the three clusters, whereas the BPH cases are grouped in clusters 1 and 2 only, and the Ca cases are located mainly in clusters 2 and 3 (Table 2). The clustering for *K* = 2 (Table 3), also shows a significant association between Type B (CTR + BPH) cases, Type M (Ca) cases and clusters. The Type B cases are concentrated in cluster 1 (73%) and the Type M in cluster 2 (64%).

For CTR and BPH subjects, there are no significant differences in the nonrandomness index over the entire range of *m* studied (from 2 to 12). However, the nonrandomness index of the CTR group is significantly lower (*p* < 0.05) than that of the Ca group at the scales *m* = 8, 9, 11 and 12. Subjects with BPH also show significantly lower values (*p* < 0.05) of the nonrandomness index than Ca for the *m* values ranging from 8 to 12. For the u-noise group, the nonrandomness indices were significantly lower (*p* < 0.05) than those of the CTR and BPH groups for *m* values ranging from 4 to 10, and than those of the Ca group from 4 to 12. In Fig. 7, the nonrandomness indices

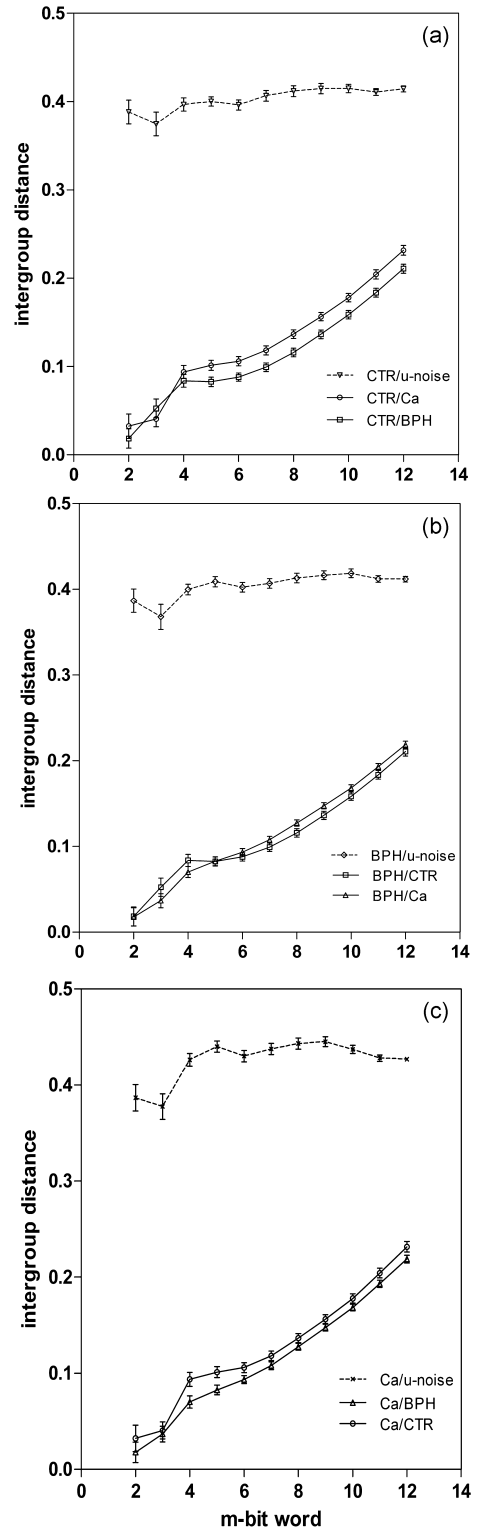


Fig. 5. For each *m*-bit word (ranging from 2 to 12, as indicated in the X-axis), the intergroup distances between (a) CTR group and u-noise, BPH and Ca groups; (b) BPH group and u-noise, CTR and Ca groups and (c) Ca group and u-noise, CTR and BPH groups, are expressed as mean ± CI (CI, confidence interval at 95%). The intergroup distances increase as the *m*-bit word increases, excepting when CTR/u-noise distance is considered.

