Anno 5 - Numero 2 - 2018

Ematologia Oncologica.it

Mielofibrosi

Organo Ufficiale
della **Fondazione Matarelli** - Milano

Con il supporto non condizionante di

Celgene

Ematologia Oncologica.it

www.ematologiaoncologica.it

Mielofibrosi

Basi molecolari
Paola Guglielmelli 7

Nuovi criteri classificativi
Umberto Gianelli, Gianluca Lopez 21

Modelli prognostici
Margherita Maffioli 29

Terapia farmacologica
Francesca Palandri, Giuseppe Auteri e Nicola Vianelli 39

Trapianto di cellule staminali
Francesca Patriarca, Roberta Demarchi, Alessandra Sperotto 47

Ematologia Oncologica.it
Vol 5 - n.2 - 2018

Direttore Responsabile
Giorgio Maggiani

Direttore Scientifico
Giorgio Lambertenghi Deliliers
Fondazione Matarelli, Milano

Comitato Editoriale
Sergio Amadori
Università degli Studi Tor Vergata, Roma

Mario Boccadoro
Università degli Studi, Torino

Alberto Bosi
Università degli Studi, Firenze

Michele Cavo
Università degli Studi, Bologna

Antonio Cuneo
Università degli Studi, Ferrara

Marco Gobbi
Università degli Studi, Genova

Cristina Mecucci
Università degli Studi, Perugia

Fabrizio Pane
Università degli Studi, Napoli

Francesco Passamonti
Università degli Studi, Varese

Gianni Pizzolo
Università degli Studi, Verona

Giorgina Specchia
Università degli Studi, Bari

Ematologia Oncologica.it
è una rivista quadrimestrale monotematica, di aggiornamento in lingua italiana, che ha essenzialmente lo scopo educativo di rendere disponibili le informazioni più aggiornate su argomenti pertinenti le malattie del sangue, in particolare quelle neoplastiche. Per raggiungere questo obiettivo la rivista desidera coinvolgere gli specialisti italiani più qualificati e informare il lettore sui più recenti progressi nel campo della ricerca di base, della clinica e della terapia.

La rivista si attiene alle raccomandazioni indicate dal World Association of Medical Editors (WAME) riguardante l'etica delle pubblicazioni in ambito sanitario.

Registrazione Tribunale di Milano
n. 348 del 19/11/2013

Progetto grafico
Dynamicom srl

Sito Internet
www.ematologiaoncologica.it

Coordinamento editoriale
Dynamicom - Milano
Tel. (+39)0289693750 - Fax (+39)02201176

Editore
Fondazione Matarelli

Periodicità
Quadrimestrale

Avvertenze ai lettori
L'Editore declina ogni responsabilità derivante da errori od omissioni eventualmente citati negli articoli, ed invita il lettore a controllare personalmente l'esattezza, facendo riferimento alla bibliografia relativa.

Norme per gli Autori
- L'accettazione dei testi inviati è comunque subordinata al parere del Comitato Editoriale che deve verificare la loro compatibilità con le norme redazionali.
- Gli Autori dei testi sono gli unici responsabili del loro contenuto, e della riproduzione delle immagini allegate.
- Il primo Autore è tenuto ad ottenere l'autorizzazione di "Copyright" qualora utilizzi figure e/o tabelle già pubblicate altrove.
- La proprietà dell'articolo, una volta pubblicato, appartiene alla Fondazione Matarelli, (Largo Crocetta, 2 - 20122 MI) che ha depositato il nome della rivista presso il Tribunale di Milano in data 19/11/2013
- Il manoscritto deve essere inviato a Dynamicom Edizioni (segreteria@ematologiaoncologica.it) che, dopo averlo controllato ed impaginato, lo invierà al Direttore Scientifico (giorgio.lambertenghi@unimi.it) per la revisione e il controllo della stesura secondo le norme redazionali. Le bozze di stampa verranno quindi rinviate all'Autore per le opportune correzioni, che dovrà provvedere entro cinque giorni lavorativi a rinviarle a: segreteria@ematologiaoncologica.it

Norme redazionali
Il contenuto dell'articolo, redatto utilizzando il programma Microsoft Word per Windows o Macintosh, non deve superare le 30-35 cartelle dattiloscritte (2000 battute cad.) compresa la bibliografia, e corredato delle illustrazioni (tabelle, grafici, figure) nel numero che l'Autore ritiene necessario, in file ad alta risoluzione (salvate in formato pdf, jpg o eps).

Lo stile del manoscritto, le citazioni bibliografiche e il loro riferimento nel testo del manoscritto devono seguire le raccomandazioni dell'International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). Per le relative informazioni, gli Autori sono pregati di consultare il sito http://www.icmje.org.

L'articolo deve essere così strutturato:
- **Titolo conciso** e pertinente con il tema della rivista;
- **Prima pagina** con nome e cognome degli Autori, istituzione di appartenenza, foto tessera a colori del primo Autore;
- **Introduzione iniziale** che esponga in maniera chiara lo scopo dell'articolo;
- **Corpo del testo** suddiviso in sottocapitoli a contenuto omogeneo;

Pagina finale:
1) nome e cognome del primo autore, con telefono, fax, e-mail al quale andrà indirizzata la corrispondenza;
2) eventuali **ringraziamenti** a persone e/o associazioni;
3) 3-5 parole chiave.

Bibliografia
Per lo stile nella stesura seguire le seguenti indicazioni o consultare il sito "International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements far Manuscripts Submitted to Biomedical Journals Sample References".
Le **voci bibliografiche** non devono superare il numero massimo di 150, numerate secondo l'ordine di comparsa nel testo, citate tra parentesi con il testo in apice e con i numeri arabi, tenendo presente gli esempi sottostanti.

Articoli con 1-6 autori
Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;30(1):100-1.

Bianchi AG, Rossi M, Patruno S, Miliani E. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;30(1):100-1.

Articoli con più di 6 autori
Bianchi AG, Rossi M, Patruno S, Miliani E, De Giglio I, Baldoni A, et al. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. N Engl J Med. 2000;30(1):100-1.

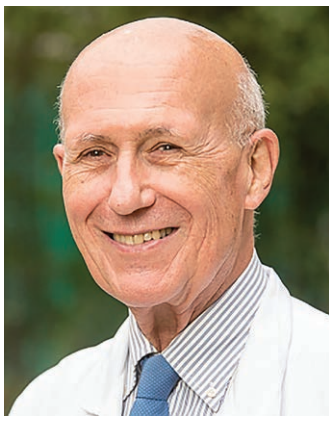
Abstract e Congressi
Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. ASH Annual Meeting Abstracts. 2000;100(10):1000.

Capitoli di libri
Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. In: Spagnoletti M. ed. The Hemoglobin, Vol 10. London: Raven Livingstone. 1980:10-15.

Bianchi AG. Immunologic effect of donor lymphocytes in bone marrow transplantation. Hematology Am Soc Hematol Educ Program 1980:10-15.

Editoriale

Giorgio Lambertenghi Deliliers
Fondazione Matarelli - Milano



Ematologia Oncologica.it dedica questo numero alla mielofibrosi, una neoplasia mieloproliferativa che, dopo una fase iniziale caratterizzata da una spiccata ipercellularità midollare, evolve progressivamente in uno stadio finale di fibrosi reticolinica e collagenosica. Recentemente la malattia ha suscitato un particolare interesse grazie ai risultati ottenuti con le tecniche di sequenziamento di nuova generazione e all'introduzione di farmaci mirati in grado di migliorare la qualità di vita dei pazienti. L'evento cardine è stato l'identificazione della mutazione del gene JAK2, presente nel 50-60% dei soggetti, responsabile della proliferazione delle cellule staminali emopoietiche. In mancanza di JAK2, altre mutazioni sono state rilevate, come quelle relative ai geni MPL e CALR. La complessità genetica e l'eterogeneità clonale della mielofibrosi sono state inoltre evidenziate dal rilievo di altre numerose mutazioni relative a geni coinvolti nella regolazione epigenetica e trascrizionale o nel processo di splicing. Nonostante i progressi della biologia molecolare, la diagnosi di mielofibrosi è ancora essenzialmente basata sui reperti del sangue periferico e del midollo. La fase iniziale prefibrotica è caratterizzata da una iperplasia della serie granulopoietica spostata a sinistra, da una riduzione dei precursori eritropoietici senza segni di displasia e soprattutto da atipie citologiche a carico dei megacariociti. Nella fase successiva, fibrotica avanzata, il midollo è quasi privo di cellule per una densa fibrosi reticolinica e collagenosica associata a intensa proliferazione vascolare con emopoiesi intrasinusoidale.

La variabilità della sopravvivenza dei pazienti con mielofibrosi, da pochi anni a diversi decenni dalla diagnosi, ha indotto a ricercare quali indicatori siano più significativi per la definizione del rischio clinico. Sono stati sviluppati modelli prognostici basati essenzialmente sull'età e sui parametri ematologici, la cui modificazione nel corso della malattia è indicativa per una progressiva trasformazione leucemica. Una suddivisione prognostica è stata proposta anche sulla evidenza di alterazioni citogenetiche singole o multiple e sullo stato mutazionale dei geni di più frequente riscontro. Sulla base della loro presenza il profilo prognostico viene definito ad alto rischio molecolare, mentre l'assenza suggerisce una più lunga sopravvivenza mediana. L'insieme delle informazioni clinico-ematologiche e genetico-molecolari ha portato allo sviluppo di sistemi prognostici integrati con l'obiettivo di razionalizzare e personalizzare le scelte terapeutiche. Le diverse opzioni devono essere adattate al singolo paziente, in base alle sue esigenze cliniche che sono prima di tutto l'anemia, la splenomegalia e i sintomi sistemici. La stratificazione del rischio è importante soprattutto per la programmazione di un eventuale trapianto di cellule staminali allogeniche. Nei pazienti asintomatici con malattia a rischio basso/intermedio è indicato un vigile monitoraggio e/o una terapia citoriduttiva in presenza di leucocitosi o trombocitosi. Se viceversa il carico sintomatologico è pesante, il paziente può beneficiare di un trattamento con ruxolitinib, bilanciandone i benefici con la sua tossicità, anche a lungo termine.

Il trapianto di cellule staminali allogeniche è l'unica modalità di trattamento che può potenzialmente curare la mielofibrosi. I primi studi sul condizionamento mieloablativo convenzionale hanno fatto emergere i limiti della procedura, rappresentati da un'elevata mortalità e dalla perdita dell'attecchimento dopo un iniziale recupero ematologico. Nell'ultimo decennio la platea dei candidati al trapianto si è ampliata grazie a due fattori: l'introduzione di modelli prognostici legati alle caratteristiche del paziente e del donatore e la scelta del regime di condizionamento. Essendo i pazienti prevalentemente al di sopra dei 45 anni e spesso portatori di comorbidità, sono indicati trattamenti a ridotta intensità. Al fine di ridurre le dimensioni della milza e il rischio di un mancato attecchimento, nella fase pretrapianto vengono utilizzati gli inibitori dei JACK2, impiegati anche nella fase di mantenimento per eradicare la malattia minima residua.

Basi Molecolari



Paola Guglielmelli

CRIMM (Centro di Ricerca ed Innovazione per le Malattie Mieloproliferative), Azienda Ospedaliero-Universitaria Careggi, Università degli studi di Firenze

Introduzione

Le neoplasie mieloproliferative croniche cromosoma Philadelphia-negative (NMP) sono un gruppo di tumori ematologici caratterizzati da un'aumentata produzione di cellule mieloidi mature e da un decorso cronico spesso della durata di molti anni. In accordo alla classificazione OMS del 2016, le NMP includono la policitemia vera (PV), la trombocitemia essenziale (TE) e la mielofibrosi (MFP) sia in fase pre-fibrotica che in fase di franca fibrosi [1]. Nonostante la maggior parte dei pazienti abbia un decorso di malattia indolente, una piccola percentuale può progredire verso una forma di leucemia acuta (LAM). L'emopoiesi clonale, un fenomeno caratterizzato dall'acquisizione di mutazioni somatiche nei progenitori mieloidi, caratterizza tutte queste diverse entità patologiche [1, 2].

La patogenesi molecolare delle NMP è stata più recentemente chiarita grazie ai risultati ottenuti mediante tecniche avanzate di sequenziamento di nuova generazione (NGS), al pari dei criteri diagnostici per le NMP. L'evento cardine nel progresso delle conoscenze è stata nel 2005 l'identificazione della mutazione nell'esone 14 del gene JAK2 che porta alla sostituzione di un singolo amminoacido V617F. Tale mutazione è definita *driver* in quanto è responsabile dell'aumentata proliferazione delle cellule staminali emopoietiche (HSC) mediante attivazione costitutiva della via di segnale JAK/STAT e del fenotipo clinico. La mutazione JAK2V617F è espressa in oltre il 95% dei pazienti con PV ed in circa 50-60% dei pazienti con TE e MFP [3-6]. Ulteriori sforzi nell'identificare mutazioni *driver*, in particolare in pazienti mancanti delle mutazioni di JAK2, hanno permesso di rilevare la presenza di mutazioni puntiformi nel gene che codifica per il recettore della trombopoietina (MPL) [7]. Tali mutazioni si osservano nell'8% dei pazienti con mielofibrosi e nel 1-5% dei pazienti con TE negativi per la mutazione V617F [8]. Con l'avvento dei sequenziamenti di nuova generazione sono state successivamente identificate mutazioni nel gene CALR con una frequenza del 25-30% nelle TE e nelle MFP, rispettivamente [9, 10]. La recente scoperta delle mutazioni di CALR rinforza l'ipotesi che le NMP sono guidate da una alterata attivazione del segnale JAK/STAT. Attualmente il 10-15% dei pazienti con TE e MFP sono definiti tripli negativi in quanto mancanti delle più comuni mutazioni *driver* [9-11]. Infine, mutazioni eterogenee sono state identificate nell'esone 12 di JAK2.

Nessuna delle mutazioni *driver* è comunque specifica per PV, TE o MFP; per tale motivo esse non sono utili nel distinguere i diversi sottotipi di NMP, anche se si ritiene che le mutazioni di MPL e CALR siano oltremodo rare in associazione ad un fenotipo eritrocitosico e le mutazioni dell'esone 12 con un fenotipo non-eritrocitosico, e la diagnosi richiede anche la valutazione di parametri ematologici e la biopsia osteomidollare [1]. Nonostante tra i criteri diagnostici per la TE e la MFP sia richiesta l'assenza del cromosoma Philadelphia, la concomitante presenza di una mutazione *driver* e del trascritto di fusione BCR-ABL è stata recentemente descritta in singoli casi [12]. Il fenotipo prevalente della malattia è quello della leucemia mieloide cronica, suggerendo che la coesistenza con una malattia mieloproliferativa cronica BCR/ABL negativa è un evento non eccezionale; pertanto, può essere indicato ricercare la presenza della mutazione JAK2V617F in quei pazienti con leucemia BCR/ABL positiva che presentano delle caratteristiche di malattie atipiche che possono essere eventualmente smascherate dalla terapia con imatinib [13].

Oltre alle mutazioni *driver*, una pletora di altre mutazioni somatiche sono state descritte nel contesto delle neoplasie mieloproliferative croniche. Tali mutazioni non sono comunque specifiche ed esclusive delle NMP. Il loro ruolo e la loro importanza sono state chiarite negli ultimi anni sia in relazione al vantaggio clonale, seppur senza definire un fenotipo clinico, sia nel promuovere la progressione leucemica (Tabella 1).

Geni coinvolti nella via di segnale JAK-STAT

Il gene JAK2, localizzato sul braccio corto del cromosoma 9 (9p24), codifica per una tirosina-chinasi che riveste un ruolo centrale nella trasduzione dei segnali indotti da fattori di crescita emopoietici. Le proteine JAK funzionano da intermediari tra i segnali esterni rappresentati da citochine e fattori di crescita che vanno a legarsi ai propri recettori e le molecole che fanno da messaggeri intracellulari. Studi in modelli murini *knock-out* (KO) hanno mostrato che JAK2 è essenziale per la via che controlla lo sviluppo eritroide, mieloide e megacariocitario [14].

GENE	LOCALIZZAZIONE CROMOSOMICA, REGIONE	FREQUENZA	FUNZIONE
DRIVER Mutazioni somatiche in geni *drivers* che rappresentano un criterio maggiore per la diagnosi di PV, TE e MFP			
JAK2 JAK2V617F JAK2 EX12	9p24.1 Esone 14 Esone 12	PV ~ 96% TE ~ 55-60% MFP ~ 60-65%	Proteina ad attività tirosin-chinasica, via di segnale intracellulare JAK/STAT
CALR	19p13.13 Esone 9	MFP ~ 25% TE ~ 20%	Proteina multifunzionale associata al reticolo endoplasmatico, vie di segnale intracellulare JAK/STAT
MPL	1p34.2 Esone 10	TE ~ 3% MFP ~ 10%	Recettore della trombopoietina, vie di segnale intracellulare JAK/STAT
NON DRIVER Mutazioni somatiche in geni *non driver* contribuiscono alla variabilità genotipica, allo *shift* fenotipico e alla progressione in neoplasia mieloide più aggressivo			
ASXL1	20q11.21 Esone 12	TE ~ 3% MFP ~ 13% BP-MPN ~ 18%	Modificatore della cromatina
IDH1 IDH2	2q34 Esoni 2-4 15q26.1 Esoni 2-4	PV ~ 2% TE ~ 1% MFP ~ 4% BP-MPN ~ 20%	Regolazione del metabolismo
EZH2	7q36.1 Gene Intero	PV ~ 3% MFP ~ 7% SMD ~ 6%	Modificatore della cromatina
SRSF2	17q25.1 Esone 2	MFP ~ 17%	Proteina dello spliceosoma
SF3B1	2q33.1 Esoni 14-15	MFP ~ 7%	Proteina dello spliceosoma
U2AF1	21q22.3 Gene Intero	MFP ~ 16%	Proteina dello spliceosoma
CBL	11q23.3 Esoni 8- 9	PV ~ rare TE ~ rare MF ~ 6%	Proteina della famiglia delle E3 ligasi, ubiquitinazione, vie di segnale intracellulare JAK/STAT
IKZF1	7p12.2 Gene Intero	CP-MPN ~ rare BP-MPN ~ 19%	
TP53	17p13.1 Esoni 4-9	MFP ~ 4% BP-MPN ~ 27%	Regolatore del ciclo cellulare e dell'apoptosi
DNMT3A	2p23.3 Gene Intero	PV ~ 7% MFP ~ 7% BP-MPN ~ 14%	Modificatore della cromatina
TET2	4q24 Gene Intero	PV ~ 16% TE ~ 5% MFP ~ 17% BP-MPN ~ 17%	Metilazione e Idrossimetilazione del DNA
SH2B3	12q24.12 Esoni 1-3	PV ~ rare	Vie di segnale intracellulare JAK/STAT

Tabella 1 *- Lista delle principali mutazioni driver e non-driver nelle NMP*

TIPO DI MUTAZIONE	EVIDENZE CLINICHE
Gain of function	• Nella PV JAK2V617F si associa ad un aumentato rischio di progressione in mielofibrosi e, in misura minore, in fase blastica; mentre nella TE di progressione in PV • Nella TE, JAK2V617F e la mutazione di CALR "type-1" si associano ad una aumentato rischio trombotico e ad un aumentato rischio di progressione in mielofibrosi • Nella MFP JAK2 (V617F) e le mutazioni di MPL hanno una minor sopravvivenza rispetto ai pazienti con le mutazioni di CALR • Le mutazioni di CALR nella TE si associano ad un basso rischio trombotico rispetto ai pazienti JAK2 mutati • I pazienti con MFP CALR-mutanti hanno una sopravvivenza più elevata rispetto ai pazienti con gli altri genotipi • I pazienti con TE triplo-negativi hanno una quadro di malattia indolente con una bassa incidenza di eventi cardiovascolari maggiori • I pazienti con MFP triplo-negativi hanno una quadro di malattia più aggressivo in cui predomina una componente mielodisplastica ed un aumentato rischio di progressione in leucemia acuta
Sconosciuta	
Gain of function	
Loss of function	Mutazioni somatiche di questi geni sono tipiche dell'emopoiesi clonale Nella MFP è considerato un fattore prognostico negativo, incluso nella categoria dei geni dell'"alto rischio molecolare" (HMR) ed associato ad un aumentato rischio di progressione in leucemia acuta.
Enzima ad attività neomorfica	Nella MFP sono considerati fattori prognostici negativi, inclusi nella categoria dei geni dell'"alto rischio molecolare" (HMR) ed associati ad un aumentato rischio di progressione in leucemia acuta.
Loss of function	Nella MFP è considerato un fattore prognostico negativo, incluso nella categoria dei geni dell'"alto rischio molecolare" (HMR) ed associato alla progressione in mielofibrosi in PV ed TE.
Loss of function	Mutazioni che coinvolgono geni che codificano per proteine dello spliceosoma e coinvolte nella patogenesi dell'anemia e della citopenia • Mutazioni di SRSF2 nella MFP sono considerate fattori prognostici negativi, incluse nella categoria dei geni dell'"alto rischio molecolare" (HMR) ed associate ad un aumentato rischio di progressione in leucemia acuta • Mutazioni di SF3B1 si associano alla presenza di sideroblasti ad anelli in pazienti con NMP • Mutazioni di U2AF1 sono associate ad un aumento del rischio di progressione in MF e di progressione in leucemia acuta
Loss of function	
Gain of function	
Gain of function	Mutazioni somatiche di questi geni sono state associate ad un aumentato rischio di progressione in leucemia acuta
Delezione	
Loss of function	Mutazioni somatiche di questi geni sono state associate ad un aumentato rischio di progressione in leucemia acuta, tipicamente mediante un meccanismo di LOH (perdita dello stato di eterozigosi)
Loss of function	Mutazioni somatiche di questi geni sono tipiche dell'emopoiesi clonale. Nelle NMP mutazioni somatiche di questi geni possono influenzare variabilmente il fenotipo clinico e predisporre per una progressione di malattia
Loss of function	
Loss of function	Mutazioni germline o somatiche possono cooperare con le mutazioni di JAK2 o di CALR nel determinare un fenotipo clinico mieloproliferativo

Le proteine della famiglia JAK presentano quattro domini: il dominio FERM, SH2, JH2 (dominio pseudochinasico) e JH1 (dominio chinasico). Nonostante i domini JH1 e JH2 abbiano sequenze omologhe, JH2 non ha una attività chinasica ma piuttosto svolge un ruolo di regolazione negativa della funzione della proteina [15]. La proteina JAK2 si trova associata, in forma inattiva, alla porzione intra-citoplasmatica dei recettori per le citochine di tipo 1, quali ad esempio la trombopoietina (TPO), l'eritropoietina (EPO) ed il fattore di crescita delle colonie granulocitarie (GCSF) [16]. La stimolazione di questi recettori da parte di specifici ligandi determina la dimerizzazione e la conseguente trans-fosforilazione di JAK2. La proteina JAK2 attivata innesca a sua volta una cascata di eventi che portano alla fosforilazione di molecole citoplasmatiche, tra cui le proteine della famiglia di fattori di trascrizione STAT3 e STAT5, protein-chinasi quali PI3K/AKT-mTOR e la via delle MAPK. L'attivazione di questi processi sfocia nella trascrizione di geni coinvolti nella proliferazione, nel differenziamento e nella sopravvivenza cellulare.

La mutazione JAK2V617F consiste in una sostituzione di tipo G/T presente a livello dell'esone 14 nella posizione 1849, che ha come risultato la sostituzione di una valina con una fenilalanina a livello del codone 617 [3, 4, 17]. Questo amminoacido è collocato nel dominio pseudochinasico (JH2) di JAK2 e la mutazione comporta la riduzione dell'abilità di tale dominio a effettuare la fisiologica regolazione negativa sul dominio tirosino-chinasico [18], portando ad un'attivazione costitutiva del recettore e conseguente crescita indipendente dalle citochine delle cellule mutate. La co-espressione dei recettori citochinici (MPL, EPOR, GCSFR) è un requisito fondamentale per indurre l'attivazione del segnale cellulare a valle del recettore. Numerosi modelli murini sono stati generati per studiare i meccanismi patogenetici correlati alla presenza della mutazione V617F nelle NMP [19]. Un interessante aspetto è stato osservato in modelli transgenici in cui è possibile esprimere la mutazione sia a bassi che a più elevati livelli. Gli animali in cui la mutazione era espressa a bassi livelli presentavano un fenotipo sovrapponibile a quello di pazienti con TE, ovvero caratterizzati da un'elevata conta piastrinica ed una moderata neutrofilia. Un aumento dell'espressione della mutazione comportava la comparsa di un fenotipo simile alla PV, con una marcata eritrocitosi in assenza di piastrinosi [20]. Studi successivi hanno rivelato che la presenza della mutazione in stato di omozigosi presente in molti pazienti affetti da PV non era dovuta ad una diminuzione dell'allele non mutato (*wild-type*, WT) ma piuttosto ad una ricombinazione mitotica e duplicazione dell'allele mutato [21] per un meccanismo di disomia uniparentale (UPD). La UPD del locus 9p24 è la più frequente alterazione genomica nelle NMP. In modelli animali *knock-in* (KI), l'espressione della mutazione in eterozigosi definiva un fenotipo policitemico mentre l'espressione della mutazione in omozigosi portava alla comparsa di un fenotipo più severo con progressione in mielofibrosi [22]. Questi studi hanno mostrato che differenze nell'espressione del gene mutato sono in grado di modulare il fenotipo nelle NMP; comunque la questione di come una singola mutazione possa determinare tre quadri clinici non può essere completamente spiegata da una differenza del carico allelico.

Esistono diversi studi che suggeriscono che questo tipo di mutazione clonale è presente anche in cellule NK [23], linfociti T e B [24] e questa evenienza potrebbe suggerire che, nonostante sia precoce, la mutazione JAK2V617F non sia l'evento clonogenico iniziale e che la sua presenza potrebbe non essere vincolante per determinare il fenotipo clinico. La recente dimostrazione di cloni leucemici JAK2WT in pazienti JAK2V617F positivi durante la fase cronica, inoltre, dà un supporto ulteriore a questa considerazione [25].

Nel 2007, sono state descritte una serie di mutazioni localizzate nell'esone 12 in pazienti mancanti della mutazione JAK2V617F in cui l'eritrocitosi era il fattore dominante [6]. Queste mutazioni si trovano, in particolare, in una regione *linker* tra i domini JH2 e SH2. Nonostante non siano localizzate a livello del dominio pseudochinasico, tali mutazioni potrebbero modificare la struttura del dominio di JH2 in una maniera simile alla mutazione JAK2V617F [26]. Le mutazioni a carico dell'esone 12 non sono associate a TE e MFP, tuttavia, alcuni pazienti con PV e mutazioni dell'esone 12 progrediscono sviluppando mielofibrosi [27].

Il gene MPL, collocato sul cromosoma 1p34, include 12 esoni e codifica per il recettore della trombopoietina (635-680 amminoacidi) che è un fattore chiave per la crescita e la sopravvivenza dei megacariociti. La maggior parte delle mutazioni identificate nel gene sono localizzate nell'esone 10 e danno luogo alla sostituzione nel dominio transmembrana, dell'aminoacido triptofano in posizione 515 con una leucina (W515L), una lisina (W515K) o una alanina (W515A) [7, 8]. Queste mutazioni sono caratterizzate da un effetto attivante sia in termini di crescita trombopoietina-indipendente sia di ipersensibilità alla TPO in numerose linee cellulari.

Come nel caso di JAK2V617F, le mutazioni di MPLW515 sono precoci e possono coinvolgere sia progenitori mieloidi che linfoidi [28-30]. Studi su modelli murini hanno dimostrato che le mutazioni di MPL sono capaci di attivare la via JAK/STAT, di ERK e di AKT e indurre un fenotipo di malattia tipo TE o MF caratterizzato da un rapido e fatale decorso, trombocitosi marcata, leucocitosi, epatosplenomegalia e fibrosi del midollo osseo [7]. Altri studi suggeriscono che le mutazioni di MPL favoriscono il differenziamento e la proliferazione megacariocitaria e mieloide [29].

Del tutto recentemente, mediante studi di sequenziamento dell'intero genoma, nuove mutazioni cosiddette non canoniche nei geni MPL e JAK2 sono state identificate nell'8-10% dei pazienti triplo-negativi [31]. Nel gene MPL queste mutazioni coinvolgono i seguenti residui amminoacidici T119I, S204P/F, E230G e Y591D. In particolare, per le mutazioni S204P e Y591D è stato dimostrato un effetto *gain-of-function*, seppur più debole rispetto alle mutazioni canoniche. Per il gene JAK2, le varianti V625F e F556V erano associate ad una ipersensibilità alla TPO e ad un aumento della fosforilazione di STAT5 in assenza di citochine [31].

