

Ruolo dell'istologia osteo-midollare nella diagnosi e nel follow up delle malattie mieloproliferative croniche Philadelphia-negative (Ph- CMPDs)

EMANUELA BOVERI
ALESSANDRO CASTELLO
BARBARA BURRONI
UMBERTO MAGRINI

Istituto di Anatomia e Istologia
Patologica, IRCCS Policlinico San
Matteo, Università di Pavia

La classificazione WHO (2001) delle malattie mieloproliferative croniche Philadelphia negative (Ph- CMPDs): criteri isto-patologici

Il ruolo della biopsia osteo-midollare (BOM) nell'ambito della diagnostica delle malattie mieloproliferative croniche Philadelphia negative (Ph- CMPDs) è stato recentemente sottolineato dalla classificazione della World Health Organization (WHO),¹ che ha stabilito precisi criteri isto-patologici per la diagnosi della Policitemia Vera (PV), della Trombocitemia Essenziale (TE) e della Mielofibrosi Idiopatica (MF). Tali criteri si basano essenzialmente sulla valutazione dei seguenti parametri istologici (Tabella 1):

- rapporto tra cellularità emopoietica e tessuto adiposo, in relazione all'età del paziente;²
- rapporto leuco-eritroblastico;
- aspetti citologici, modalità di aggregazione e localizzazione topografica dei megacariociti;
- contenuto in fibre reticoliniche midollari (fibrosi midollare), valutato mediante una scala semiquantitativa (da 0 a 3), tramite colorazioni basate sull'impregnazione argentea (di solito tecnica di Gomori).²

Policitemia vera

La biopsia osteomidollare è nella maggior parte dei casi ipercellulare per l'età del paziente e caratterizzata da proliferazione di tutte le serie emopoietiche (panmielosi) e, in particolare modo, delle serie eritro e piastrinopoietica. La maturazione e la morfologia della quota eritroide e granulocitaria sono normali; i megacariociti sono particolarmente numerosi, anche quando il midollo è normocellulare, e di aspetto caratteristicamente pleomorfo (da forme piccole ad elementi giganti in assenza di nuclei francamente atipici o di difetti di maturazione), talora con tendenza alla disposizione in clusters.³ Il contenuto in fibre reticoliniche è normale nel 70% ed aumentato nel 30% circa dei casi (di solito di un grado nella

fase policitemica, maggiore nella fase spenta post-policitemica, o di mielofibrosi post-policitemica). Possono essere presenti noduli linfoidi reattivi, più spesso centrolacunari, a composizione polimorfa (sia piccoli linfociti B CD20⁺ che T CD3⁺). La colorazione Perls per l'identificazione di pigmento emoderinico dimostra l'assenza di depositi di ferro nel 95% dei casi. I sinusoidi midollari appaiono spesso congesti e *ingolfati* da globuli rossi maturi, in assenza di una significativa proliferazione microvascolare. La componente plasmacellulare e istiocito-macrofagica è molto scarsa.

Mielofibrosi Idiopatica

Si caratterizza per la proliferazione di elementi megacariocitari e granulopoietici, con deposizione reattiva nel midollo emopoietico di tessuto connettivo reattivo (fibrosi) ed emopoiesi extramidollare. La classificazione WHO distingue due stadi, uno prefibrotico e uno fibrotico.

Stadio prefibrotico (MFO) o fase cellulare.

Caratterizza circa il 20-30% dei pazienti alla diagnosi. La BOM è ipercellulare per l'età del paziente, soprattutto per espansione della serie granulopoietica (con aumento del rapporto leuco-eritroblastico) e proliferazione dei megacariociti. La quota granulopoietica presenta ritardo di maturazione (in assenza comunque di una quota blastica significativa) e, frequentemente, particolare evidenza dello stipite eosinofilo, mentre i megacariociti tendono alla disposizione in clusters densi (più di 4-5 elementi), spesso in sede paratrabecolare o perisinusale, e sono costituiti da forme con elevato rapporto nucleo-citoplasmatico, nuclei atipici *cloud-like*, o da nuclei nudi. La fibrosi reticolinica è assente o minima (1+) e, se presente, disposta soprattutto attorno ai vasi. Di solito è apprezzabile una trama microvascolare maggiore che nel midollo normale. Possono essere presenti noduli linfoidi reattivi.

