

# PRINCIPI INTERPRETATIVI IN CITOLOGIA ONCOLOGICA

DAVIDE DE LORENZI

Medico Veterinario, Specialista in "Clinica e Patologia degli Animali da Affezione" - Forlì

## INTRODUZIONE

L'esame citologico rappresenta una tecnica di oramai consolidata importanza anche in Medicina Veterinaria; la valutazione delle linee cellulari implicate nel processo patologico permette al clinico di eseguire un rapido screening ed anche se una diagnosi definitiva non viene a volte emessa, tuttavia, la natura generale del problema può essere individuata rapidamente se viene impiegato un approccio ragionato e metodico al campione esaminato.

Quando una diagnosi definitiva non viene raggiunta, il risultato dell'esame citologico ci permette comunque di indirizzare i successivi eventuali approfondimenti diagnostici (ad es. esame colturale, istologico, radiologico, ecografico, chirurgia esplorativa, ecc...).

Sicuramente, la prima e più importante informazione che è possibile ottenere dall'analisi del campione citologico è l'identificazione della lesione come infiammatoria o come neoplastica.

Un classico algoritmo per l'approccio al campione citologico viene illustrato nella Tabella 1.

Una volta identificata la natura neoplastica della lesione, risulta di particolare importanza cercare di definirne il comportamento biologico, in altre parole di classificare il tumore come "benigno" oppure "maligno".

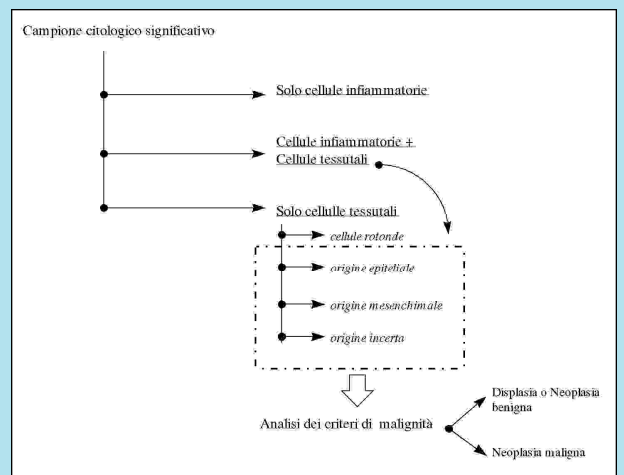
Questa relazione ha lo scopo di valutare i principali criteri citologici di malignità e di spiegarne il significato.

La prima, importantissima valutazione che dobbiamo fare, analizzando un campione citologico, è stimare l'adeguatezza dello striscio; in altre parole, devono essere valutate la cellularità generale, la conservazione delle cellule, la qualità della colorazione e aver cura che il nome del proprietario e la sede del prelievo siano scritti sulla banda sabbiata del vetrino e sul modulo di accompagnamento. Se anche uno solo di questi elementi appare inadeguato o mancante, bisogna evitare di formulare una diagnosi, limitandosi ad indicare il motivo dell'inadeguatezza del campione e ripetendo l'agoaspirazione.

Un altro concetto importante è quello della rappresentatività del campione che stiamo analizzando; infatti, a seconda della zona che abbiamo aspirato, possiamo ritrovare, in percentuali variamente rappresentate sul vetrino cellule infiammatorie, neoplastiche, tissutali normali oppure necrosi.

Proprio per questo motivo, prima di emettere una diagnosi citologica, è obbligatorio valutare tutti i vetrini che abbiamo a disposizione.

**Tabella 1**  
Approccio al campione citologico: la valutazione dei criteri di malignità rappresenta un passaggio obbligato, una volta stabilita la natura neoplastica della patologia



**Nessuna delle valutazioni che saranno l'oggetto di questa relazione può e deve essere fatta se non si è sicuri della adeguatezza e della rappresentatività del campione citologico in esame.**

## CRITERI DI MALIGNITÀ

La morfologia delle cellule è espressione della loro attività biologica; essa, infatti, da una parte ci indica la biologia genetica e molecolare della cellula stessa, mentre dall'altra riflette quello che è il comportamento biologico del tessuto e dell'ospite al quale appartiene.

Come conseguenza di queste considerazioni, possiamo certamente affermare che lo studio della morfologia cellulare rappresenta un passaggio fondamentale per lo studio e la comprensione di quella miriade di processi fisiologici e patologici che coinvolgono la cellula, il tessuto e quindi l'ospite.

Anche se questi processi sono innumerevoli, le cellule reagiscono con un limitato numero di risposte, che possono essere catalogate in alcune classi generali, per una migliore e più facile comprensione dei processi patologici.

In particolare, l'attività biologica generale della cellula viene indicata dalle caratteristiche nucleari, mentre la specifica attività funzionale viene meglio descritta dalla morfologia citoplasmatica, che manifesta le differenziazioni caratteristiche di una particolare attività cellulare.

Da un punto di vista didattico, i criteri di malignità possono essere divisi come segue:

- 1) Criteri di malignità della singola cellula:
  - a) nucleari;
  - b) citoplasmatici;
- 2) Criteri di malignità della popolazione cellulare;
- 3) Criteri di malignità indiretti.

**Importante:** In citologia diagnostica, esiste un solo ed indiscutibile criterio di malignità, e cioè il ritrovare cellule metastatiche (e cioè estranee) a livello di un tessuto o di un fluido ove queste non dovrebbero esistere. In assenza di questo reperto, nessuno dei criteri che descriveremo, permetterà *da solo* di esprimere un criterio definitivo di malignità o benignità. Il giudizio finale dipenderà dalla somma e dall'importanza dei criteri di malignità evidenziati, anche in relazione al tipo di neoplasia sospettata.

In linea generale, i più forti criteri di malignità sono quelli evidenziati a livello di nucleo cellulare, di mitosi cellulare e di architetture cellulari.

Una ultima considerazione di ordine generale: se è vero che un campione che presenta molti ed importanti criteri di malignità spesso è in effetti un tumore maligno, il non ritrovarne non può mai permetterci di escludere al 100% la presenza di una malignità, e questo come conseguenza delle particolari caratteristiche del campione citologico, che può essere più o meno rappresentativo del tessuto analizzato.

