

INDICATORI AI PROLIFERĂRII CELULARE. EXPRESIA LOR ÎN DIFERITE TUMORI ȘI ÎN CARCINOAMELE CU CELULE TRANZIȚIONALE

Angela Borda, Nicole Berger*, E.Piaton**

Disciplina de histologie

Universitatea de Medicină și Farmacie Târgu-Mureș

*Laboratorul de Anatomie Patologică

Hotel Dieu, Lyon, Franța

**Laboratorul de Histologie

Universitatea de Medicină Grange Blanche, Lyon, Franța

Evaluarea proliferării tumorale este unul din aspectele cele mai moderne și actuale ale patologiei umane. Scopul ei este de a furniza clinicianului cele mai multe informații posibile asupra unei tumori, în vederea stabilirii unei atitudini terapeutice cât mai corecte.

Carcinoamele cu celule tranziționale (CCT) ale vezicii urinare au un prognostic biologic variabil, prognostic ce poate fi corelat în cea mai mare parte a cazurilor cu gradul și stadiul tumoral, stabilite prin examen microscopic (1). Există însă situații în care aspectul microscopic nu este un indicator prognostic suficient de fidel.

Acesta este motivul pentru care, în momentul de față, interesul cercetătorilor se îndreaptă spre descoperirea unor criterii suplimentare celor clasice, de apreciere a agresivității tumorale. În acest sens, evaluarea proliferării tumorale a CCT ar putea fi utilizată ca metodă complementară parametrilor histologici clasici, pentru o mai corectă apreciere a evoluției tumorale.

Există deci în prezent, mai multe procedee de investigare a ciclului celular și deci a proliferării celulare, atât clasice cât și moderne. O clasificare a acestor metode utilizate în prezent, a fost făcută de Hall (2) :

I. Numărarea mitozelor

II. Aprecierea conținutului în ADN :

- marcajul cu timidină triturată
- marcajul cu bromodeoxiuridină (BrdU)
- citometria în flux și analiza de imagine

III. Colorarea organizatorilor nucleolari

IV. Metode imunohistochimice

I. NUMĂRAREA MITOZELOR

Faza mitotică este singura fază a ciclului celular ce poate fi recunoscută în rutină, prin simplul examen microscopic. Este metoda cea mai veche și cea mai simplă de cuantificare a proliferării celulare și ea poate fi evaluată pe colorațiile standard uzuale (2).

Exprimarea numărului de mitoze la 100 de celule tumorale, poartă numele de *index mitotic* (IM), și pare metoda cea mai reproductibilă și în același timp cea mai corectă, deoarece ține cont și de volumul celular (3).

Există numeroase studii care investighează valoarea IM în diferite tumori. Astfel, în cancerul ovarian, câțiva autori au găsit IM ca fiind un important factor prognostic (4). În cancerul de sân, se pare că el este cel mai bun factor prognostic, lucru demonstrat încă acum 50 de ani (5). În câteva tumori mai rare, IM este considerat important pentru a face distincția între o creștere tumorală benignă și malignă (6).

Pentru CCT, numărul de mitoze este inclus ca și criteriu de gradare a tumorilor în clasificarea OMS 1973.

Unii autori consideră că în cazul CCT ale vezicii urinare, atât numărul mitozelor, cât și indexul mitotic nu pot fi folosiți ca parametri independenți, de apreciere a proliferării celulare, activitatea mitotică putând fi luată în considerare doar împreună cu alți indicatori prognostici fie clinici, fie patologici (3).

Pentru alți autori, indicele mitotic ar oferi o excelentă informație prognostică (7). Studiile statistice uni și multivariate, mai recente ale lui *Lipponen* și *Eskelien* analizează relația dintre diferiți factori clinici, histologici, morfometrici și supraviețuirea bolnavilor. Dacă gradul histologic (WHO 1973), stadiul tumoral (categoria T), densitatea infiltratului limfocitar, aspectul papilar sau nodular al tumorilor au fost găsiți ca având o valoare prognostică pe termen scurt, singura variabilă cu valoare prognostică independentă și pe termen lung, a fost indexul mitotic (8,9). Mai mult, ei demonstrează statistic că, pe baza analizei frecvenței mitotice, carcinoamele cu celule tranziționale pot fi împărțite în categorii cu valoare prognostică, sugerând un nou sistem de clasificare pentru CCT superficiale (10).

II. CONȚINUTUL IN ADN

O metodă modernă de investigare a cineticii celulare este investigarea procesului de sinteză a ADN-ului.