Le mutazioni sul gene che codifica la calreticulina (CALR) sono altamente eterogenee [9, 10]: sono stati descritti oltre 60 differenti tipo di varianti, principalmente rappresentati da delezioni ed in-

serzioni, tutte localizzate nell'esone 9. Le alterazioni più comuni sono rappresentate da una delezione di 52bp (CALRdel52/Type 1; c.1092_1143del; L367fs*46) e da un'inserzione di 5bp (CALRins5/type 2; c.1154_1155insTTGTC; K385fs*47). Insieme rappresentano più dell'85% dei casi CALR-mutati, mentre le varianti meno frequenti vengono definite *type 1-like* o *type 2-like* in base a loro similitudini strutturali alle mutazioni Type 1 o Type 2, rispettivamente [32].

Dal momento che ognuna di queste varianti causa il cambiamento del frame di lettura, le proteine mutate presentano una nuova sequenza a livello del dominio C-terminale di almeno 36 aminoacidi. Questa nuova sequenza causa la perdita della segnale KDEL, provocando probabilmente un'alterazione della localizzazione cellulare e della stabilità della calreticulina [9, 10].

Calreticulina è una proteina altamente conservata con molteplici funzioni e varie localizzazioni cellulari. All'interno del reticolo endoplasmatico la proteina assicura un appropriato *folding* delle glicoproteine di nuova sintesi e modula l'omeostasi del calcio, svolgendo il ruolo di *chaperone* Ca^{2+}*-binding* del reticolo [33]. La calreticulina è stata inoltre individuata in altri compartimenti intracellulari e sulla membrana plasmatica, in cui svolge un ruolo in diversi processi biologici, come la proliferazione, l'apoptosi, la morte cellulare e la risposta immunitaria [34]. Sulla superficie cellulare, la calreticulina è coinvolta anche nell'assemblaggio e nell'espressione del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC) [35].

La proteina calreticulina matura consiste di tre principali domini strutturali: un dominio N-terminale legante la lectina e comprendente la sequenza segnale per il trasporto nel reticolo endoplasmatico; un dominio ricco in prolina con alta affinità, ma bassa capacità, per lo ione Ca^{2+} e un dominio C-terminale composto da aminoacidi carichi negativamente con alta capacità, ma bassa affinità, per Ca^{2+}. Il dominio C-terminale è coinvolto nell'omeostasi cellulare del calcio e presenta la sequenza KDEL (la sequenza aminoacidica Lys-Asp-Glu-Leu), che è implicata nel recupero delle proteine, contenenti questa sequenza, dall'apparato di Golgi al reticolo endoplasmatico [36].

L'espressione di calreticulina mutata in linee cellulari può indurre ipersensibilità a citochine emopoietiche attivando la via di segnalazione JAK/STAT e provocando la proliferazione non dipendente da fattori di crescita, come suggerito dalla fosforilazione di STAT5, in cellule con mutazione di tipo 1, anche in assenza di interleuchina-3 [37]. Recentemente, alcuni gruppi di ricerca hanno dimostrato che entrambe le varianti inducono l'attivazione citochina-indipendente di MPL [38-40]. Inoltre, è stato mostrato che la calreticulina mutata interagisce fisicamente con il dominio extracellulare di MPL [41, 42]. In modelli murini di trapianto di cellule staminali emopoietiche è stato ulteriormente mostrato che l'espressione della proteina mutata induce un fenotipo simile a quello osservato nella TE che evolve nel tempo in una forma di mielofibrosi. Un'ipotesi emergente assegna alla calreticulina, anche nella sua forma non mutata, una funzione cellulare di attivatore costitutivo del segnale recettoriale citochina-dipendente [43].

Le mutazioni sul gene CALR identificate sono state ritrovate sia in colonie granulocitarie che in colonie eritroidi, suggerendo quindi che l'evento mutazionale avvenga a livello di un progenitore comune multipotente capace di generare precursori mieloidi ed eritroidi [9].

In modo dipendente dal tipo di mutazione, le proteine alterate presentano un numero variabile di aminoacidi con carica negativa rispetto alla proteina WT. La mutazione di tipo 1 (delezione di 52 bp) causa la perdita della quasi totalità degli aminoacidi con carica negativa, mentre la mutazione di tipo 2 (inserzione di 5 bp) ne causa la perdita di circa la metà. Entrambe le mutazioni determinano quindi l'acquisizione di aminoacidi con carica positiva, provocando così un cambio netto di carica della calreticulina mutata rispetto alla proteina WT [44].

Più recentemente è stato dimostrato che le due categorie di mutazioni sono associate a differenti caratteristiche cliniche [45]; la mutazione di tipo 1, infatti, è più frequentemente identificata in pazienti con MFP e si associa ad una migliore sopravvivenza rispetto a pazienti con la mutazione di tipo 2 [46, 47]. Le mutazioni di tipo 2 sono tipicamente associate ad una più elevata conta piastrinica sia nella TE che nella MFP. I pazienti CALR mutati mostrano differenti caratteristiche fenotipiche se confrontati con i pazienti mutati in JAK2 o MPL. Pazienti CALR-mutati affetti da TE presentano ematocrito, conta leucocitaria e livelli di emoglobina molto più bassi ed una conta piastrinica più elevata se confrontati con pazienti JAK2-mutati, mentre non si osservano differenze se confrontati con pazienti mutati per il gene MPL. Inoltre l'incidenza di eventi trombotici e cardiovascolari maggiori nei pazienti CALR-mutati è significativamente ridotta rispetto ai pazienti JAK2- o MPL-mutati nella TE e nella MFP [48]. Recentemente sono stati descritti due pazienti con PV con una mutazione non-canonica di CALRK368fsx51 [49, 50]. Tale mutazione comporta la perdita del dominio KDEL e se espressa in una linea cellulare JAK2 mutata favorisce l'attivazione del segnale JAK/STAT. Rimane ancora da chiarire come questa mutazione induca un aumento dell'eritropoiesi piuttosto che quello megacariocitario, tipico delle altre varianti.

Altre mutazioni che influenzano negativamente la regolazione della via di segnale JAK/STAT, sono state riportate in pazienti con NMP. Le mutazioni nel gene LNK/SH2B3 sono un esempio di regolazione negativa di questa via di segnale e sono state descritte per la prima volta in pazienti JAK2 non mutati [51, 52]. Le mutazioni di LNK sono state principalmente identificate nell'esone 2 e topi mancanti di questo gene sviluppano un fenotipo mieloproliferativo caratterizzato da splenomegalia, un'alterata omeostasi di cellule linfoidi e mieloidi e da una ipersensibilità alle citochine [53]. La presenza di mutazioni nel gene LNK è stata inoltre osservata in circa il 9% dei pazienti in fase blastica [54].

Altri regolatori negativi del segnale JAK/STAT includono le proteine SOCS che regolano negativamente la cascata di segnale attraverso un legame diretto a JAK2 o ad altri recettori delle citochine [55]. Nelle NMP i geni SOCS sono stati trovati alterati sia per la presenza di delezioni sia per un aumento del grado di metilazione del DNA [56, 57].

Mutazioni nel gene CBL sono state riscontrate nell'esone 8 e 9 di

numerose neoplasie mieloidi, inclusa la MFP, le leucemie acute e le sindromi mielodisplastiche (SMD) [58]. CBL regola recettori citochinici (es. EPOR, c-KIT, JAK2, TYK2 e ABL) attraverso un processo di ubiquitinazione, seguito da una degradazione proteica dipendente dal proteasoma [59]. Mutazioni di CBL sono state descritte in circa il 13% dei pazienti con una leucemia acuta secondaria ad una NMP [60].

Geni coinvolti nella regolazione epigenetica

Alterazioni del profilo di metilazione o l'ipermetilazione di siti specifici del DNA con conseguente alterazione del processo di trascrizione genica sono frequentemente osservati in molte neoplasie ematologiche [61]. Mutazioni in geni coinvolti nella regolazione di meccanismi epigenetici che includono TET2, IDH1/2, DNMT3A e ASXL1 o membri del complesso PRC2 (*polycomb repressor complex 2*) sono stati identificati in pazienti con mielofibrosi [62]. Una recente ipotesi suggerisce che la comparsa di mutazioni in geni coinvolti nella regolazione epigenetica prima della comparsa di JAK2V617F sia necessaria per lo sviluppo del fenotipo mieloproliferativo. Questa ipotesi è ulteriormente sostenuta da studi in modelli murini che mostrano come il coinvolgimento di alcuni di questi geni, come ad esempio TET2, determina un'espansione di cellule staminali emopoietiche; mentre l'espressione di JAK2V617F non comporta un vantaggio proliferativo [63].

Il gene *ten-eleven translocation-2* (TET2) è membro della famiglia dei geni TET, insieme a TET1 e TET3. Tra questi TET2 è localizzato sul cromosoma 4q24; il coinvolgimento di questa regione cromosomica è stato riportato per la prima volta in riarrangiamenti descritti in alcuni casi di LAM [64]. Dal punto di vista funzionale le proteine della famiglia TET sono α-chetoglutarato (αKG)- e FE(II)-dipendenti, in grado di catalizzare l'idrossilazione della 5-metilcitosina (5mC) a 5-metilidrossicitosina (5hmC) [65-67]. Con l'impiego di analisi combinate di tipo molecolare, citogenetico e di analisi dell'intero genoma, sono stati individuati inizialmente casi di microdelezioni e di disomie uniparentali acquisite coinvolgenti TET2 in diverse neoplasie mieloidi [68]. A questo iniziale riscontro ha fatto seguito, a partire dal 2009, la scoperta sia di mutazioni somatiche troncanti (mutazioni nonsenso e piccole inserzioni/delezioni) disperse lungo tutta la sequenza codificante del gene, che di mutazioni missenso a livello di aminoacidi conservati nei domini C-terminali cataliticamente attivi, tutte risultanti in una perdita di funzione (*loss of function*) della proteina [69]; sono state riportate anche rare mutazioni a livello di siti di *splicing* [70]. Mutazioni a carico di TET2 sono state descritte in numerosi tipi di neoplasie mieloidi, fra cui le NMP ma anche in pazienti con mielodisplasia, LAM primitive e secondarie e mastocitosi sistemiche. Tali mutazioni sono state identificate in circa il 15% dei pazienti affetti da NMP [71]. La loro frequenza nelle diverse patologie è riportata in letteratura in circa il 14% nella PV, 8% nella TE, il 20% nella MF primaria e secondaria e nelle LAM secondarie, circa 29% nella mastocitosi fino al 40-50% nella leucemia mielomonocitica cronica (LMMc) [72-76].

Nelle NMP queste mutazioni sono state descritte sia agli stadi iniziali di malattia sia durante la progressione, al momento della trasformazione leucemica, presentandosi sia in pazienti mutati che non mutati per JAK2V617F. A tal proposito studi clonogenici hanno mostrato che, nel caso della copresenza delle due mutazioni in uno stesso clone, le alterazioni di TET2 possono sia precedere che seguire l'acquisizione di quella a carico di JAK2 (sia sull'esone 14 che sull'esone 12); sono stati inoltre osservati casi in cui le mutazioni di TET2 sono state acquisite in maniera indipendente nell'ambito di un pattern biclonale [77, 78]. Inoltre tali mutazioni possono coesistere con altre alterazioni patogeneticamente rilevanti, come quelle a carico di RARA, MPL, KIT, FLT3, RAS, MLL, CEBPA o NPM1 [69, 72, 79]. Infatti, l'ordine di acquisizione delle mutazioni è stato ipotizzato essere coinvolto nella definizione del fenotipo NMP. Nel 2015, uno studio ha dimostrato, mediante test clonogenici, che i pazienti che coesprimevano JAK2V617F e mutazioni in TET2 presentavano fenotipi clinici diversi a seconda di quale mutazione insorgeva per prima. Pazienti in cui la mutazione di TET2 compariva come primo evento erano più frequentemente anziani al momento della diagnosi, avevano un numero ridotto di subcloni omozigoti ed un basso rischio di trombosi, mentre i pazienti che acquisivano per primi la mutazione di JAK2 si caratterizzavano per una espansione della linea megacariocitaria ed eritroide, con un'alta probabilità di sviluppare una PV [63].

L'osservazione che la maggior parte delle mutazioni di TET2 si presenta in eterozigosi sembra suggerire che la aploinsufficienza del gene rivesta un ruolo patogenetico; tale ipotesi è avvalorata anche da studi *in vivo*, basati sulla creazione e la caratterizzazione di diversi modelli murini TET2 KO.

Cinque diversi modelli murini hanno infatti dimostrato come la perdita di TET2 risulta in un incremento del *self-renewal* delle cellule staminali emopoietiche e dei precursori mieloidi, determinando un fenotipo assimilabile a quello di una NMP, con splenomegalia, emopoiesi extramidollare ed espansione del compartimento monocitario, mentre ad oggi non c'è evidenza che la perdita di TET2 *in vivo* porti allo sviluppo di MF nel topo [80-82]. Recenti osservazioni in vitro su cellule umane hanno inoltre indicato come l'inibizione di TET2 comporti un alterato differenziamento del compartimento eritroblastico [83]; tale reperto è confermato anche dai modelli murini dove, in topi KO, le mutazioni si associavano ad una amplificazione del compartimento granulo-monocitario e un'anomala e tardiva differenziazione eritroide. Infine anche le linee linfocitarie B e T risultavano interessate dalla perdita di TET2 nei modelli murini; sono state anche descritte mutazioni a carico di TET2 in linfomi a cellule B e T [73].

Tre di questi modelli hanno dimostrato un chiaro legame fra la perdita di TET2 e la riduzione dei livelli di 5-hmc *in vivo*, mentre l'effetto di tale perdita sulla 5-mc nei pazienti deve ancora essere chiarita [84-86].

Una diversa modalità di inibizione dell'attività catalitica di TET2, mediata da mutazioni a carico dei geni isocitrato diedrogenasi 1 e 2 (IDH1 e IDH2), è stata inoltre descritta da Figueroa *et al.* [87], partendo dalla nozione che l'attività catalitica di TET2 si esplica

attraverso l'utilizzo di α-chetoglutarato (αKG) come cofattore. Le proteine IDH1 e IDH2 sono enzimi $NADP^+$-dipendenti che catalizzano, nell'ambito del ciclo di Krebs, la decarbossilazione dell'isocitrato ad α-chetoglutarato (αKG) con formazione di NADPH. Mutazioni *loss of function* a carico di IDH1 e IDH2 comportano una nuova attività enzimatica in grado di catalizzare la riduzione NADH-dipendente dell'α chetoglutarato a D-2-idrossiglutarato (D-2HG), analogo strutturale dell'αKG [88, 89]. Risulta quindi plausibile l'ipotesi che l'accumulo di D-2HG secondario a IDH1 e IDH2 mutati possa compromettere la funzione degli enzimi TET che necessitano di αKG come substrato. Tali mutazioni potrebbero pertanto spiegare anche perché in alcuni pazienti affetti da neoplasie mieloidi si riscontrino bassi livelli di 5-hmc in assenza di mutazioni a carico di TET2. I dati ottenuti nello studio di Figueroa *et al.* suggeriscono che le mutazioni di TET2 e IDH1/2 portano entrambe ad una inibizione dell'attività enzimatica di TET2.
Le mutazioni in IDH1 e IDH2 sono state inizialmente identificate in pazienti con glioblastoma. Tali mutazioni sono generalmente in eterozigosi e coinvolgono residui aminoacidici altamente conservati (IDH1-132, IDH2-140, IDH2-172) responsabili del difetto enzimatico. Il fatto che le mutazioni di TET2 e IDH1/2 siano mutualmente esclusive e che mostrino un simile profilo di ipermetilazione, suggerisce come entrambi i geni siano coinvolti nella stessa via di segnale e, nel contesto delle NMP, inneschino simili meccanismi patogenetici [87, 90]. Mutazioni nei geni IDH sono riportate a bassa frequenza durante la fase cronica (circa il 4% nelle MFP) ma aumentano nei pazienti in fase accelerata (10-20%) [91-93]. La presenza di queste mutazioni in pazienti con una forma di leucemia secondaria a NMP è inoltre associata ad una ridotta sopravvivenza. Due recenti studi hanno dimostrato che le cellule leucemiche con mutazioni eterozigoti di IDH1 o IDH2 accumulano D-2HG [94, 95]. Questa osservazione suggerisce che il 2-idrossiglutarato è un oncometabolita che gioca un ruolo non solo nella patogenesi di tumori solidi come i gliomi, ma anche nella trasformazione leucemica, e queste osservazioni potrebbero avere implicazioni terapeutiche.
Le mutazioni in eterozigosi del gene DNMT3A sono state inizialmente descritte in LAM e SMD con una frequenza del 5-22% [96]. Tuttavia, tali mutazioni sono state trovate anche in oltre il 15% dei pazienti con MF e in oltre il 7% dei pazienti con PV[97] e TE [98]. Il gene DNMT3A codifica per una metiltransferasi che è essenziale nel processo di metilazione *de novo* del DNA. L'acquisizione di mutazioni può causare la perdita di funzione determinando la riduzione dell'attività della metiltransferasi con conseguente aumento della proliferazione cellulare [98]. Le mutazioni somatiche in questo gene possono essere *gain-* (interessando più frequentemente l'amminoacido R882) o *loss-of-function* (*non-sense* o mutazioni *frameshift*). Studi per dimostrare il contributo di DNMT3A nella patogenesi delle NMP hanno fatto uso di modelli murini nei quali la perdita di DNMT3A portava un vantaggio nella capacità di *self-renewal* delle HSC ed un'espansione dei progenitori mieloidi [99]. Questo meccanismo è stato ulteriormente sostenuto dallo sviluppo di modelli murini in cui la perdita condizionata in cellule emopoietiche di DNMT3A portava ad una NMP rapidamente letale, enfatizzando il ruolo di questo gene nella trasformazione mieloide *in vivo* [100].
A partire dal 2009 sono state descritte in pazienti con NMP diverse mutazioni somatiche inattivanti la proteina ASXL1, sia di tipo *frameshift* che nonsenso [101]. Inoltre, ampie delezioni a carico della regione 20q11 sono state riportate, suggerendo che ASXL1 potrebbe rivestire anche un ruolo di oncosoppressore in queste patologie [71]. ASXL1 appartiene alla famiglia dei geni *enhancer of trithorax and polycomb* (ETP), costituito a sua volta dai geni del *polycomb group* (PcG) e del *trithorax group* (trxG): si ritiene che la sua funzione si svolga attraverso una duplice attività di attivatore/repressore trascrizionale mediante il legame con i complessi PRC1 e PRC2 (*polycomb repressive complex* 1 e 2) coinvolti in vari processi cellulari inclusi proliferazione, differenziazione e plasticità cellulare. In particolare mutazioni di ASXL1 sono state documentate in circa il 10-15% delle NMP e SMD, nel 40-60% delle LMMc, nel 7% di LAM primitiva e nel 47% di LAM secondarie, in casi di RARS-T e in alcuni pazienti con leucemia mieloide cronica [101-103]. La maggior parte delle mutazioni si collocano a livello dell'esone 12, nella regione compresa tra i residui Tyr591 e Cys1519 (in cui G646WfsX12 è la variante più frequente) [104], con conseguente perdita della porzione C-terminale che contiene il dominio PHD.
Mutazioni in ASXL1 sono descritte nelle NMP sia in fase cronica che in fase blastica, sono descritte in associazione con mutazioni di JAK2 o TET2 e, in alcuni casi, sembrano precedere l'acquisizione sia di JAK2 che di TET2 [105].
Nei casi di PV e di TE le mutazioni di ASXL1 sono eventi decisamente più rari, rispetto ai casi di MF, sia primaria che secondaria, essendo riscontrate in oltre il 30% dei pazienti. Mutazioni di ASXL1 sono predittive di una ridotta sopravvivenza nei pazienti con MF [106], mantenendo un significato prognostico negativo anche nei pazienti CALR mutati [107].
Modelli *in vivo* di KO del gene, mostrano solo un modesto effetto sulla mielopoiesi [108]. Al contrario, in un modello di KO condizionale, l'animale sviluppava un fenotipo di malattia mieloproliferativa attraverso la perdita della tri-metilazione di H3K27 mediata da PRC2 e successiva attivazione di oncogeni quali NRAS [109]. Studi più recenti in cui mutazioni di ASXL1 in eterozigosi venivano espresse in cellule CD34+ hanno mostrato alterazioni nella proliferazione e maturazione dei progenitori eritroidi suggerendo un ruolo di questo gene nella patogenesi dell'eritropoiesi inefficace, causa di severa anemia anche nella MFP [110].
Il gene EZH2 codifica per la subunità catalitica del PRC2, che è una metiltransferasi istonica coinvolta nella trimetilazione della lisina 27 dell'istone H3 (H3K27) [111]. Membri del complesso PRC2, incluso EZH2, sono direttamente coinvolti nel mantenimento del *self-renewal* e quindi nel mantenimento del compartimento staminale emopoietico [112]. Il gene EZH2 mappa sul braccio lungo del cromosoma 7 (7q35) ed è composto da 20 esoni. La proteina presenta tre domini principali, dei quali quello carbossi-terminale (dominio SET) rappresenta il dominio catalitico responsabile dell'attività metiltransferasica specifica per la lisina dell'istone H3 responsabile del silenziamento genico tipico del complesso PRC2. Recenti studi hanno evidenziato il ruolo della proteina EZH2 come soppressore

tumorale nei meccanismi molecolari alla base di differenti neoplasie mieloidi. Nello specifico, il 6-12% dei soggetti con MF presentano mutazioni a livello di regioni codificanti del gene [113]. Le mutazioni sono più frequenti a livello del dominio catalitico SET responsabile dell'attività metiltranferasica con conseguente inattivazione della stessa (*loss-of-function*). Pazienti mutati per il gene EZH2 mostrano una sopravvivenza ridotta rispetto a quelli non mutati [114]. La sopravvivenza diminuisce ulteriormente se la mutazione è presente in stato omozigote. La perdita di EZH2 in modelli murini esprimenti JAK2V617F comporta lo sviluppo di una NMP caratterizzata da un marcato aumento della conta piastrinica e granulocitaria, un aumento della fibrosi midollare ed una ridotta sopravvivenza [115].
Queste osservazioni suggeriscono il ruolo del gene EZH2 come oncosoppressore che, insieme ad altri componenti del PRC1 e PRC2, potrebbe inattivare la via di segnalazione JAK-STAT. Tuttavia, in altre neoplasie, la sua iperespressione o la presenza di mutazioni *gain-of-function* (che interessano più frequentemente l'aminoacido Y641) osservate in casi di linfoma diffuso a grandi cellule B, suggeriscono al contrario un ruolo come oncogene [116, 117]. Oltre a EZH2, nella MF sono stati identificati altri geni mutati codificanti per proteine del PRC2, come JARID2, SUZ12 ed EED [118, 119].

Geni coinvolti nel processo di *splicing*

Negli ultimi anni sono state scoperte mutazioni a carico di geni codificanti proteine coinvolte nel meccanismo di *splicing* e descritte in circa il 10% dei pazienti con NMP [120]. Le mutazioni riguardano tipicamente regioni specifiche (*hot-spot*) di geni quali SF3B1, SRSF2, U2AF1, ZRSR2, SF3A1, mentre sono rari casi di mutazioni *frameshift*. Nello specifico SRSF2 risulta mutato nel 17% di pazienti con MFP e nel 19% di pazienti con leucemia secondaria a NMP, inoltre nel 28% dei casi è associato a mutazioni di IDH1/2. Le mutazioni di SRSF2 sono state trovate nella fase cronica e leucemica degli stessi pazienti e risultano associate a prognosi sfavorevole [106, 121].
Mutazioni in U2AF1 sono state recentemente identificate nel 16% dei pazienti con MFP. Esse coinvolgono principalmente i codoni Q157 ed S34 e si associano ad una aumentata incidenza di anemia e piastrinopenia comportando una riduzione significativa della sopravvivenza in questi pazienti [122].
Resta ancora da chiarire come mutazioni somatiche di questo tipo siano responsabili di un fenotipo mieloproliferativo. Due recenti studi hanno stimato quanto sia alterato il processo di *splicing* in neoplasie mieloidi utilizzando dati pubblici di trascrittomica [123, 124]. Entrambi gli studi hanno mostrato che campioni mutati in *SF3B1* esibiscono numerose alterazioni del processo di *splicing*. Tra le proteine più frequentemente coinvolte è stata trovata ABCB7 che acquista particolare interesse dato il suo ruolo di mediatore nell'accumulo del ferro, nella crescita eritroide e per i bassi livelli di espressione osservati nei pazienti con SMD con sideroblasti ad anello [125]. Risulta quindi molto probabile che alterazioni dei meccanismi di *splicing* possano coinvolgere numerose proteine target la cui funzione è strettamente associata anche alla patogenesi delle NMP.

Geni coinvolti nella regolazione trascrizionale

I fattori trascrizionali sono fondamentali per la regolazione dell'espressione genica. La combinazione di studi di sequenziamento e di citogenetica ha permesso di identificare numerose regioni genomiche comunemente delete nelle NMP, molte delle quali includono fattori trascizionali come TP53, IKZF1, CUX1, RUNX1. IKZF1 e CUX1 mappano entrambi sul cromosoma 7, infatti delezioni di questo cromosoma (del7q/monosomia del cromosoma 7) sono frequenti non solo nelle NMP ma anche in altre neoplasie mieloidi come le LAM *de novo* [57].
IKZF1 codifica per il fattore trascrizionale Ikaros ed è coinvolto nella regolazione della crescita di linfociti T e B. Delezioni di IKZF1 sono generalmente un evento tardivo dell'evoluzione genica di un clone mieloproliferativo, portando frequentemente ad una progressione leucemica [126].
CUX1 codifica per un fattore di trascrizione che agisce come un soppressore tumorale. Recentemente è stato dimostrato che, mediante la *down*-regolazione del gene PIK3IP1, determina l'attivazione della via di segnale PI3K, favorendo l'*homing* di cellule staminali emopoietiche in modelli murini di trapianto [127].
RUNX1 è un importante fattore trascrizionale con un ruolo chiave nell'emopoiesi normale ed è uno dei più frequenti geni deregolati nella leucemia acuta. Le alterazioni più comuni di questo gene sono mutazioni puntiformi e traslocazioni. Nelle NMP circa il 17% dei pazienti con una leucemia secondaria presentano mutazioni in questo gene [128].
TP53 è un altro fattore di trascrizione che è stato dimostrato avere un ruolo fondamentale nella progressione in LAM secondaria a NMP, associata ad una ridotta sopravvivenza [129]. Mutazioni di TP53 sono state trovate raramente durante la fase cronica, perlopiù in stato di eterozigosi; viceversa aumentano drasticamente nella fase leucemica, in cui più frequentemente si osservano mutazioni in omozigosi per fenomeni di UPD o delezioni cromosomiche [130]. Infatti, mutazioni di TP53 sono state trovate a bassa frequenza per numerosi anni durante la fase cronica di NMP, prima di progredire in leucemia acuta con espansione del clone mutato. Pazienti con NMP mutati in TP53 rappresentano un sottogruppo ad alto rischio di progressione che dovrebbe beneficiare di un stretto monitoraggio della carica allelica [131]. Di notevole interesse risulta la recente osservazione che amplificazioni del gene MDM4, noto inibitore di p53, sono state trovate in pazienti con LAM secondaria a NMP [132].

Complessità genetica e diversità clonale nella MFP

Le NMP si caratterizzano per un decorso cronico della durata di molti anni; per questo motivo esse rappresentano un valido modello per lo studio delle fasi iniziali di tumorigenesi. Tuttavia è bene sottolineare che la presenza di mutazioni *driver o non-driver* non è sempre di facile interpretazione, soprattutto in seguito alla recente dimostrazione della presenza di alcune di queste mutazioni

in persone prive di altre alterazioni ematologiche. Questo fenomeno relativamente comune prende il nome di ematopoiesi clonale di potenziale indeterminato (CHIP) [132, 133]. Mutazioni somatiche di geni quali TET2, DNMT3A, ASLX1 [20] e persino di JAK2 sono state coinvolte nella genesi della CHIP. Al di sopra dei 65 anni l'emopoiesi clonale si osserva nel 10% dei soggetti, mentre al di sotto dei 50 anni solo nell'1%.

Tale condizione costituisce un fattore di rischio importante per una mortalità precoce per lo sviluppo di una neoplasia ematologica, supportando l'ipotesi multi-step di queste neoplasie (Figura 1). Infatti, una ematopoiesi clonale era dimostrata già sei mesi prima della diagnosi di una franca neoplasia ematologica in più del 40% di casi [132].

