



Definizione degli aspetti displastici nelle sindromi mielodisplastiche: proposta di un pannello morfologico standardizzato

Federica Quaglia¹, Erica Travaglino², Matteo Della Porta², Luca Malcovati², Cristiana Pascutto², Francesca Bellistri¹, Agnese Filocco¹, Mario Cazzola², Rosangela Invernizzi¹

¹Clinica Medica III e ²Clinica Ematologica, Università degli Studi di Pavia, Fondazione IRCCS Policlinico San Matteo, Pavia, Italia

Definizione degli aspetti displastici nelle sindromi mielodisplastiche: proposta di un pannello morfologico standardizzato

Le sindromi mielodisplastiche rappresentano un disordine oncoematologico complesso caratterizzato da una clinica eterogenea associata ad aumentato rischio di evoluzione in leucemia acuta mieloide. In assenza di marcatori biologici specifici per tale patologia, la diagnosi risulta ad oggi sostanzialmente di tipo morfologico. Il principale scopo del nostro lavoro consiste nell'elaborazione di un pannello morfologico dotato di parametri di specificità, sensibilità e valore prognostico associati sia a ciascun tipo di alterazione displastica, sia alla percentuale di displasia *in toto* per ciascuna linea cellulare midollare. Il pannello morfologico da noi elaborato potrebbe essere inserito, accanto ai parametri attualmente in uso, in nuovi sistemi di *score* prognostici al fine di migliorare la gestione clinico-terapeutica dei pazienti affetti da sindromi mielodisplastiche.

Definition of dysplastic features in myelodysplastic syndromes: proposal for a standardized morphological panel

Myelodysplastic syndromes can be defined as a complex oncohaematological disease with a very heterogeneous clinical presentation and variable risk of evolution in Acute Myeloid Leukemia. Since nowadays there is no biological marker which can be considered specific for this disease, the diagnosis can be reached substantially by morphology. The first aim of our research is the definition of a morphological panel characterized by parameters of specificity, sensibility and prognostic value, in association with both every single dysplastic alteration and the total percentage of dysplasia for each bone marrow cellular line. Our morphological panel could be included in new prognostic score systems, in association with the current prognostic parameters, to improve the clinical-therapeutical management of patients with myelodysplastic syndromes.

Introduzione

Le sindromi mielodisplastiche (MDS) costituiscono un gruppo di patologie clonali della cellula staminale ematopoietica caratterizzate da citopenia periferica, displasia midollare, ematopoiesi inefficace e aumentato rischio di sviluppo di leucemia acuta mieloide (AML) [1]. L'importanza epidemiologica delle MDS riguarda principalmente l'elevata frequenza di anemia nell'anziano, determinante un notevole impatto sulla qualità di vita e sulla sopravvivenza [2]. Le basi patogenetiche delle MDS sembrano essere da una parte un incrementato livello di apoptosi nei precursori midollari [3], dall'altra un meccanismo di ematopoiesi inefficace, con l'apparente paradosso di citopenia periferica ed aumentata cellularità midollare [4]. Lo sviluppo di mutazioni bloccanti il meccanismo di morte cellulare programmata sarebbe poi alla base di un vantaggio proliferativo in grado di favorire la trasformazione di MDS in AML [5]. La clinica è caratterizzata da insorgenza subdola ed ampia variabilità nell'espressione e nella gravità della presentazione, segnata dai segni e sintomi dell'insufficienza midollare; il decorso è in genere lento e progressivo. Le principali cause di morte non leucemica in pazienti affetti da MDS sono rappresentate da: insufficienza cardiaca (51%), infezioni (31%), emorragie (8%), insufficienza epatica (8%) [6]. La diagnosi di MDS risulta prevalentemente basata sul criterio morfologico, ovvero sull'individuazione dei caratteri di displasia e della percentuale di blasti a livello del sangue periferico e midollare. Risultano inoltre importanti l'esclusione di altre cause di citopenia e la ricerca di eventuali anomalie citogenetiche. Gli approcci terapeutici più frequentemente utilizzati, scelti in base alle caratteristiche del paziente e della malattia, comprendono terapia di supporto emotrasfusionale, terapia epigenetica con azacitidina, terapia immunosoppressiva; più raramente il trapianto allogenico di midollo osseo [7]. La classificazione attualmente in uso per le MDS è la WHO (*World Health Organization*) 2008 (Tabella 1), la cui principale innovazione rispetto alle precedenti classificazioni consiste nel riconoscimento della differenza prognostica tra forme con displasia midollare uni- e multi-lineare. La corretta identificazione e quantificazione della displasia risulta pertanto critica per una corretta applicazione della WHO; tuttavia non esistono ancora criteri morfologici standardizzati per la valutazione dei diversi aspetti di displasia.

Scopo del lavoro

Gli scopi del nostro lavoro sono i seguenti:

- elaborare un pannello morfologico riproducibile caratterizzato da alterazioni dotate di sensibilità, specificità e valore prognostico per valutare il grado di displasia nelle tre linee cellulari midollari;
- utilizzare il pannello per una più corretta applicazione della classificazione WHO al fine di migliorare la gestione clinico-terapeutica dei pazienti affetti da MDS.