O celulă somatică normală are un genom diploid; sinteza ADN-ului pe parcursul fazei S a ciclului celular, duce la dublarea informației genetice și celula devine temporar din diploidă, tetraploidă. Acest proces poate fi revelat și măsurat prin mai multe modalități:

1. Marcajul cu timidină triturată

Introducerea timidinei triturate și a tehnicilor de autoradiografie cu înaltă rezoluție prin anii 1950, a făcut ca acest marcaj să fie considerat ca un "Gold Standard" în studiul cineticii celulare (2). În momentul de față, datorită numeroaselor sale inconveniente, această tehnică are doar un interes istoric.

Timidina este încorporată în ADN-ul celulelor vii în cursul fazei S a ciclului celular. Aceasta presupune fie administrarea in vivo a timidinei marcate radioactiv, ceea ce rar este justificat în practica curentă, fie incubarea in vitro a celulelor imediat după recoltare și înainte de fixare. Se efectuează apoi autoradiografiile, determinându-se numărul de celule marcate în comparație cu cele nemarcate (2).

Indicele de colorabilitate cu timidină a fost considerat ca indicator prognostic în numeroase afecțiuni maligne, ca de exemplu în cancerul de sân, mielomul multiplu, limfoamele non-hodgkiniene sau ca marker al predispoziției genetice pentru cancer de colon.

În ultimii ani, mai ales după punerea la punct a altor tehnici, acestei metode i se aduc numeroase critici, mai ales faptul că necesită celule vii și manipularea de substanțe radioactive, ceea ce îi limitează mult utilizarea în practica curentă (11).

2. Incorporarea bromodeoxituridinei (BrdU)

Bromodeoxituridina (BrdU) este un analog al pirimidinei, care este încorporată rapid în celule în cursul fazei de sinteză a ADN-ului. Avantajul față de timidină este că BrdU având structură antigenică, a permis elaborarea unor anticorpi monoclonali specifici anti-BrdU de către Gratzner (12). Această posibilitate de a o pune în evidență prin metode imunohistochimice, înlătură marele dezavantaj al timidinei și anume manipularea de substanțe radioactive.

Marcajele cu timidină triturată și cu BrdU, dau rezultate similare, ambele marcând celulele aflate în faza S a ciclului celular.

Dezavantajele metodei sunt aproximativ similare cu cele ale încorporării de timidină, în special necesitatea administrării in vivo, ceea ce pune uneori probleme etice, fie a încorporării in vitro, pe celulele vii, ceea ce nu este totdeauna la îndemână în practica curentă.

Pentru tumorile de vezică urinară, în cele câteva studii experimentale publicate până în prezent, marcajul cu BrdU este considerat ca un bun indicator al proliferării celulare pe țesuturi proaspete, unii autori considerând că marcajul cu BrdU are o bună valoare prognostică (13) mai ales în corelație cu alți indicatori ai proliferării celulare, ca evidențierea imunohistochimică a PCNA și Ki-67 (14), sau cu faza S a ciclului celular determinată prin citometrie în flux (15). Acest marcaj este de un real folos pentru evaluarea rapidă a fracțiunii proliferative a unei tumori vezicale, dar faptul că încorporarea BrdU se face numai în celule vii, îi limitează utilizarea în practica curentă.

3. Citometria în flux

Citometria în flux (CMF), permite caracterizarea profilului conținutului în ADN și aprecierea proliferării celulare pentru un număr mare de celule aflate într-o suspensie monodispersată. Ea permite punerea în evidență a clonelor celulare cu un conținut anormal în ADN (ADN aneuploid) și în acest fel permite evaluarea potențialului proliferativ al unei tumori.

Principiul citometriei în flux

După cum s-a amintit mai sus, într-o populație celulară asincronă (de exemplu în creștere exponențială) o parte a celulelor se află în faza G0 sau G1 a ciclului celular, ele au un conținut fix în ADN, egal cu 2c. O altă parte, dar în cantitate mai mică, se află în faza G2 sau M a ciclului celular și au un conținut în ADN egal cu 4c. În fine, celulele care se afla în faza S, au un conținut în ADN, cuprins între 2C și 4C. (16).

Această repartizare a celulelor pe parcursul ciclului celular, se poate reprezenta sub forma unei histogramme teoretice, ce are aspectul celei din figura 1a.