Stadio fibrotico. Corrisponde alla mielofibrosi con metaplasia mieloide⁴ e circa il 70-80% dei pazienti affetti da MF è diagnosti-

Tabella 1. Parametri istopatologici nelle Ph- CMPDs.

| | <i>PV</i> (fase iniziale policitemica) | <i>MF prefibrotica</i> | <i>MF fibrotica</i> | <i>TE</i> |
|---|--|---|--|--|
| <i>Cellularità midollare aumentata in relazione all'età</i> | ~85% dei casi: aumenta ~15% dei casi: coerente con l'età | ~ 95% dei casi: aumentata | ~40% dei casi: aumentata ~60% dei casi: coerente con l'età o diminuita in relazione all'età | ~90% dei casi: coerente con l'età ~5-10% dei casi: modicamente aumentata |
| <i>Serie midollare maggiormente proliferante</i> | Eritro: +++ Mega: ++/+++ Granulo: + / ++ Panmielosi (proliferazione trilineare) | Mega: ++ / +++ Granulo: ++ / +++ Eritro: -/+ / ++ | Mega: ++ /+++ Granulo: ++ / +++ Eritro: -/+ / ++ | Mega: ++ / +++ Granulo: -/+ Eritro: -/+ |
| <i>Rapporto leuco-eritroblastico</i> | Da normale (3:1) a diminuito | Aumentato (>4:1) | Di solito aumentato (>4:1) | Normale |
| <i>Megacariociti</i> | | | | |
| Morfologia | Pleomorfi (da grandi a piccoli, senza difetti di maturazione) | Atipici, elevato rapporto nucleo-citoplasmatico, nuclei <i>cloud-like</i> e maturazione anomala | Atipici, elevato rapporto nucleo-citoplasmatico, nuclei <i>cloud-like</i> e maturazione anomala | Da grandi a giganti con nuclei iperlobulati, senza difetti di maturazione (forme soprattutto ipermature) |
| Tipo di aggregazione | Possibile disposizione in clusters | Frequente disposizione in clusters densi | Frequente disposizione in clusters densi | Dispersi o in clusters lassi |
| <i>Fibrosi</i> | 70% dei casi: assente (0) 30% dei casi: modesta (1+) | Da assente (0) a modesta (1+) | Da modesta (1+) a marcata (2-3+) | Assente (0) nella maggioranza dei casi |

cato in questo stadio; rappresenta inoltre, insieme alla leucemia acuta, l'evoluzione terminale di tutte le Ph-CMPDs. La BOM può essere normo-, iper- o ipocellulata in relazione all'età del paziente e alterna isole di emopoiesi ad aree di tessuto connettivo lasso o adiposo. Il rapporto leuco-eritroblastico è elevato, con aspetti di immaturità della serie granulopoietica. I megacariociti atipici, simili allo stadio prefibrotico, sono particolarmente numerosi, disposti in clusters o aggregati. Un aspetto caratteristico è la marcata proliferazione microvascolare a lumi spesso tortuosi e dilatati, con aspetti di emopoiesi endoluminale e con megacariociti che delimitano direttamente lo spazio vascolare al posto degli endoteli. La fibrosi midollare è per definizione presente in grado variabile, fino alla sclerosi collagena e all'osteosclerosi.

