

Decalcificazione appropriata dei campioni di biopsia del midollo osseo nell'era degli studi genetici molecolari

Il midollo emopoietico è costituito da un micro ambiente , entro il quale si collocano e con il quale interagiscono ,le cellule deputate all' emopoiesi. Il midollo emopoietico è raccolto entro una struttura protettiva rigida ,la corticale ossea ,attraversata dalle trabecole della spugnosa .Il microambiente midollare è formato da tutte le strutture e delle cellule non emopoietiche compreso entro questi spazi. Gli elementi di supporto principali per l' emopoiesi sono la rete vasale ,gli adipociti ,i fibroblasti midollari e la matrice extracellulare. La funzione del microambiente è quella di fornire un supporto che consente l' homing attraverso molecole di adesione ,delle cellule staminali nelle “nicchie” midollari, la loro proliferazione e differenziazione e l'entrata in circolo delle cellule ematiche differenziate .Le cellule staminali che colonizzeranno il midollo osseo originano dal mesoderma e dal sacco vitellino ,migrano quindi al fegato (terzo mese) e dal quarto mese in avanti che costituirà la sede principale di ematopoiesi intrauterina e dal quarto mese in avanti occupano in totalità il midollo osseo .Da una cellula staminale originano precursori commissionati in senso linfoide e mieloide. Dalla cellula staminale mieloide originano tre tipi di cellule staminali commissionate , cioè programmate a differenziarsi nella serie: eritroide e megacariocitaria; granulocitaria neutrofila ,monocito –macrofagica e mastocitaria;granulocitaria eosinofila .

Fino a 18 anni l' emopoiesi è distribuita in tutto lo scheletro ,poi inizia una progressiva concentrazione nelle porzioni assiali dello scheletro : cranio ,vertebre ,coste sterno, pelvi epifisi prossimali dell' omero e del femore.

Per tanto nell' l' adulto la sede elettiva della Biopsia ossea midollare (BOM)è la spina iliaca postero superiore (SIPS),nella prima infanzia la sede è la cresta tibiale anteriore .Il campione biopsico deve avere una lunghezza congrua almeno (1,5-2 cm) e si utilizzano diversi aghi , il diametro è di 11 Gauge per l' adulto e di 13 Gauge per l' età pediatrica ,poste in fissativo adeguato (formalina tamponata) decalcificata e processata secondo i moduli istologici routinari.

La biopsia del midollo osseo è ampiamente eseguita in pazienti con neoplasie ematologiche e sarcomi o blastomi pediatrici. , la conservazione del materiale genetico è fondamentale nella gestione dei tessuti del midollo osseo, preservare l'acido nucleico intatto, così come le proteine intatte, è fondamentale nella gestione dei tessuti del midollo osseo. Preservare l'acido nucleico intatto, così come le proteine intatte, è fondamentale per fornire non solo una diagnosi patologica accurata, ma anche diverse opzioni terapeutiche ai pazienti.

Poiché la preparazione microtomica di sezioni di tessuto calcificati sarebbe resa impossibile dalla notevole durezza della sostanza inorganica ,questa deve essere allontanata prima di procedere all'inclusione, cioè i tessuti debbono essere decalcificati .I metodi di decalcificazioni sono molti numerosi ,qualsiasi metodo di decalcificazione provoca non solo la rimozione della sostanza inorganica ma in quote più o meno ampia anche la solubilizzazione di una componente organica pertinente alla matrice calcificata e rappresentata in larga misura da glicoproteine e da proteoglicani acidi .Due gruppi di sostanze sono generalmente utilizzate come decalcificanti le soluzioni acide ,e le sostanze ad azione chelante.

Qualunque sia la decalcificazione utilizzato è opportuno tenere presenti alcune regole generali:

- 1) La soluzione decalcificante deve essere abbondante ed eventualmente deve essere cambiata spesso in modo che essa non venga saturata dalla sostanza inorganica che si libera nel tessuto;

- 2) La soluzione deve essere agitata sia manualmente di tanto in tanto ,sia mediante agitatore meccanico, per evitare la saturazione dello strato di soluzione decalcificante a contatto del tessuto e per allontanare le bollicine di gas che spesso si formano ;
- 3) Sebbene la decalcificazione sia accelerata dall'aumento di temperatura conviene decalcificare a temperatura ambiente perché si riduce il grado di idrolisi della sostanza organica;
- 4) Non lasciare i tessuti nel decalcificante quando la decalcificazione è già terminata ,perché in generale la colorabilità istologica e istochimica delle strutture decalcificate è inversamente proporzionale alla durata della decalcificazione ;
- 5) Dopo la decalcificazione lavorare a lungo il tessuto e, se sono stati utilizzati decalcificanti acidi trattare con un neutralizzante , generalmente un tampone a Ph 7,2 (molto indicato a tale scopo è una soluzione di formalina 10% in tampone a Ph 7,2)