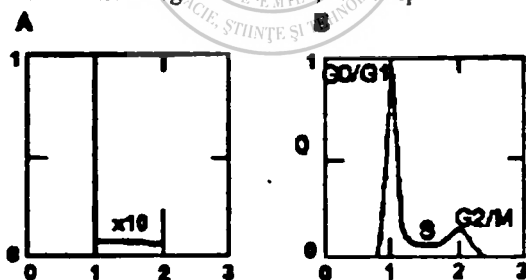


Fig. nr. 1a: Histograma teoretică a conținutului în ADN al unei populații celulare. O parte a celulelor are un conținut de ADN egal cu 2C (faza G0/G1). O parte are un conținut în ADN egal cu 4C (faza G2/M). O altă parte are un conținut în ADN cuprins între 2C și 4C (faza S).

Fig. nr. 1b: Histograma reală a conținutului în ADN al unei populații celulare obținută prin CMF. Vârfulurile G0/G1 și G2/M prezintă o distribuție gaussiană a intensităților de fluorescență a ADN-ului.

Dacă un marker fluorescent (în particular iodura de propidium, IP) este fixat de ADN, înaintea examinării celulelor prin citometrie în flux, cantitatea de fluorescență emisă de marker, se poate corela cu cantitatea de ADN conținută în nucleu (16). Rezultatele se exprimă cel mai des sub formă de histogramme, ca cea reprezentată în fig. 1b. Diferențele dintre histograma teoretică și cea reală, se datoresc erorilor proprii citometrului pe de o parte, pe de altă parte, variațiilor de marcaj ale ADN-ului.

Parametrii determinați în citometria în flux

Cu ajutorul citometriei în flux se pot determina mai mulți parametri:

A. Profilul conținutului în ADN

Determinarea conținutului în ADN este fondată pe marcajul ADN-ului cu florocromi, în mod particular IP. Cantitatea de florocromi legați de celulă, și în consecință intensitatea de fluorescență emisă, depinde de cantitatea de ADN conținută în nucleu și doar în mai mică măsură de conformația cromatinei, care condiționează accesibilitatea ADN-ului la florocromi.

Profilul conținutului în ADN este observat pe histogramme de fluorescență: pe ordonată - numărul elementelor analizate ce se proiectează în fiecare canal de intensitate, iar pe abscisă - intensitatea de suprafață a semnalului de fluorescență emis de fiecare dintre elementele analizate. Această histogramă este realizată numai pentru elementele ce se proiectează în zona de interes delimitată printr-o fereastră.

Profilul conținutului în ADN este caracterizat prin (17,18):

a) numărul de (populații) clone celulare prezente în eșantion, clone identificate prin cantitatea de florocrom (IP) intercalat în ADN;

b) indexul ADN al(e) clonei(lor) celulare, ce corespunde valorilor modale ale vârfurilor GO/G1 ale celulelor de analizat și ale celulelor normal diploide deci ale standardului intern. Indexul ADN al unei populații celulare ce are un conținut normal de ADN este egal cu 1;

c) caracterul omogen sau heterogen al cantității de IP intercalată, care se va exprima prin CV al vârfurilor.

Profilul conținutului în ADN este normal, când este prezentă o singură populație (clonă) celulară și indexul său ADN este egal cu 1. Vârful GO/G1 al acestei clone este fin (CV mic), cantitatea de IP intercalată în ADN-ul fiecărei celule este omogen. Această populație celulară este diploidă.

Profilul conținutului în ADN este anormal când:

- în eșantionul examinat este prezentă o singură clonă celulară iar indexul său ADN este diferit de 1. Această populație celulară este o populație aneuploidă;

- sunt prezente în eșantion una sau mai multe clone celulare, cu un conținut de ADN anormal dar omogen;
- este prezentă o singură populație celulară ce intercalează IP în mod heterogen.

B. Proliferarea celulară

Citometria în flux permite culegerea de informații asupra proliferării celulare, prin determinarea :

- proporției de celule prezente la un moment dat în diferitele faze ale ciclului celular,
- proporției de celule ce exprimă diferiți indicatori ai proliferării celulare,
- proporției de celule ce sintetizează ADN-ul.

În urologie, pentru tumorile vezicale, CMF nu poate fi utilizată ca metoda de depistaj pentru o populație expusă profesional, nici ca metoda de supraveghere și depistare sistematică. Această metodă trebuie folosită numai pentru bolnavii ce prezintă o tumoră vezicală deja diagnosticată, fie pentru verificarea diagnosticului histopatologic, fie pentru evaluarea eficacității unui tratament deja aplicat (19).

Pentru mulți autori, ploidia ADN-ului pare a fi cea mai corectă determinare din CMF, prezintă corelații semnificative cu gradul și stadiul tumorilor vezicale și acesta este de fapt domeniul care este exploatat cu prioritate.