Trombocitemia essenziale

Il midollo emopoietico è normocellulare per l'età del paziente o solo lievemente ipercellulare; il rapporto leuco-eritroblastico è conservato entro limiti di nor-

malità (3:1) e le serie granulo e eritropoietica mostrano una normale maturazione. I megacariociti sono aumentati di numero, di solito disposti a coppie o in clusters lassi (fino a 3-4 elementi) e mostrano caratteristicamente un nucleo iperlobulato, ipermaturo e un abbondante citoplasma, in assenza delle atipie citologiche che li caratterizzano nella mielofibrosi idiopatica.⁵ Il contenuto in fibre reticoliniche è normale o solo minimamente aumentato (1+) e non devono comunque essere presenti aree di sclerosi collagena. Il pattern microvascolare è simile al midollo osseo normale.

Ph- CMPDs, non classificabili. Tale categoria, prevista nella classificazione WHO, comprende casi (di più frequente riscontro per il patologo che per il clinico) che presentano aspetti clinici, laboratoristici e morfologici di una malattia mieloproliferativa, ma che non incontrano i criteri di nessuna specifica entità o presentano aspetti di confine tra 2 o più categorie. Si può trattare o di fasi iniziali di PV, ET e MF, in cui al tempo della valutazione gli aspetti caratteristici non sono ancora completamente sviluppati, o stadi avanzati in

cui l'estrema fibrosi midollare, l'osteosclerosi o la trasformazione verso fasi aggressive nascondono la malattia di base. Nella prima evenienza, è opportuna una rivalutazione a breve o medio termine della biopsia osteo-midollare.

Classificazione WHO 2001 delle Ph- CMPDs: vantaggi e limiti

La classificazione WHO 2001 dei tumori dei tessuti emopoietici e linfoidi si basa sull'integrazione ai fini diagnostici dei dati clinici, laboratoristici, istologici, immunofenotipici e molecolari. In tale ambito, la sezione che riguarda le Ph- CMPDs è sicuramente quella che più di altre pone in primo piano gli aspetti istopatologici. Infatti, i criteri proposti sono essenzialmente morfologici, basati sulla valutazione di colorazioni di routine (ematossilina-eosina, Giemsa, impregnazione argentea di Gomori, Perls'): ne consegue che sono da un lato di agevole applicazione da parte dei patologi, ma dall'altro possono risentire dell'interpretazione e dell'esperienza del singolo patologo.

La WHO, che considera i rilievi sulla biopsia osteo-midollare (BOM) indispensabili per un corretto inquadramento di TE e MF e complementari per la diagnosi di PV, intende integrare le linee guida del *Polycythemia Vera Study Group* (PVSG)⁶ e dell'*Italian Consensus Conference on Myelofibrosis* (ICC-M):⁴ tali criteri includono per definizione la valutazione istologica della biopsia osteo-midollare solo nei casi di mielofibrosi idiopatica. Tale procedura non è considerata indispensabile nell'inquadramento diagnostico della policitemia vera e della trombocitemia essenziale:^{6,7} la BOM viene menzionata solo in relazione alla valutazione della fibrosi midollare, trascurando il quadro morfologico d'insieme.

La classificazione WHO consente in primo luogo una corretta diagnosi differenziale tra malattia mieloproliferativa cronica e altre patologie (tra le quali soprattutto le forme secondarie -reattive vs paraneoplastiche- di policitemia e/o di trombocitemia, la panmielosi acuta e le mielodisplasie) e identifica per ognuna delle entità comprese nello spettro delle Ph-CMPDs un preciso pattern morfologico osteo-midollare. Questo è particolarmente importante per quanto riguarda la TE, che, nell'ambito della WHO, non risulta più essere una diagnosi di esclusione.