I decalcificanti acidi: sono numerosissimi ,i migliori sembrano essere quelli a base di acido nitrico ,a causa di una più rapida azione decalcificante .L'acido nitrico viene utilizzato in soluzione al 5% e per migliorare la conservazione delle strutture decalcificate ,può essere associata alla formalina. L'acido nitrico ha il difetto di ingiallire notevolmente i tessuti a causa dello sviluppo dell'acido nitroso. I protocolli con gli acidi sono inappropriati per studi genetici danneggiano irrimediabilmente il materiale genetico.

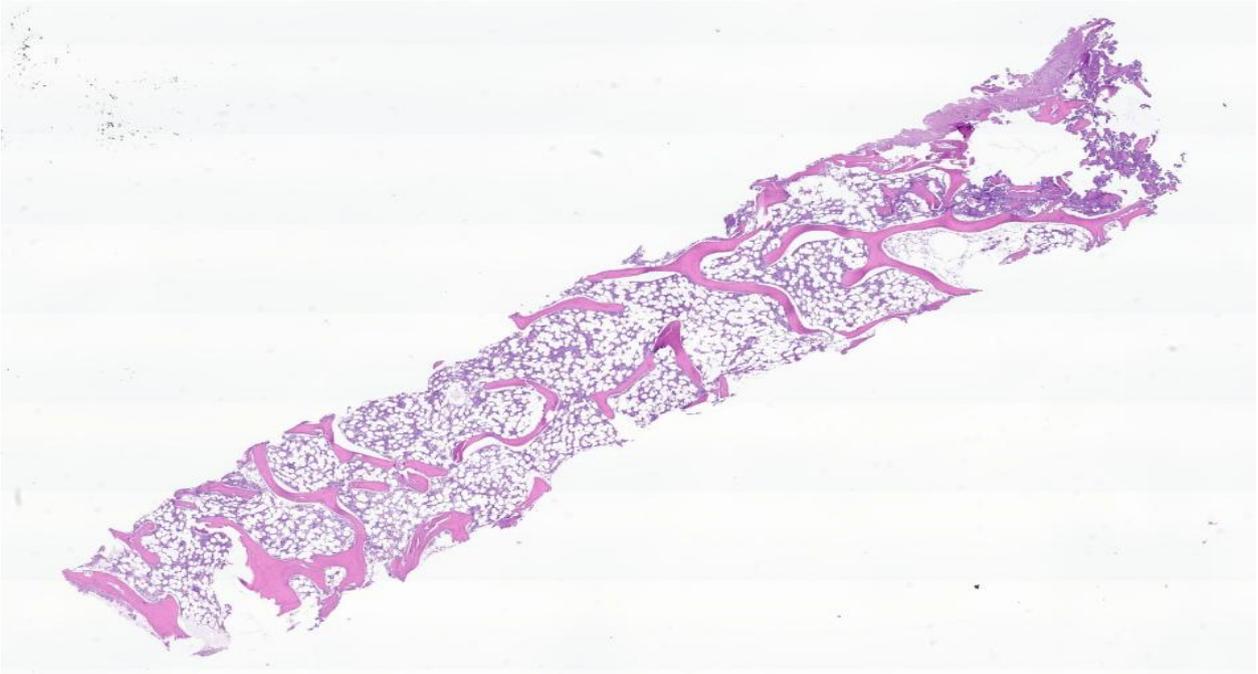
Sostanze chelanti: si intende per chelante una sostanza la cui molecola presenta due o più gruppi chimici in grado di reagire con lo stesso ione metallico con una formazione di un anello chiuso. Il termine chelante deriva infatti dalla similitudine tra questo anello che si chiude e le chele di un granchio. Le sostanze chelanti sono utilizzate come decalcificanti soprattutto con la speranza che si potesse evitare la perdita di sostanza organica che si verifica con le sostanze acide . In realtà una quota di sostanza organica ,viene perduta anche con questa sostanza .Esse hanno inoltre il difetto di decalcificare molto lentamente ,difetto in parte compensato dal fatto che i chelanti introducono nel tessuto modificazione chimiche meno cospicuo di quelle dovuta dell'uso delle sostanze acide

Il chelante utilizzato come decalcificante è l'EDTA. Con tale sigla si indica il sale disodico dell'acido etilendiaminotetracetico utilizzato o in soluzione al 5,5% in tampone fosfato a ph 7,4 oppure in soluzione 5% in formalina 10%