Dacă tumorile diploide au un risc redus de recidivă, cele aneuploide evoluează frevent spre recidivă și infiltrație (20). Se pare că este posibil în acest fel, identificarea unor grupe de pacienți cu CCT, care necesită fie o urmărire clinică mai atentă, fie un tratament mai agresiv de la început (21).

Valoarea indexului ADN are de asemenea o valoare prognostică, valoarea lui fiind invers proporțională cu activitatea mitotică a tumorii respective: cu cât indexul ADN crește de la 1,5 spre 2, cu atât activitatea mitotică diminuează. Astfel că, tumorile aneuploide cele mai agresive sunt cele care au indexul ADN cel mai scăzut, deci în jurul valorii de 1,5.

Prognosticul defavorabil al CCT cu index ADN în jurul valorii de 1,5, este deci consecința unei activități mitotice ridicate. O proliferare rapidă permite acestor celule să parcurgă în mod accelerat etapele ciclului celular, pentru a ajunge rapid la regiunea triploidă de index 1,5, caracteristică infiltrației.

Se poate spune în sfârșit că avantajul citometriei în flux este de a putea analiza în câteva secunde mai multe mii de celule și că informația furnizată este reprezentativă datorită numărului mare de celule examinate. În același timp informația este obiectivă și reproductibilă, mai ales în cazul determinării ploidiei și a indexului ADN.

Cel mai mare dezavantaj este prețul mare al echipamentului necesar, faptul că țesuturile trebuie disociate pentru a fi analizate, pierzându-se în acest fel relația spațială dintre celule, precum și dificultatea unui control histologic al fragmentului analizat. În plus, după cum s-a amintit mai sus, CMF nu poate detecta nici micile clone aneuploide și nici anomaliile minime ale cromozomilor.

III. COLORAREA ORGANIZATORILOR NUCLEOLARI

Organizatorii nucleolari, sau NOR (nucleolar organiser regions) reprezintă fragmente de ADN, care conțin genele pentru ARN-ul ribozomal asociate unor proteine acide nucleare a căror funcție nu este încă pe deplin înțeleasă.

Aceste proteine sunt argirofile și sunt cunoscute sub denumirea de AgNOR. Argirofilia și deci posibilitatea de a le pune în evidență printr-o simplă colorație cu argint, a fost descoperită de *Goodpasture* (22) și popularizată de *Crooker* (23). Pe preparatele histologice, ele apar sub forma unor mici puncte negre, permițând cuantificarea lor.

Tehnica simplă și reproductibilă a făcut ca mulți cercetători să-și îndrepte atenția spre AgNOR, unii dintre ei găsind corelații semnificative între numărul AgNOR și gradul sau stadiul diferitelor tumori: melanoame (24), limfoame (25), tumori cutanate (26). Nu aceleași corelații semnificative s-au găsit de exemplu în tumorile de sân sau în tumorile "borderline" (27).

Pentru tumorile de vezică urinară, tehnica AgNOR nu pare a avea o valoare deosebită, de vreme ce rezultatele exprimă modificările a 50-100 de celule, ceea ce nu este reprezentativ pentru tumori heterogene cum sunt carcinoamele cu celule tranzitoriale (28,29).

IV. IMUNOHISTOCHIMIA

Numeroase studii au identificat în ultimii ani, proteine nucleare, a căror expresie este strâns legată de pasajul celulelor prin ciclul celular și de transformarea lor malignă. Aceste proteine au o structură antigenică, și se pot pune în evidență prin tehnici de imunohistochimie, cu ajutorul anticorpilor monoclonali specifici. Cum aceste antigene sunt prezente doar în celulele care proliferază, studiul imunohistochimic a devenit un important mijloc de evaluare a proliferării celulare. Diferiții anticorpi monoclonali îndreptați împotriva acestor antigene, măsoară faze diferite ale ciclului celular: antigenul Ki-67 este exprimat de celulele aflate în faza G1, S și G2/M, PCNA de celulele aflate în faza S, ADN polimeraza alfa și p105 de celulele prezente în toate fazele ciclului celular, cu excepția fazei G0.

Cele mai studiate în prezent, sunt antigenul Ki-67 și PCNA-ul.

1. Antigenul Ki-67

Antigenul Ki-67 constituie un paradox: el este foarte mult utilizat în practica citologică și histologică, dar natura și funcția sa sunt încă destul de puțin cunoscute, la mai mult de 10 ani de la punerea sa în evidență pentru prima dată.