Inoltre, la classificazione WHO tenta di differenziare i pazienti in relazione alla potenziale evoluzione in mielofibrosi con metaplasia mieloide, che rappresenta, insieme alla leucemia acuta, la fase terminale di molti casi di Ph-CMPDs. Nell'ambito dei pazienti con trombocitemia clinica, è questo in primo luogo il significato della distinzione, di mielofibrosi idiopatica in fase prefibrotica / cellulare (p-MF) e vera trombocitemia. Vari studi, soprattutto di ricercatori tedeschi^{8,9}

hanno infatti evidenziato come i pazienti che si presentano clinicamente con trombocitemia abbiano un rischio diverso di evoluzione verso la mielofibrosi conclamata, a seconda del quadro morfologico osteo-midollare: quelli con un pattern midollare da vera TE (secondo i criteri WHO) sviluppano solo raramente fibrosi midollare (2% dei casi a 3 anni dalla diagnosi),¹⁰ mentre quelli con un quadro morfologico di p-MF evolvono in f-MF più rapidamente e più frequentemente e hanno una significativa diminuzione dell'aspettativa di vita.¹¹

Tale distinzione diagnostica, che si propone anche come potenziale fattore prognostico, è stata accolta con molte riserve dai clinici, perché l'introduzione degli stadi prodromici della MF comporta significative modificazioni dello spettro riconosciuto delle Ph- CMPDs: infatti, parte dei casi di TE secondo i criteri PVSG viene classificato come MF prefibrotica, secondo la WHO, alterando quindi anche l'incidenza di importanti caratteristiche cliniche, quali, ad esempio l'organomegalia, lo screezio leuco-eritroblastico, l'aumento delle cellule CD34⁺ circolanti.¹²

Attualmente, non vi è una perfetta corrispondenza tra diagnosi clinica e inquadramento istopatologico: per tale motivo, sono sempre più essenziali la stretta collaborazione e la comunicazione tra clinico e patologo, in modo da integrare il nuovo messaggio istopatologico nella pratica clinica senza modificare il comportamento terapeutico, ma eventualmente riconsiderando l'intervallo di tempo per la rivalutazione dei singoli pazienti. Sono inoltre indispensabili studi congiunti clinici ed anatomo-patologici, sia prospettici che retrospettivi,¹³ al fine di chiarire la reale incidenza della mielofibrosi prefibrotica, il rischio ed il tempo di evoluzione in mielofibrosi conclamata.

Nel 2005, vari gruppi^{14,15,16} hanno riportato la presenza di una specifica mutazione del gene JAK2 (valina al posto di fenilalanina alla posizione 617, V617F) e gli ultimi protocolli diagnostici in ordine di tempo^{6,17} hanno rapidamente integrato lo screening per questa mutazione nei soggetti con sospetta patologia mieloproliferativa cronica. Questa scoperta ha reso improvvisamente sorpassate sia la classificazione WHO sia i criteri PVSG: tale alterazione, dimostrabile, con incidenza variabile, sia nella PV, che nella TE e nella MF, costituisce il razionale molecolare di un comune meccanismo eziopatogenetico, su cui basare una nuova classificazione ed eventualmente nuovi approcci terapeutici. A circa un anno di distanza dalla pubblicazione della mutazione di JAK2, mancano in letteratura studi di correlazione tra il nuovo dato molecolare e il quadro morfologico midollare. Questi studi potrebbero da un lato verificare la specificità dei criteri istopatologici nell'escludere forme non mieloproliferative e dall'altro valutare la presenza di possibili differenze

istopatologiche tra casi mutati e casi non mutati.

Nella leucemia mieloide cronica, l'identificazione del cromosoma Philadelphia e del riarrangiamento bcr-abl ha reso inutile la valutazione della biopsia osteo-midollare sia alla diagnosi che durante follow up. Fino ad oggi, la scoperta di JAK2 non sembra modificare l'indicazione alla BOM nelle Ph- CMPDs, perché questa mutazione, per quanto specifica, non discrimina tra le varie entità ed è assente in parte dei pazienti. In tale ottica, recenti lavori clinici^{17,18} sottolineano l'importanza della biopsia osteo-midollare nel *work-up* diagnostico dei soggetti con quadri clinici di PV e TE, soprattutto se negativi per la mutazione di JAK2.

