

UTILIZZAZIONE DELL'ANTICORPO MONOCLONALE MIB 1 PER LA RICERCA DELL'ANTIGENE Ki-67 NEI TESSUTI NORMALI E NEOPLASTICI DI CAVALLO

SIRONI G., RICCABONI P.

Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Milano

Il grado di proliferazione cellulare di un tessuto patologico, ed in particolar modo di un tessuto neoplastico, è un'importante variabile biologica la cui accurata valutazione può fornire al patologo utili indicazioni. In passato, lo studio clinico della cinetica cellulare era basato sul cosiddetto "indice mitotico", sulla conta, cioè, del numero di mitosi presenti in un numero prestabilito di campi microscopici a forte ingrandimento. Col tempo, sono stati elaborati metodi più accurati quali l'incorporazione di isotopi radioattivi o di bromo-deossiridina, la cui applicazione risulta però relativamente laboriosa. In tempi più recenti l'attenzione è andata spostandosi verso metodiche quali la citometria a flusso, la conta degli organizzatori nucleolari e l'identificazione immunoistochimica di antigeni presenti esclusivamente nelle cellule proliferanti (Chieco e Robutti, 1993). Tra questi i più noti sono senz'altro il Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) (Miyachi *et al.*, 1978) e l'antigene Ki-67 (Gerdes *et al.*, 1983). Quest'ultimo, in particolare, dotato di una brevissima emivita e presente in tutte le parti attive del ciclo cellulare, ma assente nella fase G0 (Gerdes *et al.*, 1984), sembrerebbe, secondo molti Autori, fornire i maggiori vantaggi. Viceversa, appare ora chiaro che PCNA è talora espresso anche da cellule a riposo (Schwartz, 1993). Le caratteristiche ricordate hanno fatto quindi dell'antigene Ki-67 il marker di proliferazione cellulare di elezione. Il principale svantaggio dell'originario anticorpo monoclonale Ki-67 è la labilità dell'epitopo da esso riconosciuto, fatto questo che ne impedisce l'impiego su tessuti fissati con formalina od altri fissativi ed inclusi in paraffina, limitandone l'uso ai soli tessuti freschi. Nel corso degli ultimi anni, sono però stati prodotti alcuni nuovi anticorpi mono- e policlonali (Key *et al.*, 1993 a, b), alcuni dei quali sono risultati in

grado di rilevare, quando utilizzati in associazione ad una tecnica di smascheramento antigenico con forno a microonde (Gerdes *et al.*, 1992; Cattoretti *et al.*, 1993), l'antigene Ki-67 in tessuti umani fissati in formalina ed inclusi in paraffina.

Immunoreattività nei confronti dell'epitopo riconosciuto dal primo degli anticorpi prodotti contro l'antigene Ki-67 è stata osservata in cellule di varie specie animali (bovino, pecora, cane, coniglio e ratto) (Falini *et al.*, 1989). Mancano tuttavia, attualmente, dati concernenti l'antigene Ki-67 nella specie equina.

Nella presente comunicazione vengono esposti i risultati di prove volte a valutare la possibilità di utilizzare uno degli anticorpi monoclonali anti Ki-67 di più recente produzione, l'anticorpo monoclonale MIB 1, per la ricerca dell'antigene Ki-67 in tessuti di cavallo fissati in formalina ed inclusi in paraffina.

Le indagini sono state svolte utilizzando la metodica Avidina-biotina perossidasi (ABC) associata alla tecnica di smascheramento antigenico con forno a microonde (Gerdes *et al.*, 1992; Cattoretti *et al.*, 1993) ed impiegando come anticorpo primario l'anticorpo monoclonale di topo MIB 1 diluito 1:50. Le prove immunoistochimiche sono state effettuate su tessuti normali di cavallo (cute, linfonodi, milza, intestino, rene, polmone, cuore, encefalo) fissati in formalina tamponata al 10% per 18-24 ore ed inclusi in paraffina. Inoltre l'immunoreattività dell'anticorpo MIB 1 è stata verificata su campioni di 56 neoplasie di cavallo pervenuti all'Istituto di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare di Milano tra gli anni 1979 e 1993. Di tali campioni non erano noti il tempo intercorso tra il prelievo e la fissazione, il tempo di fissazione in formalina ed il tipo di formalina utilizzato.

Nei tessuti normali con distretti contenenti cellule proliferanti (cute, linfonodi, milza, intestino) l'anticorpo si è rivelato reattivo, mostrando una distribuzione della positività sovrapponibile a quella osservata in tessuti umani o di altre specie animali.

Intensa positività è stata osservata nei nuclei delle cellule basali cutanee, delle cripte intestinali, e delle aree centroblastiche linfonodali. Rarissime cellule positive sono state rinvenute inoltre nel polmone, mentre completamente negativi sono risultati rene, cuore ed encefalo.