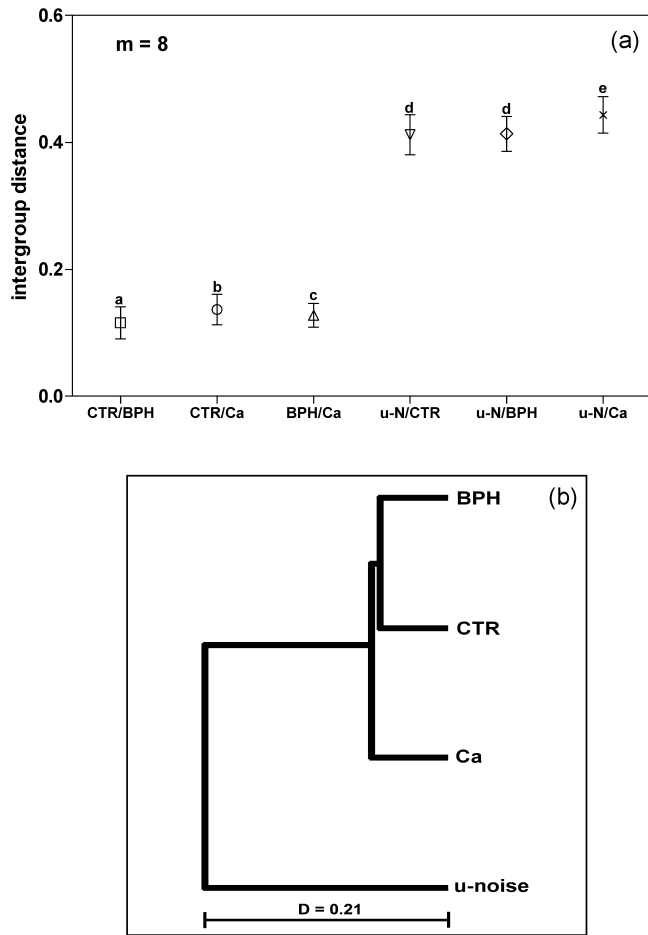


Fig. 6. In part (a) of the figure: the pairwise intergroup distances ($m = 8$) for u-noise, BPH, CTR and Ca cases, expressed as mean \pm SD. The different letters on the error bars indicate significant differences among groups ($p < 0.05$). In part (b), a rooted phylogenetic tree generated according to the distances between different groups. U-noise indicates a simulated uncorrelated random space series. The distance (D) between any two groups is the summation of the horizontal lengths along the shortest path on the tree that connects them.

Table 2. Table expressing the grouping of the CTR, BPH and Ca cases in three ($K = 3$) clusters, according to the intragroup distances.

Types	Clusters		
	1	2	3
CTR	45%	22%	33%
BPH	64%	36%	–
Ca	16%	40%	44%

The percentage of the cases from each type classified in each cluster is indicated. In the bottom of the table figures the χ^2 -value of a Pearson test for association between rows (types) and columns (clusters). $\chi^2 = 34.04; p < 0.0001$.

Table 3. Table expressing the grouping of the Type B (CTR+BPH) and Type M (Ca) cases in two ($K = 2$) clusters, according to the intragroup distances

Types	Clusters	
	1	2
B	73%	27%
M	36%	64%

The percentage of the cases from each type classified in each cluster is indicated. In the bottom of the table figures the χ^2 -value of a Pearson test for association between rows (types) and columns (clusters). $\chi^2 = 17.95; p < 0.0001$.

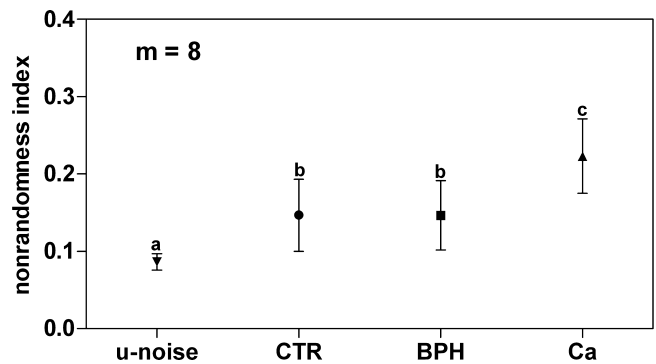


Fig. 7. Nonrandomness index ($m = 8$) for u-noise, CTR, BPH and Ca cases, expressed as mean \pm SD. The different letters on the error bars indicate significant differences among groups ($p < 0.05$).

for $m = 8$ are shown. There were no significant differences between the CTR and BPH groups, whereas the Ca group showed the highest significant value, and the u-noise group the lowest.