Materiali e metodi

Casistica

In uno studio di tipo retrospettivo abbiamo rivalutato strisci di sangue midollare di 429 casi di MDS giunti all'osservazione del Laboratorio di Citomorfologia della Clinica Medica III, IRCCS Policlinico San Matteo di Pavia. Secondo la classificazione FAB (*French American British*) [10], in uso nel periodo della raccolta dei campioni (1986-2005), i pazienti della nostra casistica con MDS potevano essere inquadrati come segue: 202 RA (anemia refrattaria), 79 RARS (anemia

refrattaria con sideroblasti ad anello), 84 RAEB (anemia refrattaria con eccesso di blasti), 14 RAEB-t (anemia refrattaria con eccesso di blasti in trasformazione), 50 CMML (leucemia mielomonocitica cronica). Come casi-controllo abbiamo incluso nello studio 214 controlli patologici (altre forme di citopenia) e 74 controlli normali dal punto di vista ematologico.

Revisione morfologica

Abbiamo utilizzato strisci di sangue midollare colorati con il May-Grünwald-Giemsa e con la reazione di Perls [11], quest'ultima per evidenziare l'eventuale presenza di sideroblasti ad anello. Abbiamo quindi ricercato la presenza di alterazioni displastiche nelle tre linee cellulari mieloidi e contato la percentuale di cellule interessate da displasia in ciascuna linea, esaminando 100 eritroblasti, 100 cellule della linea granulocitaria e 30 megacariociti. La serie megacariocitaria è stata valutata agli ingrandimenti 100x e 250x, mentre le serie eritroblastica e granulocitaria sono state studiate ad ingrandimento 1250x. Allo scopo di migliorare l'accuratezza del nostro studio in termini di ripetibilità e riproducibilità, gli strisci sono stati valutati da 3 citomorfologi indipendentemente. Al fine di rendere la lettura dei preparati omogenea abbiamo utilizzato una scheda morfologica basata sulla valutazione dei seguenti aspetti: cellularità midollare, mielogramma (contando 500 elementi nucleati abbiamo valutato la percentuale di elementi della serie eritroide e mieloide, elementi linfoplasmocitoidi, monociti, eosinofili, basofili e blasti), aspetti qualitativi e quantitativi della displasia nelle tre linee cellulari midollari, presenza di sideroblasti ad anello. In particolare, seguendo i criteri WHO, abbiamo considerato una percentuale significativa di displasia $\geq 10\%$ per le linee eritroide e granulocitaria, $\geq 25\%$ per la linea megacariocitaria. Abbiamo quindi elaborato un pannello morfologico caratterizzato da parametri di sensibilità, specificità e valore prognostico che abbiamo utilizzato per riclassificare la nostra casistica secondo i criteri WHO 2008. Per ciascun parametro morfologico e per il grado di displasia il significato prognostico è stato valutato sulla base del tasso di sopravvivenza globale e della progressione di malattia a AML o della progressione di forme di MDS a basso rischio a forme ad alto rischio.

Valutazione statistica

La probabilità cumulativa di sopravvivenza libera da malattia ed il rischio cumulativo di progressione di malattia sono stati calcolati mediante le curve di Kaplan-Meier. Tramite il test di Gehan è stata poi completata l'analisi prognostica dei diversi sottogruppi di MDS. Abbiamo quindi calcolato la specificità, sensibilità e valore prognostico dei diversi parametri definiti dal nostro pannello morfologico. Il valore prognostico di tre parametri particolarmente significativi nelle MDS quali la percentuale di blasti midollari, l'evidenza di displasia multilineare e di pancitopenia, è stato valutato secondo un'analisi univariata e multivariata utilizzando il metodo regressivo secondo Cox. Tutti i test statistici erano a due code ed un valore di $p < 0.05$ veniva considerato statisticamente significativo.

Risultati

Valutazione degli aspetti displastici

Per ognuna delle tre linee midollari abbiamo confrontato la frequenza delle singole alterazioni displastiche e della displasia *in toto* tra il gruppo di pazienti affetti da MDS, i controlli patologici ed i controlli sani. Per quanto riguarda la linea eritroide, le anomalie morfologiche più frequentemente riscontrate nelle MDS sono state la megaloblastosi, la picnosi nucleare, la presenza di inclusioni citoplasmatiche e l'irregolarità dei contorni nucleari (Figura 1). Considerando l'aspetto quantitativo, una

percentuale significativa di displasia *in toto*, $\geq 10\%$, è stata riscontrata in quasi tutti i casi di MDS, più raramente nei controlli patologici e quasi mai nei controlli sani (Figura 2). Quanto alla serie granulocitaria, le alterazioni displastiche più frequenti erano l'irregolarità della segmentazione nucleare (Figura 3), talvolta pelgeroide, l'ipo-agranulazione citoplasmatica e l'anisocitosi. Anche in questo caso una percentuale $\geq 10\%$ di elementi displastici era presente in buona parte dei casi di MDS, quasi mai nei controlli patologici e sani (Figura 4). Per quanto riguarda infine la serie megacariocitaria, le anomalie più frequenti erano rappresentate da micromegacariociti, precursori di normali dimensioni ma binucleati, elementi con piccoli nuclei separati (Figura 5). Una percentuale significativa di displasia, $\geq 25\%$, è stata riscontrata in circa il 40% dei casi di MDS, quasi mai nei controlli patologici e sani (Figura 6).

