

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E MORFOLOGICA DELLE NEOPLASIE MIELOPROLIFERATIVE: CONFRONTO FRA FORME CLASSICHE E FORME ASSOCIATE A TROMBOSI IN SITI INUSUALI.

METODI

Per il presente studio sono stati complessivamente valutati 29 pazienti con una pregressa diagnosi di trombosi splancnica (SVT) associata a una neoplasia mieloproliferativa (MPN) *BCR-ABL1*-negativa formulata fra il 1979 ed il 2013 e regolarmente seguiti presso l'UOC Oncoematologia della Fondazione IRCCS Ca' Granda – Ospedale Maggiore Policlinico di Milano. I criteri di inclusione previsti nel presente studio erano una diagnosi strumentale di SVT, associata ad una diagnosi di MPN formulata in accordo con i criteri WHO del 2008.

Le biopsie ossee ottenute alla diagnosi fissate in formalina ed incluse in paraffina, colorate con ematossilina-eosina, Giemsa e impregnazione argentea secondo Gomori, sono state rivalutate in dettaglio da un emopatologo esperto, come già precedentemente descritto [1].

Mutazioni di *JAK2*, *MPL* e *CALR* sono state ricercate su DNA estratto da granulociti provenienti da sangue periferico. La mutazione V617F del gene *JAK2* è stata ricercata tramite PCR allele-specifica, eseguita secondo la metodica descritta da Baxter et al. [2], e quindi confermata tramite sequenziamento diretto (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Warrington, UK) impiegando il Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK). Per l'analisi quantitativa dell'allele burden di *JAK2*V617F è stato utilizzato il Kit *JAK2* MutaQuant™ (Ipsogen Inc., New Haven, CT), basato sul principio delle sonde oligonucleotidiche idrolitiche a doppio fluorocromo RQ-PCR. Mutazioni di *MPL*, in particolare W515L, W515K, W515A, S505N e G509C, sono state ricercate tramite sequenziamento diretto dell'esone 10 del gene. A questo fine i primer impiegati sono stati: *MPL*10F 5' TAGCCTGGATCTCCTTGGTG 3' e *MPL*10R 5' CCTGTTTACAGGCCTTCGGC 3'. Allo scopo di identificare la presenza di delezioni o di inserzioni a carico dell'esone 9 del gene *CALR*, sono stati impiegati primer disegnati sulla base del protocollo descritto da Klampfl et al. [3].

RISULTATI

Le più comuni forme di SVT sono risultate essere la trombosi portale e quella splenica, seguite dalla trombosi mesenterica, e da ultimo dalla sindrome di Budd-Chiari. Per quanto concerne i dati di laboratorio, i valori mediani dei livelli di emoglobina, conta dei globuli bianchi e delle piastrine sono risultati tutti entro il range di normalità; al contrario i livelli serici di LDH sono risultati aumentati e la maggior parte dei pazienti (79%) si presentava all'esordio con un quadro di splenomegalia palpabile.

In merito invece al profilo molecolare, la mutazione V617F di *JAK2* è stata identificata in 27 casi (93.1%), anche se con un valore di burden allelico estremamente variabile (mediana 27%, range 4.8-97%). I rimanenti due casi *JAK2*-negativi sono stati valutati anche per la presenza di mutazioni di *MPL* e *CALR* e uno di essi è risultato portatore della mutazione *MPLW515K*, mentre nell'ultimo caso entrambi i geni sono risultati non mutati, definendo quindi il paziente come affetto da una forma di MPN cosiddetta "triplo-negativa".

Per quanto riguarda la valutazione istologica della biopsia osteo-midollare, complessivamente 11 dei 29 casi esaminati (38%) sono stati inquadrati come policitemia vera (PV), altri 11 casi (38%) come mielofibrosi primaria (PMF) e i rimanenti 6 casi (20%) come trombocitemia essenziale (ET). Un singolo caso presentava invece caratteristiche istologiche compatibili con una diagnosi di MPN, ma senza una morfologia specifica ed è stato perciò inquadrato come una forma di MPN, non altrimenti classificabile (MPN-U). Complessivamente, l'accuratezza diagnostica è risultata quindi pari a circa l'88%.

Il passo successivo è stato quello di combinare i dati anatomopatologici con quelli clinico-laboratoristici. In base ai criteri WHO del 2008, è stato possibile classificare solamente tre pazienti (10%) come affetti da PV, 11 (38%) da PMF e due (7%) da ET. Al contrario, nei 13 casi rimanenti (45%), la presenza di chiare discrepanze fra le caratteristiche cliniche e quelle morfologiche ha reso necessario classificare questi pazienti come affetti da MPN-U.