The effect of magnification on the distance across the groups is shown in Fig. 8. The profile of the intergroup distances was conserved throughout the three orders of magnification. These distances were higher in all groups at $200\times$ than either at $100\times$ or $400\times$. In relation to the effect of the quadrat size, the profile of the distance across the groups was also similar for all the pairs of groups, irrespective of the quadrat size (Fig. 9). The lowest intergroup distances were for the quadrats 450 pixels long, the highest for the quadrats 190 pixels long and intermediate for the quadrats 320 pixels long.

The scrambling of the quadrats in the space series (Fig. 10a) significantly changes the intergroup distance for the pair CTR-BPH – higher in the scrambled series than in normal ones. However, no significant changes were observed for the other pairs of groups (CTR-Ca, BPH-Ca). The change due to the rotation of the quadrats was more relevant for all the pairs (Fig. 10b) in CTR-BPH and BPH-Ca, the distance across the

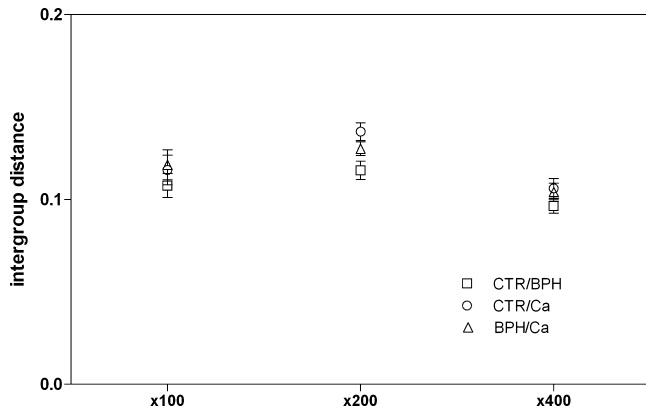


Fig. 8. Pairwise intergroup distances ($m = 8$) expressed as mean \pm CI (CI, confidence interval at 95%), for each order of magnification employed ($100\times$, $200\times$, $400\times$). All the pairs show a similar distribution, irrespective of the magnification considered.

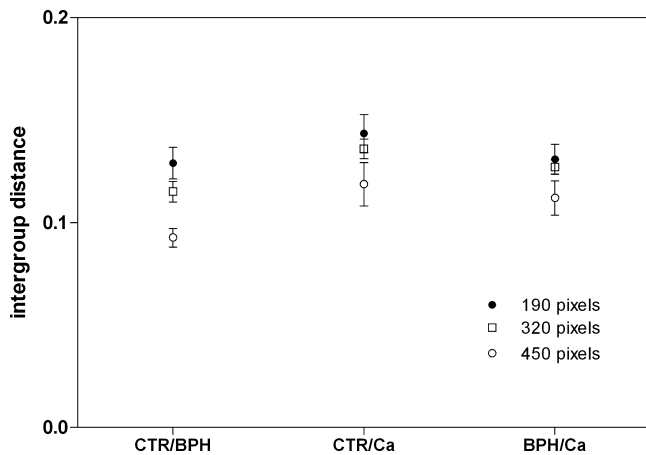


Fig. 9. Pairwise intergroup distances ($m = 8$), expressed as mean \pm CI (CI, confidence interval at 95%), for CTR, BPH and Ca cases. In the graph, the distance across the groups for series with quadrat sizes of 450, 320 and 190 pixels long are shown. All the pairs show a similar distribution irrespective of the quadrat size considered. The highest values for distance are shown in series with the 190 pixel-long quadrat, and the lowest for the 450 pixel-long quadrat.

groups was significantly higher in rotated than in normal groups, and for the pair CTR-Ca, significantly lower.