Esistono, inoltre, neoplasie (come alcuni carcinomi tiroidei nel cane) che, pur non presentando nessuno dei caratteri classici di malignità, hanno un comportamento biologico assolutamente maligno.

## CRITERI DI MALIGNITÀ DELLA SINGOLA CELLULA

### Nucleari

Rientrano, in questa categoria, alcuni fra i più importanti e significativi criteri di interpretazione delle caratteristiche di malignità delle cellule.

Prima di parlare di queste caratteristiche, facciamo un breve ripasso delle strutture che si trovano dentro il nucleo evidenziandone, in particolare, la loro funzione: potremo in questo modo capire meglio perché alterazioni presenti a questo livello diventano così importanti nel giudizio finale di malignità.

Accenneremo anche al concetto di euplasia, ovvero di normalità cellulare, poiché solo conoscendo le caratteristiche fisiologiche delle cellule sarà possibile evidenziare gli aspetti patologici.

**Nucleoli:** sono costituiti da RNA e proteine associate al RNA, e sono il sito di sintesi dei ribosomi.

Con le colorazioni di Romanowsky (MGG, DQ, Wright) essi appaiono colorati in azzurro o blu chiaro, con margini generalmente non perfettamente definiti, mentre con la colorazione di Papanicolau appaiono a limiti netti e precisi e di colore variabile rosso-arancio.

La quantità di materiale nucleolare è direttamente proporzionale alla quantità di proteine prodotte in quel momento dalla cellula: vi sono cellule che, fisiologicamente, hanno nucleoli prominenti poiché la loro produzione proteica è costantemente alta (ad es. gli epatociti e le cellule intestinali), mentre vi sono cellule che hanno minuscoli nucleoli (ad es. le cellule prostatiche normali).

Nelle infiammazioni croniche e nei tessuti cicatriziali è reperto comune il rilevare cellule mesenchimali con nucleoli molto grandi e prominenti, come conseguenza della notevole richiesta di materiale proteico nel sito interessato dal processo patologico.

**Cromatina:** è costituita da DNA e proteine associate al DNA; rappresenta il contenuto cromosomico delle cellule in fase metabolica, non in mitosi. Durante la mitosi, la cromatina si addensa a formare i cromosomi.

Nella fase intermitotica, la cromatina si organizza a formare la *cromatina marginale (eterocromatina)*, la *trama cromatinica* e la *paracromatina (intercromatina)*.

La *cromatina marginale* rappresenta quella cromatina biologicamente inattiva che si addensa contro la superficie interna della membrana nucleare; per questa ragione, prima che il Microscopio Elettronico permettesse una più esatta conoscenza della microanatomia cellulare, la cromatina marginale veniva impropriamente compresa nella denominazione "membrana nucleare", perché la risoluzione del Microscopio Ottico (M.O.) non permetteva di distinguere fra la membrana nucleare vera e l'eterocromatina.

In realtà, la membrana nucleare vera è talmente sottile che non è rilevabile durante l'osservazione al M.O. ma la sua forma è evidenziata con precisione dalla eterocromatina disposta contro di essa. Inoltre, anche il minore o maggiore spessore che è possibile rilevare con il M.O. non è da attribuire alla membrana nucleare, ma alla quantità di eterocromatina addensata.

La *trama cromatinica* rappresenta quel "reticolato" di eterocromatina addensata ed inattiva che si estende attraverso tutto il nucleo, in diretta continuazione con la cromatina marginale. Questa può disporsi a formare filamenti (da sottilissimi a più spessi e grossolani) o granuli detti anche "cromocentri" che possono essere finissimi e conferire al nucleo l'aspetto del vetro molato oppure sempre più grossolani, fino ad assumere l'aspetto di agglomerati irregolari e disomogenei.

La *paracromatina* è quella minima parte di cromatina biologicamente attiva sempre presente nel nucleo della cellula.

La paracromatina si colora pochissimo, con ogni tipo di colorante, e rappresenta la porzione chiara del nucleo, quella che si intravede fra le maglie della trama cromatinica (Paracromatina significa "che sta vicino alla cromatina").

## IL CONCETTO DI EUPLASIA, ovvero LA CELLULA NORMALE

Viene definita "normale" quella cellula che si trova in "pace ed armonia" con le altre cellule, con l'ambiente che la circonda ed in assenza di processi patologici che la coinvolgono e la modificano.

In condizione di euplasia, le caratteristiche delle principali strutture nucleari, se osservate al microscopio ottico, sono le seguenti:

- **rotonde o arrotondate:** nucleo, nucleoli, cromocentri
- **uniformi e regolari:** pattern cromatinico, distribuzione paracromatina, spessore della cromatina marginale
- **sovrapponibili** da un nucleo all'altro in un frammento multicellulare di tessuto oppure da un nucleo all'altro di una cellula multinucleata.

### PRINCIPALI MODIFICAZIONI MORFOLOGICHE DEL NUCLEO CORRELATE ALLA PRESENZA DI NEOPLASIA MALIGNA

#### Irregolarità della membrana nucleare

Gravi irregolarità di forma della membrana cellulare sono abbastanza frequenti nelle cellule neoplastiche, mentre sono assolutamente poco comuni nelle cellule non tumorali.

Come già affermato in precedenza, non possiamo vedere la membrana nucleare vera e propria, ma possiamo valutare con precisione il suo profilo guardando la cromatina marginale che si addensa contro il margine interno della membrana stessa.

Queste anomalie di profilo fanno assumere al nucleo aspetti bizzarri (Fig. 1), per la presenza di spicole appuntite che si proiettano verso l'esterno, incisive profonde che assomigliano a "morsi" o a tagli e comunque qualsiasi altro aspetto non spiegabile con lo stato di normalità (euplasia), regressione (retroplasia) od incrementata attività (proplasia) cellulare.

#### Anomalie a carico del contenuto (ipercromatismo) e della distribuzione della cromatina

Queste anomalie si riscontrano spessissimo in associazione fra di loro e per questo vengono trattate insieme.

Con il termine *ipercromatismo* si intende un percettibile aumento di intensità di colorazione del nucleo al microscopio ottico e questo come conseguenza sia di una maggiore concentrazione di DNA che di una maggiore tingibilità dell'eterocromatina.