Elaborazione di un pannello morfologico

Abbiamo quindi costruito un pannello morfologico comprendente le alterazioni displastiche sulla base della loro sensibilità e specificità (Tabella 2). Utilizzando il pannello morfologico abbiamo riclassificato la nostra casistica secondo i criteri WHO 2008. Escluse quindi le forme di RAEB-t, riclassificate come AML *de novo*, e le CMML, riclassificate come sindromi mielodisplastiche/mieloproliferative, la nostra casistica risultava costituita da 292 casi di MDS, contro i 429 casi classificati secondo la FAB.

Valore prognostico degli aspetti displastici

I pazienti sono stati seguiti con un *follow-up* di 1-246 mesi. Il valore prognostico negativo associato alla displasia midollare multilineare è stato confermato dallo studio della sopravvivenza globale e del tasso di sopravvivenza libera da malattia tramite curve di Kaplan-Meier (Figura 7). Inoltre, all'analisi univariata, la percentuale di blasti midollari, la displasia multilineare e la citopenia trilineare dimostravano valore prognostico significativo. L'analisi multivariata (comprendente età, sesso, alterazioni displastiche ed altre variabili) non confermava invece il valore prognostico della pancitopenia come significativo. In altri termini, un paziente affetto da MDS con displasia multilineare e una sola citopenia periferica ha prognosi significativamente peggiore di un paziente pancitopenico con displasia unilineare (Figura 8). L'analisi multivariata dimostrava inoltre un significato prognostico sfavorevole della displasia granulocitaria e/o megacariocitaria; la diseritripoiesi non influiva invece sulla prognosi.

Discussione

Le MDS rappresentano un problema complesso. Le classificazioni attualmente in uso sono dotate di valenza prognostica; in particolare la WHO 2008 evidenzia il peso prognostico sfavorevole associato alle forme con displasia midollare multilineare, sottolineando l'importanza della valutazione delle caratteristiche morfologiche oltre che della percentuale di blasti midollare e della presenza di anomalie citogenetiche. L'importanza clinica di questa classificazione è stata dimostrata da studi di tipo retrospettivo [6] e prospettico [12], in termini di risposta ad alcuni approcci terapeutici [13] e sulla base della diversa frequenza dello sviluppo di clonalità [14] e delle alterazioni citogenetiche [15] nei diversi sottogruppi di MDS individuati. La WHO 2008 fornisce anche criteri diagnostici minimi per la definizione di displasia midollare. Data l'importanza diagnostica del dato morfologico, risulta necessaria una più chiara definizione delle principali tipologie di displasia midollare, dal momento che non esistono ancora criteri morfologici internazionalmente accettati per la valutazione dei diversi aspetti di displasia. Il pannello morfologico da noi proposto ha lo scopo di rendere l'analisi microscopica più oggettiva e riproducibile e quindi di rendere più agevole la diagnosi differenziale tra MDS primitive e citopenie di altra natura, oltre che la distinzione delle diverse forme di MDS in base

al diverso peso prognostico. I nostri dati confermano il valore prognostico della classificazione WHO, in particolare la forte correlazione tra displasia multilineare, netta riduzione dei tassi di sopravvivenza globale e libera da malattia e aumento della probabilità di evoluzione in AML. Infatti le forme caratterizzate da displasia multilineare, indipendentemente dal numero di citopenie periferiche, presentano una prognosi più severa. In conclusione, l'utilizzo del pannello morfologico da noi elaborato potrebbe servire per una più corretta applicazione della classificazione WHO e l'inclusione del grado di displasia in eventuali nuovi sistemi di *score* prognostico per MDS potrebbe servire per migliorare la gestione clinico-terapeutica del paziente con MDS.

Tabelle e figure

Tabella 1. Classificazione WHO 2008 [8].

WHO 2001	WHO 2008	% blasti midollari	% blasti periferici
<i>RA</i> (anemia refrattaria)	<ul style="list-style-type: none"> • Citopenia refrattaria con displasia unilineare (displasia >10% in una sola linea cellulare) • Citopenia refrattaria con displasia multilineare (displasia >10% in almeno 2 linee cellulari) • MDS con isolata del(5q) (displasia eritroide e megacariocitaria) 	<5	<1
<i>RARS/RCMD-RS</i> (anemia/citopenia refrattaria con sideroblasti ad anello)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>RARS</i> (displasia eritroide)/<i>RCMD</i> (displasia in 2-3 linee) con <15% di sideroblasti ad anello 	<5	<1
<i>MDS-U</i> (MDS non determinata)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>MDS-U</i> (<i>RCUD/RCMD</i>) • MDS con pancitopenia e displasia unilineare • MDS con citogenetica correlata ma displasia <10% 	<5 <5 <5	<1 <1 <1
<i>RAEB-1</i> (anemia refrattaria con eccesso di blasti in trasformazione-1)	<ul style="list-style-type: none"> • Displasia uni- o multi-lineare 	>5, <9	>2, <4
<i>RAEB-2</i> (anemia refrattaria con eccesso di blasti in trasformazione-2)	<ul style="list-style-type: none"> • Displasia uni- o multi-lineare, comprese come entità particolari MDS ipocellulari e MDS con fibrosi midollare 	>10, <19	>5, <19, corpi di Auer

Tabella 2. Pannello morfologico: di ciascuna linea cellulare sono indicati sensibilità (SE), specificità (SP) e valore prognostico negativo (PUV).