È del tutto recente la scoperta che il rischio di sviluppare una malattia cardiovascolare (CHD) nell'uomo possa aumentare in presenza di una CHIP [134]. Infatti, i portatori di CHIP sono esposti ad un rischio circa due volte superiore di sviluppare una CHD rispetto ai non-portatori, ed un rischio 4 volte superiore di andare incontro ad un precoce infarto acuto del miocardio. Ulteriori approfondimenti utilizzando modelli murini esprimenti le mutazioni di TET2 hanno rivelato come tali animali sviluppavano delle evidenti lesioni aterosclerotiche all'interno della radice aortica e nell'aorta non altrimenti osservate nei topi di controllo.

L'analisi mediante test clonogenici di progenitori emopoietici suggerisce che le mutazioni *driver* sono acquisite precocemente. Nel contempo, numerose evidenze sperimentali hanno mostrato, in particolare per JAK2, che queste mutazioni possono insorgere come evento tardivo nella gerarchia clonale [135, 136]. Studi della clonalità in pazienti di sesso femminile con NMP hanno condotto all'identificazione di granulociti clonali con una negatività per la mutazione JAK2V617F [137]. Questo fenomeno è inoltre sostenuto dal fatto che aberrazioni cromosomiche somatiche come la delezione del braccio lungo del cromosoma 20 (del20q) possono essere presenti nel 100% del clone mieloide in pazienti in cui la mutazione V617F è presente in meno del 15% dei granulociti [138]. In aggiunta, blasti leucemici di pazienti JAK2 mutati e progrediti in leucemia possono mancare della mutazione *driver*, suggerendo che il clone leucemico esistesse prima dell'acquisizione di JAK2V617F [25]. Infine, in casi di NMP familiari con trasmissione ereditaria autosomica dominante a penetrazione incompleta, mutazioni in geni *driver* sono tendenzialmente sempre acquisite, suggerendo l'esistenza di un differente meccanismo di predisposizione genetica rispetto al JAK2V617F.

La variabilità fenotipica e prognostica osservata nelle NMP è quindi la conseguenza di una complessità genetica e di un'eterogeneità clonale in questi pazienti. Ne deriva che la conoscenza delle variabilità interindividuali e delle specificità genetiche potrebbe, in linea teorica almeno, essere ampiamente sfruttata nella formulazione di terapie personalizzate; queste rappresentano la sfida per il futuro nella gestione dei pazienti con NPM.

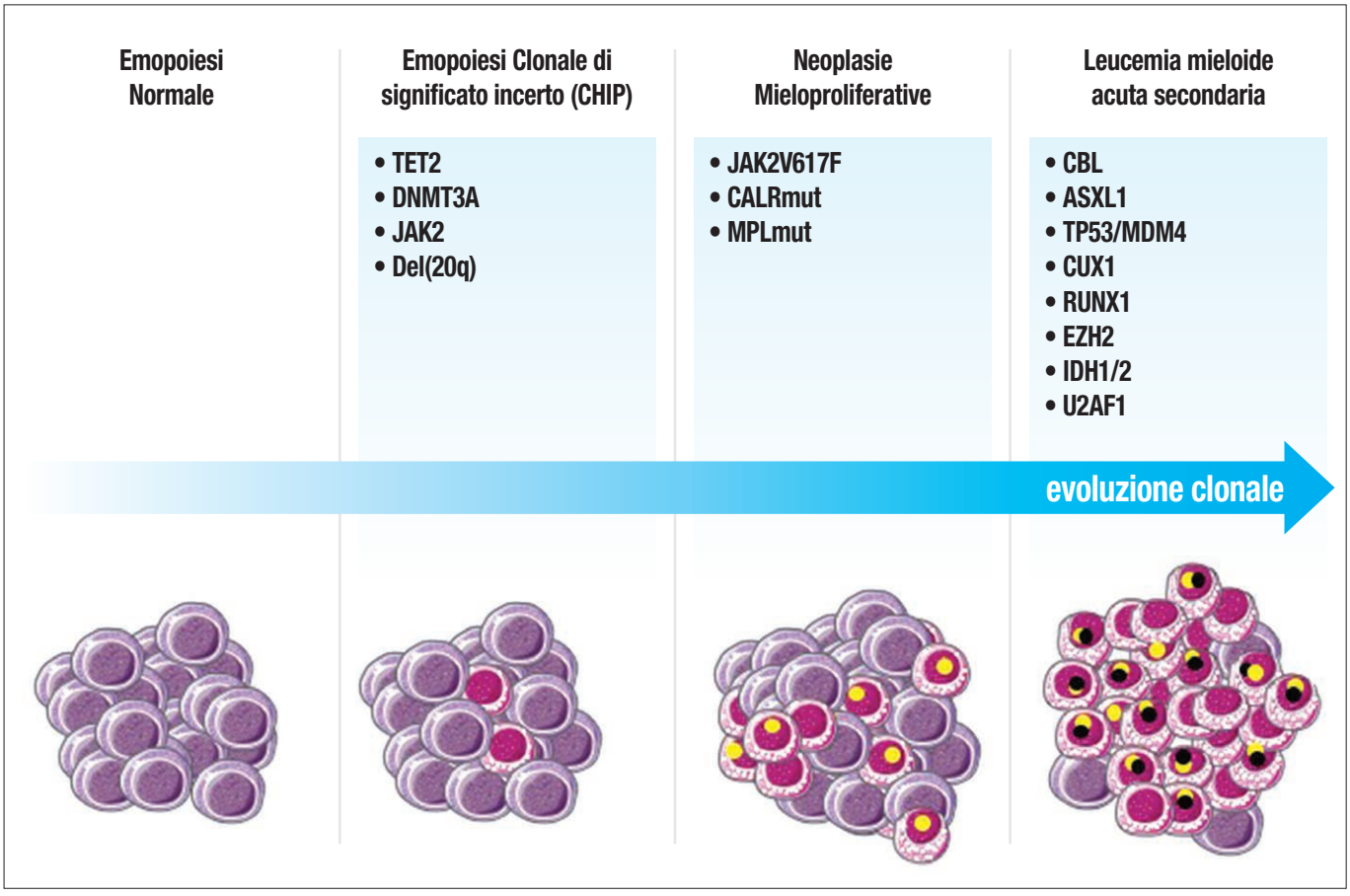


***Figura 1** - Evoluzione clonale delle NMP.*

Bibliografia

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016;127(20):2391-405.
2. Adamson JW, Fialkow PJ, Murphy S, Prchal JF, Steinmann L. Polycythemia vera: stem-cell and probable clonal origin of the disease. N Engl J Med. 1976;295(17):913-6.
3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. N Engl J Med. 2005;352(17):1779-90.
4. 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. 2005;7(4):387-97.
5. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. Lancet. 2005 25;365(9464):1054-61.
6. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. N Engl J Med. 2007;356(5):459-68.
7. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. PLoS Med. 2006;3(7):e270.
8. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. Blood. 2006;108(10):3472-6.
9. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic Mutations of Calreticulin in Myeloproliferative Neoplasms. New Engl J Med. 2013;369(25):2379-90.
10. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR Mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2. New Engl J Med. 2013;369(25):2391-405.
11. Harrison CN, Vannucchi AM. Closing the gap: genetic landscape of MPN. Blood. 2016;127(3):276-8.
12. Bornhauser M, Mohr B, Oelschlaegel U, Bornhauser P, Jacki S, Ehninger G, et al. Concurrent JAK2(V617F) mutation and BCR-ABL translocation within committed myeloid progenitors in myelofibrosis. Leukemia. 2007;21(8):1824-6.
13. Cabagnols X, Cayuela J-M, Vainchenker W. A CALR Mutation Preceding BCR-ABL1 in an Atypical Myeloproliferative Neoplasm. New Engl J Med. 2015;372:688-90.
14. Cervantes F, Pereira A. Advances in the understanding and management of primary myelofibrosis. Curr Opin Oncol. 2011;23(6):665-71.
15. Saharinen P, Silvennoinen O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. J Biol Chem. 2002;277(49):47954-63.
16. Lu X, Levine R, Tong W, Wernig G, Pikman Y, Zarnegar S, et al. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(52):18962-7.
17. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. Nature. 2005; 434(7037):1144-8.
18. Dusa A, Mouton C, Pecquet C, Herman M, Constantinescu SN. JAK2 V617F constitutive activation requires JH2 residue F595: a pseudokinase domain target for specific inhibitors. PLoS One. 2010;5(6):e11157.
19. Li J, Kent DG, Chen E, Green AR. Mouse models of myeloproliferative neoplasms: JAK of all grades. Disease Models & Mechanisms. 2011;4(3):311-7.
20. Tiedt R, Hao-Shen H, Sobas MA, Looser R, Dirnhofer S, Schwaller J, et al. Ratio of mutant JAK2-V617F to wild-type Jak2 determines the MPD phenotypes in transgenic mice. Blood. 2008;111(8):3931-40.
21. Kralovics R, Guan Y, Prchal JT. Acquired uniparental disomy of chromosome 9p is a frequent stem cell defect in polycythemia vera. Exp Hematol. 2002;30(3):229-36.
22. Akada H, Yan D, Zou H, Fiering S, Hutchison RE, Mohi MG. Conditional expression of heterozygous or homozygous Jak2V617F from its endogenous promoter induces a polycythemia vera-like disease. Blood. 2010;115(17):3589-97.
23. Bellanne-Chantelot C, Chaumarel I, Labopin M, Bellanger F, Barbu V, De Toma C, et al. Genetic and clinical implications of the Val617Phe JAK2 mutation in 72 families with myeloproliferative disorders. Blood. 2006;108(1):346-52.
24. Ishii T, Bruno E, Hoffman R, Xu M. Involvement of various hematopoietic-cell lineages by the JAK2V617F mutation in polycythemia vera. Blood. 2006;108(9):3128-34.
25. Beer PA, Delhommeau F, LeCouedic JP, Dawson MA, Chen E, Bareford D, et al. Two routes to leukemic transformation after a JAK2 mutation-positive myeloproliferative neoplasm. Blood. 2010;115(14):2891-900.
26. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. Blood. 2011;118(7):1723-35.
27. Passamonti F, Elena C, Schnittger S, Skoda RC, Green AR, Girodon F, et al. Molecular and clinical features of the myeloproliferative neoplasm associated with JAK2 exon 12 mutations. Blood. 2011;117(10):2813-6.
28. Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Markovic SN, Tefferi A. Demonstration of MPLW515K, but not JAK2V617F, in in vitro expanded CD4+ T lymphocytes. Leukemia. 2007;21(10):2206-7.
29. Chaligne R, James C, Tonetti C, Besancenot R, Le Couedic JP, Fava F, et al. Evidence for MPL W515L/K mutations in hematopoietic stem cells in primitive myelofibrosis. Blood. 2007;110(10):3735-43.
30. Pardanani A, Lasho TL, Finke C, Mesa RA, Hogan WJ, Ketterling RP, et al. Extending JAK2V617F and MPLW515 Mutation Analysis to Single Hematopoietic Colonies and B- and T-lymphocytes. Stem Cells. 2007;25(9):2358-62.
31. Milosevic Feenstra JD, Nivarthi H, Gisslinger H, Leroy E, Rumi E, Chachoua I, et al. Whole-exome sequencing identifies novel MPL and JAK2 mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. Blood. 2016;127(3):325-32.
32. Eder-Azanza L, Navarro D, Aranaz P, Novo FJ, Cross NC, Vizmanos JL. Bioinformatic analyses of CALR mutations in myeloproliferative neoplasms support a role in signaling. Leukemia. 2014;28(10):2106-9.
33. Gelebart P, Opas M, Michalak M. Calreticulin, a Ca2+-binding chaperone of the endoplasmic reticulum. Int J Biochem Cell Biol. 2005;37(2):260-6.
34. Obeid M, Panaretakis T, Joza N, Tufi R, Tesniere A, van Endert P, et al. Calreticulin exposure is required for the immunogenicity of gamma-irradiation and UVC light-induced apoptosis. Cell Death Differ. 2007;14(10):1848-50.
35. Gao B, Adhikari R, Howarth M, Nakamura K, Gold MC, Hill AB, et al. Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin. Immunity. 2002;16(1):99-109.
36. Gold LI, Eggleton P, Sweetwyne MT, Van Duyn LB, Greives MR, Naylor S-M, et al. Calreticulin: non-endoplasmic reticulum functions in physiology and disease. FASEB J. 2010;24(3):665-83.
37. Lyngholm JM, Nielsen HV, Holm M, Schiotz PO, Johnsen AH. Calreticulin is an interleukin-3-sensitive calcium-binding protein in human basophil leukocytes. Allergy. 2001;56(1):21-8.
38. Elf S, Abdelfattah NS, Chen E, Perales-Paton J, Rosen EA, Ko A, et al. Mutant calreticulin requires both its mutant C-terminus and the thrombopoietin receptor for oncogenic transformation. Cancer Discov. 2016;6(4):368-81.

39. Balligand T, Achouri Y, Pecquet C, Chachoua I, Nivarthi H, Marty C, et al. Pathologic activation of thrombopoietin receptor and JAK2-STAT5 pathway by frameshift mutants of mouse calreticulin. Leukemia. 2016;30(8):1775-8.

40. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, Nivarthi H, Albu R-I, Marty C, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. Blood. 2016;127(10):1325-35.

41. Nivarthi H, Chen D, Cleary C, Kubesova B, Jager R, Bogner E, et al. Thrombopoietin receptor is required for the oncogenic function of CALR mutants. Leukemia. 2016;30(8):1759-63.

42. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. Blood. 2016;127(10):1307-16.

43. Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, El-Khoury M, Chachoua I, Tulliez M, et al. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. Blood. 2016;127(10):1317-24.

44. Stanley RF, Steidl U. Molecular Mechanism of Mutant CALR-Mediated Transformation. Cancer Discov. 2016;6(4):344-6.

45. Tefferi A, Lasho TL, Finke C, Belachew AA, Wassie EA, Ketterling RP, et al. Type 1 vs type 2 calreticulin mutations in primary myelofibrosis: differences in phenotype and prognostic impact. Leukemia. 2014;28(7):1568-70.

46. Tefferi A, Wassie EA, Guglielmelli P, Gangat N, Belachew AA, Lasho TL, et al. Type 1 vs Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. Am J Hematol. 2014;89(8):e121-4.

47. Guglielmelli P, Rotunno G, Fanelli T, Pacilli A, Brogi G, Calabresi L, et al. Validation of the differential prognostic impact of type 1/type 1-like versus type 2/type 2-like CALR mutations in myelofibrosis. Blood Cancer J. 2015;5:e360.

48. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, Pacilli A, Pancrazzi A, Pieri L, et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. Blood. 2014;123(10):1552-5.

49. Xing CY, Li HY, Wu JB, Gao SM. Co-occurrence of JAK2 V617F and an uncommon CALR del (p.K368fs*51) mutation facilitates JAK2/STAT signaling in polycythemia vera. Leuk Lymphoma. 2016;57(7):1743-5.

50. Langabeer SE, Haslam K, Flynn CM. Isolated erythrocytosis associated with a CALR mutation. Blood Cells Mol Dis. 2017;66:6-7.

51. Oh ST, Simonds EF, Jones C, Hale MB, Goltsev Y, Gibbs KD, Jr., et al. Novel mutations in the inhibitory adaptor protein LNK drive JAK-STAT signaling in patients with myeloproliferative neoplasms. Blood. 2010;116(6):988-92.

52. Lasho TL, Pardanani A, Tefferi A. LNK mutations in JAK2 mutation-negative erythrocytosis. N Engl J Med. 2010;363(12):1189-90.

53. Velazquez L, Cheng AM, Fleming HE, Furlonger C, Vesely S, Bernstein A, et al. Cytokine Signaling and Hematopoietic Homeostasis Are Disrupted in Lnk-deficient Mice. J Exp Med. 2002;195(12):1599-611.

54. Pardanani A, Lasho T, Finke C, Oh ST, Gotlib J, Tefferi A. LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. Leukemia. 2010;24(10):1713-8.

55. Krebs DL, Hilton DJ. SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling. J Cell Sci. 2000;113(Pt 16):2813-9.

56. Teofili L, Martini M, Cenci T, Guidi F, Torti L, Giona F, et al. Epigenetic alteration of SOCS family members is a possible pathogenetic mechanism in JAK2 wild type myeloproliferative diseases. Int J Cancer. 2008;123(7):1586-92.

57. Klampfl T, Harutyunyan A, Berg T, Gisslinger B, Schalling M, Bagienski K, et al. Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. Blood. 2011;118(1):167-76.

58. Dunbar AJ, Gondek LP, O'Keefe CL, Makishima H, Rataul MS, Szpurka H, et al. 250K single nucleotide polymorphism array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous mutations, including novel missense substitutions of c-Cbl, in myeloid malignancies. Cancer Res. 2008 Dec 15;68(24):10349-57.

59. Schmidt MH, Dikic I. The Cbl interactome and its functions. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005;6(12):907-18.

60. Milosevic JD, Puda A, Malcovati L, Berg T, Hofbauer M, Stukalov A, et al. Clinical significance of genetic aberrations in secondary acute myeloid leukemia. Am J Hematol. 2012;87(11):1010-6.

61. Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. Science. 2003;300(5618):455.

62. Shih AH, Abdel-Wahab O, Patel JP, Levine RL. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. Nat Rev Cancer. 2012;12(9):599-612.

63. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, Silber Y, Wedge DC, Grinfeld J, et al. Effect of Mutation Order on Myeloproliferative Neoplasms. New Engl J Med. 2015;372(7):601-12.

64. Viguie F, Aboura A, Bouscary D, Ramond S, Delmer A, Tachdjian G, et al. Common 4q24 deletion in four cases of hematopoietic malignancy: early stem cell involvement? Leukemia. 2005;19(8):1411-5.

65. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. Science. 2009;324(5929):930-5.

66. Ko M, Huang Y, Jankowska AM, Pape UJ, Tahiliani M, Bandukwala HS, et al. Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. Nature. 2010;468(7325):839-43.

67. Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. Nature. 2010;466(7310):1129-33.

68. Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Masse A, et al. Mutation in TET2 in myeloid cancers. N Engl J Med. 2009;360(22):2289-301.

69. Langemeijer SM, Kuiper RP, Berends M, Knops R, Aslanyan MG, Massop M, et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. Nat Genet. 2009;41:838-42.

70. Busque L, Patel JP, Figueroa ME, Vasanthakumar A, Provost S, Hamilou Z, et al. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. Nat Genet. 2012; 44(11):1179-81.

71. Tefferi A. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. Leukemia. 2010;24(6):1128-38.

72. Abdel-Wahab O, Mullally A, Hedvat C, Garcia-Manero G, Patel J, Wadleigh M, et al. Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies. Blood. 2009;114(1):144-7.

73. Quivoron C, Couronné L, Della Valle V, Lopez Cécile K, Plo I, Wagner-Ballon O, et al. TET2 Inactivation Results in Pleiotropic Hematopoietic Abnormalities in Mouse and Is a Recurrent Event during Human Lymphomagenesis. Cancer Cell. 2011;20(1):25-38.

74. Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, Lim Z, Gäken J, Lea NC, et al. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. Blood. 2010;116(19):3923-32.

75. Kosmider O, Gelsi-Boyer V, Ciudad M, Racoeur C, Jooste V, Vey N, et al. TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia. Haematologica. 2009;94(12):1676-81.

76. Roche-Lestienne C, Marceau A, Labis E, Nibourel O, Coiteux V, Guilhot J, et al. Mutation analysis of TET2, IDH1, IDH2 and ASXL1 in chronic myeloid leukemia. Leukemia. 2011;25(10):1661-4.

77. Schaub FX, Looser R, Li S, Hao-Shen H, Lehmann T, Tichelli A, et al. Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms. Blood. 2010;115(10):2003-7.

78. Beer PA, Green AR. Pathogenesis and management of essential thrombocythemia. Hematology. 2009;2009(1):621-8.

79. Tefferi A, Lim KH, Abdel-Wahab O, Lasho TL, Patel J, Patnaik MM, et al. Detection of mutant TET2 in myeloid malignancies other than myeloproliferative neoplasms: CMML, MDS, MDS/MPN and AML. Leukemia. 2009;23(7):1343-5.

80. Li J, Spensberger D, Ahn JS, Anand S, Beer PA, Ghevaert C, et al. JAK2 V617F impairs hematopoietic stem cell function in a conditional knock-in mouse model of JAK2 V617F-positive essential thrombocythemia. Blood. 2010;116(9):1528-38.

81. Chen E, Schneider RK, Breyfogle LJ, Rosen EA, Poveromo L, Elf S, et al. Distinct effects of concomitant Jak2V617F expression and Tet2 loss in mice promote disease progression in myeloproliferative neoplasms. Blood. 2015;125(2):327-35.

82. Kameda T, Shide K, Yamaji T, Kamiunten A, Sekine M, Taniguchi Y, et al. Loss of TET2 has dual roles in murine myeloproliferative neoplasms: disease sustainer and disease accelerator. Blood. 2015;125:304-15.

83. Pronier E, Almire C, Mokrani H, Vasanthakumar A, Simon A, da Costa Reis Monte Mor B, et al. Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors. Blood. 2011;118(9):2551-5.

84. Li Z, Cai X, Cai C-L, Wang J, Zhang W, Petersen BE, et al. Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies. Blood. 2011;118(17):4509-18.

85. Moran-Crusio K, Reavie L, Shih A, Abdel-Wahab O, Ndiaye-Lobry D, Lobry C, et al. Tet2 Loss Leads to Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation. Cancer Cell. 2011;20(1):11-24.

86. Ko M, Rao A. TET2: epigenetic safeguard for HSC. Blood. 2011;118(17):4501-3.

87. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. Cancer Cell. 2010;18(6):553-67.

88. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. Nature. 2010;465(7300):966.

89. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrozek K, Margeson D, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol. 2010;28(14):2348-55.

90. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim SH, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenases. Cancer Cell. 2011;19(1):17-30.

91. Pardanani A, Lasho TL, Finke CM, Mai M, McClure RF, Tefferi A. IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative neoplasms. Leukemia. 2010;24(6):1146-51.

92. Tefferi A, Lasho TL, Abdel-Wahab O, Guglielmelli P, Patel J, Caramazza D, et al. IDH1 and IDH2 mutation studies in 1473 patients with chronic-, fibrotic- or blast-phase essential thrombocythemia, polycythemia vera or myelofibrosis. Leukemia. 2010;24(7):1302-9.

93. Green A, Beer P. Somatic mutations of IDH1 and IDH2 in the leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms. N Engl J Med. 2010;362(4):369-70.

94. Gross S, Cairns RA, Minden MD, Driggers EM, Bittinger MA, Jang HG, et al. Cancer-associated metabolite 2-hydroxyglutarate accumulates in acute myelogenous leukemia with isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations. J Exp Med. 2010;207(2):339-44.

95. Ward PS, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Coller HA, et al. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. Cancer Cell. 2010;17(3):225-34.

96. Lin J, Yao DM, Qian J, Chen Q, Qian W, Li Y, et al. Recurrent DNMT3A R882 mutations in Chinese patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. PLoS One. 2011;6(10):e26906.

97. Abdel-Wahab O, Pardanani A, Rampal R, Lasho TL, Levine RL, Tefferi A. DNMT3A mutational analysis in primary myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and advanced phases of myeloproliferative neoplasms. Leukemia. 2011;25(7):1219-20.

98. Stegelmann F, Bullinger L, Schlenk RF, Paschka P, Griesshammer M, Blersch C, et al. DNMT3A mutations in myeloproliferative neoplasms. Leukemia. 2011;25(7):1217-9.

99. Challen GA, Sun D, Jeong M, Luo M, Jelinek J, Berg JS, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. Nat Genet. 2012;44(1):23-31.

100. Guryanova OA, Lieu YK, Garrett-Bakelman FE, Spitzer B, Glass JL, Shank K, et al. Dnmt3a regulates myeloproliferation and liver-specific expansion of hematopoietic stem and progenitor cells. Leukemia. 2016;30(5):1133-42.

101. Gelsi-Boyer V, Trouplin V, Adelaide J, Bonansea J, Cervera N, Carbuccia N, et al. Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. Br J Haematol. 2009;145(6):788-800.

102. Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, Brecqueville M, Adelaide J, Rey J, et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. Leukemia. 2009;23(11):2183-6.

103. Boultwood J, Perry J, Zaman R, Fernandez-Santamaria C, Littlewood T, Kusec R, et al. High-density single nucleotide polymorphism array analysis and ASXL1 gene mutation screening in chronic myeloid leukemia during disease progression. Leukemia. 2010;24(6):1139-45.

104. Abdel-Wahab O, Kilpivaara O, Patel J, Busque L, Levine RL. The most commonly reported variant in ASXL1 (c.1934dupG;p.Gly646TrpfsX12) is not a somatic alteration. Leukemia. 2010;24(9):1656-7.

105. Abdel-Wahab O, Manshouri T, Patel J, Harris K, Yao J, Hedvat C, et al. Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias. Cancer Res. 2010;70(2):447-52.

106. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. Leukemia. 2013;27(9):1861-9.

107. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Finke C, Mannarelli C, et al. CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients. Leukemia. 2014;28(7):1494-500.

108. Fisher CL, Pineault N, Brookes C, Helgason CD, Ohta H, Bodner C, et al. Loss-of-function Additional sex combs like 1 mutations disrupt hematopoiesis but do not cause severe myelodysplasia or leukemia. Blood. 2010;115(1):38-46.

109. Abdel-Wahab O, Adli M, LaFave Lindsay M, Gao J, Hricik T, Shih Alan H, et al. ASXL1 Mutations Promote Myeloid Transformation through Loss of PRC2-Mediated Gene Repression. Cancer Cell. 2012;22(2):180-93.

110. Shi J, Yuan B, Hu W, Lodish H. JAK2 V617F stimulates proliferation of erythropoietin-dependent erythroid progenitors and delays their differentiation by activating Stat1 and other nonerythroid signaling pathways. Exp Hematol. 2016;44(11):1044-58e5.

111. Margueron R, Reinberg D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. Nature. 2011;469(7330):343-9.

112. Kim KH, Roberts CW. Targeting EZH2 in cancer. Nat Med. 2016;22(2):128-34.

113. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, Jones AV, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. Nat Genet. 2010;42(8):722-6.

114. Guglielmelli P, Biamonte F, Score J, Hidalgo-Curtis C, Cervantes F, Maffioli M, et al. EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. Blood. 2011;118(19):5227-34.

115. Shimizu T, Kubovcakova L, Nienhold R, Zmajkovic J, Meyer SC, Hao-Shen H, et al. Loss of Ezh2 synergizes with JAK2-V617F in initiating myeloproliferative neoplasms and promoting myelofibrosis. J Exp Med. 2016;213(8):1479-96.

116. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, Goya R, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. Nat Genet. 2010;42(2):181-5.

117. Nikoloski G, Langemeijer SMC, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tonnissen ERLTM, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. Nat Genet. 2010;42(8):665-7.

118. Puda A, Milosevic JD, Berg T, Klampfl T, Harutyunyan AS, Gisslinger B, et al. Frequent deletions of JARID2 in leukemic transformation of chronic myeloid malignancies. Am J Hematol. 2012;87(3):245-50.

119. Score J, Hidalgo-Curtis C, Jones AV, Winkelmann N, Skinner A, Ward D, et al. Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. Blood. 2012;119(5):1208-13.

120. Yoshida K, Sanada M, Shiraishi Y, Nowak D, Nagata Y, Yamamoto R, et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. Nature. 2011;478(7367):64-9.

121. Lasho TL, Gangat N, Finke C, Laborde RR, Hanson CA, Ketterling RP, et al. Prognostic Interactions Between SRSF2, ASXL1, and IDH Mutations in Primary Myelofibrosis and Determination of Added Value to Cytogenetic Risk Stratification and DIPSS-Plus. ASH Annual Meeting Abstracts. 2012 November 16, 2012;120(21):430.

122. Tefferi A, Finke CM, Lasho TL, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N, et al. U2AF1 mutation types in primary myelofibrosis: phenotypic and prognostic distinctions. Leukemia. 2018;Feb27:1-4.

123. DeBoever C, Ghia EM, Shepard PJ, Rassenti L, Barrett CL, Jepsen K, et al. Transcriptome sequencing reveals potential mechanism of cryptic 3' splice site selection in SF3B1-mutated cancers. PLoS Comput Biol. 2015;11(3):e1004105.

124. Darman RB, Seiler M, Agrawal AA, Lim KH, Peng S, Aird D, et al. Cancer-Associated SF3B1 Hotspot Mutations Induce Cryptic 3' Splice Site Selection through Use of a Different Branch Point. Cell Rep. 2015;13(5):1033-45.

125. Boultwood J, Pellagatti A, Nikpour M, Pushkaran B, Fidler C, Cattan H, et al. The role of the iron transporter ABCB7 in refractory anemia with ring sideroblasts. PLoS One. 2008;3(4):e1970.