Discussion

As has been ascertained in other studies (Santamaría *et al.*, 2009), no remarkable qualitative differences among immunostained prostate microvessels (normal and pathologic) were detected in this work. Several authors, however, indicate rather subtle changes in the histology of prostate cancer capillaries in comparison with normal ones: for instance, capillaries in prostate cancer have a wider lumen than in normal tissue and the highest proportion of microvessels near to the epithelium (touching capillaries) is

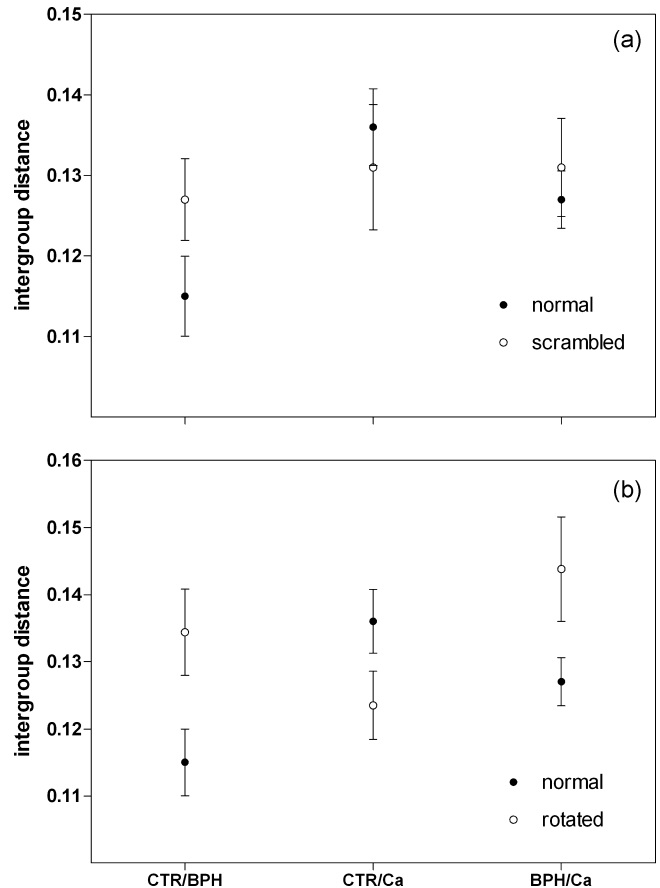


Fig. 10. In (a), pairwise intergroup distances, for both normal and scrambled series, expressed as mean \pm CI (CI, confidence interval at 95%). The profile of distribution of the distance across the groups was similar either in normal or scrambled series. For the CTR-BPH pair, the values for normal series were significantly lower than those values for the scrambled sequence. In the other two pairs, the CI from normal and scrambled series are seen overlapping. In (b), pairwise intergroup distances, for both normal and rotated series, expressed as mean \pm CI (CI, confidence interval at 95%). For all the pairwise distances, there were significant differences between the normal and rotated series.

seen in normal prostate (Montironi *et al.*, 1996). Moreover, the presence of openings between endothelial cells, creating leaky vessels, is frequent in cancer angiogenesis (Hashizume *et al.*, 2000; Terman & Stoletov, 2001). Nevertheless, all these changes are difficult to evaluate to obtain clear differences between normal and tumour prostate microvessels. From a quantitative point of view, significant changes have been found in relation to an increasing microvessel length for tumour capillaries in comparison with normal ones (Santamaría *et al.*, 2009). However, when the space series from CTR, BPH and Ca were compared, no relevant differences were detected. All the series showed a similar variability of the volume fraction for Factor-VIII along the X-axis, indicating a rather heterogeneous distribution of the microvessel profiles for all the groups.

This estimate of volume fraction is more robust than those including the microvessel as a whole, because we only considered the structures immunostained to Factor-VIII (endothelial cells), and not the vascular lumen that could contribute with a considerable amount of the variability, influenced by an eventual vasodilation, which might erroneously lead to a suspicion of increased angiogenesis.

Moreover, the mean values of V_V F-VIII are quite similar in the three groups studied. Therefore, a simple qualitative observation of the space series does not suffice to establish differences for the microvessel distribution among normal, BPH and cancer prostate specimens.

Contrary to that observed when the methodology of categorisation of biological signals (Peng *et al.*, 2007) was applied to the study of human heartbeat fluctuations (Yang *et al.*, 2003), our results on prostate microvessels show that, the intrasubject distances are indeed similar to the intragroup distances for all the groups studied. This indicates that there are no unique microvascular patterns associated with each individual at small space scales.