Questo è dovuto principalmente al fatto che le cellule neoplastiche sono in genere poliploidi ovvero, presentano una anomalia cromosomica dovuta alla presenza di un numero di cromosomi maggiore di un multiplo intero del normale assetto aploide; essendovi più DNA, vi saranno

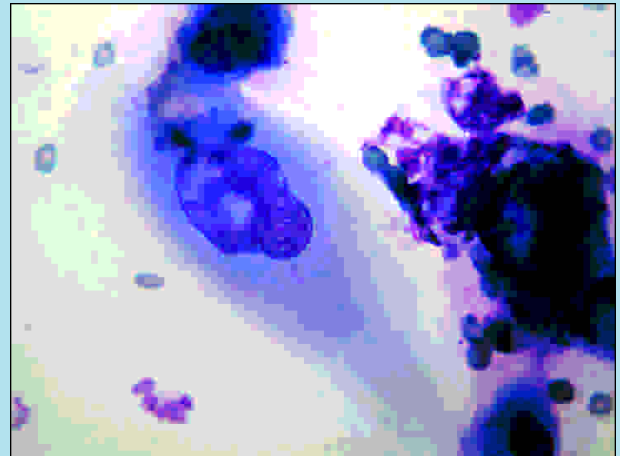


FIGURA 1 - Anomalie della membrana nucleare in questa cellula di carcinoma squamocellulare (MGG - 1000X).

più proteine ad esso collegate e sono queste che, una volta colorate, determinano l'ipercromatismo nucleare così spesso rilevabile nelle cellule neoplastiche.

L'ipercromatismo è frequentemente associato alla distribuzione irregolare della cromatina: viene abbandonata quella disposizione regolare ed uniforme presente nelle cellule in euplasia e la cromatina si addensa a formare numerosi cromocentri sotto forma di ammassi irregolari e filamenti grossolani casualmente distribuiti in tutta la trama cromatinica.

Particolarmente evidenti sono le anomalie a carico della cromatina marginale che, a volte, assume l'aspetto di spesse agglomerati alternati ad aree dove essa è così sottile da non essere evidenziabile al microscopio ottico. La marginalizzazione della cromatina nucleare ha un significato preciso: essa, infatti, è un segno precoce di degenerazione cellulare.

Per contro, la paracromatina può apparire ancora più chiara fino a diventare otticamente vuota, risaltando notevolmente con le aree ipercromatiche circostanti; questo esagerato pleomorfismo nucleare, appare ancora più evidente se il nucleo viene ipoteticamente diviso in quattro settori ed ogni settore viene paragonato agli altri: in una cellula normale, la distribuzione è omogenea e le 4 sezioni sono praticamente sovrapponibili fra di loro, come densità e distribuzione di cromatina, mentre nel nucleo della cellula neoplastica, le differenze sono molto ben evidenti fra settore e settore.

#### Anomalie a carico dei nucleoli

In seguito a vari tipi di stimoli patologici, si possono avere alterazioni nel volume, regolarità, forma e numero dei nucleoli presenti nel nucleo.

Nucleoli anche di cospicue dimensioni ( $\geq 5 \mu$ ), si possono incontrare ogniqualvolta la cellula sia impegnata nella produzione di proteine come, ad esempio, a seguito di flogosi acuta o cronica oppure di processi riparativi. Nella cellula neoplastica, al contrario, i nucleoli aumentano di volume come conseguenza del blocco nel trasporto dei prodotti nucleolari verso il citoplasma.

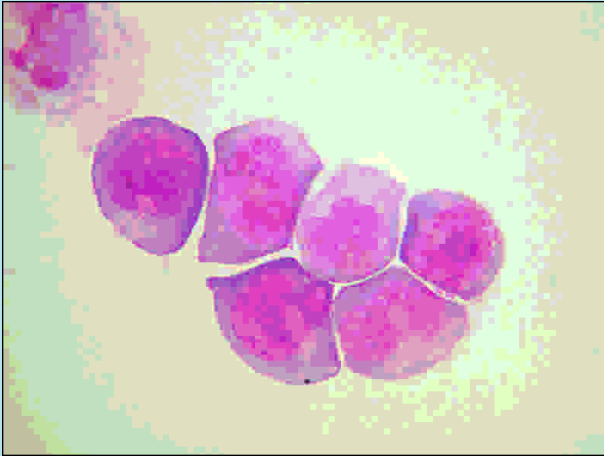


FIGURA 2 - Nucleoli multipli ed in numero diverso in cellule della stessa popolazione rappresentano un importante criterio di atipia neoplastica; in questa fotomicrografia si nota anche anisonucleolisi sia all'interno di ogni singola cellula che nel confronto fra i vari nuclei (MGG - 1000X).

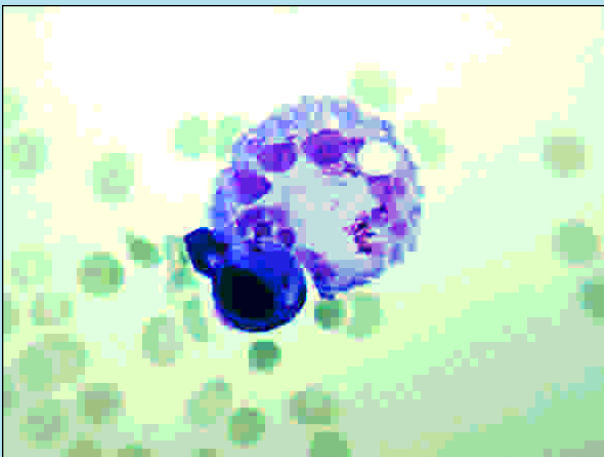


FIGURA 3 - Anisocariosi, distribuzione disomogenea della cromatina ed anisonucleolisi rappresentano forti criteri di malignità se riscontrati a carico dei vari nuclei di un elemento cellulare multinucleato (MGG - 1000X).

Sempre come conseguenza di una forte richiesta nella produzione di proteine, i nucleoli possono essere numerosi ( 5-6) e di dimensioni diverse nella stessa cellula, per cui anche l'anisonucleolisi non rappresenta, di per sé, un criterio molto importante di malignità.

Al contrario, non esiste nessuna motivazione al di fuori della presenza di una neoplasia maligna, per spiegare il riscontro di nucleoli di forme bizzarre, con spicole o margini retti ed angolati; questo aspetto, specialmente se in associazione ai due sopra menzionati, rappresenta sicuramente un forte ed importante indizio di malignità (Fig. 2).