126. Jager R, Gisslinger H, Passamonti F, Rumi E, Berg T, Gisslinger B, et al. Deletions of the transcription factor Ikaros in myeloproliferative neoplasms. Leukemia. 2010;24(7):1290-8.

127. Wong CC, Martincorena I, Rust AG, Rashid M, Alifrangis C, Alexandrov LB, et al. Inactivating CUX1 mutations promote tumorigenesis. Nat Genet. 2014;46(1):33-8.

128. Jawhar M, Schwaab J, Schnittger S, Meggendorfer M, Pfirrmann M, Sotlar K, et al. Additional mutations in SRSF2, ASXL1 and/or RUNX1 identify a high-risk group of patients with KIT D816V(+) advanced systemic mastocytosis. Leukemia. 2016;30(1):136-43.

129. Harutyunyan A, Klampfl T, Cazzola M, Kralovics R. p53 Lesions in Leukemic Transformation. N Engl J Med. 2011;364(5):488-90.

130. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, Looser R, Hao-Shen H, Nissen I, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. Blood. 2014;123(14):2220-8.

131. Kadia TM, Jain P, Ravandi F, Garcia-Manero G, Andreef M, Takahashi K, et al. TP53 mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia: Clinicomolecular characteristics, response to therapy, and outcomes. Cancer. 2016;122(22):3484-91.

132. Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. N Engl J Med. 2014;371(26):2477-87.

133. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. N Engl J Med. 2014;371(26):2488-98.

134. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, et al. Clonal Hematopoiesis and Risk of Atherosclerotic Cardiovascular Disease. N Engl J Med. 2017;377(2):111-21.

135. Theocharides A, Boissinot M, Girodon F, Garand R, Teo SS, Lippert E, et al. Leukemic blasts in transformed JAK2-V617F-positive myeloproliferative disorders are frequently negative for the JAK2-V617F mutation. Blood. 2007;110(1):375-9.

136. Campbell PJ, Baxter EJ, Beer PA, Scott LM, Bench AJ, Huntly BJ, et al. Mutation of JAK2 in the myeloproliferative disorders: timing, clonality studies, cytogenetic associations, and role in leukemic transformation. Blood. 2006;108(10):3548-55.

137. Kralovics R, Teo SS, Li S, Theocharides A, Buser AS, Tichelli A, et al. Acquisition of the V617F mutation of JAK2 is a late genetic event in a subset of patients with myeloproliferative disorders. Blood. 2006;108(4):1377-80.

138. Levine RL, Belisle C, Wadleigh M, Zahrieh D, Lee S, Chagnon P, et al. X-inactivation-based clonality analysis and quantitative JAK2V617F assessment reveal a strong association between clonality and JAK2V617F in PV but not ET/MMM, and identifies a subset of JAK2V617F-negative ET and MMM patients with clonal hematopoiesis. Blood. 2006;107(10):4139-41.

Parole Chiave

Mielofibrosi, emopoiesi clonale, mutazioni, progressione clonale.

Indirizzi per la corrispondenza

Paola Guglielmelli
Tel. 055 7948901
Fax 055 7947688
Paola.guglielmelli@unifi.it

Nuovi criteri classificativi



Umberto Gianelli, Gianluca Lopez

Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Fisiopatologia medico-chirurgica e dei trapianti, UOC di Anatomia Patologica, Fondazione IRCCS Ca' Granda - Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, Via F. Sforza 35 - 20122 Milano

Introduzione

Le neoplasie mieloproliferative sono disordini clonali della cellula staminale ematopoietica, che si caratterizzano per una proliferazione efficace dei precursori midollari di una o più delle tre linee maturative, con incremento delle forme mature nel sangue periferico, variabile tendenza alla evoluzione mielofibrotica e/o alla evoluzione leucemica acuta.

In particolare, l'evoluzione mielofibrotica rappresenta una fase costante nella storia naturale della mielofibrosi primaria (MFP), anche se la velocità con cui il processo si manifesta può variare da paziente a paziente. Al contrario, tale evoluzione è molto rara nella trombocitemia essenziale (TE) mentre può riguardare circa un quarto dei pazienti affetti da policitemia vera (PV).

In questo lavoro, saranno presi in considerazione i criteri diagnostici della MFP, della mielofibrosi post-trombocitemica (post TE-MF) e della mielofibrosi post-policitemica (post-PV-MF) in accordo con gli aggiornamenti della classificazione OMS dei tumori dei tessuti emopoietico e linfoide (2017). Verranno inoltre discussi i criteri diagnostico-differenziali tra la fase prefibrotica di MFP e la TE e le informazioni prognostiche che si possono ottenere da una valutazione accurata delle alterazioni stromali che si associano alla evoluzione mielofibrotica.

Mielofibrosi primaria

La MFP è una neoplasia mieloproliferativa che si caratterizza per una proliferazione dei precursori delle serie granulopoietica e piastrinopoietica nel midollo osseo, cui si associano, nelle fasi avanzate della malattia, fibrosi reticolinica o collagenosica ed emopoiesi extramidollare. Nel corso della storia naturale della malattia, si distinguono 2 fasi cliniche e patologiche: la *fase prefibrotica* (pre-MFP) caratterizzata da ipercellularità del midollo osseo per proliferazione delle serie granulopoietica e piastrinopoietica in assenza di fibrosi o associata a fibrosi reticolinica di grado lieve; la *fase fibrotica avanzata* (*overt*-MFP) in cui la cellularità midollare tende a diminuire, la fibrosi reticolinica e/o collagenosica tendono progressivamente ad aumentare, insieme alla comparsa di emopoiesi extramidollare (metaplasia mieloide) e di splenomegalia.

La MFP è una malattia rara, con una incidenza stimata della fase fibrotica avanzata di 0,5-1,5 casi per 100.000 anno. [1-4] Riguardo alla fase prefibrotica non vi sono dati validati sull'incidenza, anche se alcuni centri di riferimento indicano come questa fase rappresenti il 30-50% di tutti i casi di MFP.

La MFP si presenta più comunemente nella sesta e settima decade di vita, anche se il 10% circa dei casi si manifesta prima dei 40 anni. [5] Il sangue periferico e il midollo osseo sono sempre coinvolti. Nelle fasi avanzate della malattia, l'emopoiesi extramidollare (conosciuta anche come metaplasia mieloide) diventa prominente, soprattutto nella milza, [6] con accumulo di cellule staminali neoplastiche. [7] Altri possibili siti di emopoiesi extramidollare sono fegato, linfonodi, reni, surreni, dura madre, tratto gastrointestinale, polmoni, pleura, mammella, cute e tessuti molli. [3] Nelle fasi iniziali, il numero di cellule progenitrici CD34+ è lievemente aumentato nel midollo osseo, ma non nel sangue periferico. Il numero di cellule CD34+ midollari è inversamente proporzionato al numero di cellule CD34+ circolanti; [8-10] solo nelle fasi avanzate esse aumentano grandemente di numero nel sangue periferico. Fino al 30% dei casi sono asintomatici al momento della diagnosi, e sono scoperti per il riscontro di splenomegalia all'esame obiettivo oppure per la presenza di anemia, leucocitosi e/o trombocitosi all'emocromo. Meno comunemente, la diagnosi risulta dall'evidenza di leucoeritroblastosi inspiegata o di un aumento dei livelli di lattico deidrogenasi (LDH). [3,11,12] Nella fase prefibrotica di malattia, l'unico riscontro clinico può essere una marcata trombocitosi, la quale può simulare una trombocitemia essenziale. Altre caratteristiche cliniche possono essere normali o solo lievemente alterate. [12-17] Più del 50% dei pazienti con MFP sperimenta sintomi costituzionali, come affaticamento, dispnea, calo ponderale, sudorazione notturna, febbricola e cachessia. [18] Questi sintomi riflettono l'attività biologica della malattia, compromettono la qualità della vita del paziente e sono associati alla prognosi. [19] La splenomegalia, di vario grado, è identificata in più del 90% dei pazienti e può essere massiva. Circa il 50% dei pazienti mostra inoltre epatomegalia, in base allo stadio della malattia. [3,5,11,20]

Nella MFP la mutazione V617F del gene JAK2 è identificabile nel 50-60% dei casi; mutazioni di CALR si riscontrano nel 20-25% dei casi, e mutazioni di MPL nel 5-8%. Circa il 12% dei casi vengono definiti tripli-negativi in quanto in questi casi non è possibile identificare mutazioni *driver*. [21-23]

Fase prefibrotica

Diversi centri di riferimento riportano che circa il 30-50% dei pazienti viene diagnosticato in questa fase iniziale/prefibrotica (pre-MFP) della malattia. [24-29]

Nel recente aggiornamento classificativo dell'OMS, ci si è sforzati di definire con precisione i criteri diagnostici, clinici, morfologici e molecolari utili per distinguere questa fase iniziale della malattia (Tabella 1) dalla fase fibrotica avanzata (overt-MFP).

In accordo con tali criteri, la diagnosi di pre-MFP si basa in primo luogo sui reperti ottenibili dall'esame del midollo osseo, che appare ipercellulato in relazione all'età, per proliferazione della serie granulopoietica e dei megacariociti. La serie granulopoietica appare iperplastica, con incremento dei metamielociti, dei neutrofili a banda e segmentati, variabilmente associato ad un incremento dei precursori più immaturi (*left-shifting*). I mieloblasti non aumentano in percentuale, e non si riscontrano aggregati di blasti; tuttavia, il numero di progenitori CD34+ sparsi è lievemente incrementato. [10,25] La serie eritropoietica inizialmente è normale, anche se già precocemente si può documentare una riduzione dei precursori eritropoietici che tende a diventare costante con l'aumento del grado di fibrosi. In tutti i casi non si documenta displasia a carico della serie eritropoietica. Le caratteristiche morfologiche dei megacariociti rappresentano un ulteriore criterio diagnostico importante. [25,26,30-33] Essi sono aumentati di numero, tendono a formare degli aggregati densi (gruppi di almeno tre megacariociti i cui bordi cellulari sono in stretto contatto) o, meno caratteristicamente, lassi (gruppi di almeno tre megacariociti con interposti elementi delle serie emopoietiche e/o elementi stromali). Contrariamente a quanto si reperta nella TE e nella PV, i megacariociti della MFP sono caratterizzati da atipie citologiche importanti quali l'alterazione del rapporto nucleo-citoplasmatico, l'aspetto vescicoloso dei nuclei che appaiono ingranditi e ipolobati (nuclei vescicolosi), la dispersione della cromatina nucleare (cromatina azzollata e ipercromasia), e la dismorfia nucleare che frequentemente si associa ad un aspetto laccato ipereosinofilo dei citoplasmi (megacariocito dismorfico). Le atipie morfologiche dei megacariociti sono probabilmente l'aspetto istologico più utile ai fini diagnostici della pre-MFP, che si caratterizza inoltre per l'assenza di fibrosi reticolinica (MF-0) o per la presenza solo di una fibrosi di grado lieve (MF-1) in accordo con il Consensus Europeo per la valutazione della cellularità e della fibrosi midollare. [29]

La proliferazione vascolare è lievemente incrementata nel midollo osseo, senza anomalie della forma dei vasi sanguigni. [34,35] In circa il 20% dei casi, sono presenti noduli linfoidi. [15,25]

In accordo ai criteri classificativi OMS, il quadro morfologico midollare rappresenta il primo criterio maggiore per la diagnosi di pre-MFP. Gli altri criteri maggiori consistono nella esclusione di tutte le altre forme di neoplasie mieloproliferative e mielodisplastiche, nella determinazione della clonalità della proliferazione mieloide attraverso la identificazione delle mutazioni *driver* coinvolgenti i geni JAK2, CALR e MPL e nella esclusione di tutte le forme di fibrosi midollare reattiva.

Da ultimo, la diagnosi di pre-MFP è possibile quando ai 3 criteri maggiori che devono essere documentati in tutti i casi si aggiunge almeno uno dei seguenti criteri minori: anemia, leucocitosi, splenomegalia ed incremento dei valori di LDH.

La maggior parte dei casi di MFP iniziale evolve verso la forma avanzata, a cui si associa emopoiesi extramidollare. [25,31,36-38]

La diagnosi di MFP in fase prefibrotica richiede che siano soddisfatti tutti i 3 criteri maggiori e almeno 1 criterio minore

Criteri maggiori

1. Proliferazione megacariocitaria con atipia, in assenza di fibrosi reticolinica di grado > 1, con aumento della cellularità midollare, proliferazione granulocitaria, e (spesso) ridotta eritropoiesi.
2. Assenza di positività ai criteri OMS per leucemia mieloide cronica BCR-ABL1 positiva, policitemia vera, sindromi mielodisplastiche, o altre neoplasie mieloidi.
3. Mutazioni di JAK2, CALR o MPL

oppure

Presenza di un altro marker clonale

oppure

Fibrosi reticolinica reattiva midollare assente o di minima entità

Criteri minori

Presenza di almeno uno dei seguenti reperti, confermato da due determinazioni consecutive:

1. Anemia non attribuibile a comorbilità
2. Leucocitosi ≥ 11 x 10^9/L
3. Splenomegalia palpabile
4. Livelli di lattato deidrogenasi (LDH) al di sopra dei limiti superiori

***Tabella 1** - Criteri diagnostici per la MFP in fase prefibrotica.*

Fase fibrotica avanzata

Ad oggi, la gran parte dei pazienti affetti da MFP è ancora diagnosticata in fase fibrotica avanzata (overt-MFP). [3,11,20] Analogamente a quanto avviene nella pre-MFP, i criteri diagnostici si basano sull'integrazione degli aspetti morfologici, molecolari e clinici (Tabella 2). Dal punto di vista morfologico, il midollo osseo della overt-MFP si caratterizza per una cellularità emopoietica che tende progressivamente a diminuire: si passa da una

situazione di ipercellularità legata alla proliferazione della serie granulopoietica e dei megacariociti, ad una fase di ipocellularità in cui le lacune emopoietiche vengono progressivamente occupate dal collagene, frammisto al quale residuano principalmente forme mieloidi immature e megacariociti. Questi ultimi appaiono mediamente di più piccole dimensioni e mostrano importanti dismorfismi ed atipie citologiche; essi tendono a disporsi in ampi aggregati o cordoni, spesso in prossimità di seni vascolari dilatati. In alcuni casi si possono riscontrare dei focolai prominenti di cellule immature, ma i mieloblasti costituiscono meno del 10% della popolazione cellulare midollare. [25,37] Nella overt-MFP il rapporto mielo-eritroide è costantemente aumentato per la progressiva riduzione della serie eritropoietica. Nella overt-MFP è possibile documentare mediante impregnazione argentica e colorazione tricromica di Masson la presenza di fibrosi reticolinica e collagene che, per definizione, deve essere moderata o severa (MF-2 o MF-3, sec. OMS). In alcuni casi, il midollo osseo è quasi privo di cellule emopoietiche, e presenta solo densa fibrosi reticolinica o collagenosica con piccole isole di cellule progenitrici all'interno dei seni vascolari. Consensualmente allo sviluppo della mielofibrosi si associa un'importante proliferazione vascolare, con marcata tortuosità dei vasi e distensione luminale, spesso associata a cospicua emopoiesi intrasinusoidale. [34,39-41] Le alterazioni stromali associate alla malattia coinvolgono l'interstizio (con la deposizione di fibre reticolari e collagene), le strutture vascolari ed il trabecolato osseo. Inizialmente si può osservare un certo grado di rimaneggiamento dovuto al riassorbimento e alla deposizione di osteoide ai bordi delle trabecole ossee, per poi arrivare ad una fase osteosclerotica, in cui le trabecole appaiono larghe ed irregolari, variabilmente interconnesse tra di loro, potendo occupare più del 50% dello spazio midollare. [25]

La progressione della malattia verso la fase fibrotica è parte della storia naturale della malattia e non sembra significativamente influenzata dalle modalità standard di trattamento citoriduttivo (con l'eccezione del trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche in cui è stata riportata una riduzione del grado di fibrosi dopo la terapia). [9,37,38,42-44] Più recentemente è stato riportato che l'interferone [45,46] e la terapia con inibitori di JAK1/JAK2 [47-53] può ritardare o addirittura invertire lo sviluppo di fibrosi midollare in tutti i suoi aspetti (fibrosi reticolinica, fibrosi collagenosica, osteosclerosi).

Lo sviluppo di monocitosi può indicare progressione della malattia. [54] Nei pazienti con una precedente diagnosi di MFP, il riscontro nel sangue periferico e/o nel midollo osseo del 10-19% di blasti e l'identificazione di un aumentato numero di cellule CD34+ in aggregati e/o disposti in sede paratrabecolare nel midollo osseo [10,25] indica una fase accelerata della malattia, mentre il riscontro di ≥20% di blasti indica una fase di trasformazione blastica. Raramente, i pazienti possono presentarsi inizialmente in una di queste due fasi.

Una caratteristica della mielofibrosi avanzata è la presenza di focolai di emopoiesi extramidollare, principalmente nella milza e nel fegato. Nella milza si osserva un'espansione della polpa rossa da parte di cellule eritroidi, granulociti e megacariociti. [55] La componente maggiore dell'emopoiesi extramidollare è più spesso rappresentata da megacariociti. Occasionalmente, dei grossi aggregati di megacariociti a crescita coesiva possono formare delle lesioni tumorali macroscopicamente visibili. In presenza di lesioni nodulari e in ogni fase avanzata di malattia con emopoiesi extramidollare in generale, deve essere considerata l'ipotesi di un sarcoma mieloide, escludibile con studi di immunoistochimica per CD34 e CD117 (KIT). [7,10] I cordoni di polpa rossa possono mostrare fibrosi e pooling di piastrine. I sinusoidi epatici possono mostrare emopoiesi extramidollare prominente, ed è possibile lo sviluppo di cirrosi epatica. [3]

La diagnosi di MFP in fase avanzata richiede che siano soddisfatti tutti i 3 criteri maggiori e almeno 1 criterio minore

Criteri maggiori

1. Proliferazione megacariocitaria con atipia, accompagnata da fibrosi reticolinica o collagene di grado 2 o 3.
2. Assenza di positività ai criteri OMS per leucemia mieloide cronica BCR-ABL1 positiva, policitemia vera, sindromi mielodisplastiche, o altre neoplasie mieloidi
3. Mutazioni di JAK2, CALR o MPL

oppure

Presenza di un altro marker clonale

oppure

Fibrosi reticolinica reattiva midollare assente o di minima entità

Criteri minori

Presenza di almeno uno dei seguenti reperti, confermato da due determinazioni consecutive:

1. Anemia non attribuibile a comorbilità
2. Leucocitosi ≥ 11 x 10^9/L
3. Splenomegalia palpabile
4. Livelli di lattato deidrogenasi (LDH) al di sopra dei limiti superiori

***Tabella 2** - Criteri diagnostici per la MFP in fase avanzata.*

Mielofibrosi secondaria

Seppure con frequenza diversa, anche le altre neoplasie mieloproliferative Philadelphia-negative possono, nel corso della loro storia naturale, evolvere verso una fase mielofibrotica avanzata (mielofibrosi secondaria).

Tale evoluzione è relativamente frequente nella PV, ove è riportata una frequenza di evoluzione mielofibrotica pari a circa il 20-25%; al contrario si tratta di una evenienza molto più rara nella TE: le casistiche dei centri ematologici più importanti riportano una fre-

quenza di evoluzione mielofibrotica nella TE intorno al 5% circa. In entrambi i casi, la classificazione OMS ha previsto criteri diagnostici rigorosi di tipo morfologico e clinico (Tabella 3A e 3B).
In particolare, i due criteri diagnostici maggiori prevedono una diagnosi di PV o di TE precedentemente formulata in accordo ai criteri OMS (2008) e la documentazione, mediante impregnazione argentica e/o colorazione istochimica tricromica, di un grado di fibrosi moderato o severo (MF-2 o MF-3).
La documentazione di una precedente diagnosi di PV o TE, formulata in accordo ai criteri diagnostici OMS, è essenziale in quanto può essere molto difficile ritrovare nel midollo osseo le stigmate della malattia primaria, dopo che si sono sviluppate quelle alterazioni morfologiche che sono comuni a tutte le fasi di mielofibrosi avanzata. [56]
La diagnosi di evoluzione mielofibrotica richiede anche la presenza di almeno 2 criteri diagnostici minori di tipo clinico e/o morfologico, che consistono nello sviluppo di anemia, splenomegalia, sintomi costituzionali, incremento dei livelli di LDH e leuco-eritroblastosi.

Criteri richiesti
1. Pregressa diagnosi di policitemia vera (sec. OMS).
2. Fibrosi midollare di grado 2-3 in una scala da 0 a 3 di grado 3-4 in una scala da 0 a 4
Criteri addizionali (almeno 2)
1. Anemia o riduzione della necessità di trattamento citoriduttivo o flebotomie per la eritrocitosi
2. Leuco-eritroblastosi
3. Splenomegalia ingravescente, definita come un aumento della splenomegalia palpabile di almeno 5 cm dal margine costale inferiore, o sviluppo di una splenomegalia di nuova insorgenza
4. Sviluppo di almeno 2 dei seguenti sintomi: >10% di perdita di peso negli ultimi 6 mesi; sudorazioni notturne; febbre inspiegata (>37,5° C)

***Tabella 3A** - Criteri diagnostici per la mielofibrosi post-policitemia vera.*

Criteri richiesti
1. Pregressa diagnosi di trombocitemia essenziale secondo OMS
2. Fibrosi midollare di grado 2-3 in una scala da 0 a 3 di grado 3-4 in una scala da 0 a 4
Criteri addizionali (almeno 2)
1. Anemia e una riduzione >2g/dL di concentrazione di emoglobina
2. Leuco-eritroblastosi
3. Splenomegalia ingravescente, definita come un aumento della splenomegalia palpabile di almeno 5 cm dal margine costale inferiore, o sviluppo di una splenomegalia di nuova insorgenza
4. Livelli di lattato deidrogenasi (LDH) al di sopra dei limiti superiori
5. Sviluppo di almeno 2 dei seguenti sintomi: >10% di perdita di peso negli ultimi 6 mesi; sudorazioni notturne; febbre inspiegata (>37,5° C)

***Tabella 3B** - Criteri diagnostici per la mielofibrosi post-trombocitemia essenziale.*

Fase prefibrotica di MFP e TE

Una delle maggiori critiche a cui è stata esposta la precedente versione della classificazione OMS 2008 riguarda il problema della diagnosi differenziale tra la pre-MFP associata a trombocitosi e la TE. In questo contesto occorre però ricordare che studi pubblicati da diversi gruppi hanno dimostrato che uno scrupoloso esame morfologico della biopsia osteo-midollare è indispensabile ai fini di una corretta diagnosi differenziale. [13,15-17,30,36,57-61]
Sulla base di questi risultati si è pensato, nell'aggiornamento della classificazione, di preparare uno schema che illustrasse con chiarezza le caratteristiche morfologiche utili per la diagnosi differenziale (Tabella 4).
Il razionale alla base di questa schematizzazione si basa sulla ipotesi che una valutazione della morfologia sulla base di criteri sempre più qualitativi (presenza o assenza) e/o semiquantitativi (ridotto, normale, aumentato) sia più riproducibile che una valutazione semplicemente basata sulla descrizione.
Questo approccio diagnostico-differenziale prevede l'analisi dei seguenti parametri morfologici: cellularità emopoietica, serie eritropoietica e granulopoietica, rapporto mielo-eritroide, megacariociti (caratteristiche morfologiche e caratteristiche dell'aggregazione) e grado di fibrosi reticolinica.

Caratteristica morfologica	TE	Pre-MFP
Cellularità (in relazione all'età)	Normale	Aumentata
Rapporto mieloide/eritroide	Normale	Aumentato
Aggregati densi di megacariociti	Rari	Frequenti
Dimensioni dei megacariociti	Grandi/giganti	Variabili
Lobulatura nucleare	Nuclei iperlobulati	Nuclei bulbosi/ ipolobulati
Fibrosi reticolinica, grado 1	Molto rara	Più frequente

***Tabella 4** - Caratteristiche morfologiche d'ausilio nel distinguere la TE dalla MFP in fase prefibrotica.*

La TE si caratterizza per una proliferazione che coinvolge esclusivamente la serie piastrinopoietica, con incremento del numero dei megacariociti, mentre le serie eritropoietica e granulopoietica sono sostanzialmente immodificate. Ciò implica che il midollo emopoietico sia normocellulato per età, con rapporto mieloeritroide conservato. I megacariociti sono più frequentemente grandi o giganti, con citoplasmi maturi e nuclei iperlobati, privi di atipie citologiche (nuclei a corna di cervo). Essi tendono a formare degli aggregati lassi (aggregati di almeno 3 megacariociti) con interposizione di cellule emopoietiche e stromali.
È importante sottolineare che nessun singolo parametro morfologico indicato in questo schema è patognomonico di malattia e che la corretta diagnosi differenziale tra la pre-MFP e la TE si basa sulla identificazione di due profili morfologici distinti e specifici.
I risultati di questo sforzo classificativo sono stati confermati in un importante lavoro cooperativo italiano in cui si documenta come l'applicazione della classificazione OMS aggiornata sia in grado di distinguere nell'ambito della mielofibrosi due fasi della malattia diverse per morfologia, clinica e prognosi. [62]

Alterazioni stromali nella MFP

Un'accurata valutazione morfologica che riguardi non solo le componenti emopoietiche ma anche lo stroma midollare, è importante non solo ai fini diagnostici e diagnostico-differenziali ma anche dal punto di vista prognostico. Il significato prognostico della fibrosi midollare era già stato intuito da Thiele *et al.* in un lavoro in cui si documentava l'associazione del grado di fibrosi midollare con alcune variabili ematologiche. [63] Successivamente in due lavori più recenti, il nostro gruppo ha dimostrato il significato prognostico del *grading* della fibrosi nella MFP e ha documentato come, utilizzando il *grading* della fibrosi midollare in associazione con l'*International Prognostic Scoring System*, si ottenga una migliore stratificazione prognostica dei pazienti. [64,65] Più recentemente, in un grosso studio cooperativo italiano, tali dati sono stati ulteriormente confermati ed è stata documentata, nei casi di fibrosi avanzata, una maggiore frequenza di mutazioni non *driver* a carico di geni quali ASXL1 e EZH2 che si associano ad una prognosi più sfavorevole. [66]
Un ulteriore aggiornamento della classificazione OMS riguarda l'introduzione di criteri per la valutazione dettagliata delle alterazioni stromali che si accompagnano alla MFP. In particolare, viene suggerito un sistema di grading dettagliato della fibrosi reticolinica, del collagene e dell'osteosclerosi da applicare per la rivalutazione di malattia nei trial clinici. Tale sistema di grading è stato pubblicato in un lavoro metodologico tedesco nel 2015 (Tabelle 5A, 5B, 5C). [28] Recentemente, il nostro gruppo ha dimostrato come una valutazione dettagliata delle alterazioni stromali alla diagnosi, eseguita in accordo a questo sistema di stadiazione abbia maggiore valore prognostico della valutazione della sola fibrosi midollare (Figura 1 e 2). [67]

Grado	Definizione
MF-0	Fibre reticoliniche sparse, senza intersezioni (*cross-over*), come da midollo osseo normale
MF-1	Intreccio lasso di fibre reticoliniche con parecchie intersezioni, specialmente in aree perivascolari
MF-2	Marcato e diffuso aumento delle fibre reticoliniche, con estese intersezioni ed occasionalmente con focali fasci di fibre spesse compatibili con collagene e/o focale osteosclerosi
MF-3	Marcato e diffuso aumento delle fibre reticoliniche, con estese intersezioni e fasci di fibre spesse compatibili con collagene, solitamente in associazione ad osteosclerosi

***Tabella 5A** - Grading semiquantitativo della fibrosi del midollo osseo.*

Grado	Definizione
0	Collagene presente solo a livello perivascolare (normale)
1	Focale deposizione di collagene in zona paratrabecolare o centrale, senza interconnessioni
2	Deposizione di collagene in zona paratrabecolare o centrale con focali interconnessioni, oppure deposizione paratrabecolare generalizzata
3	Intersezioni diffuse in >30% dello spazio midollare

***Tabella 5B** - Grading semiquantitativo della deposizione di collagene.*

Grado	Definizione
0	Trabecole ossee regolari (bordi trabecolari definiti)
1	Focali spicule, *budding* o apposizione di osso neoformato
2	Diffusa apposizione paratrabecolare di osso neoformato con ispessimento trabecolare, talvolta con focali interconnessioni
3	Interconnessioni estese di tessuto osseo neoformato, con obliterazione dello spazio midollare

***Tabella 5C** - Grading semiquantitativo dell'osteosclerosi.*

Conclusioni

In conclusione, appare opportuno affermare che l'applicazione dettagliata dei criteri classificativi OMS aggiornati consente di formulare una diagnosi corretta di malattia e, nell'ambito di questa, di distinguere tra due fasi cliniche e patologiche differenti, che richiedono differenti approcci terapeutici e che si associano a prognosi diverse. Inoltre, sono stati perfezionati i criteri diagnostico-differenziali, in particolare con la trombocitemia essenziale, una neoplasia mieloproliferativa caratterizzata da un andamento clinico profondamente differente.