The lowest intragroup distance was found in the u-noise series because of the expected homogeneity of these artificially constructed series. Nevertheless, cancer cases evidence the greatest intragroup distance according to the heterogeneity of the neoplastic specimens (Mattfeldt *et al.*, 2000). Prostate cancer tissue is more densely supplied with capillaries than normal tissue and the three-dimensional arrangement of the vessels differs with respect to interaction at various distance ranges (Mattfeldt *et al.*, 2006). Furthermore, it is interesting to note that the BPH group shows a greater intragroup homogeneity than either the CTR or Ca groups, as it is located near to the u-noise series. In relation to the individual variability of the microvessel architecture, BPH cannot be considered as a transitional condition from normal prostate to cancer with a microvessel pattern intermediate between the normal and the tumour microvascular features.

We find that distances between subjects across groups are frequently greater than distances between subjects within a group. This result supports the notion that there are space patterns for microvessels in different states, whether in the normal prostate or in BPH and cancer tissues. However, there is an overlap among groups. When these distances were quantified from the entire range of m values, the intergroup distances grow according to the increase of m , but the differences across the groups were maintained from 4 to 12 m values, which implies a consistence of the intergroup differences through all the space scales explored. In regard to the intergroup distances, the space series from BPH represents a slight deviation from the normal state (CTR group), whereas the Ca group shows more remarkable deviation, as corresponds to a neoplastic condition with an impairment of the normal angiogenesis (Folkman, 1992; Bigler *et al.*, 1993; Condon, 2005). The artificial u-noise group

represents the extreme case in that only noise and no signal is present.

This proximity between CTR and BPH cases expressed in the 'phylogenetic tree' was also reflected by a more standard clustering method i.e. the K-means cluster method; when $K = 2$, a significant amount of BPH and CTR cases were grouped into one cluster, although more than 60% of the cancer cases were located in the other cluster. However, the intergroup distances were unable to discriminate CTR, BPH and Ca cases into three clearly different clusters.

The degree of specified complexity or 'meaningful structural richness' (Costa *et al.*, 2005; that is nonrandom distribution) for the microvascular bed can be accurately estimated by the nonrandomness index employed in this study. As expected, this complexity index was significantly greater for all the groups than that measured for the u-noise series on a wide range of scales (from 4 to 10 m values). Normal prostate and BPH specimens show similar nonrandom distribution for their microvessels throughout the entire range of m values, in accordance with the benign character of the BPH condition. This also suggests that the changes in angiogenesis detected in BPH (Deering *et al.*, 1995) are mild in comparison to those described for prostate cancer (Bigler *et al.*, 1993). Moreover, a significant increase of complexity (nonrandom distribution) was found for the cancer microvessels with respect to controls (for 8, 9, 11 and 12 m values) and to BPH (from 8 to 12 m values).

This increase of nonrandomness index for cancer microvessels is somewhat by contrast to that one would expect intuitively, because cancer implies unregulated, disordered growth by definition, then a lesser regularity should be expected in tumour microvessels. The nonrandomness index estimates the complexity of a certain structure, and the increase of complexity in the tumour vessels does not necessarily indicate that their arrangement was more regular than in the normal ones. In fact, the cancer vessels can be more entangled and heterogeneous. There is no straightforward correspondence between regularity and complexity. Neither completely predictable (e.g. periodic) signals, nor completely unpredictable (e.g. uncorrelated random) signals, are truly complex, because they can be described very compactly. There is no consensus definition of complexity. Intuitively, complexity is associated with 'meaningful structural richness' incorporating correlations over multiple scales, and thus more irregularities.

However, these estimates of complexity for the microvascular bed should be validated by other methods, either by other nonlinear tools, such as the multiscale sampled entropy (Costa *et al.*, 2005) or by other more conventional methods based on image analysis (Tambasco *et al.*, 2009).

When the robustness of the method was assessed for changes in resolution and quadrat size, the profile of the intergroup distance among the pairs of groups was well conserved. However, the method was sensitive to the

orientation, rendering some remarkable differences when the quadrats were either scrambled or rotated. Scrambling singularly affected the distances between CTR and BPH, which could be interpreted in the sense that breaking the sequence of the space series affects the groups with a more regular and homogenous disposition of the microvessels (normal cases and cases with a benign condition, such as BPH), more importantly. Otherwise, as the quadrats were coaligned during capture, it seems understandable that rotation affects the disposition of the microvascular profiles more deeply and therefore, the distance across the groups.