### Molteplicità nucleare

La presenza di più nuclei all'interno di una stessa cellula, non rappresenta, di per sé, un criterio di malignità; esistono infatti numerosi esempi di polinucleosi in popolazioni cellulari del tutto normali.

Ricordiamo, ad esempio, le cellule transizionali delle vie urinarie, le cellule mesoteliali, le cellule ciliate bronchiali, gli osteoclasti, le cellule giganti da corpo estraneo, ecc.

Tuttavia, quando all'interno dei vari nuclei troviamo le caratteristiche descritte ai punti 1, 2 e 3, un sospetto di malignità deve essere emesso (Fig. 3); nella cellula neoplastica, infatti, la multinuclearità è conseguenza di divisioni nucleari (normali, ma più spesso anomale) non seguite da divisione citoplasmatica oppure, più raramente, da fusione di due o più cellule neoplastiche. I nuclei risultanti, saranno perciò colpiti in varia maniera dalle anomalie a carico di cromatina, nucleoli e membrana nucleare.

### Macrocariosi ed aumentato rapporto nucleo/citoplasma (N/C)

Un nucleo avente diametro superiore ai 10-12  $\mu$  deve essere considerato come "sospetto"; nelle cellule neoplastiche, infatti, le dimensioni del nucleo possono aumentare sia come conseguenza della poliploidia e del relativo aumento di DNA, sia come aumento dell'idratazione conseguente alle difficoltà di scambio di ioni e molecole fra i due versanti della membrana nucleare (c.d. edema nucleare funzionale).

La relazione fra volume nucleare e citoplasmatico rimane entro limiti costanti nelle cellule normali. L'aumento della componente nucleare di questo rapporto è uno dei caratteri più distintivi della malignità ed inoltre ci fornisce anche un indice del grado di differenziazione delle cellule neoplastiche, infatti, in generale, più le cellule neoplastiche sono indifferenziate più il rapporto N/C è elevato.

Un aumento di volume del nucleo può essere presente anche in cellule non maligne come risultato di vari processi patologici (infiammazione, processi riparativi, metaplasia); in questi casi, tuttavia, l'aumento del nucleo è accompagnato da un aumento globale del volume cellulare ed il rapporto N/C si mantiene entro limiti costanti di benignità.

Vale la pena di ricordare che le cellule della linea linfocitaria presentano fisiologicamente un elevato rapporto N/C.

### Mitosi anomale

Un altro importante criterio di malignità identificabile a livello di nucleo cellulare è il riconoscimento di mitosi anomale.

Come conseguenza delle gravi alterazioni a livello di materiale cromatinico, il regolare svolgimento della mitosi cellulare viene impedito ed il risultato sarà quello di una divisione anomala e bizzarra del nucleo.

I quadri più frequentemente osservabili sono quelli di divisione asimmetrica del materiale cromatinico, divisioni multipolari, cromosomi addensati ai poli del nucleo (c.d. cromosomi polari), ritardo di migrazione dei cromosomi in anafase.

Come conseguenza di queste aberrazioni, si avranno cellule multipolari con varie anomalie e livello nucleare oppure nuclei giganti, abnormi, mostruosi.

## CRITERI DI MALIGNITÀ DELLA SINGOLA CELLULA

### Citoplasmatici

Le modificazioni a carico del citoplasma, spesso facilmente evidenziabili e fortemente suggestive di malignità, devono tuttavia essere sempre considerate di secondaria importanza e come elementi complementari alle più importanti modificazioni coinvolgenti il nucleo ed i suoi elementi costitutivi.

Come già detto in precedenza, la specifica attività funzionale viene meglio descritta dalla morfologia citoplasmatica, che manifesta le differenziazioni caratteristiche di una particolare attività cellulare.

È importante avere chiaro il concetto di *differenziazione* o *maturazione cellulare*: con questo termine si intende indicare il processo che, sotto il controllo genetico del nucleo, porta alle modificazioni morfofunzionali che permettono alla cellula di specializzarsi ed esplicare il compito per la quale essa è richiesta dall'organismo. Questo comporterà particolari differenziazioni a carico della matrice citoplasmatica e della membrana cellulare; fra le prime ricordiamo lo sviluppo di tonofibrille (nelle cellule squamose dell'epidermide), di miofibrille (nelle cellule muscolari) e di neurofilamenti (nelle cellule nervose), mentre fra le seconde ricordiamo la formazione di desmosomi (che permettono la giunzione fra cellule di uno stesso tessuto permettendo un passaggio selettivo delle più svariate sostanze), di orletti striati, di ciglia, ed altro ancora.

Nella differenziazione cellulare normale, ad esempio, l'epitelio squamoso pluristratificato va incontro a maturazione diretta dalle cellule basali alle cellule superficiali corneificate: si può dire, di conseguenza, che queste ultime sono più differenziate delle cellule basali.

### Dedifferenziazione cellulare

Anche le cellule neoplastiche sottostanno al processo della differenziazione, ma questo può essere incompleto o aberrante; il concetto di differenziazione relativo a cellule neoplastiche, è rappresentato dalla somiglianza delle cellule tumorali al tessuto di origine corrispondente, per cui si definisce "differenziato" dal punto di vista citologico, un tumore le cui cellule presentino caratteristiche morfologiche tali da permettere facilmente di individuare la linea cellulare colpita: un esempio classico è quello del mastocitoma di Grado I nel quale tutte le cellule neoplastiche presentano abbondanti granulazioni a livello citoplasmatico.

Al contrario, si definisce "indifferenziato" dal punto di vista citologico, un tumore le cui cellule abbiano perso a tal punto le caratteristiche morfologiche delle cellule originarie da renderne difficile, se non impossibile, l'attribuzione del tessuto di origine: un classico esempio è quello del melanoma amelanotico, dove vengono a mancare quasi totalmente le granulazioni citoplasmatiche nero-verdastre che caratterizzano il melanocita maturo.

Il massimo livello di dedifferenziazione viene chiamato *anaplasia*.