Anticorpul anti-Ki-67 identifică deci un antigen slab caracterizat, dar asociat ciclului celular și exprimat de celulele aflate în toate fazele ciclului celular, cu excepția fazei G0 și începutul fazei G1.

Tumorile benigne au puține celule Ki-67 pozitive, totdeauna mai puțin de 10%, valorile medii oscilând între 1,1 și 4,4%. În carcinoame, procentajul de celule Ki-67 pozitive este foarte variabil, ajungând până la 60%. Deși există variații în procentajul obținut de diferiți autori, toți găsesc o corelație semnificativă între procentajul de celule marcate Ki-67, aspectul histologic, gradul tumoral și supraviețuirea bolnavilor.

De exemplu în tumorile de sân, carcinoamele lobulare ar fi mai puțin proliferative decât cele canalare, iar cele medulare cu un prognostic rezervat, au un procentaj de celule Ki-67 foarte ridicat (30).

Diferiți autori au raportat în studii preliminare o bună corelație între pozitivitatea celulelor la anticorpul anti-Ki-67 și celelalte tehnici de investigare a proliferării tumorale, în diferite tumori umane: tumori ale țesuturilor moi (30), tumori pulmonare (31), limfoame non-hodgkiniene (32).

Studiile în legătură cu expresia anticorpului Ki-67 la nivelul tumorilor uroteliale sunt recente și cuprind până în prezent un număr mic de lucrări. În cea mai mare parte a cazurilor, indexul Ki-67 (procentul de celule pozitive la 100 de celule tumorale), prezintă o corelație pozitivă cu gradul și stadiul tumoral și pare să aibă un real interes prognostic (33,34).

Dacă la începutul deceniului 9 se constată o diminuare marcată a interesului pentru acest antigen, datorită pe de o parte faptului că el putea fi pus în evidență doar pe fragmente congelate datorită sensibilității epitopului la procesele de fixare, iar pe de altă parte, datorită apariției pe piață a anticorpului anti-PCNA, evaluabil pe secțiuni la parafină, începând din anul 1993 se constată o revigorare a interesului pentru antigenul Ki-67, o dată cu comercializarea anticorpului MIB1, elaborat de *Gattoretti* (35). Acest anticorp, utilizabil pe fragmente fixate și incluse în parafină, elimină cel mai mare dezavantaj al anticorpului Ki-67, acela de a putea fi utilizat numai pe fragmente proaspete.

2. PCNA

Mult mai utilizat în ultimul timp decât Ki-67, este anticorpul anti-PCNA, PCNA (proliferating cell nuclear antigen) fiind o proteină nucleară.

PCNA este o polipeptidă nucleară non-histonă, care funcționează ca și cofactor pentru polimeraza delta a ADN-ului. Studii recente, sugerează că PCNA este absolut necesar pentru sinteza ADN-ului nuclear, iar rata de sinteză este în strânsă

corelație cu rata de proliferare celulară și cu fazele ciclului celular. Astfel, cantitatea sa, se dublează sau se triplează la sfârșitul fazei G1, imediat înaintea începerii ADN-ului, devine maximă și se menține în platou pe parcursul fazei S, pentru ca apoi să scadă rapid la începutul fazei G2. Celulele aflate în mitoză nu exprimă acest antigen (36,37).

O adevărată explozie de studii în legatura cu PCNA-ul a apărut o dată cu comercializarea anticorpilor utilizabili pe secțiuni la parafină. Acești anticorpi au permis efectuarea de studii retrospective ce au avut drept scop găsirea unor corelații pozitive între PCNA și alți factori cu importanță prognostică cunoscută: gradul și stadiul tumoral, indicele mitotic, încorporarea de timidină și de BrdU, alți markeri imunologici ai proliferării nucleare (Ki- 67) și mai ales cu faza S a ciclului celular, determinată în citometria în flux, cu evoluția bolnavului.

Cele mai bune corelații între indexul PCNA (procentul de celule marcate la 100 de celule tumorale) și faza S a ciclului celular, s-au găsit în limfoamele gastrice (38). Alți autori, studiind tumori fixate în metarcan (39) găsesc și ei o corelație pozitivă între indexul PCNA și faza S a ciclului celular cu mențiunea că indexul PCNA a fost găsit mai ridicat decât populația de celule aflate în faza S.

Din contră, Jain (40) pentru carcinoamele gastrice și Yu (41) pentru hemangiopericitoame nu au găsit o corelație pozitivă statistic semnificativă între acești doi parametri.