Nella tabella 1 sono riportati i dati riguardanti la classificazione istologica dei campioni neoplastici esaminati ed i risultati riguardanti la loro reattività immunoistochimica nei confronti dell'anticorpo MIB 1. Su tali campioni ci si è limitati a valutare la reattività dell'anticorpo, senza effettuare alcuna preci-

	+	+/-	-
Cute (23)			
Papilloma squamoso	0	0	1
Basalioma	1	0	0
Adenocarcinoma sebaceo	0	0	1
Fibroma	3	1	4
Linfangioma	1	1	0
Schwannoma	3	0	1
Sarcoide	4	1	1
Apparato digerente (3)			
Papilloma squamoso orale	1	1	
Carcinoma squamoso gastrico	0	1	0
Apparato respiratorio (4)			
Schwannoma nasale	1	0	0
Carcinoma squamoso polmonare	1	1	0
Carcinoma indifferenziato polmonare	1	0	0
Apparato urinario (2)			
Adenoma renale	0	0	1
Carcinoma tubulare renale	0	0	1
Apparato genitale (12)			
Tumore a cellule di Leydig	0	0	1
Sertolioma	1	0	0
Tecoma	0	0	1
Tumore a cellule della granulosa	0	0	1
Fibroma testicolare	1	0	0
Basalioma vulvare	1	0	0
Carcinoma squamoso penieno	2	2	2
Sistema endocrino (4)			
Adenoma follicolare tiroideo	1	0	0
Carcinoma follicolare tiroideo	0	1	0
Feocromocitoma surrenalico	0	1	1
Sistema ematopoietico (4)			
Linfoma	0	2	0
Mieloma	0	1	0
Leucemia megacariocitica	1	0	0
Occhio e annessi oculari (4)			
Basalioma	1	0	0
Carcinoma squamoso	3	0	0
Totale (56)	27	13	16

Tabella 1 - Risultati delle indagini immunistochemiche realizzate su campioni di neoplasie benigne e maligne di cavallo. Il grado di reattività delle cellule è stato suddiviso in ottimale (+), sub-ottimale (+/-) e negativo (-). Per ogni apparato viene riportato in parentesi il totale dei campioni esaminati.

sa determinazione quantitativa delle cellule proliferanti presenti. Come ci si poteva attendere, a causa della notevole eterogeneità dei campioni per quanto attiene ai tempi di fissazione, è stata osservata una notevole variabilità della reattività, non solo in termini numerici, ma anche in relazione al grado di intensità della marcatura. Dei 56 casi esaminati, solo 40 sono risultati positivi per l'antigene Ki-67: 27 campioni hanno reagito in maniera ottimale, mostrando nuclei intensamente marcati; in 13 campioni la reazione è risultata sub-ottimale, caratterizzata cioè da una tenue marcatura del disegno cromatinico, e 16 campioni sono risultati del tutto negativi.

Oltre all'intensità della colorazione è stata osservata anche una variabilità della frequenza di cellule positive in relazione al tipo di neoplasia esaminata. Tale frequenza risultava infatti assai bassa nelle neoplasie benigne e raggiungeva invece valori, a volte elevatissimi, nei tumori maligni ad elevato grado di differenziazione.

In conclusione, sulla base dei risultati ottenuti, si può affermare che: l'anticorpo monoclonale MIB 1, utilizzato in associazione alla tecnica di smascheramento antigenico in forno a microonde è in grado di evidenziare la presenza dell'antigene Ki-67 anche in tessuti di equino. Tale anticorpo potrebbe rivelarsi quindi un'utilissimo strumento per lo studio di molte patologie, soprattutto neoplastiche della specie equina.

Per quanto concerne l'esito delle prove effettuate sui campioni neoplastici selezionati dal materiale routinariamente inviato all'Istituto, elevato è il numero di casi che ha reagito negativamente (16 casi) o comunque in modo sub-ottimale (13 casi). E' noto che la fissazione in formalina per tempi superiori alle 72 ore è in grado di determinare la scomparsa di immunoreattività dell'epitopo dell'antigene Ki-67 riconosciuto dall'anticorpo MIB 1 (Cattoretti *et al.*, 1992). E' stata inoltre segnalata da alcuni altri Autori la possibilità che, nei tessuti eccessivamente fissati (48 ore anziché 24) e troppo brevemente riscaldati in forno a microonde, si possa riscontrare una riduzione, talora modesta, altre volte più consistente, del numero di cellule marcate positivamente (Munakata e Hendricks, 1993). E' presumibile che l'elevato numero di campioni neoplastici risultati negativi o marcati in modo sub-ottimale osservato nella presente prova sia da ascrivere all'elevata permanenza in formalina di tali campioni.

Sulla base della presente osservazione va quindi sottolineato che solo una rigorosa standardizzazione ed ottimizzazione dei tempi intercorrenti tra il prelievo e la fissazione e dei tempi di fissazione può permettere di ottenere quell'attendibilità di risultati che si richiede ad una valutazione quantitativa dell'immunomarcatura.