Non sempre, comunque, il grado di differenziazione è inversamente proporzionale alla malignità della neoplasia: esistono carcinomi mucosocernenti (cioè così ben differenziati da produrre addirittura muco, come le cellule norma-

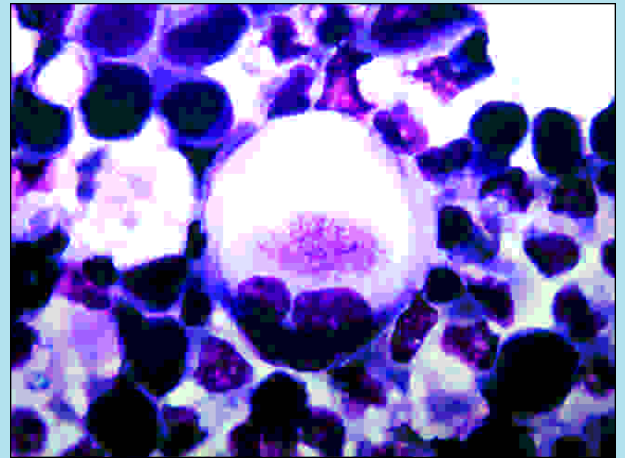


FIGURA 4 - Cellula ad anello con castone: questa particolare morfologia è tipica, anche se non esclusiva, delle neoplasie epiteliali ghiandolari (MGG - 1000X).

li) che hanno un comportamento biologico molto maligno mentre il basalioma ha un comportamento biologico certamente meno maligno del carcinoma squamocellulare, pur essendo un tumore che colpisce cellule meno differenziate della stessa linea evolutiva.

### Cellule ad anello con castone ("signet ring cells")

In alcuni adenocarcinomi, specialmente in quelli di derivazione gastrica, intestinale o mammaria, è possibile identificare cellule neoplastiche che presentano un grosso vacuolo omogeneo che colma tutto lo spazio citoplasmatico spingendo il nucleo contro la membrana citoplasmatica, deformandolo (Fig. 4).

L'aspetto finale sarà quello tipico di un anello con castone o a sigillo. Questo materiale è muco ed è generalmente positivo con la colorazione di PAS.

Pur essendo un aspetto piuttosto tipico, non è tuttavia patognomonico di adenocarcinoma; soprattutto in corso di versamenti cavitari, le cellule mesoteliali reattive possono, in fase di degenerazione, assumere l'aspetto morfologico appena descritto e questo non crea certo problemi interpretativi di poco conto, se si tiene presente la frequenza con la quale molti adenocarcinomi metastatizzano a livello di membrane sierose e di organi interni.

Il significato di questa anomalia è da ricercarsi nel fatto che queste cellule neoplastiche, pur mantenendo la capacità di produrre muco, non sono in grado di secernerlo per cui si riempiono e degenerano senza riuscire a liberarlo.

### Iperbasofilia

L'aumentata basofilia citoplasmatica è un rilievo piuttosto frequente all'osservazione con il microscopio ottico, di cellule neoplastiche.

Questa alterata tingibilità del citoplasma è conseguenza di una attività sintetica abnorme ed esagerata; il materiale proteico che si addensa, in modo afinalistico, a livello di citoplasma è responsabile di tale fenomeno.

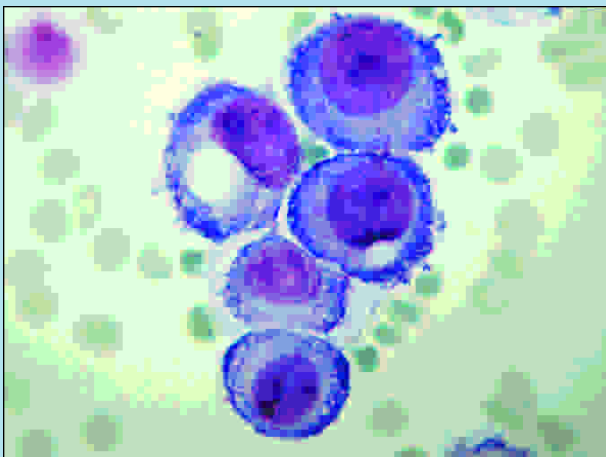


FIGURA 5 - Pleomorfismo cellulare: anisocitosi, anisocariosi, anisonucleolisi, variazioni del rapporto N/C e gradi diversi di differenziazione caratterizzano gli elementi cellulari di questa popolazione neoplastica (MGG - 1000X).

## CRITERI DI MALIGNITÀ DELLA POPOLAZIONE CELLULARE

Mentre le valutazioni fino a qui fatte, relative a nucleo e citoplasma, possono essere definite come citologia del medio e forte ingrandimento, le considerazioni relative alla popolazione cellulare possono essere definite come citologia del piccolo e medio ingrandimento.

Infatti, i criteri di malignità a questo livello vengono analizzati sia paragonando le cellule fra di loro, nella globalità dello striscio disponibile, sia valutando le caratteristiche dei frammenti di tessuto neoplastico raccolti con l'aspirazione.

### Pleomorfismo

Uno dei caratteri più salienti di malignità riscontrabile a carico di una popolazione cellulare è dato dal pleomorfismo, ovvero dalla marcata variazione di forma e volume delle cellule ed in particolare dei nuclei e del loro contenuto (Fig. 5).

In particolare, si definisce *anisocitosi* la differenza in forma e volume di cellule di una stessa popolazione; *anisocariosi* la differenza in forma e volume dei nuclei cellulari; *anisonucleolisi* la differenza in numero, forma e volume dei nucleoli presenti nei nuclei cellulari.

Queste modificazioni, a volte tanto marcate da potere essere definite drammatiche, sono la conseguenza del controllo aberrante oppure mancante, da parte del nucleo neoplastico, della crescita e della differenziazione cellulare.

Un altro aspetto importante di pleomorfismo, già descritto in precedenza, è il rilievo della variazione del rapporto N/C nell'ambito della popolazione cellulare.

### Ipercellularità

Questo parametro è fortemente influenzato dal tipo di tumore che stiamo analizzando.