LINEA ERITROIDE diseritropoiesi ≥10%	SE 71	SP 91	PUV 0.17
<i>Megaloblastosi</i>	79	73	0.92
<i>Picnosi nucleare</i>	69	59	0.45
<i>Gemmazione nucleare</i>	79	55	0.48
<i>Contorni nucleari irregolari</i>	77	47	0.02
<i>Multinuclearità</i>	79	51	0.02
<i>Ponti internucleari</i>	58	40	0.74
<i>Vacuolizzazione citoplasmatica</i>	87	47	0.58
<i>Inclusioni citoplasmatiche</i>	77	62	0.34
<i>Ponti intercitoplasmatici</i>	56	43	0.79
<i>Emoglobinizazione incompleta</i>	70	51	0.65
<i>Citoplasma sfrangiato</i>	66	48	0.11
<i>Asincronismo nucleo/citoplasmatico</i>	84	42	0.92
<i>Sideroblasti ad anello</i>	98	54	0.62
LINEA GRANULOCITARIA disgranulopoiesi ≥10%	SE 90	SP 55	PUV 0.0004
<i>Blocco maturativo</i>	94	42	0.75
<i>Asincronismo nucleo/citoplasmatico</i>	89	46	0.95
<i>Nuclei tipo Pseudo-Pelger</i>	82	50	0.52
<i>Forma nucleare bizzarra</i>	67	59	0.91
<i>Ipo-degranulazione citoplasmatica</i>	84	55	0.18
<i>Anomalie tintoriali</i>	100	41	0.18
<i>Anisocitosi</i>	83	50	0.42
<i>Prevalenza di forme immature</i>	80	45	0.01
LINEA MEGACARIOCITARIA dismegacariopoiesi ≥25%	SE 98	SP 58	PUV 0.000
<i>Forme larghe mononucleate</i>	71	58	0.8
<i>Nuclei dispersi</i>	88	54	0.67
<i>Ipolobularità nucleare</i>	56	45	0.99
<i>Piccoli elementi binucleati</i>	86	59	0.01
<i>Micromegacariociti</i>	91	53	0.01
<i>Elementi degranulati</i>	88	51	0.14

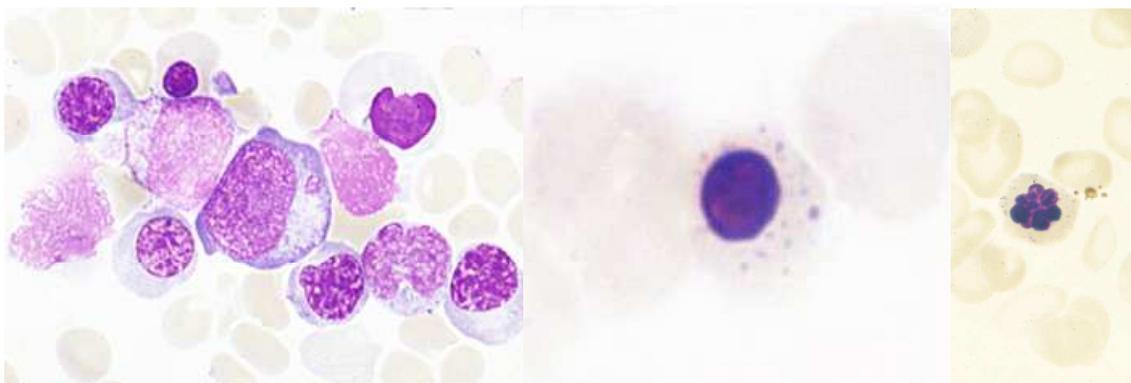


Figura 1. Anomalie morfologiche più frequenti nella serie eritroide: megaloblastosi, picnosi nucleare, granulazioni citoplasmatiche, irregolarità dei contorni nucleari (da sinistra a destra).