SUMMARY

A series of normal tissues and 56 benign and malignant of the horse tumours, fixed in formalin and embedded in paraffin-wax, were analyzed immunohistochemically for detection of Ki-67 antigen using the Ki-67-equivalent monoclonal antibody MIB 1. In normal tissues, positive nuclei were seen in areas containing proliferating cells in skin, intestine, spleen and lymph nodes; rare positive cells were also found in lung. No positive reactions were observed in kidney, heart and brain. Forty of the 56 tumours displayed optimal or sub-optimal positive reaction for Ki-67 antigen using MIB 1. The study demonstrates, therefore, that a cell proliferation associated antigen Ki-67 is also present in horse and is immunohistochemically recognized in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by the monoclonal antibody MIB 1. However, care must be taken in avoiding overfixation of the tissues when quantitative measurements are performed.

RIASSUNTO

Vari tessuti normali ed una serie di 56 tumori benigni e maligni di cavallo, fissati in formalina ed inclusi in paraffina sono stati esaminati immunoistochimicamente per evidenziare l'antigene Ki-67, utilizzando l'anticorpo monoclonale MIB 1. Nei tessuti normali, nuclei positivi sono stati osservati in aree contenenti cellule proliferanti di cute, intestino, milza e linfonodi; alcune rare cellule sono inoltre state osservate nel polmone. Non sono invece state riscontrate reazioni positive in rene, cuore ed encefalo. Quaranta dei 56 tumori esaminati hanno reagito in modo ottimale o sub-ottimale con l'anticorpo MIB 1 mostrando cellule positive per antigene Ki-67. Il presente studio dimostra quindi che un antigene proliferazione associato Ki-67 è presente anche nel cavallo ed è immunoistochimicamente rilevabile in tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina facendo uso dell'anticorpo monoclonale MIB 1. Tuttavia, quando si vogliono effettuare valutazioni quantitative della marcatura è necessario evitare la sovralfissazione dei tessuti.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Cattoretti G., Becker M.H.G., Key G., Duchrow M., Schluter C., Gallet J., Gerdes J.: *Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections.* Journal of Pathology, 168: 357-363,1992.
- 2) Cattoretti G., Pileri S., Parravicini C., Becker M.H.G. Poggi S., Bifulco C., Key G., D'Amato L., Sabattini E., Feudale E., Reynolds F., Gerdes J., Rilke F.: *Antigen unmasking on formalin fixed, paraffin embedded tissues sections.* Journal of Pathology, 171: 83-98,1993.
- 3) Chieco P., Robutti F.: *Metodi in Citologia Analitica Citomorfometria del DNA e analisi in situ dell'attività proliferativa dei tessuti solidi.* Ed. Eurocopy Bologna 1993.
- 4) Falini B., Flenghi L., Fagioli M., Stein H., Schwarting R., Riccardi C., Manocchio I., Pileri S., Pelicci P.G., Lanfrancone L.: *Evolutionary conservation in various mammalian species of the human proliferation-associated epitope recognized by the Ki-67 monoclonal antibody.* Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 37: 1471-1478, 1989.
- 5) Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H.: *Production of a monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation.* International Journal of Cancer, 31: 13-20,1983.
- 6) Gerdes J., Lemke H., Baisch H., Wachter H.H., Schwab U., Stein H.: *Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67.* Journal of Immunology 133: 1710-1715,1984.
- 7) Gerdes J., Becker M.H.G., Key G., Cattoretti G.: *Immunohistological detection of tumor growth fraction (Ki-67 antigen) in formalin-fixed and routinely processed tissues.* Journal of Pathology, 168: 85-86,1992
- 8) Key G., Becker M.H.G., Baron B., Duchrow M., Schluter C., Flad H.D., Gerdes J.: *New Ki-67-equivalent murine monoclonal antibodies (MIB 1-3) generated against bacterially expressed parts of the Ki-67 cDNA containing three 62 base pair repetitive elements encoding for the Ki-67 epitope.* Laboratory Investigation, 68: 629-636, 1993 a.
- 9) Key G., Larsen Petersen J., Becker M.H.G., Duchrow M., Schluter C., Askaa J., Gerdes J.: *New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of paraffin wax sections.* Journal of Clinical Pathology, 46: 1080-1084,1993 b.
- 10) Miyachi K., Fritzler M.J., Tan E.M.: *Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells.* Journal of Immunology, 121: 2228-2234,1978.
- 11) Munakata S. and Hendricks J.B. (1993): *Effect of fixation time and microwave oven heating time on retrieval of the Ki-67 antigen from paraffin embedded tissue.* Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 41,1241-1246.
- 12) Schwarting R.: *Little missed markers and Ki-67.* Laboratory Investigation, 68: 597-599, 1993.