The sensitivity of the method to the rotation of the data requires executing precautions related to the sampling and assembling of the data series to avoid biased results. Two considerations must be taken into account: first, it is mandatory that the sampling of the strips allow the same chance for the selection of the data series in all space directions. This was accomplished in this study, because the sections of the prostate were performed by an IUR protocol. The second caveat is related to how the strips are assembled: the quadrats must be coaligned according to the X-axis of the strip, previously selected by the IUR protocol.

We conclude that: (1) The method originally applied to the analysis of the human heartbeat can be easily adapted to V_V F-VIII space series from prostate microvessels, provided that a meaningful mapping to symbolic sequences can be obtained. (2) There are no unique prostate microvascular patterns associated with each individual at small space scales. (3) There are characteristic patterns that describe the microvascular structures of different physiologic/pathologic states (normal vs. hyperplastic prostate or cancer prostate). (4) This linguistic-type method is potentially useful because of its ability to take into account the differences between prostate cancer and both normal and benign prostate conditions, with respect to the microvessel patterns.

References

- Baddeley, A. & Vedel Jensen, E. (2005) Uniform and isotropic uniform designs. *Stereology for Statisticians* (ed. by A. Baddeley & E. Vedel Jensen), pp. 155–173. Chapman & Hall, Boca Raton, Florida.
- Bigler, S.A., Deering, R.E. & Brawer, M.K. (1993) Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum. Pathol.* **24**(2), 220–226.
- Condon, M.S. (2005) The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. *Semin. Cancer Biol.* **15**(2), 132–137.
- Costa, M., Goldberger, A.L. & Peng, C.K. (2005) Multiscale entropy analysis of biological signals. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter Phys.* **71**(2 Pt 1), 0219061–18.
- D'Amore, P.A. (1992) Capillary growth: a two-cell system. *Semin. Cancer Biol.* **3**(2), 49–56.
- Deering, R.E., Bigler, S.A., Brown, M. & Brawer, M.K. (1995) Microvasculature in benign prostatic hyperplasia. *Prostate* **26**(3), 111–115.
- Elbert, T., Ray, W.J., Kowalik, Z.J., Skinner, J.E., Graf, K.E. & Birbaumer, N. (1994). Chaos and physiology: deterministic chaos in excitable cell assemblies. *Physiol. Rev.* **74**(1), 1–47.
- Epstein, J.I., Allsbrook, W.C., Jr., Amin, M.B. & Egevad, L.L. (2005) The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **29**(9), 1228–1242.
- Folkman, J. (1992) The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin. Cancer Biol.* **3**(2), 65–71.
- Gundersen, H.J. & Osterby, R. (1981) Optimizing sampling efficiency of stereological studies in biology: or “do more less well.” *J. Microsc.* **121**(Pt 1), 65–73.
- Hahn, G.L., Chen, Y.R., Nienaber, J.A., Eigenberg, R.A. & Parkhurst, A.M. (1992) Characterizing animal stress through fractal analysis of thermoregulatory responses. *J. Therm. Biol.* **17**(2), 115–120.
- Hashizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., McLean, J.W., Thurston, G., Roberge, S., et al. (2000) Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol.* **156**(4), 1363–1380.
- Heffernan, M.S. (1996) Comparative effects of microcurrent stimulation on EEG spectrum and correlation dimension. *Integr. Physiol. Behav. Sci.* **31**(3), 202–209.
- Howard, C.V. & Reed, M.G. (2005) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, 2nd edn. Bios Scientific Publishers, Oxford.
- Koch, H.P. & Zacek, H. (1991) Fractals also in pharmacokinetics? *Pharmazie* **46**(12), 870–871.
- MacQueen, J. (1967) Some methods for classification and analysis of multivariate observations. *Proceedings of the Fifth Berkeley Symposium on Mathematics, Statistics and Probability* (Berkeley, University of California Press), vol. 1, pp. 281–297.
- Mattfeldt, T. (1997) Nonlinear deterministic analysis of tissue texture: a stereological study on mastopathic and mammary cancer tissue using chaos theory. *J. Microsc.* **185**(Pt 1), 47–66.
- Mattfeldt, T., Frey, H. & Rose, C. (1993a) Second-order stereology of benign and malignant alterations of the human mammary gland. *J. Microsc.* **171**(Pt 2), 143–151.
- Mattfeldt, T., Vogel, U., Gottfried, H.W. & Frey, H. (1993b) Second-order stereology of prostatic adenocarcinoma and normal prostatic tissue. *Acta Stereol.* **12**, 203–208.
- Mattfeldt, T., Schmidt, V., Reepschlager, D., Rose, C. & Frey, H. (1996) Centred contact density functions for the statistical analysis of random sets. A stereological study on benign and malignant glandular tissue using image analysis. *J. Microsc.* **183**(Pt 2), 158–169.
- Mattfeldt, T., Gottfried, H., Schmidt, V. & Kestler, H.A. (2000). Classification of spatial textures in benign and cancerous glandular tissues by stereology and stochastic geometry using artificial neural networks. *J. Microsc.* **198**(Pt 2), 143–158.
- Mattfeldt, T., Eckel, S., Fleischer, F. & Schmidt, V. (2006) Statistical analysis of reduced pair correlation functions of capillaries in the prostate gland. *J. Microsc.* **223**(Pt 2), 107–119.
- McNeal, J.E. (1990) Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. *Urol. Clin. North Am.* **17**(3), 477–486.
- Montironi, R., Diamanti, L., Thompson, D., Bartels, H.G. & Bartels, P.H. (1996) Analysis of the capillary architecture in the precursors of prostate cancer: recent findings and new concepts. *Eur. Urol.* **30**(2), 191–200.
- O'Brien, T.S. & Harris, A.L. (1995) Angiogenesis in urological malignancy. *Br. J. Urol.* **76**(6), 675–682.