Volendo entrare più nel dettaglio, solo nel caso della PMF è stato possibile identificare una completa concordanza fra le caratteristiche morfologiche e i dati clinici. Al contrario, considerando i casi con un fenotipo morfologico simil-PV, questi erano risultati tutti positivi per la mutazione *JAK2V617F*, ma 8 di questi 11 pazienti non rispondevano al primo dei criteri maggiori previsti per la diagnosi di PV (ossia un tasso di emoglobina >18.5 g/dl negli uomini e >16.5 g/dl nelle donne). Tenendo poi in considerazione anche la nuova entità nosologica definita come "masked" PV [4], abbiamo considerato la proposta di una riduzione dei livelli diagnostici di emoglobina (>16.5 g/dl negli uomini e >16 g/dl nelle donne), ma anche tale criterio non veniva rispettato. In aggiunta, in tutti questi pazienti i livelli serici di eritropoietina (EPO) erano normali, se non elevati.

Da ultimo, considerando i casi con un profilo morfologico simil-ET, anch'essi erano risultati tutti positivi per la presenza della mutazione V617F di *JAK2*, ma 4 di questi 6 pazienti non rispettavano il primo criterio previsto per la diagnosi di ET (conta piastrinica >450.000/mmc). Inoltre, in due di questi pazienti i livelli serici di EPO sono risultati inappropriatamente ridotti.

Alla luce dei risultati fin qui esposti, possiamo affermare che anche nei pazienti affetti da MPN associate a SVT, in maniera analoga alle forme di MPN "classiche", è possibile identificare tre differenti profili morfologici, definiti come simil-PV, simil-PMF o simil-ET. Di conseguenza, a differenza di quanto accade per i valori di crasi ematica, la biopsia osteo-midollare può effettivamente rappresentare una metodica di indagine sufficientemente specifica per porre diagnosi di MPN e quanto meno per suggerire una distinzione fra le tre forme "classiche" anche nei casi associati a SVT.

Andando successivamente ad analizzare le caratteristiche clinico-laboratoristiche di ciascun caso in base al suo fenotipo morfologico, sono emersi gradi di corrispondenza piuttosto differenti.

In particolare, nella PMF è stato possibile dimostrare una concordanza del 100%, anche escludendo dalle analisi due dei quattro criteri minori (ossia la presenza di splenomegalia e di anemia) a causa della loro bassa specificità in questo subset di pazienti.

Di converso, nei casi con un profilo morfologico simil-ET vi erano delle discrepanze significative; più nel dettaglio, solo in due casi su sei è stata confermata la diagnosi di ET, mentre nei rimanenti quattro casi i valori di crasi ematica erano tutti inclusi entro i range di normalità. In aggiunta, è stato identificato un ulteriore fattore potenzialmente confondente, quale livelli di EPO soppressi in due pazienti.

I livelli di concordanza più bassi sono stati comunque osservati nei pazienti con una morfologia simil-PV: solo tre di questi 11 casi presentavano infatti il tipico fenotipo clinico da PV. In questo senso, i nostri dati sono perfettamente in linea con quanto è stato riportato fino ad oggi in letteratura, avvalorando ulteriormente la tesi in merito alla scarsa specificità degli attuali criteri diagnostici per la PV nei pazienti con SVT [5]. In particolare, in questi pazienti i livelli di emoglobina erano frequentemente nel range di norma, se non ridotti, a causa di condizioni concomitanti quali emodiluizione, ipersplenismo e/o sanguinamenti occulti; di converso, il riscontro di un'eritropoiesi incrementata a livello midollare potrebbe anche rappresentare un fenomeno puramente reattivo alle condizioni prima menzionate. Un ulteriore punto critico è quindi rappresentato dai livelli serici di EPO, che in caso di SVT possono essere inappropriatamente elevati a seguito dell'insulto epatico, andando così peraltro a supportare l'incremento dell'eritropoiesi nel midollo osseo.