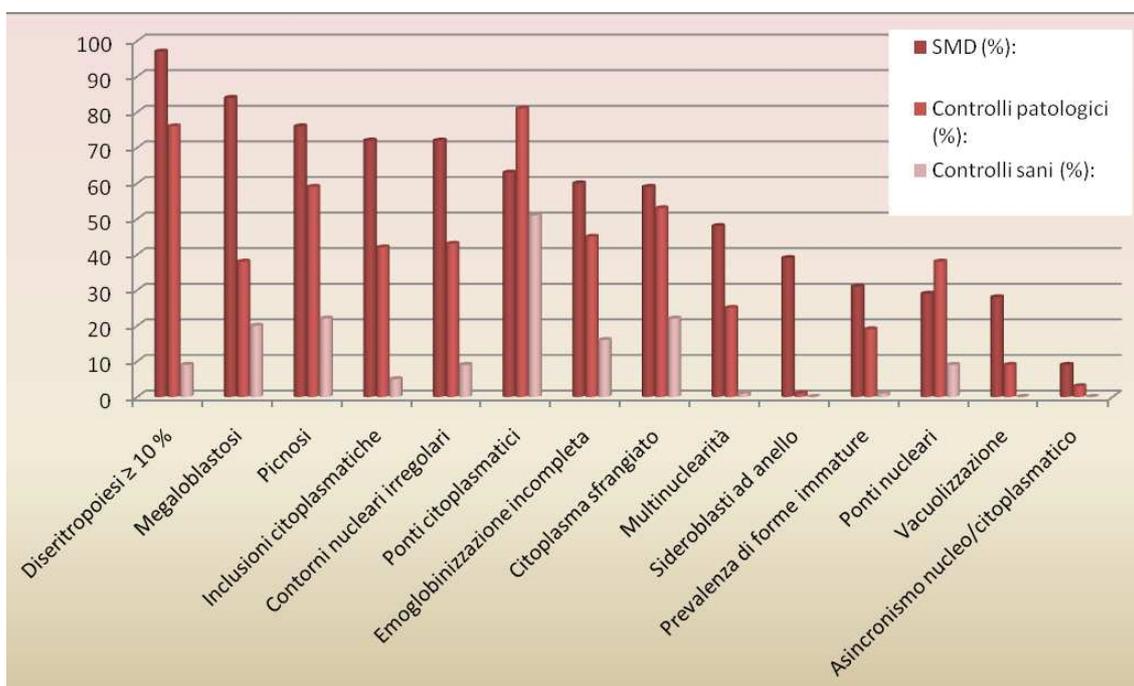


Figura 2. Caratteri morfologici di diseritropoesi: frequenza delle alterazioni displastiche.

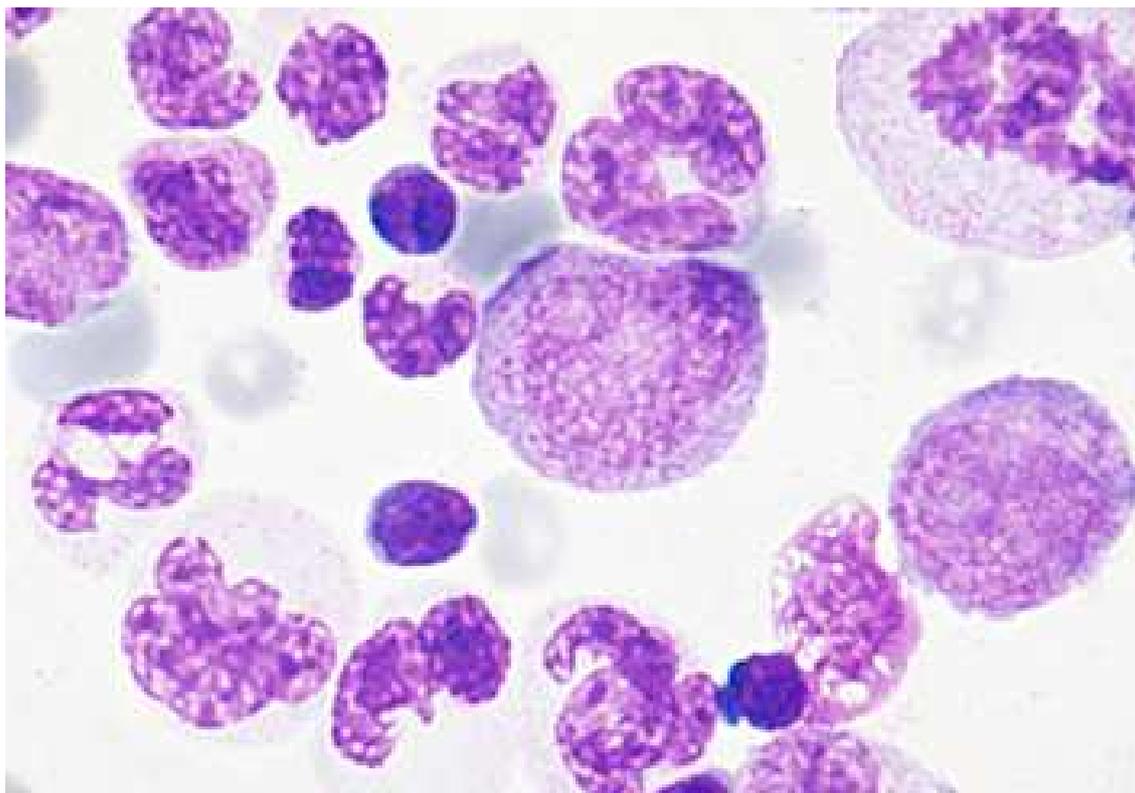


Figura 3. Forma nucleare bizzarra nella serie granulocitaria.