- Padhani, A.R., Harvey, C.J. & Cosgrove, D.O. (2005) Angiogenesis imaging in the management of prostate cancer. *Nat. Clin. Pract. Urol.* **2**(12), 596–607.
- Peng, C.K., Yang, A.C. & Goldberger, A.L. (2007) Statistical physics approach to categorize biologic signals: from heart rate dynamics to DNA sequences. *Chaos* **17**(1), 0151151–6.
- Rasband, W.S. & Bright, D.S. (1995) NIH image: a public domain image processing program for the Macintosh. *Microbeam Anal.* **4**, 137–149.
- Rosenstein, M.T., Collins, J.J. & De Luca, C.J. (1993) A practical method for calculating largest Lyapunov exponents from small data sets. *Physica D* **65**, 117–134.
- Rosenstein, M.T., Collins, J.J. & De Luca, C.J. (1994) Reconstruction expansion as a geometry-based framework for choosing proper delay times. *Physica D* **73**, 82–89.
- RoyChoudhury, A., Felsenstein, J. & Thompson, E.A. (2008) A two-stage pruning algorithm for likelihood computation for a population tree. *Genetics* **180**(2), 1095–1105.
- Santamaría, L., Ingelmo, I., Ruiz, J., *et al.* (2009) Stereological estimate of the length of microvessels and the number. Proliferation and apoptosis of endothelial cells in prostate cancer. *Open Prostate Cancer J.* **2**, 46–53.
- Tambasco, M., Costello, B.M., Kouznetsov, A., Yau, A. & Magliocco, A.M. (2009) Quantifying the architectural complexity of microscopic images of histology specimens. *Micron* **40**(4), 486–494.
- Terman, B.I. & Stoletov, K.V. (2001) VEGF and tumor angiogenesis. *Einstein Q. J. Biol. Med.* **18**, 59–66.
- Yang, A.C., Hseu, S.S., Yien, H.W., Goldberger, A.L. & Peng, C.K. (2003) Linguistic analysis of the human heartbeat using frequency and rank order statistics. *Phys. Rev Lett.* **90**(10), 1081031–4.
- Zhang, T. & Johns, E.J. (1998) Chaotic characteristics of renal nerve peak interval sequence in normotensive and hypertensive rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **25**(11), 896–903.
- Zipf, G.K. (1942) Children's speech. *Science* **96**, 344–345.