Da ultimo si è intuito che una valutazione dettagliata non solo delle modificazioni a carico delle serie emopoietiche ma anche delle alterazioni stromali associate alla malattia sia importante anche a scopo prognostico, nello sforzo di caratterizzare sempre più il singolo paziente per una sua gestione sempre più ottimale.

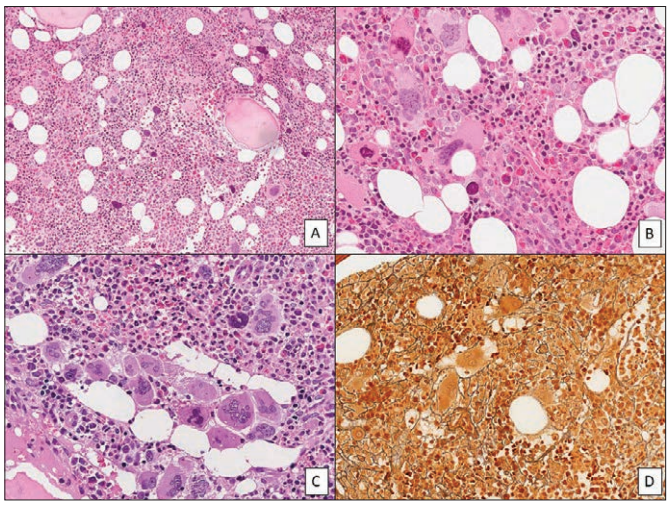


***Figura 1** - MFP in fase prefibrotica: midollo emopoietico ipercellulare per età, con proliferazione delle serie granulopoietica e piastrinopoietica (A); i megacariociti sono aumentati di numero, mostrano atipie citologiche (B) e formano aggregati densi (C). La fibrosi reticolinica è di grado lieve (MF-1) (D).*

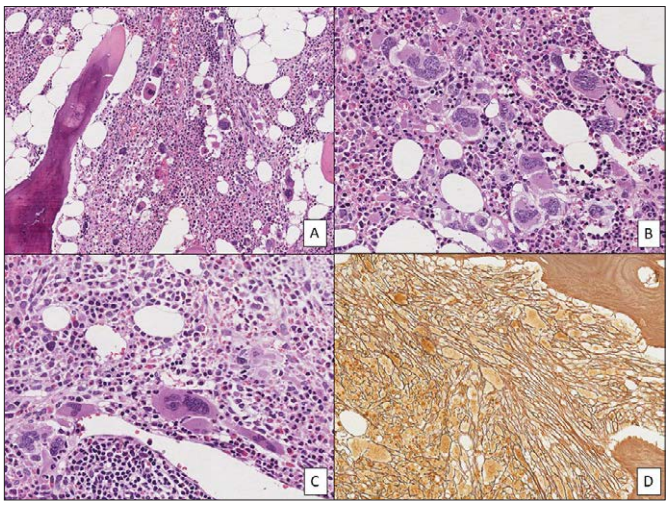


***Figura 2** - MFP in fase fibrotica avanzata: midollo ipercellulare per età, con proliferazione delle serie granulopoietica e piastrinopoietica (A); i megacariociti sono molto numerosi, marcatamente atipici e formano ampi aggregate densi (B); talora appaiono deformati e dismorfici per la presenza di fibrosi (C). La fibrosi collagene è evidente e di grado avanzato (MF-3) (D).*

Bibliografia

1. Mehta J, Wang H, Iqbal SU, Mesa R. Epidemiology of myeloproliferative neoplasms in the United States. Leuk Lymphoma. 2014;55(3):595- 600.
2. Moulard O, Mehta J, Fryzek J, Olivares R, Igbal U, Mesa R. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. Eur J Haematol. 2014;92(4):289-97.
3. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am J Hematol. 2014;89(9):915-25.
4. Titmarsh GJ, Duncombe AS, McMullin MF, O'Rorke M, Mesa R, De Vocht F, et al. How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. Am J Hematol. 2014;89(6):581-7.
5. Cervantes F, Barosi G, Demory JL, Reilly J, Guarnone R, Dupriez B, et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups. Br J Haematol. 1998;102(3):684-90.
6. Andréasson B, Swolin B, Kutti J. Patients with idiopathic myelofibrosis show increased CD34+ cell concentrations in peripheral blood compared to patients with polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. Eur J Haematol. 2002;68(4):189-93.
7. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V, Piaggio G, Marchetti M, et al. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. Blood. 2001;98(12):3249-55.
8. Thiele J, Kvasnicka HM, Diehl V. Bone marrow CD34+ progenitor cells in Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative disorders-a clinicopathological study on 575 patients. Leuk Lymphoma. 2005;46(2):709-15.
9. Passamonti F, Vanelli L, Malabarba L, Rumi E, Pungolino E, Malcovati L, et al. Clinical utility of the absolute number of circulating CD34-positive cells in patients with chronic myeloproliferative disorders. Haematologica. 2003;88(10):1123-9.
10. Thiele J, Kvasnicka HM, Czieslick C. CD34+ progenitor cells in idiopathic (primary) myelofibrosis: a comparative quantification between spleen and bone marrow tissue. Ann Hematol. 2002;81(2):86-9.
11. Cervantes F, Barosi G. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: diagnosis, prognostic factors, and staging. Semin Oncol. 2005;32(4):395-402.
12. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: recommendations from an ad hoc international expert panel. Blood. 2007;110(4):1092-7.

13. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Ruggeri M, et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. J Clin Oncol. 2011;29(23):3179-84.
14. Barosi G, Rosti V, Bonetti E, Campanelli R, Carolei A, Catarsi P, et al. Evidence that prefibrotic myelofibrosis is aligned along a clinical and biological continuum featuring primary myelofibrosis. PLoS One. 2012;7(4):e35631.
15. Thiele J, Kvasnicka HM. Diagnostic differentiation of essential thrombocythaemia from thrombocythaemias associated with chronic idiopathic myelofibrosis by discriminate analysis of bone marrow features-a clinicopathological study on 272 patients. Histol Histopathol. 2003;18(1):93-102.
16. Thiele J, Kvasnicka HM. Clinicopathological criteria for differential diagnosis of thrombocythemias in various myeloproliferative disorders. Semin Thromb Hemost. 2006;32(3):219-30.
17. Thiele J, Kvasnicka HM, Müllauer L, Buxhofer-Ausch V, Gisslinger B, Gisslinger H. Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification. Blood. 2011;117(21):5710-8.
18. Mesa RA, Kantarjian H, Tefferi A, Dueck A, Levy R, Vaddi K, et al. Evaluating the serial use of the Myelofibrosis Symptom Assessment Form for measuring symptomatic improvement: performance in 87 myelofibrosis patients on a JAK1 and JAK2 inhibitor (INCB018424) clinical trial. Cancer. 2011;117(21):4869-77.
19. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. Blood. 2009;113(13):2895- 901.
20. Barosi G, Hoffman R. Idiopathic myelofibrosis. Semin Hematol. 2005;42(4):248-58.
21. Tefferi A, Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies. J Clin Oncol. 2011;29(5):573-82.
22. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. Blood. 2014;124(16):2507-13.
23. Tefferi A, Thiele J, Vannucchi AM, Barbui T. An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. Leukemia. 2014;28(7):1407-13.
24. Barosi G. Essential thrombocythemia vs. early/prefibrotic myelofibrosis: why does it matter. Best Pract Res Clin Haematol. 2014;27(2):129-40.
25. Thiele J, Kvasnicka HM. Hematopathologic findings in chronic idiopathic myelofibrosis. Semin Oncol. 2005;32(4):380-94.
26. Buhr T, Georgii A, Choritz H. Myelofibrosis in chronic myeloproliferative disorders. Incidence among subtypes according to the Hannover Classification. Pathol Res Pract. 1993;189(2):121-32.
27. Thiele J, Kvasnicka HM. Prefibrotic chronic idiopathic myelofibrosis-a diagnostic enigma? Acta Haematol. 2004;111(3):155-9.
28. Kvasnicka HM, Beham-Schmid C, Bob R, Dirnhofer S, Hussein K, Kreipe H, et al. Problems and pitfalls in grading of bone marrow fibrosis, collagen deposition and osteosclerosis - a consensus-based study. Histopathology. 2016;68(6):905-15.
29. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. Haematologica. 2005;90(8):1128-32.
30. Kvasnicka HM. WHO classification of myeloproliferative neoplasms (MPN): A critical update. Curr Hematol Malig Rep. 2013;8(4):333-41.
31. Kvasnicka HM, Thiele J. Prodromal myeloproliferative neoplasms: the 2008 WHO classification. Am J Hematol. 2010;85(2):62-9.
32. Thiele J, Kvasnicka HM. The 2008 WHO diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis. Curr Hematol Malig Rep. 2009;4(1):33-40.
33. Thiele J, Kvasnicka HM, Orazi A. Bone marrow histopathology in myeloproliferative disorders-current diagnostic approach. Semin Hematol. 2005;42(4):184-95.
34. Kvasnicka HM, Thiele J. Bone marrow angiogenesis: methods of quantification and changes evolving in chronic myeloproliferative disorders. Histol Histopathol. 2004;19(4):1245-60.
35. Gianelli U, Vener C, Raviele PR, Savi F, Somalvico F, Calori R, et al. VEGF expression correlates with microvessel density in Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative disorders. Am J Clin Pathol 2007;128(6):966-73.
36. Kreft A, Büche G, Ghalibafian M, Buhr T, Fischer T, Kirkpatrick CJ. The incidence of myelofibrosis in essential thrombocythaemia, polycythaemia vera and chronic idiopathic myelofibrosis: a retrospective evaluation of sequential bone marrow biopsies. Acta Haematol. 2005;113(2):137-43.
37. Buhr T, Büsche G, Choritz H, Länger F, Kreipe H. Evolution of myelofibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis as evidenced in sequential bone marrow biopsy specimens. Am J Clin Pathol. 2003;119(1):152-8.
38. Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Graeff A, Diehl V. Dynamics of fibrosis in chronic idiopathic (primary) myelofibrosis during therapy: a follow-up study on 309 patients. Leuk Lymphoma. 2003;44(6):949-53.
39. Boveri E, Passamonti F, Rumi E, Pietra D, Elena C, Arcaini L, et al. Bone marrow microvessel density in chronic myeloproliferative disorders: a study of 115 patients with clinicopathological and molecular correlations. Br J Haematol. 2008;140(2):162-8.
40. Mesa RA, Hanson CA, Rajkumar SV, Schroeder G, Tefferi A, et al. Evaluation and clinical correlations of bone marrow angiogenesis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. Blood. 2000;96(10):3374-80.
41. Ni H, Barosi G, Hoffman R. Quantitative evaluation of bone marrow angiogenesis in idiopathic myelofibrosis. Am J Clin Pathol. 2006;126(2):241-7.
42. Thiele J, Kvasnicka HM, Schmitt-Graeff A, Diehl V. Bone marrow histopathology following cytoreductive therapy in chronic idiopathic myelofibrosis. Histopathology. 2003;43(5):470-9.
43. Kröger N, Thiele J, Zander A, Schwerdtfeger R, Kobbe G, Bornhäuser M, et al. Rapid regression of bone marrow fibrosis after dose-reduced allogeneic stem cell transplantation in patients with primary myelofibrosis. Exp Hematol. 2007;35(11):1719-22.
44. Thiele J, Kvasnicka HM, Dietrich H, Stein G, Hann M, Kaminski A, et al. Dynamics of bone marrow changes in patients with chronic idiopathic myelofibrosis following allogeneic stem cell transplantation. Histol Histopathol. 2005;20(3):879-89.
45. Chott A, Gisslinger H, Thiele J, Fritz E, Linkesch W, Radaszkiewicz T, et al. Interferon-alpha-induced morphological changes of megakaryocytes: a histomorphometrical study on bone marrow biopsies in chronic myeloproliferative disorders with excessive thrombocytosis. Br J Haematol. 1990;74(1):10-6.
46. Pizzi M, Silver RT, Barel A, Orazi A. Recombinant interferon-αin myelofibrosis reduces bone marrow fibrosis, improves its morphology and is associated with clinical response. Mod Pathol. 2015;28(1):1315-23.
47. Harrison CN, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Knoops L, et al. Long-term findings from Comfort-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. Leukemia. 2016;30(8):1701-7.
48. Iurlo A, Cattaneo D, Boiocchi L, Orofino N, Fermo E, Cortelezzi A, et al. Clinical and morphologic features in five post-polycythemic myelofibrosis patients treated with ruxolitinib. Ann Hematol. 2015;94(10):1749-51.
49. Iurlo A, Gianelli U, Rapezzi D, Cattaneo D, Fermo E, Binda F, et al. Imatinib and ruxolitinib association: first experience in two patients. Haematologica. 2014;99(6):e76-7.
50. Jamieson C, Hasserjian R, Gotlib J, Cortes J, Stone R, Talpaz M, et al. Effect of treatment with a JAK2-selective inhibitor, fedratinib, on bone marrow fibrosis in patients with myelofibrosis.; J Transl Med. 2015;13:294.

51. Massaro F, Molica M, Breccia M. How ruxolitinib modified the outcome in myelofibrosis: focus on overall survival, allele burden reduction and fibrosis changes. Expert Rev Hematol. 2017;10(2):155-9.

52. Wilkins BS, Radia D, Woodley C, Farhi SE, Keohane C, Harrison CN. Resolution of bone marrow fibrosis in a patient receiving JAK1/JAK2 inhibitor treatment with ruxolitinib. Haematologica. 2013;98(12):1872-6.

53. Kvasnicka HM, Thiele J, Bueso-Ramos CE, Sun W, Cortes J, Kantarjian HM, et al. Long-term effects of ruxolitinib versus best available therapy on bone marrow fibrosis in patients with myelofibrosis. J Hematol Oncol. 2018;11(1):42.

54. Boiocchi L, Espinal-Witter R, Geyer JT, Steinhilber J, Bonzheim I, Knowles DM, et al. Development of monocytosis in patients with primary myelofibrosis indicates an accelerated phase of the disease. Mod Pathol. 2013;26(2):204-12.

55. Prakash S, Hoffman R, Barouk S, Wang YL, Knowles DM, Orazi A. Splenic extramedullary hematopoietic proliferation in Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms: heterogeneous morphology and cytological composition. Mod Pathol. 2012;25(6):815-27.

56. Boiocchi L, Mathew S, Gianelli U, Iurlo A, Radice T, Barouk-Fox S, et al. Morphologic and cytogenetic differences between post-polycythemic myelofibrosis and primary myelofibrosis in fibrotic stage. Mod Pathol. 2013;(12):1577-85.

57. Florena AM, Tripodo C, Iannitto E, Porcasi R, Ingrao S, Franco V. Value of bone marrow biopsy in the diagnosis of essential thrombocythemia. Haematologica. 2004;89(8):911-9.

58. Gianelli U, Bossi A, Cortinovis I, Sabattini E, Tripodo C, Boveri E, et al. Reproducibility of the WHO histological criteria for the diagnosis of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. Mod Pathol. 2014;27(6):814-22.

59. Gianelli U, Bossi A, Cortinovis I, Sabattini E, Tripodo C, Boveri E, et al. Essential thrombocythemia or chronic idiopathic myelofibrosis? A single-center study based on hematopoietic bone marrow histology. Leuk Lymphoma. 2006;47(9):1774-81.

60. Gisslinger H, Gotic M, Holowiecki J, Penka M, Thiele J, Kvasnicka HM, et al. Anagrelide compared with hydroxyurea in WHO-classified essential thrombocythemia: the ANAHYDRET Study, a randomized controlled trial. Blood. 2013;121(10):1720-8.

61. Madelung AB, Bondo H, Stamp I, Loevgreen P, Nielsen SL, Falensteen A, et al. World Health Organization-defined classification of myeloproliferative neoplasms: morphological reproducibility and clinical correlations- the Danish experience. Am J Hematol. 2013;88(12):1012-6.

62. Guglielmelli P, Pacilli A, Rotunno G, Rumi E, Rosti V, Delaini F, et al. Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis. Blood. 2017;129(24):3227-3236.

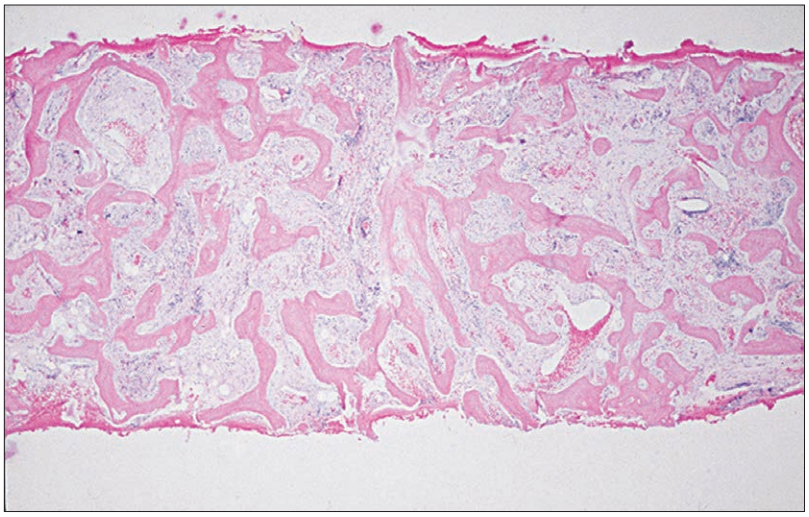
63. Thiele J, Kvasnicka HM. Grade of bone marrow fibrosis is associated with relevant hematological findings-a clinicopathological study on 865 patients with chronic idiopathic myelofibrosis. Ann Hematol. 2006;85(4):226-32.

64. Vener C, Fracchiolla NS, Gianelli U, Calori R, Radaelli F, Iurlo A, et al. Prognostic implications of the European consensus for grading of bone marrow fibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis. Blood. 2008;111(4):1862-5.

65. Gianelli U, Vener C, Bossi A, Cortinovis I, Iurlo A, Fracchiolla NS, et al. The European Consensus on grading of bone marrow fibrosis allows a better prognostication of patients with primary myelofibrosis. Mod Pathol. 2012;25(9):1193-202.

66. Guglielmelli P, Rotunno G, Pacilli A, Rumi E, Rosti V, Delaini F, et al. Prognostic impact of bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis. A study of the AGIMM group on 490 patients. Am J Hematol. 2016;91(9):918-22.

67. Gianelli U, Fiori S, Cattaneo D, Bossi A, Cortinovis I, Bonometti A, et al. Prognostic significance of a comprehensive histological evaluation of reticulin fibrosis, collagen deposition and osteosclerosis in primary myelofibrosis patients. Histopathology. 2017;71(6):897-908.



Biopsia osteomidollare (Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).

Parole Chiave

Mielofibrosi primaria, mielofibrosi post-trombocitemica, mielofibrosi post-policitemica, fibrosi midollare.

Indirizzi per la corrispondenza

Umberto Gianelli
Ospedale Maggiore Policlinico di Milano
Via F. Sforza 35
20122 Milano

Modelli prognostici



Margherita Maffioli

S.C. di Ematologia - ASST Sette Laghi - Ospedale di Circolo Varese

Introduzione

L'incidenza della mielofibrosi primaria (MFP) nei paesi occidentali è di 0,4-0,7 nuovi casi per 100.000 persone per anno. L'età mediana alla diagnosi è di 64 anni. [1] La presentazione clinica alla diagnosi può essere estremamente variabile e può essere caratterizzata da anemia, piastrinopenia o piastrinosi, leucopenia o leucocitosi, anisopoichilocitosi, presenza di dacriociti e screzio leuco-eritroblastico, splenomegalia associata ad eventuale epatomegalia e sintomatologia sistemica. Al momento della diagnosi la maggior parte dei pazienti ha una splenomegalia palpabile all'esame obiettivo, circa un terzo presenta sintomi sistemici e circa un quarto esegue emotrasfusioni. [1, 2] Nell'arco del primo anno dalla diagnosi la quota di pazienti con sintomatologia sistemica, blasti circolanti, emoglobina inferiore a 10 g/dL, piastrinopenia, leucopenia e quella dei pazienti sottoposti a terapia trasfusionale aumenta significativamente rispetto alla diagnosi. [2] Questi dati sottolineano l'eterogeneità e la tendenza progressiva della patologia che, associate ad una sopravvivenza che può variare da 1-2 anni a decenni dalla diagnosi, rendono ragione della necessità di identificare fattori prognostici che guidino le scelte terapeutiche ed il *timing* delle medesime. Diversi sistemi prognostici si sono succeduti negli anni, nel tentativo di produrre strumenti sempre più accurati per stratificare i pazienti affetti da mielofibrosi in distinte categorie prognostiche a cui proporre approcci terapeutici differenti. Il presente capitolo si propone di ripercorrere i principali modelli e indicatori prognostici nella mielofibrosi sia primaria che secondaria a trombocitemia essenziale e a policitemia vera, sottolineandone l'utilità in scenari terapeutici differenti.

Modelli prognostici clinici

Nella pratica clinica e nella maggior parte degli studi clinici interventistici vengono utilizzati i modelli prognostici *International Prognostic Scoring System* (IPSS) [1] e *Dynamic IPSS* (DIPSS), [3] sviluppati a partire da una coorte multicentrica di pazienti con MFP e che si basano su parametri clinici ubiquitariamente disponibili. Tali score sono da impiegare rispettivamente alla diagnosi (IPSS) e durante il decorso della malattia per una ripuntualizzazione della prognosi (DIPSS). Tali sistemi identificano quattro categorie di rischio sulla base dei seguenti parametri: età superiore a 65 anni, presenza di sintomi sistemici, livelli di emoglobina inferiori a 10 g/dL, conta leucocitaria superiore a 25 x 10^9/L, riscontro di elementi blastici nel sangue periferico in misura maggiore o uguale all'1%. Nell'IPSS i fattori di rischio hanno ugual peso mentre nel DIPSS l'anemia contribuisce in maniera doppia rispetto agli altri fattori alla stratificazione prognostica (Tabella 1). Nella coorte dell'IPSS le cause di morte erano le seguenti: trasformazione leucemica (31%), progressione di malattia non clonale (18%), trombosi e complicanze vascolari (13%), infezioni (11%), eventi emorragici in assenza di trasformazione leucemica (5%), ipertensione portale (4%), neoplasie secondarie (4%), altre cause (13%). Le categorie di rischio identificate vengono definite a basso rischio, a rischio intermedio-1, a rischio intermedio-2 e ad alto rischio e suddividono i pazienti secondo una stima della sopravvivenza mediana attesa, che nell'IPSS varia da più di 11 anni nei pazienti a basso rischio a 27 mesi in quelli ad alto rischio (Tabella 2). Modifiche incrementali del DIPSS nel corso della storia clinica del paziente predicono una riduzione dell'attesa di vita e sono associate ad un aumentato rischio di trasformazione leucemica, che nei pazienti ad alto rischio DIPSS è aumentato di quasi 25 volte rispetto ai pazienti che permangono nella categoria a basso rischio. [4] Il modello DIPSS è anche in grado di predire l'esito della procedura allotrapiantologica: con un follow up mediano di 5,9 anni non veniva raggiunta la sopravvivenza mediana nei pazienti trapiantati (da donatore familiare o da registro negli anni 1990-2009) in condizione di DIPSS basso e intermedio-1, mentre era di 7 e 2,5 anni per i pazienti rispettivamente con DIPSS intermedio-2 e alto al momento della procedura. [5] Uno studio retrospettivo ha confrontato l'outcome, a seconda dello stato DIPSS, di pazienti con MFP di età inferiore a 65 anni trattati convenzionalmente (nell'era precedente i farmaci JAK-inibitori) con pazienti di pari età sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche. L'analisi ha mostrato un vantaggio in termini di sopravvivenza per i pazienti con DIPSS basso trattati con strategie non-trapiantologiche e per i pazienti con DIPSS intermedio-2 ed alto sottoposti a trapianto. Nei pazienti a rischio intermedio-1 non è stato possibile stabilire una superiorità di uno dei due approcci sull'altro e si raccomanda pertanto una valutazione individuale del

paziente nel tentativo di individuare la strategia più vantaggiosa sulla base del quadro clinico-genetico-molecolare complessivo. [6]
Circa un terzo dei pazienti con MFP presenta un cariotipo anormale. [7] Nella coorte IPSS informazioni circa la presenza di anomalie citogenetiche (tuttavia non sempre specificate) erano disponibili nel 40% dei pazienti ed è stata osservata un'associazione tra la presenza di anomalie citogenetiche e valori di emoglobina inferiori a 10 g/dL. La presenza di anomalie citogenetiche contribuiva tuttavia alla definizione prognostica solo nei pazienti a rischio intermedio-1 e intermedio-2. [1] La rilevanza prognostica di alterazioni cariotipiche nella MFP è stata successivamente ribadita in uno studio monocentrico sia in termini di impatto sulla sopravvivenza che sul rischio di trasformazione leucemica. Pazienti portatori di anomalie citogenetiche cosiddette sfavorevoli (ovvero un cariotipo complesso oppure singole o doppie anomalie citogenetiche includenti +8, -7/7q-, i(17q), -5/5q-, 12p-, inv(3) e riarrangiamenti che coinvolgono 11q23) presentavano una sopravvivenza stimata a 5 anni dell'8%, a fronte di una sopravvivenza a 5 anni del 51% nei pazienti con cariotipo favorevole (ovvero un cariotipo normale oppure ogni anomalia citogenetica non considerata sfavorevole). Il tasso stimato di trasformazione leucemica a 5 anni era del 46% e del 7% rispettivamente nei pazienti con rischio sfavorevole e favorevole da un punto di vista citogenetico. [7] Tale impatto negativo era indipendente dallo score clinico del paziente e costituiva pertanto un'informazione prognostica aggiuntiva. Un successivo modello prognostico, definito DIPSS-Plus, ha quindi incluso tra i fattori di rischio la presenza di anomalie citogenetiche sfavorevoli, oltre che di valori di piastrine inferiori a 100 x 10^9/L e di trasfusione-dipendenza, suddividendo ancora i pazienti (valutati in parte alla diagnosi e in parte oltre il primo anno dalla diagnosi) in quattro categorie di rischio con attese di vita variabili da più di 15 anni in quelli a basso rischio a meno di 2 anni in quelli ad alto rischio (Tabelle 1 e 2). [8] L'evenienza di una *punctio sicca* può determinare una difficoltà a reperire sangue midollare per l'esecuzione dell'analisi citogenetica. Uno studio condotto su 59 pazienti ha documentato una discreta resa impiegando sangue periferico per l'analisi e una buona concordanza tra gli esiti ottenuti impiegando sangue periferico e midollare. [9] Pur considerando ciò, l'assetto citogenetico non può evidentemente essere riattualizzato ad ogni visita del paziente, diversamente da quanto accade per i fattori di rischio clinici. Successive rivalutazioni del valore prognostico delle anomalie citogenetiche nella MFP hanno sottolineato un'eterogeneità di outcome all'interno della categoria a rischio citogenetico sfavorevole, con una mortalità a 2 anni eccedente l'80% in pazienti con cariotipo monosomico o con inv(3) o i(17q). [10] Una suddivisione prognostica citogenetica a tre categorie è stata allora proposta: pazienti a rischio molto alto, ovvero individui con singole o multiple anomalie includenti -7, i(17q), inv(3)/3q21, 12p-/12p11.2, 11q-/11q23 o altre trisomie autosomiche ad eccezione di +8/+9; pazienti a rischio favorevole, ovvero individui con cariotipo normale o anomalie singole includenti 13q-, +9, 20q-, traslocazioni/duplicazioni del cromosoma 1, anomalie del cromosoma sessuale tra cui -Y; pazienti a rischio sfavorevole, ovvero individui portatori di qualsiasi anomalia non inclusa nei due gruppi precedenti. La sopravvivenza mediana attesa è di 1,2, 2,9 e 4,4 anni nei pazienti rispettivamente a rischio molto alto, sfavorevole e favorevole. Anche il rischio di trasformazione leucemica varia a seconda della categoria di rischio citogenetico, che è aumentato di 4,4 e 2 volte nei pazienti a rischio molto alto e sfavorevole rispetto ai pazienti a rischio citogenetico favorevole. [11]
I pazienti appartenenti alle categorie di rischio intermedio-2 e alto secondo l'IPSS, il DIPSS e il DIPSS-Plus, presentano un'attesa di vita mediana stimata inferiore a 5 anni. Su questa tipologia di paziente si sono pertanto concentrati gli sforzi terapeutici iniziali con farmaci JAK-inibitori. [12] Ruxolitinib, l'unico JAK-inibitore ad oggi approvato nel trattamento della mielofibrosi, viene in molti paesi dispensato a seconda dello score (D)IPSS, essendo stato studiato in maniera randomizzata solo in pazienti con IPSS intermedio-2 o alto. [13, 14] Tali pazienti sono anche quelli potenzialmente candidabili ad una procedura trapiantologica. [15] Ciò sottolinea la grande rilevanza dei sistemici prognostici cosiddetti clinici; essi vengono infatti impiegati in maniera sistematica universale per definire il programma di cura del paziente guidando le decisioni terapeutiche trapiantologiche e non. Le variabili prognostiche incluse nei tre modelli sopra citati e le stime di sopravvivenza mediana attesa corrispondenti alle categorie di rischio identificate sono riassunte nelle Tabelle 1 e 2.