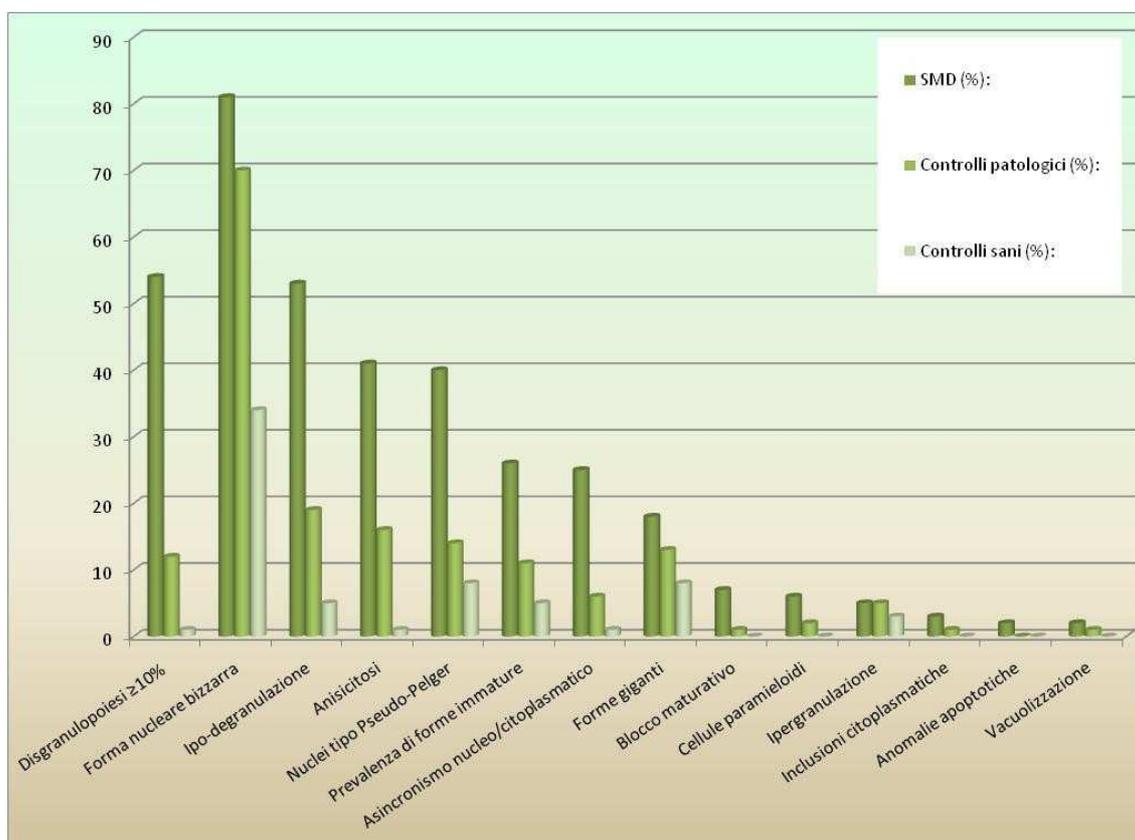


Figura 4. Caratteri morfologici di disgranulopoiesi: frequenza delle alterazioni displastiche.

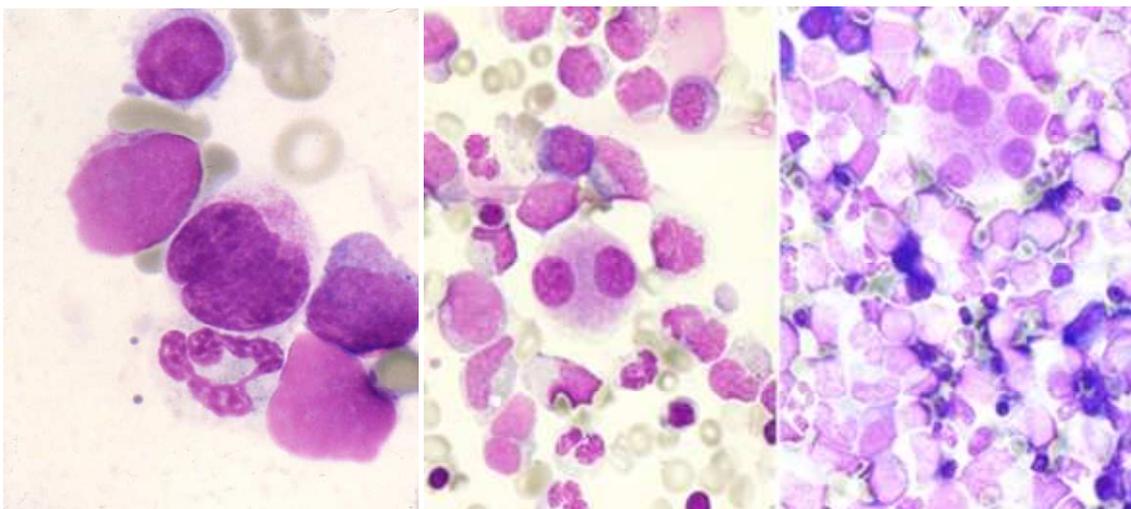


Figura 5. Anomalie morfologiche più frequenti nella serie megacariocitaria: micromegacariociti, precursori binucleati, precursori con piccoli nuclei separati.