La biopsia osteomidollare nel follow up delle Ph- CMPDs

La biopsia osteomidollare può essere effettuata durante il decorso della malattia ad intervalli di tempo dalla diagnosi molto variabili (da mesi ad anni), in relazione alle modificazioni del quadro clinico-ematologico (più frequentemente, comparsa / peggioramento di epato-splenomegalia, citopenie periferiche, aumento delle cellule CD34⁺ circolanti).

La biopsia osteo-midollare di rivalutazione può documentare:

- l'evoluzione verso un quadro morfologico di mielofibrosi conclamata (fibrosi midollare, proliferazione granulocitaria e megacariocitaria); è l'eventualità più frequente e corrisponde alla storia naturale delle Ph- CMPD. Soprattutto nel passato, molti casi di PV venivano sottoposti a biopsia osteo-midollare solo in questo stadio, perché tale procedura non era prevista nei protocolli diagnostici all'esordio della malattia;
- aspetti di *remissione* midollare con riduzione della cellularità emopoietica e del grado di fibrosi (se presente nella BOM alla diagnosi);¹⁹
- quadri di ipoplasia midollare (cellularità emopoietica inferiore rispetto a quanto normale per l'età del paziente), soprattutto nel caso di terapie prolungate, con sviluppo di una pancitopenia periferica;
- modificazioni displastiche, con aspetti di maturazione irregolare, *left-shifting* delle serie maturative midollari ed eventuale presenza di una quota variabile di blasti;
- l'evoluzione in leucemia acuta. Nonostante le leucemie acute vengano raramente sottoposte alla biopsia osteo-midollare, è relativamente frequente che vengano biopsiati casi di evoluzione leucemica in corso di Ph- CMPDs, soprattutto in fase mielofibrotica, perché la *punctio sicca*, di frequente riscontro in questi pazienti, rende poco informativo l'aspirato midollare.

Molto più spesso che alla diagnosi (punti b-, c-, d), il quadro della biopsia di rivalutazione non è patogno-

monico di una singola entità, perché le eventuali terapie possono avere influito sulla morfologia del midollo emopoietico.^{20,21} Questo è valido sia per regimi chemioterapici, che influiscono per definizione sulla proliferazione e sulla maturazione delle serie emopoietiche, sia per protocolli non chemioterapici, quali ad esempio la salassoterapia nella PV, che può indurre alterazione dei megacariociti e gradi variabili di fibrosi midollare. È per questo essenziale che vengano segnalati al patologo i trattamenti eseguiti in passato dal paziente e che venga eseguito un confronto con la biopsia osteo-midollare effettuata alla diagnosi.