	IPSS (punteggio fattori di rischio)	**DIPSS** (punteggio fattori di rischio)	**DIPSS-Plus** (punteggio fattori di rischio)
Età > 65 anni	1	1	Nota 1
Sintomi costituzionali	1	1	
Emoglobina < 10 g/dL	1	2	
Leucociti > 25 x 10^9/L	1	1	
Blasti s. periferico ≥ 1%	1	1	
Cariotipo sfavorevole *	--	--	1
Trasfusione-dipendenza	--	--	1
Piastrine < 100 x 10^9/L	--	--	1

* +8, -7/7q-, i(17q), -5/5q-, 12p-, inv(3) o riarrangiamenti che coinvolgono 11q23
Nota 1: calcolare il punteggio DIPSS; assegnare da 0 a 3 punti a seconda della categoria DIPSS risultante

***Tabella 1** - Variabili incluse nei modelli prognostici IPSS, DIPSS, DIPSS-Plus e relativo punteggio nella MFP.*

<table>
<tr><th>Somma dei punteggi delle variabili di rischio</th><th>IPSS</th><th>DIPSS</th><th>DIPSS-Plus</th></tr>
<tr><td>0</td><td>11,3</td><td>Non raggiunta</td><td>15,4</td></tr>
<tr><td>1</td><td>7,9</td><td rowspan="2">14,2</td><td>6,5</td></tr>
<tr><td>2</td><td>4</td><td rowspan="2">2,9</td></tr>
<tr><td>3</td><td rowspan="3">2,3</td><td rowspan="2">4</td></tr>
<tr><td>4</td><td rowspan="2">1,3</td></tr>
<tr><td>5</td><td rowspan="2">1,5</td></tr>
<tr><td>6</td><td>--</td></tr>
<tr><td colspan="4">Rischio basso
Rischio intermedio-1
Rischio intermedio-2
Rischio alto</td></tr>
</table>

***Tabella 2** - Sopravvivenza mediana stimata (in anni) nei pazienti appartenenti alle differenti categorie di rischio IPSS, DIPSS, DIPSS-Plus (mielofibrosi primaria).*

Significato prognostico dello stato mutazionale

Mutazioni *driver*

Le mutazioni dei geni JAK2, CALR e MPL sono comuni alle neoplasie mieloproliferative croniche (MPN) e sono in grado di ricapitolare il fenotipo di malattia in modelli trapiantologici murini. Si tratta di mutazioni spesso ma non invariabilmente mutualmente esclusive.[16] Queste mutazioni determinano un'attivazione costitutiva della via di trasduzione del segnale JAK2/*signal transducer and activator of transcription* (STAT) e studi che valutano il profilo di espressione genica documentano un aumentato *signaling* attraverso JAK2 in tutti i pazienti con neoplasie mieloproliferative croniche, indipendentemente dalla mutazione sottostante.[17] Nella MFP circa il 65% dei pazienti presenta la mutazione JAK2V617F, il 20-25% mutazioni dell'esone 9 del gene CALR e circa il 5% mutazioni di MPL. I pazienti privi di una mutazione determinante il fenotipo o *driver* vengono definiti tripli negativi (TN). Nella MFP sono state osservate correlazioni tra genotipo e fenotipo, in particolare alla diagnosi i pazienti CALR-mutati sembrano essere più giovani, avere valori di leucociti più bassi e di piastrine più alti ed appartenere a categorie IPSS più basse. All'estremo opposto dello spettro si collocano i pazienti TN. Una valutazione dinamica mediante analisi dei rischi competitivi conferma che nei pazienti CALR-mutati è meno frequente lo sviluppo di anemia, piastrinopenia, leucocitosi e splenomegalia palpabile a più di 10 cm dall'arcata costale. I pazienti CALR-mutati hanno un minor rischio trombotico (ridotto circa della metà) rispetto a quelli portatori della mutazione JAK2V617F, indipendentemente dall'età. Quest'osservazione conferma il ruolo trombofilico della mutazione JAK2V617F anche nella MFP. I pazienti TN sono più a rischio di trasformazione leucemica rispetto agli altri (incidenza cumulativa di trasformazione leucemica a 10 anni: 19,4% nei pazienti JAK2-mutati; 9,4% nei pazienti CALR-mutati; 16,9% nei pazienti MPL-mutati e 34,4% nei pazienti TN; valore di p massimo pari a 0,043). L'assetto delle mutazioni *driver* si traduce anche in un impatto sull'attesa stimata di vita, migliore nei pazienti CALR-mutati e significativamente ridotta nei pazienti TN (attesa mediana di vita stimata nei pazienti CALR-mutati 17,7 anni; in quelli JAK2-mutati 9,2 anni; in quelli MPL-mutati 9,1 anni e nei pazienti TN 3,2 anni). Il contributo prognostico delle mutazioni *driver* è indipendente dalle variabili IPSS, potenziandone l'informatività prognostica.[18] Nelle MPN sono state identificate più di 30 mutazioni *frameshift* somatiche del gene CALR risultanti da inserzioni, delezioni o combinazioni di inserzioni e delezioni; le più frequenti sono una delezione di 52 paia di basi (p.L367fs*46, mutazione CALR di tipo 1) e un'inserzione di 5 paia di basi (p.K385fs*47, mutazione CALR di tipo 2). La quasi totalità delle restanti mutazioni di CALR può essere suddivisa, in base alla propensità predetta in silico della proteina mutata a formare alfa eliche, in tipo 1-*like* e tipo 2-*like*.[19] La valutazione dei sottotipi di mutazioni di CALR ha mostrato che nella MFP le mutazioni di tipo 1/tipo 1-*like* sono più frequenti rispetto a quelle di tipo 2/tipo 2-*like* e che l'impatto prognostico favorevole sembra essere limitato alle mutazioni di tipo 1/tipo 1-like.[20, 21]

Mutazioni addizionali

Il panorama mutazionale della MFP è estremamente complesso. Oltre alle mutazioni *driver* sono frequentemente presenti altre mutazioni cosiddette addizionali. Un'analisi condotta prima dell'identificazione delle mutazioni di CALR mediante RT-PCR di JAK2V617F e mediante sequenziamento Sanger di EZH2, TET2 e di regioni critiche di DNMT3A, CBL, ASXL1, IDH1, IDH2, SRSF2 e MPL ha documentato che circa l'80% dei pazienti presenta almeno 1 mutazione nei geni o nelle regioni geniche analizzate, circa il 30% ne presenta almeno 2 e il 6,4% è portatore di 3 o più mutazioni.[22] Mutazioni di ASXL1, SRSF2 e possibilmente EZH2 erano più frequenti nei pazienti con alto rischio IPSS/DIPSS-Plus. La frequenza con cui sono state riscontrate queste mutazioni è di circa il 30% per le mutazioni di ASXL1, del 15% per le mutazioni di SRSF2 e di circa il 5% per le mutazioni di EZH2. La presenza di mutazioni dei tre geni sopra menzionati e di IDH1/IDH2 (meno frequenti) è risultata predittiva di una ridotta sopravvivenza e di un aumentato rischio leucemico. La presenza di mutazioni in uno di questi cinque geni definisce pertanto un alto rischio molecolare (HMR, *high molecular risk*), mentre l'assenza di tali mutazioni costituisce un profilo molecolare a basso rischio (LMR, *low molecular risk*). La sopravvivenza mediana attesa è di 6,75 anni nei pazienti con HMR e di oltre 12 anni nei pazienti LMR; il contributo prognostico di tale caratterizzazione molecolare è indipendente dall'applicazione dell'IPSS o di una stratificazione del rischio citogenetica. Va tuttavia sottolineato che le mutazioni di ASXL1, che sono le più frequenti, sono le uniche, se considerate individualmente, a mantenere un

impatto sulla sopravvivenza in analisi multivariata. Il rischio cumulativo di trasformazione leucemica mediante analisi dei rischi competitivi era superiore nei pazienti con HMR rispetto a quelli con LMR (*hazard ratio* 2,96; 95% CI: 1,85-4,76; P < 0,0001). [22] Considerando che la presenza di un assetto molecolare HMR ha un significato prognostico negativo IPSS-indipendente, circa il 20-25% dei pazienti con IPSS basso o intermedio-1, portatori di mutazioni HMR, va considerato a prognosi meno favorevole di quanto il modello clinico farebbe pensare. Paradossalmente il contributo prognostico dello stato HMR nei pazienti IPSS a rischio più elevato è meno significativo essendo l'attesa di vita stimata mediante IPSS già particolarmente infausta. Alla luce di ciò, secondo le raccomandazioni stilate dal *European LeukemiaNet* (ELN) e dal *European Blood and Marrow Transplantation Group* (EBMT), la presenza di mutazioni di ASXL1 andrebbe considerata nel valutare l'indicazione trapiantologica in pazienti giovani con mielofibrosi a rischio intermedio-1.[15] Oltre alla presenza o assenza di mutazioni cosiddette HMR, anche il loro numero ha un'importanza prognostica. In una coorte di quasi 800 pazienti con MFP circa il 30% presentava un profilo HMR, di cui poco meno di un terzo presentava 2 o più mutazioni HMR. La presenza di 2 o più mutazioni HMR riduceva ulteriormente l'attesa di vita: la sopravvivenza mediana attesa era di 2,6 anni nei pazienti con 2 o più mutazioni HMR; di 7,0 anni nei pazienti con 1 mutazione HMR e di 12,3 anni nei pazienti LMR. Il contributo prognostico del numero di mutazioni HMR è indipendente dall'applicazione dell'IPSS o del DIPSS-Plus. Anche in questo caso un numero elevato di mutazioni HMR è associato ad una ridotta sopravvivenza libera da trasformazione leucemica.[23] Si segnala che l'impatto prognostico negativo del profilo HMR è presente, seppur in parte mitigato, anche in corso di terapia con il farmaco JAK1/2 inibitore ruxolitinib.[24]

Le mutazioni *driver* e quelle addizionali possono coesistere e il loro ruolo prognostico può risultarne modificato. La presenza di mutazioni di CALR sembra mitigare il ruolo prognostico negativo dello stato HMR [23] e in particolare mutazioni di tipo 1/tipo 1-*like* identificano pazienti ASXL1- o SRSF2-mutati e prognosi meno sfavorevole. L'attesa di vita mediana stimata di pazienti co-mutati per ASXL1 o SRSF2 e CALR di tipo 1/tipo 1-like è di 5,8 anni, mentre è di 2,9 anni nei pazienti ASXL1- o SRSF2-mutati e CALR *wild type*. [20]

Modelli prognostici genetico-molecolari

L'acquisizione di informazioni relative all'impatto inter-indipendente di fattori di rischio clinico e genetico-molecolari ha portato allo sviluppo di sistemi prognostici integrati. Tali modelli hanno il vantaggio di permettere una più accurata dissezione prognostica ma si basano su esami attualmente non universalmente disponibili. Sarà pertanto compito della comunità scientifica ematologica nazionale ed internazionale creare delle reti tra vari centri in modo da permettere l'esecuzione di test dall'elevato significato prognostico in maniera capillare, specie ai pazienti più giovani che potrebbero giovarsi di approcci terapeutici intensivi.

Mutation-Enhanced International Prognostic Scoring System 70 (MIPSS70)

Il modello MIPSS70 nella MFP è stato costruito in una coorte multicentrica di poco più di 800 pazienti molecolarmente caratterizzati (mediante tecniche standard per le mutazioni *driver* e mediante *targeted deep sequencing* per le mutazioni costituenti il profilo HMR), di età inferiore o uguale a 70 anni. [25] Informazioni citogenetiche erano presenti in circa il 70% dei pazienti. Il 30-40% dei pazienti presentava un profilo molecolare ad alto rischio. Sono stati identificati i seguenti fattori di rischio indipendenti:

- livelli di emoglobina inferiori a 10 g/dL;
- conta leucocitaria superiore a 25 x 10^9/L;
- valori di piastrine inferiori a 100 x 10^9/L;
- riscontro di elementi blastici nel sangue periferico in misura maggiore o uguale al 2%;
- grado di fibrosi maggiore o uguale a 2;
- presenza di sintomi sistemici;
- assenza di mutazioni di CALR tipo 1/tipo 1-*like*;
- presenza di mutazioni HMR;
- presenza di più di 1 mutazione HMR.

Non è presente l'età trattandosi di un criterio di selezione dei pazienti inclusi nel modello.

I fattori di rischio che contribuiscono in maniera doppia alla definizione del rischio comprendono leucocitosi, trombocitopenia e presenza di più di 1 mutazione HMR (Tabella 3). Il modello prevede la suddivisione dei pazienti in tre categorie prognostiche (distribuzione dei pazienti nella cosiddetta coorte di *training*: 48,6% nella categoria a basso rischio; 40,4% in quella a rischio intermedio e 11,0% in quella a rischio alto) con sopravvivenza mediana stimata di 27,7, 7,1 e 2,3 anni rispettivamente per i pazienti a rischio basso, intermedio e alto (Tabella 4). L'inclusione del dato citogenetico porta a identificare un numero inferiore di fattori di rischio indipendenti (incluso il cariotipo sfavorevole, qui definito come ogni cariotipo anomalo eccetto singole anomalie includenti 20q-, 13q-, +9, traslocazioni/duplicazioni del cromosoma 1, anomalie dei cromosomi sessuali tra cui anche -Y, ed esclusi leucocitosi, piastrinopenia e grado di fibrosi). Tale modello, definito MIPSS70-Plus, suddivide i pazienti in quattro categorie di rischio (basso, intermedio, alto e molto alto) con sopravvivenze mediane stimate che variano da 20 a meno di 2 anni (Tabella 4). Sia il MIPSS70 che il MIPSS70-Plus possono essere estesi a pazienti di più di 70 anni di età e sono in grado di predire la trasformazione leucemica (che avviene nel 23% e nel 17,3% dei pazienti a rischio MIPSS70-Plus rispettivamente molto alto e alto). L'analisi della curva ROC (*Receiver operating characteristic curve*) supporta la superiorità del modello MIPSS70 rispetto all'originale IPSS. In particolare, solo il 54% dei pazienti con alto rischio MIPSS70 apparteneva alla categoria IPSS ad alto rischio. Il 46% dei pazienti ha subito invece un passaggio ad una categoria di rischio superiore, associata ad una prognosi peggiore. Va tuttavia sottolineato che l'IPSS presentava quattro categorie di rischio (a differenza del MIPSS70) e che circa il 70% dei pazienti con MIPSS70 alto veniva categorizzato come avente un rischio IPSS

intermedio-2 o alto, categorie sostanzialmente sovrapponibili ai fini terapeutici. Rimane comunque una quota di pazienti pari a circa il 30% (n = 16) appartenente al gruppo ad alto rischio MIPSS70 (con stima di sopravvivenza mediana di poco più di 2 anni) che veniva invece caratterizzata come avente un rischio IPSS basso o intermedio-1 e che non veniva pertanto inclusa in programmi di terapia più intensiva.

	MIPSS70 (punteggio fattori di rischio)	**MIPSS70-Plus** (punteggio fattori di rischio)	**GIPSS** (punteggio fattori di rischio)
Emoglobina < 10 g/dL	1	1	--
Leucociti > 25 x 10^9/L	2	--	--
Piastrine < 100 x 10^9/L	2	--	--
Blasti s. periferico ≥ 2%	1	1	--
Sintomi costituzionali	1	1	--
Grado di fibrosi ≥ 2	1	--	--
Assenza di mutazioni di CALR tipo 1/tipo 1-*like*	1	2	1
Presenza di mutazioni HMR*	1	1	--
Presenza di più di 1 mutazione HMR	2	2	--
Cariotipo a rischio molto alto**	--	--	2
Cariotipo sfavorevole***	--	3	1
Mutazione ASXL1	--	--	1
Mutazione SRSF2	--	--	1
Mutazione U2AF1Q157	--	--	1

* HMR, *high molecular risk*, ovvero portatore di una mutazione nei geni ASXL1, SRSF2, EZH2, IDH1, IDH2
** Cariotipo a rischio molto alto, ovvero singole o multiple anomalie includenti -7, i(17q), inv(3)/3q21, 12p-/12p11.2, 11q-/11q23 o altre trisomie autosomiche ad eccezione di +8/+9
*** Cariotipo sfavorevole definito diversamente nel MIPSS70 e nel GIPSS:
- Cariotipo sfavorevole MIPSS70-Plus: ogni cariotipo anomalo eccetto singole anomalie includenti 20q-, 13q-, +9, traslocazioni/duplicazioni del cromosoma 1, anomalie dei cromosomi sessuali tra cui anche -Y
- Cariotipo sfavorevole GIPSS: pazienti non a rischio citogenetico molto alto (vedi **) e pazienti non a rischio favorevole (ovvero individui con cariotipo normale o anomalie singole includenti 13q-, +9, 20q-, traslocazioni/duplicazioni del cromosoma 1, anomalie del cromosoma sessuale tra cui -Y)

Tabella 3 *- Variabili incluse nei modelli prognostici MIPSS70, MIPSS70-Plus e GIPSS e relativo punteggio (MFP).*

Genetically Inspired Prognostic Scoring System (GIPSS)

Il modello GIPSS rappresenta un tentativo di definire la prognosi dei pazienti con MFP sulla base esclusivamente di dati citogenetici e molecolari. Il sistema è stato definito utilizzando una coorte di pazienti con MFP caratterizzati da un punto di vista citogenetico e molecolare (studiati per le seguenti mutazioni: JAK2V617F, mutazioni di CALR, MPL, ASXL1, SRSF2, EZH2, IDH1/2 e U2AF1). [26] Da un punto di vista citogenetico i pazienti venivano suddivisi nelle tre categorie prognostiche già citate in precedenza, ovvero la categoria a rischio citogenetico molto alto, a rischio sfavorevole e a rischio favorevole. [11] Nel sistema GIPSS la categoria di rischio citogenetico molto alto contribuisce in maniera doppia alla definizione del rischio, diversamente dagli altri fattori di rischio che includono la presenza di un profilo di rischio citogenetico sfavorevole, la presenza di mutazioni di ASXL1, SRSF2 e della mutazione U2AF1Q157 e l'assenza di mutazioni di CALR tipo 1/tipo 1-*like* (Tabella 3). Il modello prevede la suddivisione dei pazienti in quattro categorie prognostiche con sopravvivenza mediana stimata di 26,4, 8, 4,2 e 2 anni rispettivamente per i pazienti a rischio basso, intermedio-1, intermedio-2 e alto (Tabella 4). Tuttavia, per quanto riguarda i pazienti appartenenti alle categorie di rischio intermedio-1 e -2 (71% dei pazienti), viene suggerita per ora la complementazione con altri modelli prognostici per guidare le decisioni terapeutiche maggiori. Le variabili prognostiche incluse nei modelli sopra citati e le stime di sopravvivenza mediana attesa corrispondenti alle categorie di rischio identificate sono riassunte nelle Tabelle 3 e 4.

Somma dei punteggi delle variabili di rischio	**MIPSS70**	**MIPSS70-Plus**	**GIPSS**
0	27,2	20	26,4
1			8
2	7,1*		4,2
3		6,3	2
4		3,9	
5	2,3		
6			
≥ 7		1,7	--

Rischio basso
Rischio intermedio-1
Rischio intermedio-2
Rischio alto
* Il modello MIPSS70 prevede solo tre categorie di rischio: basso, intermedio e alto

Tabella 4 *- Sopravvivenza mediana stimata (in anni) nei pazienti appartenenti alle differenti categorie di rischio MIPSS70, MIPSS70-Plus, GIPSS (MFP).*

Ruolo prognostico della MFP

La recente revisione della classificazione diagnostica dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, OMS (World Health Organization, WHO), distingue la MFP in fase prefibrotica (pre-MFP) da quella in fase conclamata sulla base prevalentemente dell'istologia midollare. [16] La pre-MFP è caratterizzata da un grado di fibrosi midollare pari a 0 o 1, mentre la fase conclamata della patologia è caratterizzata da una fibrosi midollare pari a 2 o 3. Il significato prognostico negativo di gradi crescenti di fibrosi midollare è riconosciuto da vari anni. [27-29] Da un punto di vista fenotipico e genotipico le due condizioni presentano differenze rilevanti con conseguenze in termini prognostici. I pazienti con MFP in fase conclamata, rispetto a quelli in fase prefibrotica, hanno un'età superiore, sono più spesso anemici, piastrinopenici e leucopenici, presentano più spesso blasti circolanti, sono più frequentemente sintomatici ed hanno più spesso una splenomegalia importante. Tali dati delineano un quadro di malattia più avanzata per quanto riguarda i pazienti con MFP in fase conclamata. Prevedibilmente, visto che diversi parametri differenzialmente presenti nelle due condizioni coincidono con fattori di rischio inclusi nei modelli prognostici, il 74,8% dei pazienti con pre-MFP presenta un rischio IPSS basso o intermedio-1, mentre circa la metà dei pazienti con MFP in fase conclamata appartiene alle categorie di rischio IPSS più alte (rischio intermedio-2 e alto). Oltretutto, i pazienti con MFP in fase conclamata presentano più spesso anomalie citogenetiche rispetto alla controparte in fase prefibrotica (38% vs 18%, p <0,0001) e tali anomalie sono più spesso sfavorevoli nei pazienti con malattia in fase conclamata rispetto a quelli con pre-MFP (12% vs 4%, p = 0,006). Le mutazioni *driver* sono distribuite in maniera simile nelle due condizioni e la quota di pazienti TN è del 10,1% nella pre-MFP e del 13,6% nella MFP in fase conclamata. Al contrario, mutazioni di ASXL1 e SRSF2 sono più spesso presenti nella MFP in fase conclamata, rendendo ragione di una quota maggiore di pazienti con profilo HMR nella fase conclamata di malattia (44,4% nella MFP in fase conclamata *vs* 27,0% nella pre-MFP, p <0,0001). Anche i pazienti con più di una mutazione HMR sono più rappresentati nella coorte di pazienti con MFP in fase conclamata. Il significato prognostico positivo delle mutazioni di CALR di tipo 1 e quello negativo della tripla negatività e del profilo HMR è mantenuto sia nella pre-MFP sia nella fase conclamata. Infine, la propensione a progredire di categoria prognostica (ovvero passare da una determinata categoria prognostica ad una più elevata) è maggiore nei pazienti con MFP in fase conclamata. Le caratteristiche fenotipiche e genotipiche sfavorevoli sopra descritte si traducono in una riduzione della sopravvivenza globale e di quella libera da trasformazione leucemica per i pazienti con MFP in fase conclamata. La sopravvivenza mediana stimata è di 7,2 anni nella MFP in fase conclamata, a fronte di 14,7 anni nella pre-MFP. L'incidenza cumulativa di leucemia a 5 e 10 anni è di 7% e 12% rispettivamente nella pre-MFP, mentre è di 11% e 23% rispettivamente nella MFP in fase conclamata, con un *hazard ratio* di 2,2 per quanto riguarda la sopravvivenza libera da leucemia. [30] Va tuttavia sottolineato che i modelli prognostici precedentemente riportati (IPSS, DIPSS, DIPSS-Plus, MIPSS70, MIPSS70-Plus, GIPSS) sono stati definiti in coorti di pazienti affetti da MFP dalle quali erano esclusi pazienti con grado di fibrosi midollare pari a 0 (che venivano considerati separatamente nella classificazione OMS del 2008). Da ciò consegue che applicare tali modelli a pazienti con MFP in fase prefibrotica diagnosticati secondo la classificazione OMS del 2017 (che include sia pazienti con fibrosi midollare pari a 1 in cui i sistemi prognostici sono stati studiati, sia quelli con fibrosi midollare assente per i quali non è noto se i modelli funzionino) potrebbe essere subottimale. In effetti, uno studio condotto su più di 650 pazienti con MFP ha testato l'efficacia del modello IPSS nell'identificare pazienti a prognosi distinta nella pre-MFP e nella fase conclamata di MFP, documentando la capacità solo parziale del sistema di individuare categorie di rischio distinte nelle due condizioni. Nella pre-MFP, l'outcome dei pazienti identificati come IPSS a rischio intermedio-1 e -2 è sovrapponibile. Viceversa, nella MFP in fase conclamata lo stesso avviene per pazienti appartenenti alle categorie di rischio IPSS intermedio-2 e alto. [30]

Mielofibrosi secondaria

La mielofibrosi può essere primaria oppure secondaria a trombocitemia essenziale (PET MF) o a policitemia vera (PPV MF). La mielofibrosi secondaria (SMF), pur venendo spesso accomunata alla MFP, presenta in realtà delle caratteristiche cliniche e genetico-molecolari distinte. Da un punto di vista fenotipico, i pazienti con MFP sono più spesso trasfusione-dipendenti rispetto a quelli con SMF. I pazienti con PPV MF presentano più frequentemente sintomi sistemici e leucocitosi, mentre la piastrinopenia sembra essere più frequente nella MFP e nella PPV MF. [31] La distribuzione delle mutazioni *driver* nella PET MF sembra essere sovrapponibile a quella nella MFP mentre tutti i pazienti con PPV MF sono JAK2V617F-positivi. I pazienti JAK2V617F-mutati con SMF hanno valori di leucociti più elevati rispetto alla controparte CALR-mutata; anche l'entità della splenomegalia sembra essere superiore nei pazienti JAK2V617F-mutati rispetto a quelli portatori di una mutazione di CALR e rispetto ai casi TN. Ciò sembra sottolineare la trasversalità del fenotipo mieloproliferativo associato alla presenza della mutazione JAK2V617F. Viceversa, non è stato possibile evidenziare un'associazione tra rischio trombotico e genotipo, diversamente da quanto avviene nella MFP, in cui gli individui JAK2V617F-mutati sembrano avere una maggiore incidenza di trombosi. Nella SMF i pazienti CALR-mutati, senza distinzione tra sottotipi, hanno un minor rischio leucemico e una sopravvivenza più lunga rispetto ai pazienti JAK2V617F-positivi; [32] al contrario i pazienti TN con PET MF hanno un'aspettativa di vita ridotta, in maniera simile a quanto avviene nella MFP. [33] Mutazioni addizionali in ASXL1, EZH2, SRSF2, IDH1 o IDH2 (profilo HMR) sono presenti nel 25%-35% dei pazienti. Nella SMF tuttavia l'assetto HMR non è risultato predittivo di un outcome peggiore, con l'eccezione delle mutazioni di SRSF2

nella PET MF, associate ad una riduzione della sopravvivenza. [33] Dati derivanti dal progetto MYSEC (*Myelofibrosis Secondary to PV and ET Collaboration*) dimostrano che nella SMF, analogamente a quanto accade nella MFP, circa un terzo dei pazienti presenta un'alterazione citogenetica. Il 40% e 28% dei pazienti rispettivamente con PPV MF e PET MF presenta un cariotipo anomalo. Pazienti con cariotipo monosomico (pari al 3% nella coorte di pazienti con SMF del progetto MYSEC) e/o complesso (pari al 7% nel MYSEC, *vs* stime del 5-11% nella MFP) hanno un'aspettativa di vita ridotta (sopravvivenza mediana stimata inferiore a 3,5 anni) rispetto a quelli con cariotipo normale (sopravvivenza mediana stimata pari a 10,1 anni) o con alterazioni cromosomiche singole o doppie. I pazienti con cariotipo complesso hanno un rischio leucemico 4 volte superiore rispetto a quello dei restanti pazienti. [34] Tali dati dimostrano la peculiarità della SMF e suggeriscono la necessità di un approccio prognostico e possibilmente terapeutico ad hoc.