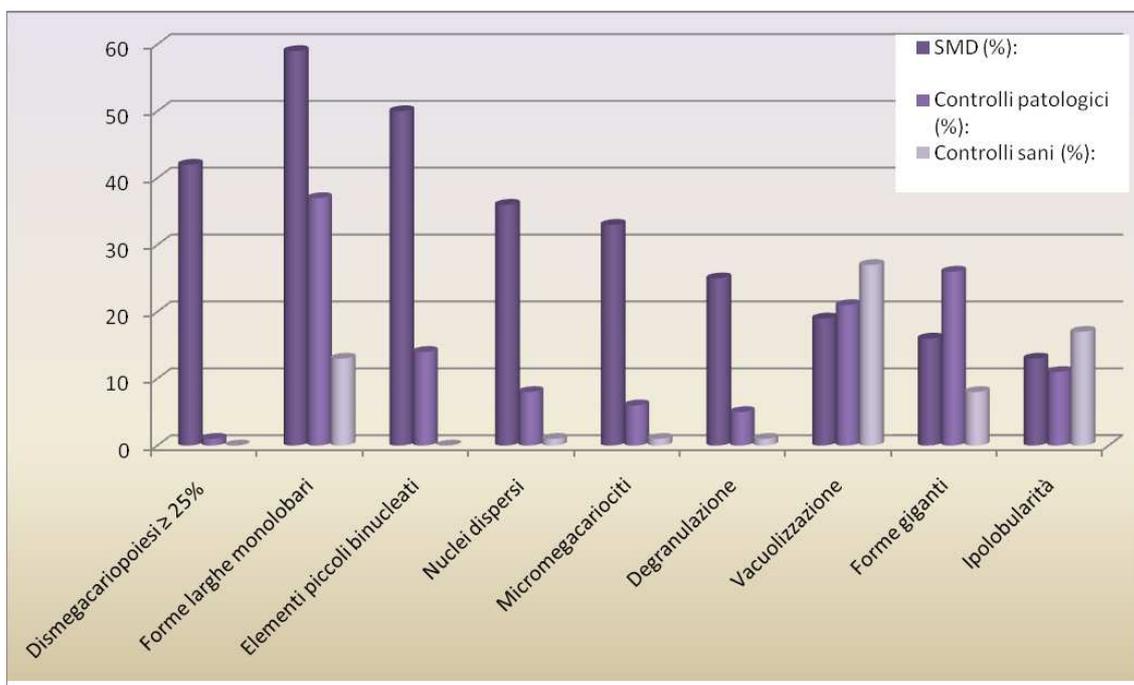


Figura 6. Caratteri morfologici di dismegacariopoesi: frequenza degli aspetti displastici.

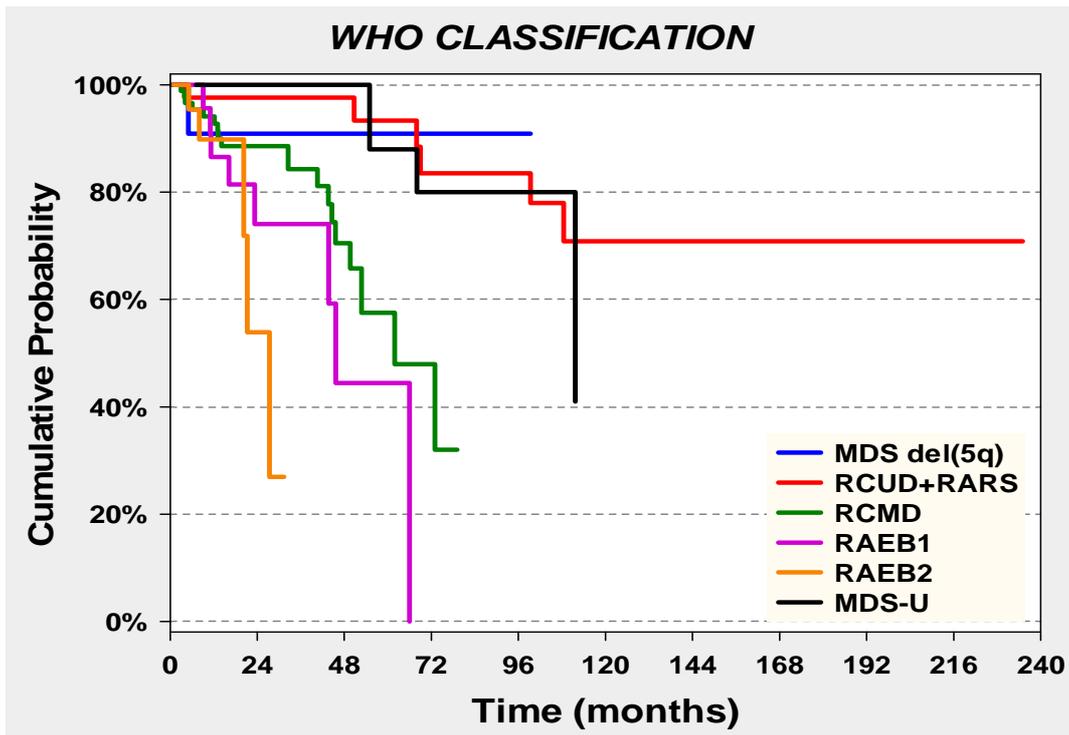


Figura 7. Curve di Kaplan-Meier per la sopravvivenza globale.