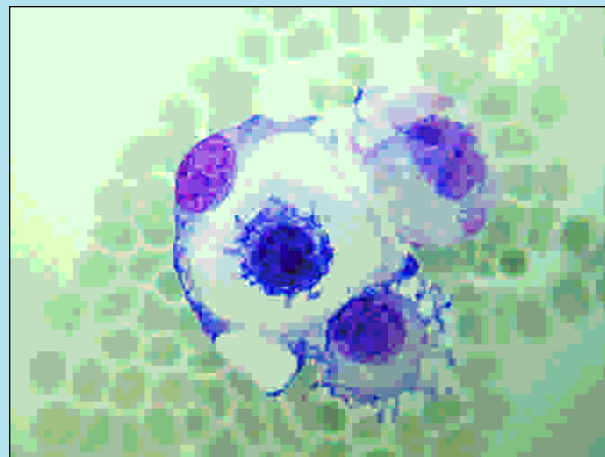


FIGURA 6 - "Cannibalismo" o pseudofagocitosi cellulare: non si tratta di un vero fenomeno di fagocitosi, ma piuttosto di una alterata capacità delle cellule neoplastiche di assumere fra di loro rapporti spaziali coerenti (MGG - 1000X).

Infatti, il rilievo di moltissime cellule è assolutamente comune in presenza di neoplasie a cellule rotonde, frequente in presenza di neoplasie di origine epiteliale ma poco comune in presenza di neoplasie di origine mesenchimale.

Il rilievo di ipercellularità a carico di una popolazione di cellule di origine mesenchimale, anche in assenza di criteri di malignità importanti, deve sempre fare sospettare una neoplasia; questo avviene perché le cellule neoplastiche mesenchimali tendono a perdere la forte coesione intercellulare che caratterizza i tessuti connettivali.

### "Cannibalismo" cellulare

Il *cannibalismo* o *inclusione cellulare* rappresenta il fenomeno per cui una cellula è contenuta nel citoplasma di un'altra cellula (Fig. 6).

Questo fenomeno è stato spiegato, dai primi citologi, come un vero e proprio quadro di fagocitosi fra cellule neoplastiche, da qui il termine "cannibalismo".

In realtà, le cose avvengono in maniera diversa: i contatti anormali che si stabiliscono fra cellule neoplastiche contigue e che hanno perduto l'inibizione da contatto possono causare profonde invaginazioni del citoplasma con il risultato che una cellula sferica sembra fagocitata all'interno di una seconda la quale, invece, la circonda con lunghe propaggini citoplasmatiche.

Questa interpretazione è confermata dal fatto che le membrane che delimitano le due cellule sono perfettamente integre presentando lo sviluppo di desmosomi normali.

Da sottolineare il fatto che questi quadri di pseudofagocitosi rappresentano rapporti intercellulari che si possono ritrovare nelle cellule mesoteliali reattive e non neoplastiche.

### Indice mitotico

Questo indice esprime il rapporto fra il numero totale delle cellule presenti ed il numero delle cellule in mitosi.

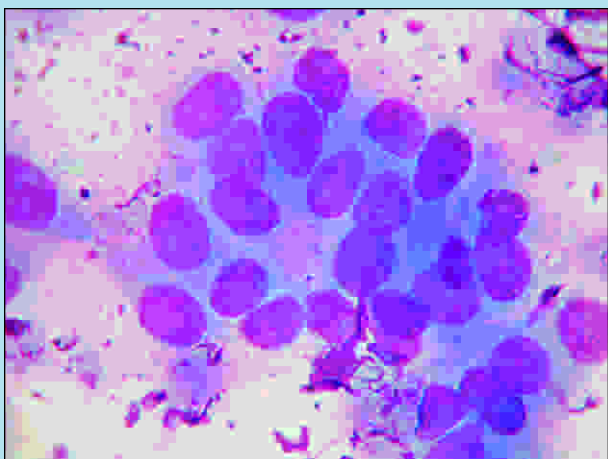


FIGURA 7 - Cellule neoplastiche a citoarchitettura acinare che denuncia l'origine ghiandolare della neoplasia (MGG - 1000X).

Pur essendo un parametro molto utile ed affidabile in istologia, non lo è altrettanto in citologia perché l'assenza di coesione fra le cellule e la variabilità della densità di queste ultime sul vetrino permette unicamente valutazioni di tipo empirico e soggettivo, che possono risentire in modo notevole dell'area dello striscio che si sta analizzando.

Dal punto di vista citologico, risulta molto più indicativo di malignità il rilievo di alcune mitosi anomale che di numerose mitosi normali.

### Citoarchitetture

Un concetto relativamente nuovo in medicina veterinaria, anche se caposaldo dell'interpretazione citologica in medicina umana da moltissimo tempo, è quello della valutazione citologica delle architetture, ovvero della disposizione reciproca delle cellule appartenenti allo stesso tessuto.

Ogni tessuto normale manifesta una determinata disposizione architettonica, conseguenza del comportamento biologico e del controllo genetico delle cellule che lo compongono (Fig. 7).

La disposizione architettonica amplifica e razionalizza la biologia di ogni singola cellula ed infatti, le cellule di un determinato tessuto non solo nascono con la capacità di esprimere determinate funzionalità metaboliche ma anche con una programmazione per disporsi reciprocamente in maniera da ottimizzare le loro potenzialità.

Quando un determinato tessuto va incontro ad una patologia neoplastica, specialmente in presenza di neoplasie mediamente o ben differenziate, è possibile rilevare nello striscio che stiamo analizzando frammenti multicellulari che conservano disposizioni architettoniche tipiche del tessuto di origine, permettendoci così di aggiungere informazioni preziose e complementari a quelle derivanti dall'analisi morfologica delle singole cellule.

È altresì vero che nelle neoplasie indifferenziate, il tessuto tumorale cresce in maniera caotica ed afinalistica, assumendo disposizioni spaziali ed architettoniche che non permettono il riconoscimento esatto del tessuto di origi-

ne: anche in citologia, come in istologia, si può parlare, in presenza di questi quadri, di "perdita di polarità" ed il suo rilievo deve sempre fare sospettare una patologia neoplastica.

### CRITERI INDIRETTI DI MALIGNITÀ

Tutte le considerazioni fino a qui fatte, sono relative alle cellule che noi sospettiamo appartenenti alla neoplasia.

Esistono tuttavia dei criteri valutativi che, pur non basandosi sulla presenza o assenza di cellule sospette, possono fare insorgere al citologo il sospetto di una neoplasia in atto: si parla di criteri "indiretti" di malignità. La loro identificazione da parte del citologo permette, se non di emettere una diagnosi di malignità, sicuramente di aumentare l'attenzione per cercare di individuare la causa della loro presenza.