Myelofibrosis Secondary to PV and ET Collaboration-Prognostic Model (MYSEC-PM)

Nella pratica clinica e negli studi sperimentali i pazienti con SMF sono stati pressoché invariabilmente trattati allo stesso modo dei pazienti con MFP, sia da un punto di vista prognostico che della conseguente candidabilità a determinate strategie terapeutiche. In Italia, per esempio, la rimborsabilità di ruxolitinib si basa sulla stratificazione prognostica dei pazienti secondo il sistema IPSS, indipendentemente dalla diagnosi di MFP o di SMF. In maniera analoga, le indicazioni trapiantologiche nella SMF si basano su modelli prognostici teoricamente MFP-specifici. Vari studi hanno tuttavia sottolineato i limiti dei modelli (D)IPSS nello stratificare accuratamente la prognosi dei pazienti con SMF. [31, 35, 36] Alla luce di ciò uno sforzo collaborativo internazionale ha portato allo sviluppo di un modello prognostico specifico per la SMF, il MYSEC-*Prognostic Model* o MYSEC-PM. [37] Tale sistema è stato sviluppato analizzando un data base comprendente 781 pazienti con SMF, di cui 397 con PET MF e 384 con PPV MF. La sopravvivenza mediana stimata dei 685 pazienti molecolarmente caratterizzati era di 9,3 anni, senza differenze statisticamente significative tra la PET MF e la PPV MF; il modello prognostico è stato conseguentemente costruito sull'intera popolazione di pazienti con SMF. Le cause di morte erano le seguenti: progressione di malattia non clonale (38%), trasformazione leucemica (33%), neoplasie secondarie (8%), infezioni (8%), scompenso cardiaco (7%), complicanze vascolari (5%), altre cause (1%). Sono stati identificati i seguenti fattori di rischio dal contributo prognostico non omogeneo: livelli di emoglobina inferiori a 11 g/dL; valori di piastrine inferiori a 150 x 10^9/L; riscontro di elementi blastici nel sangue periferico in misura maggiore o uguale al 3%; presenza di sintomi sistemici; assenza di mutazioni di CALR. L'età è stata inclusa come variabile prognostica continua (Tabella 5). Le categorie di rischio identificate vengono definite a basso rischio, a rischio intermedio-1, a rischio intermedio-2 e ad alto rischio e suddividono i pazienti secondo una stima della sopravvivenza mediana attesa, che non è stata raggiunta nei pazienti a basso rischio, mentre è di 9,3, 4,5 e 2 anni rispettivamente per i pazienti appartenenti alle categorie di rischio intermedio-1, intermedio-2 e alto (Tabella 6, calcolatore on-line MYSEC-PM: http://www.mysec-pm.eu/). Nella coorte MYSEC un cariotipo normale si associava ad una sopravvivenza migliore. Il dato citogenetico era tuttavia disponibile solo nel 49% dei pazienti; tale variabile è stata pertanto esclusa dall'analisi. Uno studio successivo ha dimostrato che il cariotipo alterato non è una variabile prognostica indipendente dal MYSEC-PM, diversamente dal cariotipo monosomico. [34] L'efficacia del sistema MYSEC-PM nel discriminare categorie di pazienti con SMF prognosticamente distinte è stata confermata da vari gruppi. [38, 39] Sono attualmente in corso valutazioni del modello MYSEC-PM in vari *setting* clinico-terapeutici in modo da poterlo includere negli algoritmi decisionali.

Le variabili prognostiche incluse nel MYSEC-PM e le stime di sopravvivenza mediana attesa corrispondenti alle categorie di rischio identificate sono riassunte nelle Tabelle 5 e 6.

	MYSEC-PM (punteggio fattori di rischio)
Età alla diagnosi (per anno)	0,15
Sintomi costituzionali	1
Emoglobina < 11 g/dL	2
Piastrine < 150 x 10^9/L	1
Blasti s. periferico ≥ 3%	2
Assenza di mutazioni di CALR	2

***Tabella 5** - Variabili incluse nel modello prognostico MYSEC-PM e relativo punteggio nella SMF.*

Somma dei punteggi delle variabili di rischio	**MYSEC-PM**
<11 (basso rischio)	Non raggiunta
≥ 11 e <14 (rischio intermedio-1)	9,3
≥14 e <16 (rischio intermedio-2)	4,5
≥ 16 (alto rischio)	2

***Tabella 6** - Sopravvivenza mediana stimata (in anni) nei pazienti appartenenti alle differenti categorie di rischio MYSEC-PM nella SMF.*

Conclusioni

La necessità di modelli prognostici specifici ed efficienti è particolarmente evidente in patologie clinicamente e prognosticamente eterogenee come la MFP e la SMF. Nel corso degli anni i sistemi prognostici che si sono succeduti e complementati hanno integrato dati clinici e genetico-molecolari, rispecchiando l'avanzamento delle conoscenze patogenetiche nelle varie fasi evolutive di queste condizioni. Le opzioni di cura nei pazienti con mielofibrosi possono variare da approcci osservazionali a strategie farmacologiche o trapiantologiche. Se nei pazienti non candidabili a trapianto una stratificazione prognostica minuziosa può sembrare eccessiva, va tuttavia ricordato che (i) l'eleggibilità alla procedura trapiantologica è stata estesa, secondo le raccomandazioni ELN-EBMT, sino ai 70 anni di età, e (ii) pur nell'era dei JAK-inibitori (o forse anche grazie all'uso dei JAK-inibitori), si registra un aumento del numero di trapianti eseguiti per MPN dal 2004 in poi. [40] Evidentemente, con il proposito di razionalizzare le scelte terapeutiche e di contenere la spesa sanitaria, si rendono sempre più necessari, oltre ai modelli prognostici, fattori o sistemi predittivi della risposta alle terapie disponibili.

Bibliografia

1. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. Blood. 2009;113(13):2895-901.
2. Tefferi A, Lasho TL, Jimma T, Finke CM, Gangat N, Vaidya R, et al. One thousand patients with primary myelofibrosis: the mayo clinic experience. Mayo Clin Proc. 2012;87(1):25-33.
3. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). Blood. 2010;115(9):1703-8.
4. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Cazzola M, et al. Dynamic International Prognostic Scoring System (DIPSS) predicts progression to acute myeloid leukemia in primary myelofibrosis. Blood. 2010;116(15):2857-8.
5. Scott BL, Gooley TA, Sorror ML, Rezvani AR, Linenberger ML, Grim J, et al. The Dynamic International Prognostic Scoring System for myelofibrosis predicts outcomes after hematopoietic cell transplantation. Blood. 2012;119:2657-64.
6. Kroger N, Giorgino T, Scott BL, Ditschkowski M, Alchalby H, Cervantes F, et al. Impact of allogeneic stem cell transplantation on survival of patients less than 65 years of age with primary myelofibrosis. Blood. 2015;125(21):3347-50.
7. Caramazza D, Begna KH, Gangat N, Vaidya R, Siragusa S, Van Dyke DL, et al. Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients. Leukemia. 2011;25(1):82-8.
8. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. J Clin Oncol. 2011;29(4):392-7.
9. Hussein K, Ketterling RP, Dewald GW, Van Dyke DL, Mesa R, Hanson CA, et al. Peripheral blood cytogenetic studies in myelofibrosis: overall yield and comparison with bone marrow cytogenetic studies. Leuk Res. 2008;32(10):1597-600.
10. Tefferi A, Jimma T, Gangat N, Vaidya R, Begna KH, Hanson CA, et al. Predictors of greater than 80% 2-year mortality in primary myelofibrosis: a Mayo Clinic study of 884 karyotypically annotated patients. Blood. 2011;118(17):4595-8.
11. Tefferi A, Nicolosi M, Mudireddy M, Lasho TL, Gangat N, Begna KH, et al. Revised cytogenetic risk stratification in primary myelofibrosis: analysis based on 1002 informative patients. Leukemia. 2018;32(5):1189-1199.
12. Passamonti F, Maffioli M. The role of JAK2 inhibitors in MPNs 7 years after approval. Blood. 2018;131(22):2426-35.
13. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. N Engl J Med. 2012;366(9):799-807.
14. Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. N Engl J Med. 2012;366(9):787-98.
15. Kroger NM, Deeg JH, Olavarria E, Niederwieser D, Bacigalupo A, Barbui T, et al. Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: a consensus process by an EBMT/ELN international working group. Leukemia. 2015;29(11):2126-33.
16. Passamonti F, Maffioli M. Update from the latest WHO classification of MPNs: a user's manual. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2016;2016(1):534-42.
17. Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O, Patel JP, Brunel JP, Mermel CH, et al. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. Blood. 2014;123(22):e123-33.
18. Rumi E, Pietra D, Pascutto C, Guglielmelli P, Martinez-Trillos A, Casetti I, et al. Clinical effect of driver mutations of JAK2, CALR, or MPL in primary myelofibrosis. Blood. 2014;124(7):1062-9.
19. Lasho TL, Finke CM, Tischer A, Pardanani A, Tefferi A. Mayo CALR mutation type classification guide using alpha helix propensity. Am J Hematol. 2018;93(5):E128-e9.
20. Tefferi A, Nicolosi M, Mudireddy M, Szuber N, Finke CM, Lasho TL, et al. Driver mutations and prognosis in primary myelofibrosis: Mayo-Careggi MPN alliance study of 1,095 patients. Am J Hematol. 2018;93(3):348-55.
21. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Ketterling R, Hanson CH, et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. Leukemia. 2014;28(7):1472-7.
22. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. Leukemia. 2013;27(9):1861-9.
23. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Score J, Mannarelli C, Pancrazzi A, et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. Leukemia. 2014;28(9):1804-10.
24. Guglielmelli P, Biamonte F, Rotunno G, Artusi V, Artuso L, Bernardis I, et al. Impact of mutational status on outcomes in myelofibrosis patients treated with ruxolitinib in the COMFORT-II study. Blood. 2014;123(14):2157-60.
25. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Mudireddy M, Mannarelli C, Nicolosi M, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. J Clin Oncol. 2018;36(4):310-8.
26. Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, Mannelli F, Mudireddy M, Bartalucci N, et al. GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. Leukemia. 2018;32(7):1631-42.

27. Thiele J, Kvasnicka HM. Grade of bone marrow fibrosis is associated with relevant hematological findings-a clinicopathological study on 865 patients with chronic idiopathic myelofibrosis. Ann Hematol. 2006;85(4):226-32.

28. Gianelli U, Vener C, Bossi A, Cortinovis I, Iurlo A, Fracchiolla NS, et al. The European Consensus on grading of bone marrow fibrosis allows a better prognostication of patients with primary myelofibrosis. Mod Pathol. 2012;25(9):1193-202.

29. Guglielmelli P, Vannucchi AM. The prognostic impact of bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis. Am J Hematol. 2016;91(10):E454-5.

30. Guglielmelli P, Pacilli A, Rotunno G, Rumi E, Rosti V, Delaini F, et al. Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis. Blood. 2017;129(24):3227-36.

31. Masarova L, Bose P, Daver N, Pemmaraju N, Newberry KJ, Manshouri T, et al. Patients with post-essential thrombocythemia and post-polycythemia vera differ from patients with primary myelofibrosis. Leuk Res. 2017;59:110-6.

32. Passamonti F, Mora B, Giorgino T, Guglielmelli P, Cazzola M, Maffioli M, et al. Driver mutations' effect in secondary myelofibrosis: an international multicenter study based on 781 patients. Leukemia. 2017;31(4):970-3.

33. Rotunno G, Pacilli A, Artusi V, Rumi E, Maffioli M, Delaini F, et al. Epidemiology and clinical relevance of mutations in postpolycythemia vera and postessential thrombocythemia myelofibrosis: A study on 359 patients of the AGIMM group. Am J Hematol. 2016;91(7):681-6.

34. Mora B, Giorgino T, Guglielmelli P, Rumi E, Maffioli M, Rambaldi A, et al. Value of cytogenetic abnormalities in post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a study of the MYSEC project. Haematologica. 2018. Epub ahead of print.

35. Hernandez-Boluda JC, Pereira A, Gomez M, Boque C, Ferrer-Marin F, Raya JM, et al. The International Prognostic Scoring System does not accurately discriminate different risk categories in patients with post-essential thrombocythemia and post-polycythemia vera myelofibrosis. Haematologica. 2014;99(4):E55-7.

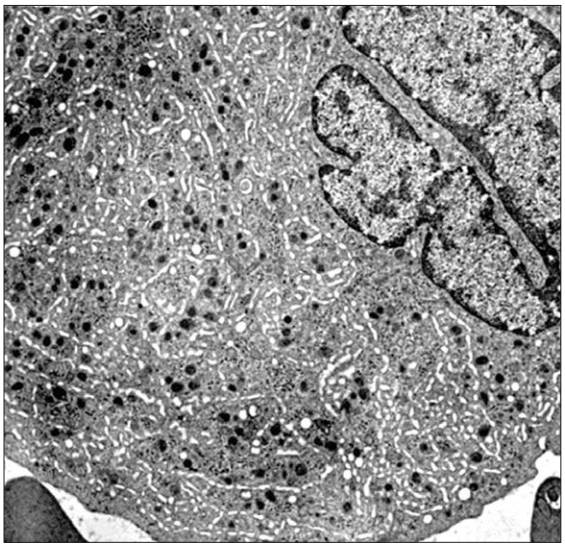
36. Tefferi A, Saeed L, Hanson CA, Ketterling RP, Pardanani A, Gangat N. Application of current prognostic models for primary myelofibrosis in the setting of post-polycythemia vera or post-essential thrombocythemia myelofibrosis. Leukemia. 2017;31(12):2851.

37. Passamonti F, Giorgino T, Mora B, Guglielmelli P, Rumi E, Maffioli M, et al. A clinical-molecular prognostic model to predict survival in patients with post polycythemia vera and post essential thrombocythemia myelofibrosis. Leukemia. 2017;31(12):2726-31.

38. Hernandez-Boluda JC, Pereira A, Correa JG, Alvarez-Larran A, Ferrer-Marin F, Raya JM, et al. Performance of the myelofibrosis secondary to PV and ET-prognostic model (MYSEC-PM) in a series of 262 patients from the Spanish registry of myelofibrosis. Leukemia. 2018;32(2):553-5.

39. Masarova L, Kantarjian H, Verstovsek S. Validation of the Myelofibrosis Secondary to PV and ET-Prognostic Model in Newly Diagnosed Patients with Post-Polycythemia Vera and Post-Essential Thrombocythemia Myelofibrosis: MD Anderson Cancer Center. Clin Lympho, Myeloma Leuk. 2017;17(10):S20-S21.

40. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Basak GW, Bonini C, Duarte R, et al. Is the use of unrelated donor transplantation leveling off in Europe? The 2016 European Society for Blood and Marrow Transplant activity survey report. Bone Marrow Transplant. 2018. Epub ahead of print.



Megacariocita: membrane di demarcazione piastrinica
(Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).

Parole Chiave

Mielofibrosi primaria *vs* secondaria, modelli prognostici clinici, fattori di rischio clinici, fattori di rischio molecolari, modelli prognostici integrati genetico-molecolari.

Indirizzi per la corrispondenza

Margherita Maffioli
S.C. di Ematologia
ASST Sette Laghi - Ospedale di Circolo Varese
V.le L. Borri 57
21100 - Varese (VA)
margherita.maffioli@asst-settelaghi.it

Terapia farmacologica



Francesca Palandri, Giuseppe Auteri e Nicola Vianelli

Istituto di Ematologia "L. e A. Seràgnoli" - Azienda Ospedaliera-Universitaria - Sant'Orsola-Malpighi - Bologna

Introduzione

La mielofibrosi (MF) è una rara neoplasia ematologica con un'incidenza di 0,1-1,0 per 100.000 persone all'anno. Può presentarsi come malattia primaria (MFP) o come evoluzione da trombocitemia essenziale o policitemia Vera (PPV/PET-MF) [1] e generalmente colpisce gli anziani, con un'età media di circa 70 anni alla diagnosi. La MF è caratterizzata da mieloproliferazione clonale con fibrosi reattiva del midollo osseo, emopoiesi extramidollare e abnorme produzione di citochine pro-infiammatorie. Le manifestazioni cliniche comprendono anemia, epato-splenomegalia, sintomi costituzionali (ad es. perdita di peso, sudorazione notturna, febbre), dolori osteo-articolari, prurito, trombosi ed emorragie. [2] Il fenotipo clinico della MF è molto variabile tra i pazienti. Se la splenomegalia ed i sintomi sistemici sono presenti in circa l'80% dei pazienti alla diagnosi, l'anemia è riscontrata in circa il 30-50% dei casi. Tali manifestazioni possono combinarsi in modo variabile tra di loro, e possono associarsi in modo altrettanto variabile con altre manifestazioni clinico-laboratoristiche, come gli eventi trombotici/emorragici, le infezioni, la leucocitosi o la piastrinosi, la pancitopenia, lo sviluppo di neoplasie solide o la progressione in fase leucemica. Pertanto, non è possibile indicare una terapia di prima linea unica. Al contrario, tutte le opzioni terapeutiche devono essere adattate al singolo paziente, in base alle esigenze cliniche, alla prognosi, agli obiettivi di trattamento e allo stato di salute globale.

In questo capitolo discuteremo le opzioni terapeutiche farmacologiche della MF, valutando in primo luogo le necessità terapeutiche dei pazienti (terapia orientata ai problemi clinici) senza dimenticare che l'indicazione terapeutica deve essere stabilita anche in base al rischio della malattia (terapia adattata al rischio) (Figura 1).

Terapia orientata ai problemi clinici

Al di fuori del trapianto di cellule staminali allogeniche (alloSCT), non esiste una terapia medica che possa eradicare la MF. [3-5] Il trattamento viene stabilito sulla base dei bisogni clinici predominanti del paziente, che sono principalmente tre: l'anemia, la splenomegalia e i sintomi sistemici. Tali problematiche cliniche possono coesistere e possono modificarsi nel tempo. È pertanto necessario mettere in ordine di priorità le esigenze cliniche, modificandone l'ordine durante il corso della malattia. È inoltre importante discutere con il paziente che ogni scelta terapeutica, intrapresa nell'intento di migliorare un aspetto clinico, potrebbe avere effetti negativi su altre problematiche, peggiorandone l'andamento.

Anemia

L'anemia (definita come concentrazione di emoglobina inferiore a 10 g/dl in assenza di altre cause) è presente fin dalla diagnosi nel 30-50% dei pazienti. Durante il decorso della malattia, la maggior parte dei pazienti affetti da MF acquisisce e aggrava progressivamente la condizione anemica, che è causata principalmente dal sequestro splenico, da eritropoiesi inefficace legata alla fibrosi midollare, dal rilascio di citochine infiammatorie, da uno stato di emolisi cronica e talvolta da deficit marziale di tipo funzionale. Inoltre, emorragie acute e subacute possono aggravare lo stato anemico. L'anemia è inclusa tra i fattori prognostici predittivi di peggior sopravvivenza in tutti i modelli prognostici ad oggi utilizzati, e può causare una riduzione significativa della qualità della vita del paziente. [6-8]

Un trattamento specifico per l'anemia deve essere preso in considerazione in caso di emoglobina inferiore a 10 g/dl.

L'algoritmo terapeutico dell'anemia include principalmente gli androgeni, l'eritropoietina (EPO) ricombinante e i farmaci immunomodulanti (Figura 2).

Gli androgeni (principalmente ossimetolone e danazolo) sono farmaci generalmente ben tollerati, nonostante possano causare epatotossicità e siano controindicati in soggetti con pregresse patologie tumorali ormono-dipendenti. Sebbene manchino studi clinici prospettici, la percentuale di risposta attesa è di circa il 30%. [9, 10]

La risposta agli agenti stimolanti l'eritropoiesi (ESA) varia dal 30 al 45%, ma il loro uso può promuovere lo sviluppo o il peggioramento della splenomegalia. Pertanto, gli ESA vengono generalmente presi in considerazione in pazienti senza splenomegalia e con bassi livelli di EPO (inferiore a 500 UI). [11-13]

I farmaci immunomodulatori (ImiDs) includono talidomide

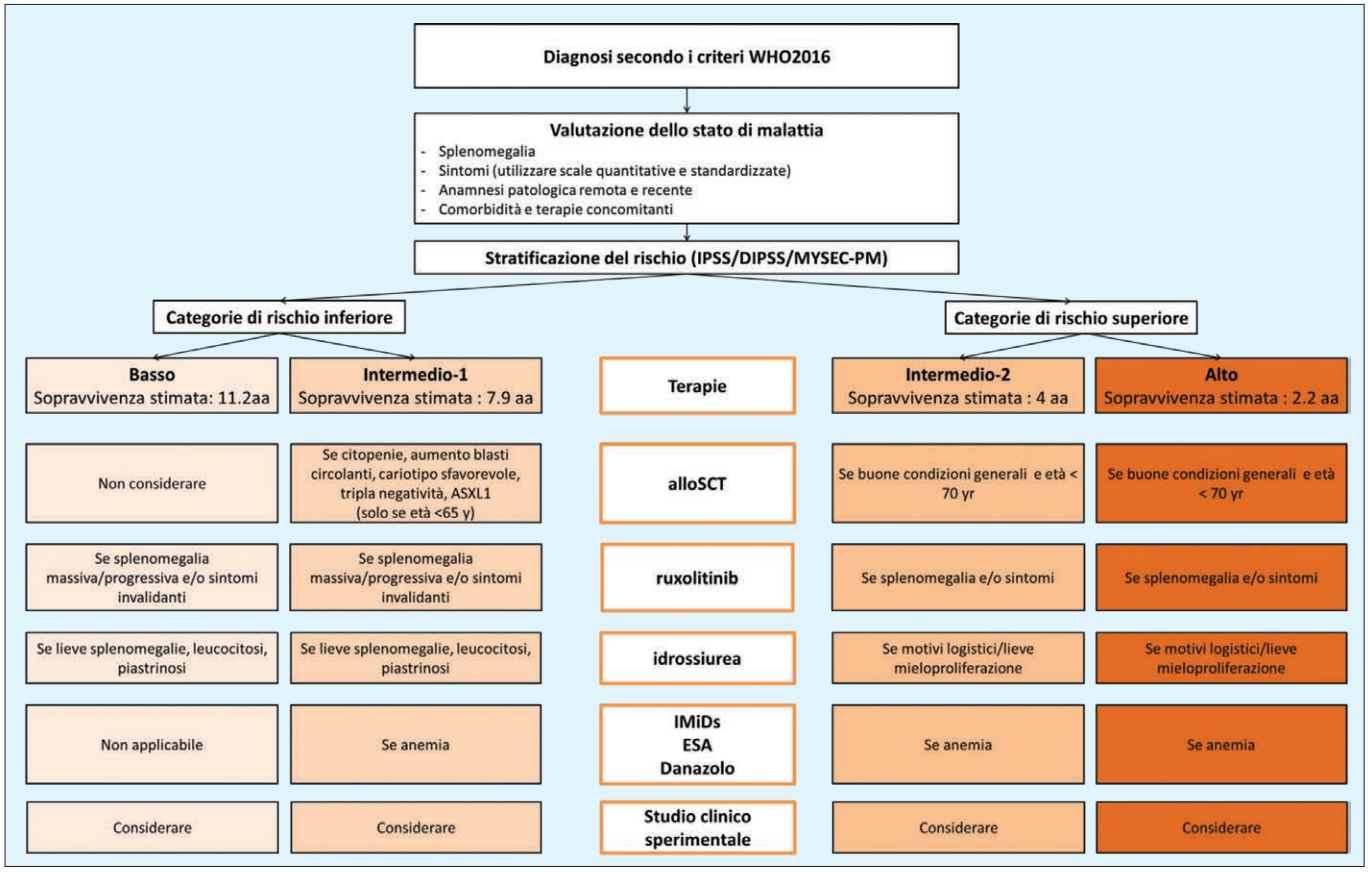


Figura 1 *- Strategie terapeutiche nella mielofibrosi, in base al rischio di malattia e alle necessità cliniche del paziente.*
IPSS: International Prognostic Score System; DIPSS: Dynamic-IPSS; MYSEC-PM: Myelofibrosis Secondary to PV and ET Prognostic Mod. alloSCT: trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche. ImiDs: farmaci immunomodulanti (talidomide, lenalidomide, pomalidomide). ESA: eritropoietina ricombinante.

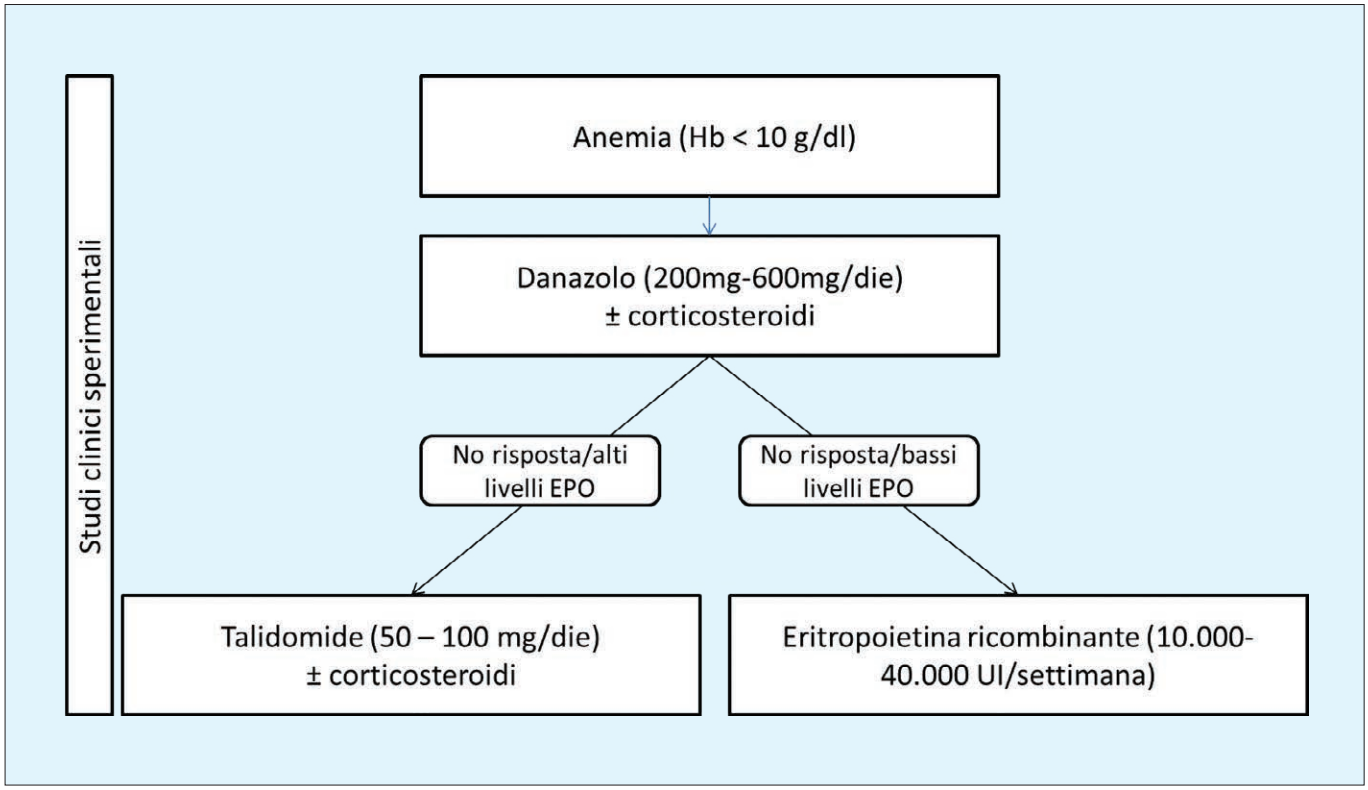


Figura 2 *- Possibile algoritmo terapeutico del paziente con anemia.*

(prima generazione) e lenalidomide/pomalidomide (seconda generazione) [14-17]. La tollerabilità non è eccellente a causa soprattutto della neuropatia periferica; inoltre, questi farmaci aumentano il rischio trombotico. La lenalidomide è stata inoltre associata anche ad una considerevole mielosoppressione. Un recente studio randomizzato di pomalidomide *vs* placebo in pazienti con MF con anemia trasfusione-dipendente, non ha mostrato un vantaggio significativo nel braccio con pomalidomide. [18]
I corticosteroidi da soli possono anche essere usati per la gestione dell'anemia refrattaria, con risposte transitorie.