Explicația acestor discordanțe constă în primul rând în calculul fazei S, calculată în CMF. Proportia de celule calculată automat de ordinator, nu exprimă totdeauna o valoare reală, fie datorită contaminării celulelor tumorale cu celule stromale și inflamatoare, fie heterogeneității intrinseci a tumorii, fie datorită faptului că populații mici aneuploide nu pot fi detectate prin CMF. În al doilea rând, unele discordanțe se datorează și PCNA-ului. Fixarea prelungită, precum și uscarea lamelor la o temperatură mai ridicată de 60°C, poate masca situsurile specifice și poate determina o subestimare a acestei determinări. Aceasta ar fi una din explicațiile posibile pentru unele diferențe de colorabilitate nucleară în interiorul aceleiași tumori (37). De asemenea, compararea diferitelor clone de anticorpi anti-PCNA, trebuie făcută cu prudență, deoarece ele marchează epitopuri diferite și au o distribuție diferită pe parcursul ciclului celular.

În ceea ce privește tumorile de vezică urinară, până în prezent există foarte puține studii, dar în totalitate sunt de acord că imunomarcarea cu PCNA prezintă o corelație pozitivă, statistic semnificativă cu gradul și stadiul tumoral (42,43). Numeroase studii (44,45,46,47) au permis stabilirea unor corelații semnificative și cu alți indicatori ai proliferării celulare: indexul ADN, fracțiunea mitotică, AgNOR, precum și cu rata de supraviețuire a bolnavilor.

În acest context, imunomarcarea anti-PCNA, metodă foarte simplă de efectuat, pare una dintre cele mai promițătoare metode pentru practica curentă, cu fragmente fixate fie în formol, fie în soluție Bouin. Dar cum anticorpii anti-PCNA sunt achiziți recent, sunt necesare studii mai ample pentru a le demonstra valoarea prognostică.

După enumerarea celor mai cunoscute metode de evaluare a proliferării tumorale, trebuie să ne punem câteva întrebări :

- se pot folosi oare acești indicatori ai cineticii tumorale în practica clinică ca indicatori prognostici?
- pot ei oare identifica subgrupe de pacienți cu risc de progresiune a bolii și deci cu o supraviețuire mai scurtă?
- rezultatele pot fi ele utilizate pentru nuanțarea terapiei?
- oare aceste metode merită să fie făcute?

Pentru moment nu există un răspuns tranșant la aceste întrebări. Nici unul din parametrii enumerați mai sus, nu poate defini singur capacitatea reală de creștere a unei tumori sau potențialul său metastatic sau de recidivă, dar pentru cea mai mare parte a autorilor, ei pot constitui indicatori foarte utili.

Dacă ținem cont și de faptul că metodele de evaluare a markerilor de proliferare nucleară, trebuie să fie simple, reproductibile, aplicabile pe materiale prelucrate convențional, simple la interpretare, puține dintre ele pot fi utilizate în mod efectiv, în rutină, multe constituind încă doar obiect de cercetare.

Nici una dintre aceste metode nu poate fi utilizată singură pentru a aprecia evoluția tumorală, ci ca o ramură a unui arbore decizional, deci ca metodă complementară parametrilor histologici clasici, care rămân încă suverani. Unele dintre ele necesită încă standardizări ale tehnicii și ale evaluării rezultatelor, care trebuie încă definite, acceptate și implementate în practică în mod uniform.

Singura utilizată în prezent în practica curentă este numărarea mitozelor, datorită simplității ei. Cea mai fiabilă este determinarea ploidiei și a indexului ADN-ului tumoral. Cele mai promițătoare în acest moment sunt metodele de imunomarcaj anti-PCNA și anti-MIB1, care pot fi efectuate de o manieră simplă, în orice laborator dotat pentru tehnici imunohistochimice, pe țesuturi fixate și incluse în parafină. Buna corelație cu criteriile histologice clasice, și cu alți indicatori ai proliferării celulare, buna valoare prognostică, încurajează cercetările viitoare asupra aplicabilității imunomarcajului anti-PCNA și a fracțiunii proliferative în evaluarea prognostică a tumorilor în general și deci și a carcinoamelor uroteliale.