### Presenza di eritrociti e di macrofagi carichi di emosiderina

La presenza, sul vetrino, di numerosi eritrociti può suggerire fenomeni emorragici secondari a forme tumorali ed il suo significato è del tutto sovrapponibile a quello della ricerca del sangue occulto nelle feci e nelle urine.

Ovviamente si tratta di un segno di nessuna importanza nei preparati ottenuti per abrasione o spazzolatura, ma assume un significato particolare in campioni che derivano da versamenti cavitari, urine, liquor cefalorachidiano e lavaggio broncoalveolare.

Come conseguenza della emorragia, possono essere evidenti numerosi siderofagi, ovvero macrofagi che hanno fagocitato eritrociti ed hanno, al loro interno, depositi di emosiderina e di ematina: la loro presenza ci indica che l'emorragia è presente da un certo periodo di tempo e che, pertanto, non può essere stata causata dalle manovre eseguite per raccogliere i campioni da esaminare.

### Fondo necrotico

Il rilievo di un fondo composto da detriti cellulari necrotici, precipitati proteici e macrofagi ripieni di questi detriti, deve fare sospettare la presenza di una neoplasia in fase avanzata.

Questo fenomeno detto "diatesi tumorale", è conseguenza sia della rapida morte e degenerazione delle cellule neoplastiche, che non sono in grado di replicarsi normalmente e di svolgere le fisiologiche attività metaboliche che spetterebbero alle cellule dalle quali derivano, sia dal fatto che il tumore, crescendo e sviluppandosi in maniera afinalistica e caotica, presenterà aree con insufficiente od assente apporto vascolare destinate ad ischemia e necrosi.

### Presenza di popolazioni cellulari reattive

La presenza di una popolazione cellulare reattiva può rappresentare la risposta dell'organismo a certi tipi di neoplasia.

In particolare, la presenza di moltissimi granulociti eosinofili in un versamento deve farci sospettare la presenza di un mastocitoma, così come la presenza di una forte reazione mesoteliale reattiva, in assenza di concomitante flogosi che ne giustifichi la presenza, deve farci insospettire riguardo la presenza di una sottostante patologia neoplastica.

## ALTERAZIONI CELLULARI SIMULANTI LA MALIGNITÀ

Esistono una serie di situazioni patologiche non neoplastiche che possono simulare quadri di malignità citologica.

La loro conoscenza è pertanto fondamentale, per non incorrere in errori le cui conseguenze possono essere drammatiche.

### Proliferazione infiammatoria

Lo stimolo infiammatorio può determinare una attiva proliferazione cellulare come risposta diretta ad un agente patogeno: come conseguenza di questa intensa proliferazione si possono osservare quadri di ingrandimento nucleare, polinucleosi, ipercromatismo, marginalizzazione della cromatina e presenza di macronucleoli.

L'interpretazione delle modificazioni cellulari infiammatorie deve focalizzarsi sulle alterazioni del citoplasma e delle strutture cromatiniche. Il volume citoplasmatico tende ad aumentare, parallelamente a quello nucleare, con un minimo spostamento del rapporto nucleo-citoplasmatico.

I nuclei possono essere polimorfi, per effetto della degenerazione cellulare indotta dalla flogosi; si possono avere anche nuclei con contorni irregolari, cromatina addensata alla periferia, carioressi e picnosi.

Di fatto, in presenza di flogosi cronica, si possono rilevare cellule tissutali fortemente sospette: per questo motivo, in presenza di linee cellulari reattivo-flogistiche (neutrofilii, linfociti, macrofagi, fibroblasti, ecc.) le valutazioni di malignità devono essere estremamente caute.

L'esame deve essere eventualmente ripetuto dopo un ciclo di terapia antibiotica e, se permangono dubbi, deve essere proposta una biopsia per una valutazione istologica.

### Iperplasia ed ipertrofia

Si definisce *iperplasia* un aumento volumetrico di organi o tessuti conseguente all'aumento numerico delle cellule che li compongono, mentre si definisce *ipertrofia* un aumento volumetrico delle singole cellule.

Questi fenomeni, spesso associati, si possono rilevare in vari tipi di epiteli e mucose (cilindrico, squamoso, transizione) come conseguenza di stimoli irritativi cronici oppure in tessuti ghiandolari (mammella, prostata) come conseguenza di attività ormonale.

Dal punto di vista citologico, le cellule epiteliali e mucose iperplastiche benigne, sono caratterizzate da un aumento delle dimensioni nucleari, con contorni regolari e cromatina a trama delicata e distribuzione uniforme.

Il rapporto nucleo-citoplasma è praticamente costante.

## Riparazione e rigenerazione

Le reazioni riparative che interessano i tessuti, si manifestano con ipertrofia nucleare e prominenza dei nucleoli, potendo così simulare la malignità.

La rigenerazione o la riparazione delle superfici epiteliali e mucose che seguono ad una lesione tissutale, avvengono mediante tessuto di granulazione. La ripitelizzazione inizia a partire dai margini della lesione e ricopre progressivamente il neoformato tessuto di granulazione con un singolo strato di cellule immature che si differenzieranno in un secondo momento.

Le cellule in attiva rigenerazione presentano caratteri morfologici simili a quelli già descritti in "Iperplasia ed ipertrofia", spesso associati ad alterazioni di tipo infiammatorio.

Dal punto di vista citologico, i nuclei sono ingranditi ed ipercromatici, con macronucleoli evidenti; tuttavia, la disposizione della cromatina è uniforme, finemente granulata, senza formazione di aggregati grossolani ed irregolari con membrana nucleare regolare omogenea e ben distinta.

### Cellule multinucleate

Uno dei segni citologici di malignità è dato dalla presenza di cellule giganti, con marcata ipertrofia nucleare e nuclei multipli o plurilobati. Questo aspetto non va confuso con la multinuclearità che si può osservare in cellule benigne.

*Cellule multinucleate maligne*: come già detto, nelle neoplasie maligne la multinuclearità è conseguente a mitosi anomale multipolari; i criteri che permettono di riconoscere cellule di questo tipo come maligne sono: aumento del rapporto N/C, ipercromatismo con presenza di addensamenti cromatinici grossolani, contorno nucleare irregolare, nucleoli prominenti e nuclei di forma e dimensioni diverse.

