

## CINETICA CELLULARE IN SEMINOMI DI EQUIDI

G. De Vico e B. Restucci.

*Università degli Studi di Napoli "Federico II"*

*Dipartimento di Patologia e Sanità Animale. Settore Anatomia Patologica.*

### **Introduzione**

La determinazione dell'attività proliferativa, delle cellule neoplastiche valutata mediante i cosiddetti "indici di proliferazione cellulare" (Indice Mitotico, Ag-NOR, PCNA) fornisce spesso utili indicazioni sul comportamento biologico di un determinato tumore. In particolare, le cosiddette proteine Ag-NOR, sono un gruppo eterogeneo di proteine acide, non istoniche, strettamente associate al DNA (DNAr) che codifica per l'RNA ribosomiale (RNAr) (Fakan e Hernandez-Verdun, 1986). In sezioni di tessuto colorate con una specifica tecnica di impregnazione argentica (tecnica Ag-NOR) (Ploton et al., 1986), esse appaiono come punti neri di diverse dimensioni (Ag-NORs) spesso aggregati all'interno dei nucleoli (Ag-NOR Clusters) (Howat et al., 1988). Il numero, le dimensioni e la distribuzione di tali strutture nel nucleo delle cellule di una determinata popolazione neoplastica, variano proporzionalmente alla *velocità* di moltiplicazione cellulare (tasso di crescita) (Derenzini et al. 1990), e al *numero* di cellule proliferanti (frazione di crescita). Alla frazione di crescita di un tumore, è correlato anche il cosiddetto Indice Mitotico, rappresentato dalla percentuale di figure mitotiche su un numero determinato di elementi neoplastici (Quinn e Wright, 1990). Negli ultimi anni, l'uso di tali indici in oncologia veterinaria si è sempre più affermato, dimostrandosi un valido mezzo diagnostico e prognostico in numerosi tumori spontanei animali (De Vico, Maiolino, Galati, 1996).

In questo studio, ci è sembrato utile valutare il valore prognostico della quantificazione delle proteine Ag-NOR in alcuni seminomi di equidi, nonché le correlazioni esistenti, in questi tumori, tra quantità di proteine Ag-NOR ed Indice Mitotico (IM).

## **Materiali e Metodi**

Sono stati esaminati 10 seminomi di equidi, di cui uno metastatizzato in numerosi organi. Tutti i casi esaminati risultavano, secondo la classificazione istologica del WHO (Nielsen e Lein, 1974), di "tipo diffuso". Per ogni caso studiato, campioni di tessuto neoplastico fissati in formalina ed inclusi in paraffina sono stati sezionati a  $5\mu\text{m}$  e colorati con Ematossilina-Eosina e con la tecnica Ag-NOR mediante incubazione prolungata (De Vico et al. 1994). Lo studio morfometrico degli Ag-NOR Clusters è stato effettuato mediante sistema automatico di analisi di immagine: per ogni caso studiato, da sezioni di tessuto marcate con l'argento sono stati selezionati campi a più alta cellularità utilizzando un obiettivo 40X. Le immagini selezionate sono state quindi raccolte nella memoria digitale del sistema di analisi, e mostrate sul monitor. Una volta definito il livello di grigio corrispondente ai soli Clusters di Ag-NORs, il numero e l'area degli aggregati venivano calcolati automaticamente, ed infine i valori ottenuti erano divisi per il numero di cellule selezionate (almeno 100 cellule per ogni campione) in modo da ottenere il numero medio e l'area media degli Ag-NOR Clusters per cellula. Per ogni caso studiato, inoltre, l'area media dei Clusters di Ag-NOR per cellula, veniva rapportata all'area media dei nuclei delle cellule neoplastiche, ottenuta mediante l'utilizzo della funzione "Draw/merge" del sistema di analisi. Per ogni caso esaminato, veniva infine calcolato l'indice mitotico corretto per il volume (M/V Index) (Haapasalo et al., 1989) utilizzando sezioni colorate con EE. Venivano così studiate le correlazioni tra Ag-NOR clusters ed attività mitotica, nonché quelle tra i valori dei parametri calcolati ed il comportamento biologico dei tumori esaminati.

## **Risultati**

Istologicamente, il seminoma metastatizzato era costituito, rispetto ai seminomi non metastatizzati, prevalentemente da cellule più piccole, con nucleo ipercromatico e citoplasma debolmente basofilo a limiti ben definiti.

Il valore medio dell'area degli Ag-NOR Clusters/nucleo, variava da 3.18 a  $13.86\ \mu\text{m}^2$  nel seminoma metastatizzato (media  $6.9\pm 2.21\ \mu\text{m}^2$ ), mentre nei seminomi non metastatizzati, tale valore risultava compreso tra 3.38 e  $15.18\ \mu\text{m}^2$  (media  $8.09\pm 2.59\ \mu\text{m}^2$ ). Il numero medio di Ag-NOR Clusters/cellula risultava di  $3.32\pm 1.03$  nel seminoma metastatizzato, e di  $1.56\pm 1.04$  nel gruppo di seminomi non metastatizzati.

L'area nucleare media nel seminoma metastatizzato risultava pari a  $28 \pm 2.05 \mu\text{m}^2$ , mentre nei seminomi non metastatizzati essa risultava di  $64 \pm 2.3 \mu\text{m}^2$ ; Il rapporto area nucleare/area Ag-NOR Clusters era pari a  $7.9 \pm 1.05$  nei seminomi non metastatizzati e  $4.05 \pm 0.12$  nel seminoma metastatizzato. Le differenze tra i valori medi del numero di Ag-NOR Clusters/cellula, nonché quelli del rapporto "area nucleare/area Ag-NOR Cluster", tra il seminoma metastatizzato e quelli non metastatizzati, sono statisticamente significative.