Bibliografie

1. *Lipponen P.K.* et al.: Classic prognostic factors, flow cytometric data, nuclear morphometric variables and mitotic indexes as predictors in transitional cell bladder cancer. *Anticancer Res* 1991, *11*, 911-916;
2. *Hull P.A., Levison D.A.*: Review: Assessment of cell proliferation in histological material. *J.Clin.Pathol.* 1990, *43*, 184-192;
3. *Quinn C.M., Wright N.A.*: The clinical assessment of proliferation and growth in human tumors : Evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J.Pathol.* 1990, *160*, 93-102;

4. *Haapasalo H.K., et al.*: Comparison of three quantitation methods for PCNA immunostaining: applicability and relation to survival in 83 astrocytic neoplasms. *J. Pathol.* 1993, *171*, 207-214;

5. *Bloom H.J., Richardson W.W.*: Histological grading and prognosis in breast cancer. *Br J. Cancer* 1957, *11*, 359-365;

6. *Silverberg S.G.*: Reproducibility of the mitosis count in the histologic diagnosis of smooth muscle tumors of the uterus. *Hum. Pathol.* 1976, *7*, 451;

7. *Vasko J. et al.*: Prognostic value of a systematized method for determination of mitotic frequency in bladder cancer assisted by computerized image analysis. *J. Urogenital Pathol.* 1991, *1*, 53-59;

8. *Lipponen P.K., Eskelinen M.J.*: How to count mitoses in bladder cancer grading? *Anticancer Res.* 1991, *11*, 825-829;

9. *Lipponen P.K. et al.*: Clinical prognostic factors in transitional cell cancer of the bladder. *Urol. Int.* 1993, *50*, 192-197;

10. *Lipponen P.K. et al.*: Grading of superficial bladder cancer by quantitative mitotic frequency analysis. *J. Urol.* 1993, *149*, 36-41;

11. *Smallwood J.A., Cooper A., Taylor L.*: The errors of thymidine labelling in breast cancer. *Clin. Oncol.* 1983, *9*, 331-335;

12. *Gratzner H.G.*: Monoclonal antibody to 5-bromodeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science*, 1982, *218*, 474-475;

13. *Popert R.J. et al.*: Bromodeoxyuridine labelling of transitional cell carcinoma of the bladder - an index of recurrence? *Br J. Urol.* 1993, *71*, 279-283;

14. *Tsujihashi H. et al.*: Cell proliferation of human bladder tumors determined by BrdUrd and Ki-67 immunostaining. *J. Urol.* 1991, *145*, 846-849;

15. *Tachibana M. et al.*: Prognostic significance of bromodeoxyuridine high labeled bladder cancer measured by flow cytometry: does flow cytometric determination predict the prognosis of patients with transitional cell carcinoma of the bladder. *J. Urol.* 1993, *149*, 739-743;

16. *Lacombe F.*: Techniques d'étude du cycle cellulaire par cytométrie en flux en hématologie et en cancérologie. *Rev. Fr. Lab.* 1991, *218*, 29-36;

17. *Vago P.*: Clinical flow cytometric DNA analysis of human solid tumors. *Bull. Cancer*, 1995, *82*, 122-128;

18. *Hedley D.W., Shankey T.V., Wheelless L.L.*: DNA cytometry consensus conference. *Cytometry*, 1993, *14*, 471-477;

19. *Lipponen P.K.*: Review of cytometric methods in the assessment of prognosis in transitional cell bladder cancer. *Eur. Urol.* 1992, *21*, 177-183;

20. *Hamano K., Kinjo M., Kumazawa J.*: Flow-cytometric deoxyribonucleic acid analysis of human bladder cancers with reference to histopathological findings. *Eur. Urol.* 1992, *22*, 153-157;

21. *Norming U. et al.*: Prognostic significance of mucosal aneuploidy in stage Ta/T1 grade 3 carcinoma of the bladder. *J. Urol.* 1992, *148*, 1420-1426;