*Cellule istiocitarie multinucleate*: si tratta di sincizi cellulari multinucleati ad attività fagocitaria che si possono rinvenire in corso di flogosi croniche, generalmente di tipo non settico.

I nuclei multipli sono rotondi od ovali, di dimensioni uniformi, situati centralmente, a volte sovrapposti fra loro e con cromatina finemente granulata.

In generale, le membrane nucleari sono regolari e ben definite, il citoplasma è abbondante, a volte con vacuoli fagocitari, limiti poco distinguibili.

*Cellule giganti di tipo osteoclastico*: cellule giganti multinucleate sono segnalate negli aspirati provenienti da lesioni displasiche di osso e sinovia, nonché da tumori benigni della gengiva del cane (epulidi). Anche qui, i nuclei sono regolarmente rotondi od ovali, in posizione centrale e contorno ben delineato. Le caratteristiche del citoplasma, che si presenta privo di vacuoli e a limiti netti e definiti, permettono la distinzione di queste cellule da quelle istiocitarie multinucleate.

Per concludere, vorrei ripetere ancora una volta quanto già espresso all'inizio di questa relazione, poiché considero questi concetti di importanza fondamentale:

- 1) In citologia diagnostica, esiste un solo ed indiscutibile criterio di malignità, e cioè il ritrovare cellule metastatiche (e cioè estranee) a livello di un tessuto o di un fluido ove queste non dovrebbero esistere. In assenza di questo reperto, nessuno dei criteri che sono stati descritti, permetterà da solo di esprimere un criterio definitivo di malignità o benignità. Il giudizio finale dipenderà dalla somma e dall'importanza dei criteri di malignità evidenziati, anche in relazione al tipo di neoplasia sospettata.
- 2) Nessuna delle valutazioni che sono state l'oggetto di questa relazione può e deve essere fatta se non si è sicuri della adeguatezza e della rappresentatività del campione citologico in esame.

## Lettere consigliate

- Bibbo M. Comprehensive Cytopathology 2nd edition, WB Saunders, Philadelphia, 1997.
- Fournel-Fleury C., Magnol J-P, Guelfi J.F., Color Atlas of Cancer Cytology of the Dog and the Cat Conference Nationale des Veterinaires Spécialisés en Petit Animaux, Paris, 1994.
- Takahashi M., Citologia del Cancro Verduci editore, Roma, 1987.
- DeMay R.M., The Art and Science of Cytopathology ASCP Press, Chicago, 1996.
- Baker R., Lumsden J.H., Color Atlas of Cytology of the Dog and Cat Mosby ed, St Louis (MI), 1999.
- Cowell R.L., Tyler R.D., Meinkoth J.H., Diagnostic Cytology and Hematology of the dog and the cat 2nd ed, Mosby, St.Louis, 1999.
- Raskin R.E., Meyer D.J. Atlas of Canine and Feline Cytology W.B. Saunders Co., Philadelphia, 2001.

## RICHIESTA CASI DI PODODERMATITE PLASMACELLULARE FELINA

Caro collega:

la pododermatite plasmacellulare è una malattia rara del gatto di eziologia sconosciuta. Tra le cause più probabili sono stati suggeriti meccanismi immunomediati ed anomalie strutturali a carico dei cuscinetti plantari.

Non sembra esistere una predisposizione di razza, sesso o età. Clinicamente la malattia si manifesta con un aumento di volume di uno o più cuscinetti plantari, in particolare di quelli metacarpali e metatarsali e solitamente sono colpite due o più zampe contemporaneamente. I cuscinetti interessati perdono progressivamente la consueta consistenza fibro-elastica e divengono progressivamente flaccidi e di colore violaceo. Nelle sue fasi iniziali la malattia può essere asintomatica, tuttavia nei casi cronici i cuscinetti possono ulcerarsi ed infettarsi causando dolore all'animale ed emorragie.

L'esame istologico delle lesioni permette di apprezzare una dermatite da perivascolare a diffusa preminentemente plasmacellulare, inoltre il tracciato elettroforetico delle proteine sieriche nei soggetti colpiti permette di evidenziare una ipergammaglobulinemia policlonale.

Non sono solitamente apprezzabili altri segni di malattie sistemiche concomitanti, anche se occasionalmente è stata osservata la presenza di stomatite linfoplasmacellulare, positività al test per la FIV, glomerulonefrite ed amiloidosi renale.

La terapia della pododermatite plasmacellulare prevedeva fino ad ora l'impiego di terapie immunosoppressive o l'asportazione chirurgica dei cuscinetti ulcerati.

Recentemente da alcuni autori è stata utilizzata la doxiciclina alla dose di 10 mg/kg/die. In circa tre quarti dei gatti trattati le lesioni sono migliorate ed in un quarto dei soggetti si è ottenuta una completa remissione.

Stiamo conducendo uno studio al fine di confermare l'efficacia della terapia e per valutare la correlazione tra la risposta clinica e le variazioni quali e quantitative delle proteine sieriche nel corso del trattamento con doxiciclina.

Se hai modo di visitare e riconoscere in gatti i segni clinici di questa malattia, ti prego di contattarci. Ai proprietari verranno fornite gratuitamente le visite cliniche, tutti gli esami ematochimici e istologici per confermare la diagnosi e la terapia con doxiciclina. I soggetti dovranno essere visitati tre volte nell'arco di tre mesi (una volta al mese).

Per ulteriori informazioni puoi contattarci per e-mail.

Con l'augurio di una fattiva collaborazione auguriamo a tutti buon lavoro!!!

**Fabia Scarpella**, <scarpella@iol.it>, **Antonella Vercelli** [tarver@libero.it](mailto:tarver@libero.it),

**Chiara Noli** [pitnoli@iol.it](mailto:pitnoli@iol.it), **Federico Leone** [mrfeleo@libero.it](mailto:mrfeleo@libero.it),

**Fabrizio Fabbrini** [fabrizio.fabbrini@tin.it](mailto:fabrizio.fabbrini@tin.it), **Franca Galeotti** [frgale@tin.it](mailto:frgale@tin.it),

**Francesco Albanese** [foalban@tin.it](mailto:foalban@tin.it), **Erica Romano** <ericaromano@hotmail.com>

**Ersilia Pappalardo** <ersiliap@hotmail.com>