Il M/V Index nel seminoma metastatizzato era pari a  $95.52/\text{mm}^2$ , e risultava significativamente più elevato rispetto a quello dei seminomi non metastatizzati (M/V Index =  $35 \pm 12/\text{mm}^2$ ).

### **Discussione**

Lo studio di parametri cellulari morfo-funzionali quantificabili di valore prognostico vede oggi impegnato un numero sempre crescente di ricercatori coinvolti nel campo della diagnostica oncologica sia umana che veterinaria. A tale riguardo, la ricerca di tali parametri nei tumori spontanei degli animali, non va intesa solo quale mezzo per ottenere una più alta precisione diagnostica, ma anche quale importante momento comparativo con le corrispondenti neoplasie dell'uomo. E' noto infatti che gli animali domestici rappresentano preziosi modelli di studio per i tumori umani, anche perché spesso, essi condividono con l'uomo ambienti ed abitudini di vita. Per quanto riguarda i tumori del testicolo, oltre all'uomo, soltanto il cane e gli equidi ne sviluppano spontaneamente con discreta frequenza (Galati, 1977). Per i seminomi dell'uomo e del cane, in particolare, recenti studi sembrano dimostrare che la quantificazione delle proteine Ag-NOR possa essere utilissima nell'individuare tumori a più alto potere invasivo e metastatico (Delahunt et al., 1990; De Vico et al., 1994). I dati ottenuti in questo studio, sembrano confermare il valore prognostico della quantificazione delle proteine Ag-NOR anche nei seminomi degli equidi. In particolare, i parametri più utili tra quelli esaminati, sono risultati essere il numero medio di Ag-NOR clusters/cellula e il rapporto "area nucleare/area Ag-NOR Clusters", i cui valori sono significativamente differenti, nel seminoma metastatizzato, rispetto al gruppo di seminomi non metastatizzati. Per quanto riguarda le correlazioni esistenti tra proteine Ag-NOR, ciclo cellulare ed indice mitotico, si ritiene che le *dimensioni medie* degli Ag-NOR Clusters/cellula siano proporzionali

alla velocità con cui la cellula completa il proprio ciclo (Derenzini et al., 1990); Il **numero medio** di Ag-NOR Clusters/cellula, nonché la loro distribuzione all'interno del nucleo, sembrano invece variare in relazione alla fase del ciclo cellulare, aumentando in profase ed in tarda telofase (Anastassova-Kristeva, 1977) e quindi proporzionalmente al numero di cellule in fase "M". Nel nostro studio, il riscontro di un più alto IM nel seminoma con un maggior numero di Ag-NOR clusters/nucleo (quello metastatizzato), sembra corroborare tale ipotesi, suggerendo altresì che il seminoma metastatizzato aveva una "frazione di crescita" più elevata di quelli non metastatizzati. Una situazione simile è stata riscontrata anche in alcuni seminomi di cane metastatizzati precocemente (De Vico et al., 1994) e nei cosiddetti seminomi ad alto indice mitotico dell'uomo (Delahunt et al, 1990), rafforzando così l'opinione che ulteriori e più approfonditi studi sulla cinetica cellulare nei seminomi spontanei degli animali possa fornire indicazioni utili per una migliore comprensione dei meccanismi che portano alla trasformazione neoplastica, alla invasione tissutale e alla metastasi anche nei corrispondenti tumori umani.

### **Bibliografia**

- 1) Anastassova-Kristeva M : The nucleolar cycle in man. J Cell Sci, **25**, 103-110, 1977.
- 2) Delahunt B, Mostofi FK, Sesterhenn IA, Ribas JL, Avallone FA: Nucleolar organizer regions in seminoma and intratubular malignant germ cells . Mod Pathol, **3**, 141-145, 1990.
- 3) Derenzini M, Pession A, Trerè D : Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. Lab Inv, **63**, 137-140, 1990.
- 4) De Vico G, Maiolino P, Galati P : Cell proliferation indices in animal tumours - a brief review. Eur J Vet Pathol, **2**, 127-132, 1996.
- 5) De Vico G, Papparella S, Di Guardo G : Number and size of silver-stained nucleoli (Ag-NOR clusters) in canine seminomas: correlation with histological features and tumour behaviour. J Comp Pathol, **110**, 267-273, 1994.
- 6) Fakan S, Hernandez-Verdun D : The nucleolus and the nucleolar organizer regions. Biol Cell, **59**, 189-206, 1986.
- 7) Galati P: Tumori spontanei negli animali. Atti XIV Congr Naz Soc It Pat ,1-39, 1977.
- 8) Haapasalo H, Pesonen E: Volume corrected mitotic index (M/V-INDEX). The standard of mitotic activity in neoplasms. Path Res Pract, **185**, 551-554, 1989.

- 9) Howat AJ, Giri DD, Wright LA, Underwood JCE : Silver-stained nucleoli and nucleolar organizer regions count are of no prognostic value in thick cutaneous malignant melanoma. *J Pathol*, **159**, 121-127, 1988.
- 10) Nielsen SW, Lein DH: Tumours of the testis. *Bull. W.H.O.*, **50**, 71-78, 1974.
- 11) Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himberg G, Pigeon F, Adnet JJ: Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer regions at the optical level. *Histochem J* , **18**, 5-14, 1986.
- 12) Quinn CM, Wright NA: The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol*, **160**, 93-102, 1990.