Per quanto riguarda invece le analisi molecolari, la mutazione V617F di *JAK2* è stata identificata nella maggior parte dei nostri pazienti, e in tutti i casi *JAK2*-positivi abbiamo valutato il cosiddetto burden allelico di *JAK2*: quest'ultimo è però risultato estremamente variabile, e quindi di scarsa utilità nel discriminare fra le diverse forme di MPN. Per quanto riguarda invece i due casi *JAK2*-negativi, in uno è stata identificata una mutazione rara del gene *MPL*, nota come W515K, mentre nel rimanente caso non si sono osservate mutazioni a carico dei geni *MPL* e *CALR*, ed è stato perciò definito come affetto da una MPN "triplo-negativa". Questi dati sono perfettamente in linea rispetto a quanto riportato in letteratura in merito all'importanza della ricerca della mutazione *JAK2*V617F nei pazienti con SVT [6-9]. Tuttavia, tale test diagnostico singolarmente preso non sempre è sufficiente: infatti, anche in una serie di pazienti relativamente piccola come la nostra, tale mutazione non era presente in due casi. Di conseguenza, in situazioni come queste il passo successivo dovrebbe essere quello di ricercare le mutazioni di *MPL* [10,11]. Per quanto riguarda infine le mutazioni di *CALR*, queste dovrebbero essere ricercate nei casi di SVT *JAK2*- ed *MPL*-negative, anche se Turon et al. [12] ed Haslam et al. [13] hanno recentemente descritto un'incidenza delle mutazioni di *CALR* estremamente bassa in due ampie coorti di pazienti con SVT di diversa eziologia. Analogamente, nel nostro unico caso *JAK2*- ed *MPL*-negativo, anche il gene *CALR* è risultato essere non mutato.

Alla luce di quanto sopra riportato, occorre ribadire che solamente considerando congiuntamente i dati clinici, morfologici e molecolari è stato possibile formulare una diagnosi di MPN in tutti i casi da noi presi in esame ed identificare una corrispondenza fra fenotipo morfologico e clinico in circa la metà dei pazienti [14]. Di conseguenza, riteniamo che la biopsia osteo-midollare dovrebbe rappresentare un elemento chiave nell'ambito di un corretto iter diagnostico delle SVT. E' pur vero che anche questa metodica è gravata da alcuni limiti: in particolare, la sua sensibilità diagnostica nel caso di una MPN associata a SVT risulta essere compresa fra il 64 e il 93.5% dei casi [7,15]. Inoltre, essa consente agli emopatologi di discriminare fra tre differenti profili morfologici, ma questi ultimi assai di frequente non corrispondono alle caratteristiche clinico-laboratoristiche di quello stesso paziente. Questo punto è di particolare importanza, dal momento che formulare una diagnosi di PV, piuttosto che di PMF o di ET correla con prognosi drammaticamente differenti, implicando ovviamente approcci terapeutici ben distinti.

In conclusione, il nostro studio suggerisce che un approccio omnicomprensivo che consideri dati morfologici, clinici e di biologia molecolare è indispensabile per poter arrivare a porre diagnosi di MPN nei pazienti esorditi con una SVT, alla luce delle loro caratteristiche di presentazione del tutto atipiche, con inevitabili risvolti clinici.

BIBLIOGRAFIA

1. Gianelli U, Bossi A, Cortinovis I, et al. Reproducibility of the WHO histological criteria for the diagnosis of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Mod Pathol* 2014;27:814-22.
2. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054–61.
3. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Eng J Med* 2013;369:2379-90.
4. Barbui T, Thiele J, Vannucchi AM, Tefferi A. Rethinking the diagnostic criteria of polycythemia vera. *Leukemia* 2014;28:1191–5.
5. Barosi G, Vannucchi AM, De Stefano V, et al. Identifying and addressing unmet clinical needs in Ph-neg classical myeloproliferative neoplasms: a consensus-based SIE, SIES, GITMO position paper. *Leuk Res* 2014;38:155-60.
6. Sekhar M, McVinnie K, Burroughs AK. Splanchnic vein thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Br J Haematol* 2013;162:730-47.
7. Primignani M, Barosi G, Bergamaschi G, et al. Role of the JAK2 mutation in the diagnosis of chronic myeloproliferative disorders in splanchnic vein thrombosis. *Hepatology* 2006;44:1528–34.
8. Dentali F, Squizzato A, Brivio L, et al. JAK2V617F mutation for the early diagnosis of Ph-myeloproliferative neoplasms in patients with venous thromboembolism: a meta-analysis. *Blood* 2009;113:5617–23.
9. Vannucchi AM, Guglielmelli P. JAK2 mutation-related disease and thrombosis. *Semin Thromb Hemost* 2013;39:496-506.
10. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006;3:e270.
11. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108:3472–6.
12. Turon F, Cervantes F, Colomer D, et al. Role of calreticulin mutations in the etiological diagnosis of splanchnic vein thrombosis. *J Hepatol* 2015;62:72-4.
13. Haslam K, Langabeer SE. Incidence of CALR mutations in patients with splanchnic vein thrombosis. *Br J Haematol* 2015;168:459-60.

14. Gianelli U, Iurlo A, Cattaneo D, Lambertenghi-Delilieri G. Cooperation between pathologists and clinicians allows a better diagnosis of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Expert Rev Hematol* 2014;7:255-64.
15. Kiladjian JJ, Cervantes F, Leebeek FW, et al. The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. *Blood* 2008;111:4922-9.