22. *Goodpasture C., Bloom S.E.*: Visualisation of nucleolar organiser regions in mammalian chromosome using silver staining. *Chromosoma* 1986, 53, 37-50;
23. *Crocker J.*: Nucleolar organizer regions. In : Underwood JCE, ed. Current topics in pathology: Nuclear pathology. Berlin: Springer Verlag, 1989.
24. *Leong A. S-Y, Gilham P.*: Silver staining of nucleolar organizer regions in malignant melanoma and melanotic nevi. *Hum. Pathol.* 1989, 20, 257-262;
25. *Crocker J., McCrtney J.C., Smith P.J.*: Correlation between DNA flow cytometric and nucleolar organizer region data in non-Hodkin's lymphoma. *J. Pathol.* 1988, 154, 151-160;
26. *Egan M.J., Crocker J.*: Nucleolar organizer regions in cutaneous tumours. *J. Pathol.* 1988, 154, 247-253;
27. *Lipponen P.K., Eskelinen M.J.*: Nucleolar organizer regions(NORs) in bladder cancer, relation to histological grade, clinical stage and prognosis. *Anticancer Res.* 1991, 11, 75-80;
28. *Limas C. et al.*: Proliferative activity of urothelial neoplasms. Comparison of BrdU incorporation, Ki-67 expression and nucleolar organiser regions. *J. Clin. Pathol.* 1993, 46, 159-165;
29. *Charpin C. et al.*: Fraction de croissance (Ki- 67), balance de ploidie et index de prolifération dans les tumeurs du tractus urogénital et du sein. *Ann Pathol.* 1989, 9, 331-339;
30. *Ueda T. et al.*: Prognostic significance of Ki-67 reactivity in soft tissue sarcomas. *Cancer*, 1989, 63, 1607-1611;
31. *Gatter K.C. et al.*: New approach to assessing lung tumors in man. *J. Clin. Pathol.* 1986, 39, 590-593;
32. *Veneroni S. et al.*: Comparative analysis of ³H-thymidine labelling index and monoclonal antibody Ki-67 in non-Hodgkins lymphoma. *Hematol. Oncol.* 1988, 6, 21-28;
33. *Mudler A.H. et al.*: Prognostic factors in bladder carcinoma: histologic parameters and expresion of a cell cycle related nuclear antigen (Ki-67). *J. Pathol.* 1992, 166, 37- 43;
34. *Fontana D. et al.*: Monoclonal antibody Ki-67 in the study of proliferative activity of bladder carcinoma. *J. Urol.* 1992, 148, 1149-1151;
35. *Gattoreti G. et al.*: Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB1 and MIB2) detect proliferating cells in microwave-processed formalin fixed paraffin sections. *J. Pathol.* 1992, 168, 357-363;
36. *Bravo R. et al.*: Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase delta. *Nature*, 1987, 326, 515- 517;
37. *Hall P.A. et al.*: Proliferating cell nuclear antigen(PCNA) immunolocalisation in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol.* 1990, 162, 285-294;

38.Woods A.L.L. et al.: The prognostic value of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) immunostaining in gastrointestinal lymphomas. *J Pathol.* 1990, 161-342A;

39.Garcia R.L.,Collera M.D., Gown A.M.: Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. *Am. J. Pathol.* 1989, 134, 733-739;

40.Jain S. et al.: Prognostic value of proliferating cell nuclear antigen in gastric carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 1991, 44, 655-659;

41.Yu C. et al.: Immunohistochemical staining with a monoclonal antibody to proliferating cell nuclear antigen may be a good indicator of prognosis in haemangiopericytomas. *J. Pathol.* 1990, 161. 342A;

42.Skopelitou A., Korkolopoulou P., Papanicolaou A.: Comparative assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining and of nucleolar organiser regions staining in transitional cell carcinomas of the urinary bladder. *Eur. Urol.* 1992, 22, 235-240;

43.Lipponen P.K., Eskelinen M.J.: Cell proliferation of transitional cell bladder tumors determined by PCNA/cyclin immunostaining and its prognostic value. *Br. J. Cancer*, 1992, 66, 171-176;

44.Kuczyk M.A. et al.: Value of proliferation status (PCNA) and p53 immunohistochemistry as a prognostic factor for clinical course of superficial cancer of urinary bladder. *Urology*, 1995, A 34, 146-152;

45.Pick A. et al.: Cell proliferation indices, morphometry and DNA flow cytometry provide objective criteria for distinguishing low and high grade bladder carcinomas. *Wirschows Arch.* 1994, 424, 143-148;

46.Serio G.: PCNA/cycline expression in transitional cell carcinomas of the human bladder:its correlation with Ki-67 and epidermal growth factor receptor immunostainings.*Pathologica*, 1994, 86, 161-166;

47.Hattori K. et al.: Proliferating cell nuclear antigen/cyclin in human transitional cell carcinoma. *Br. J. Urol.* 1995, 75, 162-166.

CELL PROLIFERATION MARKERS. THEIR EXPRESSION IN DIFFERENT TUMOURS AND IN TRANSITIONAL CELL CARCINOMA

Angela Borda, Nicole Berger, E.Piaton

Cell kinetic information is at present an important adjunct to histologically-based tumour classification. In this article, we present the most important methods to assess cell proliferation in different tumours and in transitional cell carcinoma of the bladder: mitosis count, the DNA content, nucleolar organiser regions and the immunohistochemical demonstration of Ki-67 and PCNA antigens. For each of these methods, the advantages and the disadvantages are discussed.

Sosit la redacție: 24.05.1996