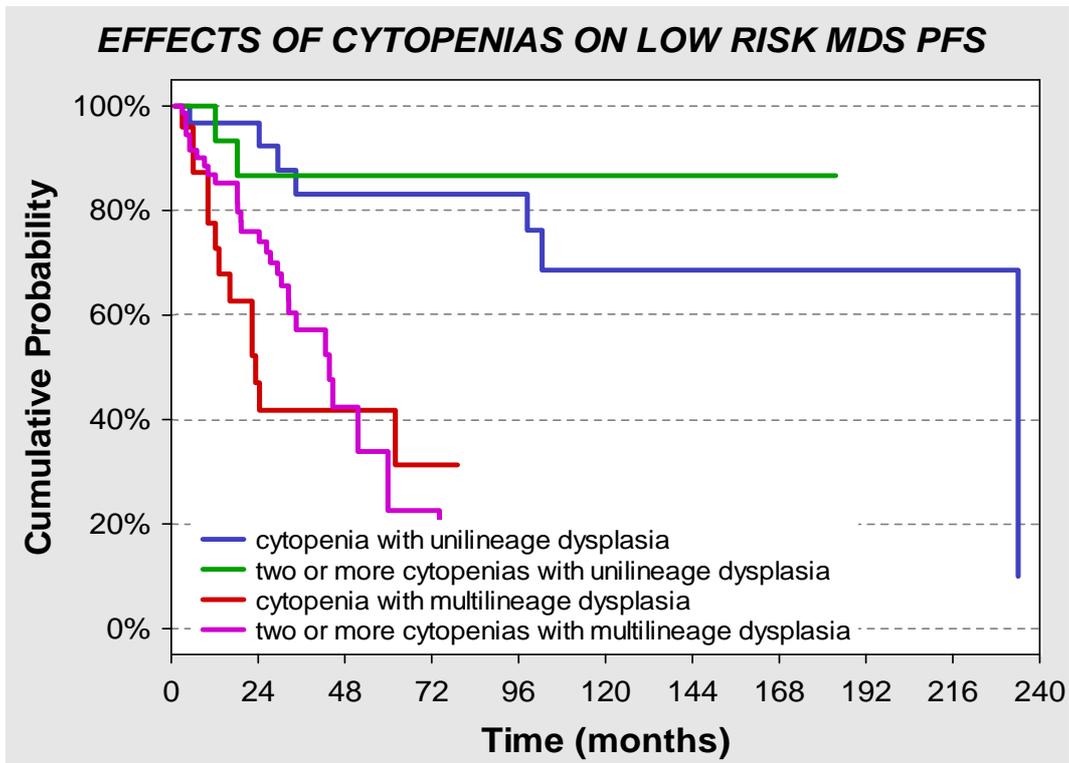


Figura 8. Effetto prognostico della displasia midollare e della citopenia periferica.

Bibliografia

1. Pathology and Genetics, Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. *IARC press*, Lyon 2001.
2. Cantù Rajnoldi A, Fenu S, Krndrup G et al. Evaluation of dysplastic features in myelodysplastic syndromes: experience from the morphology group of the European Working Group in Childhood. *Ann Hematol* 2005;84:429-433.
3. Ramos F, Fuertes-Nunez M, Suarez-Vilela et al. What does apoptosis have to do with clinical features in MDS?. *Haematol* 2002;87:381-391.
4. Cazzola M, Malcovati L. Myelodysplastic syndrome-coping with ineffective hematopoiesis. *N Engl Journal of Med* 2005;352:536-538.
5. Invernizzi R. The role of apoptosis in myelodysplastic syndrome. *Haematol* 2002;87:337-339.
6. Malcovati L, Della Prta MG, Pascutto C et al. Prognostic Factors and Life Expectancy in Myelodysplastic Syndromes Classified According to WHO Criteria: A Basis for Clinical Decision Making. *Journal of Clin Oncol* 2005;23:7594-7603.
7. Santini V, Alessandrino PE, Angelucci E et al. Clinical management of myelodysplastic syndromes: update of SIE, SIES, GITMO practice guidelines. *Leuk Res* 2010;87:337-339.
8. WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues. *WHO Press*, Lyon 2008.
9. Greenberg P, Cox C, Le Beau MM et al. International Scoring System for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079-2088.
10. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematol* 1982;51:189-199.
11. Douglas AS, Dacie JV. The incidence and significance of iron-containing granules in human erythrocytes and their precursors. *Journal of Clin Pathol* 1953;307-313.
12. Germing U, Strupp C, Kuendgen A et al. Prospective validation of the WHO proposals for the classification of myelodysplastic syndromes. *Haematol*, 2006;91:1596-1604.
13. Howe RB, Porwit-Mac Donald A, Wanat R et al. The WHO classification of MDS does make a difference. *Blood*, 2004;103:3265-3270.
14. Cermak J, Belickova M, Krejcova H et al. The presence of clonal cell subpopulations in peripheral blood and bone marrow of patients with refractory cytopenia with multilineage dysplasia but not patients with refractory anemia may reflect a multistep pathogenesis of myelodysplasia. *Leuk Res*, 2005;29:371-379.
15. Bernasconi P, Klersy C, Boni M et al. WHO classification in combination with cytogenetic markers improves the prognostic stratification of patients with the novo primary myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematol*, 2007;137:193-205.