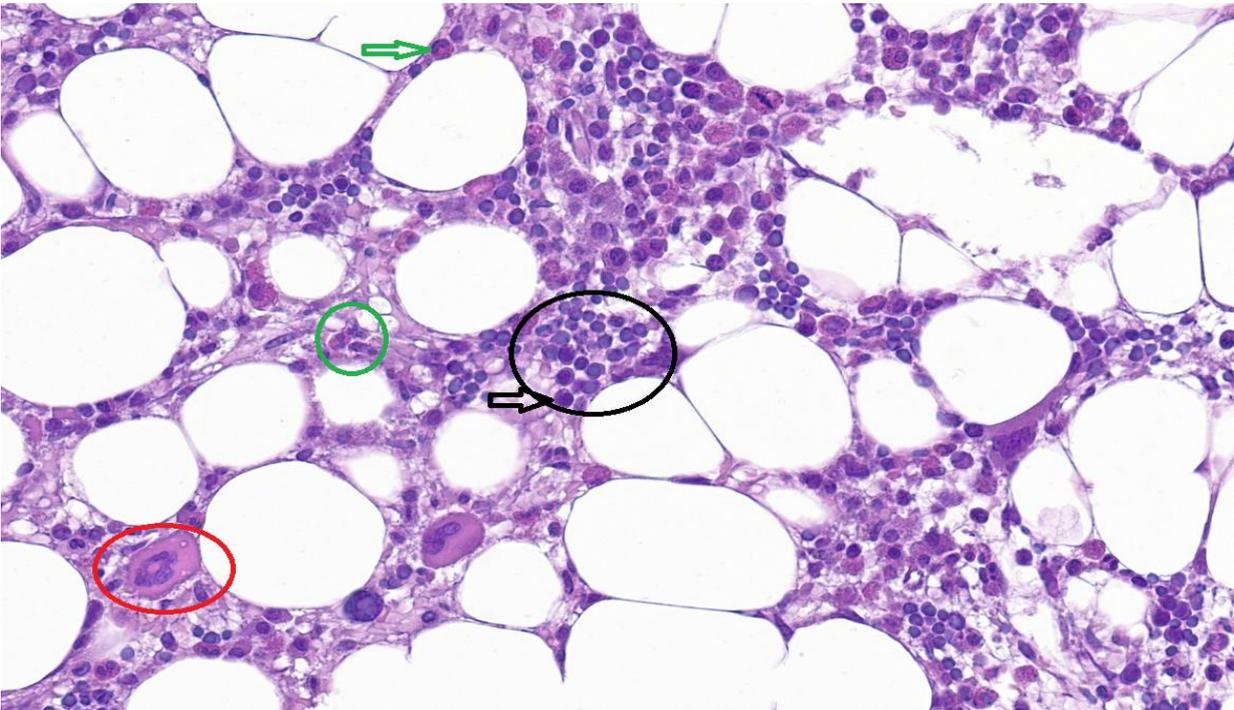
Nella scelta degli agenti decalcificanti, il rapporto costo-efficacia e i tempi di risposta dalla biopsia alla diagnosi patologica finale sono fattori importanti. Le soluzioni acide costano meno e richiede meno tempo rispetto all'EDTA. I tessuti ossei di piccole dimensioni, come il midollo osseo, richiedono dalle tre alle ventiquattro ore per la decalcificazione con il protocollo EDTA.

In quest'epoca, dove degli studi genetici molecolari, la fanno da maggiore , la decalcificazione con EDTA come si è visto in numerosi studi ,rappresenta il **gold standard** , pertanto deve essere utilizzata di routine nel reparto di istopatologia nonostante il lieve ritardo nella processazione dei tessuti, essa non compromette la qualità della colorazione immunoistochimica e tintologica , e soprattutto preserva maggiormente gli acidi nucleici.

In allegato due immagini di biopsia osteomidollare normale in pazienti con pregressa storia di linfoma a grandi cellule B trattato con chemioterapia R-CHOP.Il midollo appare normale;(normocellulato per l'età anagrafica del paziente ,trilineare ,normomaturante)



a) Bom normale E.E 25X.png



b) BOM normale E.E 30X, in nero colonie eritroidi, freccia nera elementi eritroidi immaturi (eritroblasti) in verde elementi maturi della linea granulopoietica , freccia verde precursori mieloidi. In rosso megacariociti.png

Si ringrazia per le immagini il Dott. Lako Kostica Dirigente Medico specialista in Anatomia Patologica esperto in malattie emolinfoproliferative presso Polo Ospedaliero integrato ASL Latina