Bibliografia

- World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics. Tumours of Haematopoietic & lymphoid tissues. ES Jaffe, NL Harris, H Stein, JW Vardiman, eds. IARC Press, Lyon (France), 2001
- Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orzi A. European consensus on grading of bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. *Haematologica* 90: 1128-1132, 2005
- Thiele J, Kvasnicka HM, Zankovich R, Diehl V. The value of bone marrow histology in differentiating between early stage polycythemia vera and secondary (reactive) polycythemia. *Haematologica* 86: 368-374, 2001
- Barosi G, Ambrosetti A, Finelli C, Grossi A, Leoni P, Liberato NL, Petti MC, Pogliani E, Ricetti M, Ruoli S, Visani G, Tura S. The Italian Consensus Conference on diagnostic criteria for myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Br J Haematol* 104: 730-737, 1999
- Florena AM, Tripodo C, Iannitto E, Porcasi R, Ingraio S, Franco V. Value of bone marrow biopsy in the diagnosis of essential thrombocythemia. *Haematologica* 89: 911-919, 2004
- Murphy S, Peterson P, Iland H, Laszlo J. Experience of the Polycythemia Vera Study Group with essential thrombocythemia: a final report on diagnostic criteria, survival and leukemic transition by treatment. *Sem Hematology* 34: 29-39, 1997
- Campbell PJ, Green AR. Management of Polycythemia Vera and Essential Thrombocythemia. *Hematology*: 201-208, 2005
- Thiele J, Kvasnicka HM, Zankovich R, Diehl V. Relevance of bone marrow features in the differential diagnosis between essential thrombocythemia and early stage idiopathic myelofibrosis. *Haematologica* 85: 1126-1134, 2000
- Kreft A, Weiss M, Wiese B, Choritz H, Buhr T, Busche G, Georgii A. Chronic idiopathic myelofibrosis: prognostic impact of myelofibrosis and clinical parameters on event-free survival in 122 patients who presented in pre-fibrotic and fibrotic stages. A retrospective study identifying subgroups of different prognoses by using the RECPAM method. *Ann Hematol*. 82: 605-611, 2003
- Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Graeff A, Zankovich R, Diehl V. Follow-up examinations including sequential bone marrow biopsies in essential thrombocythemia (ET): a retrospective clinicopathological study. *Am J Haematol* 70: 283-291, 2002
- Thiele J, Kvasnicka HM. Chronic myeloproliferative disorders with thrombocythemia: a comparative study of two classification systems (PVSG, WHO) on 839 patients. *Ann Hematol* 82: 148-152, 2003
- Passamonti F, Vanelli L, Malabarba L, Rumi E, Pungolino E, Malcovati L, Pascutto C, Morra E, Lazzarino M, Cazzola M. Clinical utility of the absolute number of circulating CD34-positive cells in patients with chronic myeloproliferative disorders. *Haematologica* 88: 1123-1129, 2003
- Gugliotta L, Bulgarelli S, Asioli S, Tieghi A, Gardini G, Sabattini E, Franco V, Boveri E, Kvasnicka HM, Vianelli N, Candoni A, Latagliata R, Passamonti F, Rupoli S, Martinelli V, Zaccaria A, Lauria F, De Biasi E, Sacchi S, Gobbi M, Tabilio A, Cacciola E, Cacciola R, Grossi A, Mazza P, Bonifazi F, Favini P, Mandelli F, Baccarani M, Thiele J. Bone marrow evaluation according to the PVSG and WHO criteria in 90 Essential thrombocythemia (ET) patients treated with PEG Interferon alpha-2b. Preliminary results. *Blood* 106: abstract 4962 of the ASH Annual Meeting, Atlanta, 2005
- Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton

- S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, the Cancer Genome Project, Green AR. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 365: 1054-1061, 2005
15. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 7: 387-397, 2005
 16. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 352: 1779-1790, 2005
 17. Tefferi A, Sirhan S, Lasho TL, Schwager SM, Li CY, Dingli D, Wolanskyj AP, Steensma DP, Mesa R, Gilliland DG. Concomitant neutrophil JAK2V617F mutation screening and PRV-1 expression analysis in myeloproliferative disorders and secondary polycythemia. *Br J Haematol* 131: 166-171, 2005
 18. Tefferi A, Pardanani A. Mutation screening for JAK2 V617F: when to order the test and how to interpret the results. *Leukemia Res*, 2006, epub
 19. Barosi G, Bordessoule D, Briere J, Cervantes F, Demory JL, Dupriez B, Gisslinger H, Griesshammer M, Hasselbalch H, Kusec R, Le Bousse-Kerdiles MC, Liberato NL, Marchetti M, Reilly JT, Thiele J, European Myelofibrosis Network. Response criteria for myelofibrosis with myeloid metaplasia: results of an initiative of the European Myelofibrosis Network (EUMNET). *Blood* 106: 2849-2853, 2005
 20. Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Graeff A, Diehl V. Bone marrow histopathology following cytoreductive therapy in chronic idiopathic myelofibrosis. *Histopathology* 32: 470-479, 2003
 21. Thiele J, Kvasnicka HM, Fuchs N, Brunnbauer K, Volkwein N, Schmitt-Graeff A. Anagrelide-induced bone marrow changes during therapy of chronic myeloproliferative disorders with thrombocytosis. An immunohistochemical and morphometric study of sequential trephine biopsies. *Haematologica* 88: 1130-1138, 2003