Splenomegalia e sintomi sistemici

La splenomegalia e i sintomi sistemici sono presenti in oltre l'80% dei pazienti con MF alla diagnosi e sono progressivamente evolutivi. Prima dell'avvento di ruxolitinib, l'idrossiurea (HU) e i corticosteroidi erano rispettivamente la terapia di prima linea per la splenomegalia e i sintomi.
L'idrossiurea è un agente antineoplastico non alchilante che viene comunemente usato nelle neoplasie mieloproliferative per controllare la leucocitosi, la piastrinosi e la splenomegalia. Uno studio retrospettivo su 40 pazienti ha riportato che l'idrossiurea era in grado di ottenere una risposta della splenomegalia (riduzione della dimensione della milza palpabile ≥ 50%) nel 40% dei pazienti. La durata mediana della risposta era di 13,2 mesi (range 3-126,2 mesi). La tossicità ematologica è stata osservata in quasi la metà dei pazienti (45%). [19]
Allo stesso modo, i corticosteroidi possono ottenere un beneficio clinico parziale e transitorio. L'utilizzo di HU e steroidi nella pratica clinica è ora in gran parte superato dagli inibitori di JAK2, in particolare ruxolitinib.
Ruxolitinib ha dimostrato di essere superiore rispetto al placebo e alla terapia standard (prevalentemente HU) nei pazienti con MF a rischio intermedio-2 e alto, nei due studi registrativi di fase 3, COMFORT-I e COMFORT-II [20, 21]. In questi studi, ruxolitinib ha portato a riduzioni rapide e durature della splenomegalia e dei sintomi, con miglioramento della qualità della vita [20-23]. Tra i pazienti originariamente randomizzati a ruxolitinib, il 59,4% (92/155) aveva raggiunto una riduzione del volume della milza almeno del 35% in qualsiasi momento durante lo studio, con una durata mediana di risposta di 168,3 settimane. Complessivamente, circa il 25% dei pazienti mantiene una risposta splenica dopo 3 anni di terapia continuativa con ruxolitinib. Gli eventi avversi più comuni sono l'anemia e la piastrinopenia, attesi a causa del meccanismo d'azione del farmaco. Circa il 30% dei pazienti sviluppa una anemia di grado 3-4, soprattutto durante le prime 12-24 settimane di terapia, con possibile necessità di ricorrere a saltuario supporto trasfusionale e/o riduzioni temporanee delle dosi. Una piastrinopenia severa si osserva invece in circa il 10-15% dei pazienti; come l'anemia, la piastrinopenia è un evento precoce, che richiede aggiustamenti posologici (indicati da scheda tecnica) ed eventuali sospensioni del farmaco. Inoltre, si è osservata un'aumentata incidenza di infezioni gravi e opportunistiche correlate all'utilizzo di ruxolitinib, probabilmente causate da un'azione immunosoppressiva del farmaco. [24-26] Circa il 50% dei pazienti sviluppa, nel corso dei primi 6 mesi di terapia, almeno un evento infettivo, più spesso di tipo batterico a localizzazione polmonare; l'incidenza di tali eventi decresce poi con il tempo. È pertanto raccomandato eseguire uno screening prima della terapia e un monitoraggio infettivologico durante l'assunzione di ruxolitinib. Studi post-hoc più recenti hanno indicato che ruxolitinib è anche associato a un beneficio in termini di sopravvivenza rispetto al placebo o alla terapia standard, [27-30] probabilmente a causa dell'inversione della cachessia e della riduzione delle citochine proinfiammatorie, note per il loro impatto negativo sulla sopravvivenza. Tuttavia, tali dati non sono suffragati da sufficiente evidenza clinica; ruxolitinib pertanto non deve essere prescritto solo con l'intento di prolungare la sopravvivenza.
Infine, la splenectomia è indicata nei pazienti con splenomegalia massiva e associata a dolore addominale, in cui gli inibitori di JAK2 non possano essere utilizzati o si siano già dimostrati inefficaci [2]. La splenectomia ha inoltre una indicazione relativa in previsione di un trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche, al fine di aumentare la probabilità di attecchimento e ridurre quella di ricaduta post-trapianto. [31] La splenectomia è gravata da un tasso di mortalità perioperatoria del 5%-10% e da un tasso di morbilità fino al 40%, prevalentemente correlata a trombosi splancniche post-operatorie. [32]

Terapia basata sul rischio di malattia

Operativamente, i pazienti con MF vengono stratificati in due grandi categorie: 1) rischio più elevato, comprendente i pazienti con rischio alto/intermedio-2, la cui sopravvivenza mediana è inferiore a 5 anni; 2) rischio medio-basso, includente i pazienti a rischio intermedio-1/basso, proiettata verso una sopravvivenza più lunga.
L'unica modalità di trattamento che può potenzialmente curare la MF è il trapianto di cellule staminali allogeniche, che è comunque gravato da un rischio significativo di morbidità e anche mortalità correlato alla procedura (stimabile attorno al 30-50% a seconda della tipologia del paziente, del donatore e dello stato di malattia). La fattibilità del trapianto di cellule staminali allogeniche deve essere valutata in tutti i pazienti di età <70 anni a rischio intermedio-2 o ad alto rischio e in un sottogruppo specifico di pazienti a basso rischio.

Pazienti a rischio intermedio 2/alto non candidabili a trapianto di cellule staminali allogeniche

I pazienti che non possono essere sottoposti a trapianto e che abbiano una probabilità di sopravvivenza inferiore a 5 anni dalla diagnosi, dovrebbero ricevere una terapia che possa essere indirizzata ai loro principali bisogni clinici. In caso di splenomegalia e/o sintomi sistemici, ruxolitinib può essere considerato la prima opzione terapeutica. Tutti i pazienti con MF dovrebbero sempre essere considerati per studi clinici sperimentali.
Diversi trattamenti di combinazione sono attualmente in fase di studio preclinico e di fase 1/2 al fine di aumentare l'efficacia e ridurre la tossicità di ruxolitinib. [33, 34] Sono inoltre in fase di studio inibitori di JAK2 alternativi a ruxolitinib. Tra questi, pacritinib, un

inibitore di JAK2 e FLT3, è il più promettente. [35-37] Negli studi PERSIST, pacritinib ha mostrato superiorità rispetto alla miglior terapia disponibile, includendo ruxolitinib, in termini di riduzioni della splenomegalia e dei sintomi. Momelotinib è un inibitore JAK1/2, con la caratteristica unica di migliorare l'anemia, verosimilmente mediata da una inibizione dell'epcidina; tuttavia, gli studi di fase 3 (SIMPLIFY-1 e -2) non hanno dimostrato la superiorità di momelotinib nell'ottenere risposte sui sintomi sistemici superiori rispetto a ruxolitinib [38, 39]. Inoltre, fedratinib, un inibitore di JAK2 e FLT3, sta riprendendo il suo cammino di sperimentazione terapeutica, dopo una sospensione degli studi clinici a causa della comparsa di tossicità neurologica correlata a deficit di tiamina. Imetelstat è un inibitore della telomerasi che, nello studio di fase 2, ha mostrato di essere in grado di ottenere risposte non solo ematologiche, ma anche molecolari e istologiche [40]; lo studio di fase 3 IMBARK è attualmente in corso. PRM-151, una pentraxina-2 umana ricombinante è anche oggetto di uno studio di fase 2 (PROMOTE). Inibitori di TGF-beta (sotatercept, luspatercept) e induttori dell'apoptosi (LCL161) sono in fase di iniziale valutazione clinica.

Pazienti a rischio basso/intermedio-1

Alla diagnosi, circa il 50% dei pazienti con MF primaria si trova nelle categorie a rischio più basso (basso rischio, 22%, rischio intermedio-1, 29%) secondo lo score IPSS. Quando si utilizza il MYSEC-PM [41] in pazienti con MF secondaria a PV/TE, circa il 60% dei pazienti si trova nelle categorie a basso rischio (basso: 19%, intermedio-1: 40%). Questi pazienti sono proiettati a una sopravvivenza prevista mediana superiore a 5 anni e pertanto non sono candidabili allo SCT.

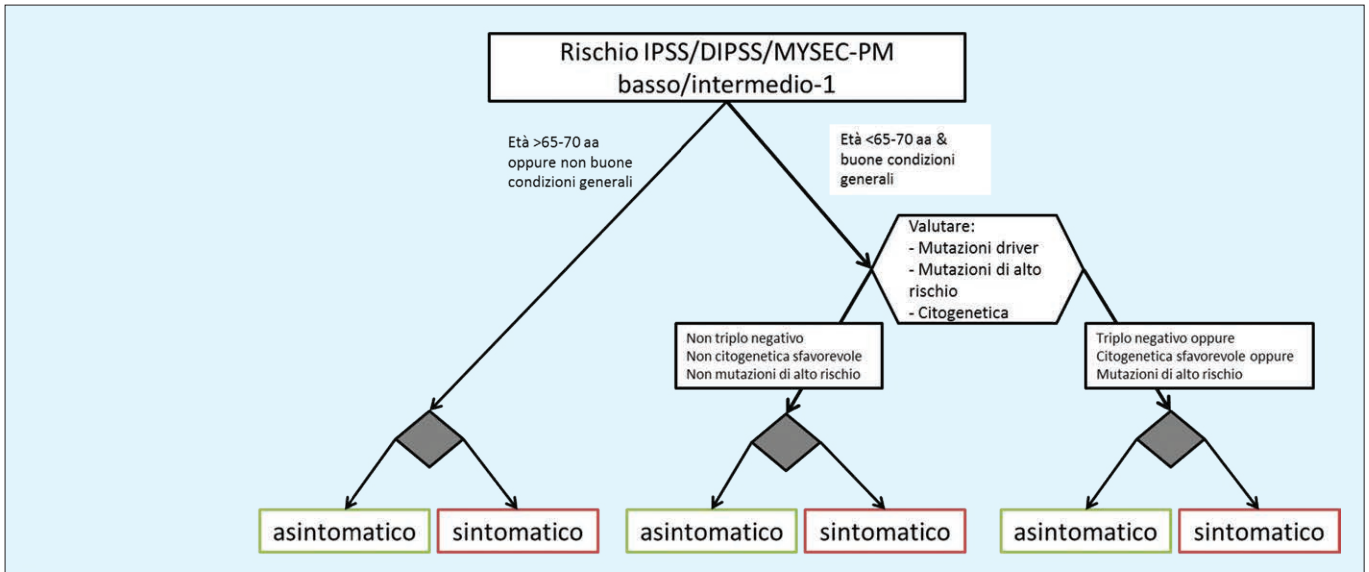
Un vigile monitoraggio, in assenza di terapia specifica, è ancora considerato una opzione ragionevole per i pazienti asintomatici con malattia a rischio basso/intermedio-1. La terapia citoriduttiva potrebbe essere necessaria in presenza di leucocitosi o trombocitosi estreme, per ridurre il rischio trombotico.

Ad oggi, non sono state sviluppate linee guida specifiche per identificare i pazienti con mielofibrosi a rischio basso/intermedio-1, che abbiano una malattia inadeguatamente controllata. Di seguito, descriviamo alcune situazioni speciali che possono identificare i pazienti che necessitano di una terapia personalizzata.

Presenza di mutazioni subclonali

Mutazioni in uno qualsiasi dei cinque geni ad alto rischio (EZH2, ASXL1, IDH1, IDH2 e SRSF2) possono essere rilevate nel 21,1% e 23,4% dei pazienti con MFP a rischio basso e intermedio-1 e sono associate a ridotta sopravvivenza e ad aumento del rischio di trasformazione blastica, rispetto ai pazienti senza mutazioni (basso rischio molecolare; LMR) [42]. Nei pazienti con MF secondaria, solo la mutazione di SRSF2 è stata associata a prognosi peggiore.

Pertanto, i pazienti con IPSS basso o intermedio-1 con mutazioni HMR (nei pazienti con MF secondaria si considera solo la mutazione di SRSF2), richiederebbero idealmente un intervento precoce con trattamenti che prevengano o ritardino la progressione di malattia o la trasformazione leucemica e potenzialmente in grado di migliorare la loro sopravvivenza (Figura 3) [43].



Osservazione	sì	sì	sì
Idrossiurea	sì	sì	sì
Ruxolitinib	sì	sì	sì
Studio clinico	sì	sì	sì
Allo-trapianto		Se progressione	Se intm-1

Figura 3 - Algoritmo terapeutico integrato per i pazienti a rischio basso/intermedio-1.

Carico di malattia

Recentemente, uno studio multicentrico internazionale ha valutato la percezione da parte dei pazienti e dei loro ematologi di riferimento del peso sintomatologico della malattia mieloproliferativa (e della gestione del trattamento), tra cui il carico complessivo della malattia, la qualità della vita, l'impatto sulle attività della vita quotidiana e sulla produttività lavorativa in 813 intervistati con MPN (MF, n = 207). Lo studio ha mostrato che i pazienti con MF a rischio DIPSS basso sono da moderatamente ad altamente sintomatici nel 44% dei casi e che la riduzione della qualità della vita e dell'attività sociale/lavorativa è simile nelle categorie a basso e ad alto rischio. Un aumento del *total symptom score* (TSS) è stato anche significativamente associato con una maggiore dimensione della milza (palpabile a > 10 cm dall'arcata costale: media TSS, 25,2 vs 30,0, p = 0,02; > 15 cm: 25,5 vs 32,9, p = 0,004) [44]. Analogamente, un'indagine online su 699 pazienti con MPN (MF, n = 174), ha mostrato che l'83% dei pazienti con MF lamentava una riduzione della qualità della vita a causa di sintomi correlati alla mielofibrosi e il 41,1% riferiva anche una compromissione generale sul lavoro [45].

Presi insieme, questi studi sottolineano come il carico di malattia può essere grave anche nelle categorie a basso rischio. Non è tuttavia semplice identificare i pazienti la cui entità dei sintomi possa giustificare l'inizio tempestivo di una terapia. È stato osservato come la presenza di almeno un sintomo con uno score superiore a 5/10 utilizzando il TSS possa identificare i pazienti che trarranno maggior beneficio dal trattamento basato sui sintomi. Inoltre, nei pazienti a rischio intermedio-1, ruxolitinib è stato fortemente raccomandato per migliorare i sintomi sistemici, nei pazienti con un punteggio MPN10> 44 e/o una splenomegalia palpabile ad almeno 15 cm sotto il margine costale secondo le linee guida ELN [46, 47]. Tuttavia, la determinazione di un *cut-off* specifico per l'inizio del trattamento dovrebbe essere determinata su base individuale, bilanciando il rapporto rischio-beneficio.

Trattamento precoce: pro e contro

In un'analisi di un sottogruppo di 163 pazienti con MF a rischio IPSS intermedio-1 trattati con ruxolitinib nello studio JUMP (NCT01493414), [48] i dati di efficacia e sicurezza erano paragonabili a quelli osservati nella popolazione totale. Questi dati sono stati confermati dai risultati del trial britannico nel Regno Unito, inclusi 14 pazienti a rischio intermedio-1. In un'analisi retrospettiva su 408 pazienti affetti da MF trattati con ruxolitinib in base agli obblighi di prescrizione in 18 centri italiani di ematologia, i pazienti a rischio intermedio -1 e con una malattia meno avanzata (in particolare: milza palpabile inferiore a 10 cm al di sotto del margine costale, trasfusione-indipendenza, conta piastrinica > $200x10^9$/l) avevano una probabilità significativamente migliore di risposta della splenomegalia. In una sottoanalisi di 70 pazienti a rischio IPSS intermedio-1, il 54,7% e l'80% dei pazienti valutabili ha raggiunto a 6 mesi una risposta rispettivamente sulla splenomegalia e sui sintomi. [49] Questi risultati, sebbene derivati da studi non controllati e non randomizzati, suggeriscono che i pazienti con rischio intermedio-1 sintomatico possono avere significativi benefici clinici dalla terapia con ruxolitinib. Di conseguenza, l'indicazione europea all'uso di ruxolitinib include tutti i pazienti con splenomegalia e/o sintomi correlati a MF, indipendentemente dal rischio di malattia, a differenza dell'indicazione statunitense, che invece applica un modello di trattamento adattato al rischio, includendo solo pazienti a rischio intermedio-alto.

Tuttavia, la possibilità di migliorare la qualità di vita del paziente, riducendo il carico sintomatologico, deve essere bilanciata dalla valutazione della tossicità attesa. Nei principali studi prospettici con ruxolitinib, includenti principalmente pazienti con IPSS intermedio-2/alto, la tossicità ematologica (anemia e trombocitopenia) era il più frequente evento avverso correlato al farmaco. A questo proposito, un'analisi della dinamica dell'emoglobina in pazienti trattati con ruxolitinib negli studi COMFORT-I e COMFORT-II, ha dimostrato che la diminuzione dell'emoglobina con la terapia con ruxolitinib non ha impatto sulla sopravvivenza globale, come invece nel caso dell'anemizzazione dovuta alla malattia [50]. Infatti, in questa analisi, l'introduzione del trattamento con ruxolitinib ha ridotto l'effetto prognostico negativo dell'anemia sulla sopravvivenza globale. Oltre alla tossicità ematologica, nelle prime 24 settimane di terapia sono state osservate infezioni nel 50% dei pazienti che hanno ricevuto ruxolitinib (soprattutto: bronchite, gastroenterite, rinofaringite e infezioni del tratto urinario). Inoltre, eventi atipici e opportunistici sono stati segnalati in alcuni casi clinici. Tali eventi avversi sono attesi nel corso del trattamento con ruxolitinib, dato che i pazienti con MF sono predisposti alle infezioni [51] e dato il possibile impatto del trattamento con inibitore di JAK sulle cellule T, killer naturali e dendritiche [52].

I pazienti trattati nelle prime fasi della MF sono proiettati verso una sopravvivenza più lunga rispetto alle categorie a rischio più elevato e pertanto sono suscettibili di ricevere la terapia con ruxolitinib per un periodo di tempo più lungo. Il rischio di un potenziale aumento del rischio di tossicità a lungo termine dovrebbe pertanto essere preso in considerazione, quando è prevista una somministrazione prolungata del farmaco. Complessivamente, il profilo di sicurezza di ruxolitinib in questi pazienti è stato coerente con quello osservato negli studi COMFORT [20,-21], con anemia e trombocitopenia come eventi avversi più comuni (anche se apparentemente meno frequenti nei pazienti trattati con IPSS intermedio-1 rispetto ai pazienti a rischio intermedio-2/alto). Inoltre, i tassi di eventi avversi non ematologici erano simili a quelli osservati negli studi di fase 3, senza segnalazioni di herpes zoster, epatite B o tubercolosi [53]. Da notare che uno studio retrospettivo italiano ha recentemente identificato, tra i principali fattori di rischio infettivologico, un più alto rischio di malattia e una splenomegalia massiva, entrambi fattori

meno frequentemente presenti nei pazienti a rischio basso/intermedio-1. Un recente studio su 446 pazienti trattati con ruxolitinib nella comune pratica clinica, ha mostrato che 123 pazienti (28%) hanno avuto 161 eventi infettivi (grado 3-4, 32%, fatale, 9%), con un tasso di incidenza di 17 casi per 100 pazienti/anno. Il tasso di infezioni tende a diminuire nel tempo: 68% entro 1 anno, 17% tra 1 e 2 anni, 9% tra 2 e 3 anni, 6% successivamente ($p < 0,0001$). Nell'analisi multivariata, una categoria IPSS più elevata (alta/intermedia-2) e una splenomegalia massiva (>10 cm al di sotto margine costale sinistro) erano associati a un rischio infettivo più elevato. Al contrario, il raggiungimento della risposta della milza ($p = 0,048$) o dei sintomi ($p = 0,0001$) secondo i criteri IWG-MRT/ELN durante la terapia con ruxolitinib erano associati a una minore incidenza di infezioni [54].

Complessivamente, l'incidenza degli eventi avversi era simile, e in alcuni casi inferiore, in entrambi i gruppi di pazienti, suggerendo che l'uso anticipato di ruxolitinib non aumenta la tossicità a breve termine nei pazienti con MF. È comunque importante ricordare che il periodo di osservazione dei pazienti a basso rischio trattati con ruxolitinib è ancora relativamente breve. Ciò è di particolare rilevanza nella valutazione degli eventi che possono essere associati a un'esposizione al trattamento più lunga, come i tumori secondari.

Prospettive future

Nonostante un notevole miglioramento della conoscenza degli aspetti biologici, prognostici e terapeutici nella MF, diverse questioni devono ancora essere affrontate. I modelli di rischio per la sopravvivenza non considerano il carico sintomatologico della malattia, la cui valutazione deve essere standardizzata e deve portare ad identificare quei pazienti che, nonostante il basso rischio, richiedono un trattamento orientato ai sintomi. Mancano strategie per ridurre il rischio di progressione mielofibrotica/leucemica, insieme a un approccio medico con potenziale eradicativo della malattia. In particolare, gli inibitori JAK2 di seconda generazione, gli inibitori JAK2-specifici per la mutazione e l'immunoterapia verso CALR mutata, sono in fase di studio per migliorare la selettività clonale.

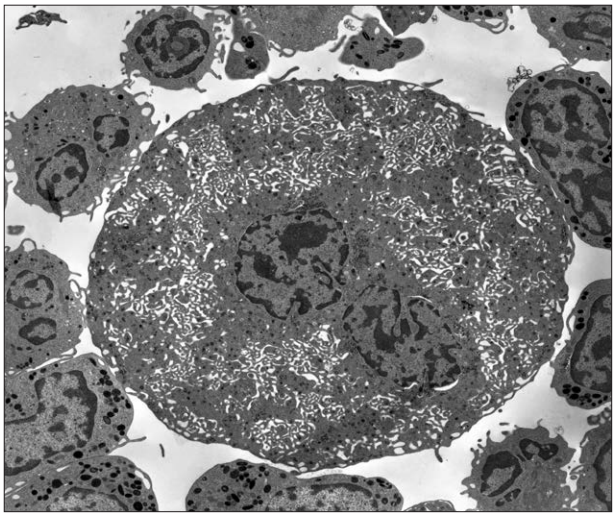
La prognosi e il ruolo delle terapie mirate nelle fasi precoci di malattia devono ancora essere studiati in coorti prospettiche; inoltre, non è ancora chiaro se un trattamento precoce possa migliorare i risultati a lungo termine.

Bibliografia

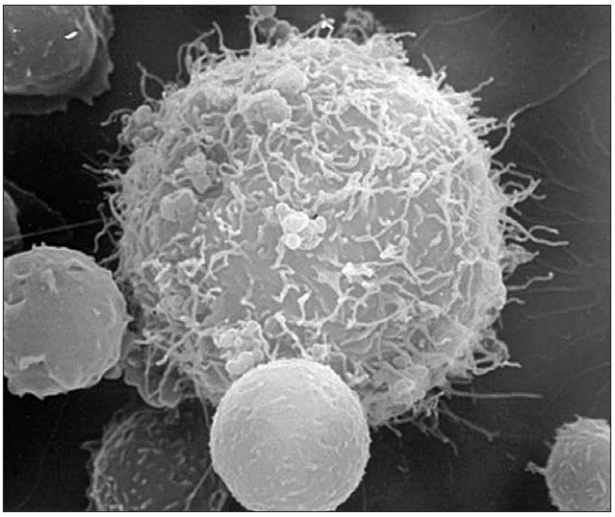
1. Campo E, Swerdlow SH, Harris NL, Pileri S, Stein H, Jaffe ES. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. Blood. 2011;117(19):5019-32.
2. Cervantes F. How I treat myelofibrosis. Blood. 2014;124(17):2635-42.
3. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am J Hematol. 2016;91(12):1262-1271.
4. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. J Clin Oncol. 2011;29(6):761-70.
5. Kroger NM, Deeg JH, Olavarria E, Niederwieser D, Bacigalupo A, Barbui T, et al. Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: a consensus process by an EBMT/ELN international working group. Leukemia. 2015;29(11):2126-33.
6. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. Blood. 2009;113(13):2895-901.
7. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Cazzola M, et al. Dynamic International Prognostic Scoring System (DIPSS) predicts progression to acute myeloid leukemia in primary myelofibrosis. Blood. 2010;116(15):2857-8.
8. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS Plus: A Refined Dynamic International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis That Incorporates Prognostic Information From Karyotype, Platelet Count, and Transfusion Status. J Clin Oncol. 2011;29(4):392-7.
9. Hast R, Engstedt L, Jameson S, Killander A, Lundh B, Reizenstein P, et al. Oxymetholone treatment in myelofibrosis. Blut. 1978;37(1):19-26.
10. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Domingo A, Arellano-Rodrigo E, Montserrat E. Efficacy and tolerability of danazol as a treatment for the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: long-term results in 30 patients. Br J Haematol. 2005;129(6):771-5.
11. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Hernandez-Boluda JC, Sureda A, Torrebadell M, Montserrat E. Erythropoietin treatment of the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: results in 20 patients and review of the literature. Br J Haematol. 2004;127(4):399-403.
12. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Hernandez-Boluda JC, Sureda A, Granell M, Vallansot R, et al. Darbepoetin-alpha for the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia. Br J Haematol. 2006;134(2):184-6.
13. Tsiara SN, Chaidos A, Bourantas LK, Kapsali HD, Bourantas KL. Recombinant human erythropoietin for the treatment of anaemia in patients with chronic idiopathic myelofibrosis. Acta haematologica. 2007;117(3):156-61.
14. Tefferi A, Cortes J, Verstovsek S, Mesa RA, Thomas D, Lasho TL, et al. Lenalidomide therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. Blood. 2006;108(4):1158-64.
15. Barosi G, Elliott M, Canepa L, Ballerini F, Piccaluga PP, Visani G, et al. Thalidomide in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a pooled-analysis of individual patient data from five studies. Leuk Lymphoma. 2002;43(12):2301-7.
16. Tefferi A, Verstovsek S, Barosi G, Passamonti F, Roboz GJ, Gisslinger H, et al. Pomalidomide is active in the treatment of anemia associated with myelofibrosis. J Clin Oncol. 2009;27(27):4563-9.
17. Mesa RA, Pardanani AD, Hussein K, Wu W, Schwager S, Litzow MR, et al. Phase1/-2 study of Pomalidomide in myelofibrosis. Am J Hematol. 2010;85(2):129-30.
18. Tefferi A, Al-Ali HK, Barosi G, Devos T, Gisslinger H, Jiang Q, et al. A randomized study of pomalidomide vs placebo in persons with myeloproliferative neoplasm-associated myelofibrosis and RBC-transfusion dependence. Leukemia. 2017;31(4):896-902.

19. Martinez-Trillos A, Gaya A, Maffioli M, Arellano-Rodrigo E, Calvo X, Diaz-Beya M, et al. Efficacy and tolerability of hydroxyurea in the treatment of the hyperproliferative manifestations of myelofibrosis: results in 40 patients. Ann Hematol. 2010;89(12):1233-7.
20. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. N Engl J Med. 2012;366(9):799-807.
21. Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Waltzman R, Stalbovskaya V, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. N Engl J Med. 2012;366(9):787-98.
22. Mesa RA, Gotlib J, Gupta V, Catalano JV, Deininger MW, Shields AL, et al. Effect of ruxolitinib therapy on myelofibrosis-related symptoms and other patient-reported outcomes in COMFORT-I: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Clin Oncol. 2013;31(10):1285-92.
23. Harrison CN, Mesa RA, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Knoops L, et al. Health-related quality of life and symptoms in patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib versus best available therapy. Br J Haematol. 2013;162(2):229-39.
24. Colomba C, Rubino R, Siracusa L, Lalicata F, Trizzino M, Titone L, et al. Disseminated tuberculosis in a patient treated with a JAK2 selective inhibitor: a case report. BMC Res Notes. 2012;5:552.
25. Wysham NG, Sullivan DR, Allada G. An opportunistic infection associated with ruxolitinib, a novel janus kinase 1,2 inhibitor. Chest. 2013;143(5):1478-9.
26. Lee SC, Feenstra J, Georghiou PR. Pneumocystis jiroveci pneumonitis complicating ruxolitinib therapy. BMJ case reports. 2014;2014.
27. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Levy RS, Gupta V, DiPersio JF, et al. Efficacy, safety, and survival with ruxolitinib in patients with myelofibrosis: results of a median 3-year follow-up of COMFORT-I. Haematologica. 2015;100(4):479-88.
28. Cervantes F, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Sirulnik A, Stalbovskaya V, et al. Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis. Blood. 2013;122(25):4047-53.
29. Vannucchi AM, Kantarjian HM, Kiladjian JJ, Gotlib J, Cervantes F, Mesa RA, et al. A pooled analysis of overall survival in COMFORT-I and COMFORT-II, 2 randomized phase III trials of ruxolitinib for the treatment of myelofibrosis. Haematologica. 2015;100(9):1139-45.
30. Harrison CN, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Knoops L, et al. Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. Leukemia. 2016;30(8):1701-7.
31. Robin M, Zine M, Chevret S, Meignin V, Munoz-Bongrand N, Moatti H, et al. The Impact of Splenectomy in Myelofibrosis Patients before Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2017;23(6):958-64.
32. Santos FP, Tam CS, Kantarjian H, Cortes J, Thomas D, Pollock R, et al. Splenectomy in patients with myeloproliferative neoplasms: efficacy, complications and impact on survival and transformation. Leuk Lymphoma. 2014;55(1):121-7.
33. Gowin K, Kosiorek H, Dueck A, Mascarenhas J, Hoffman R, Reeder C, et al. Multicenter phase 2 study of combination therapy with ruxolitinib and danazol in patients with myelofibrosis. Leuk Res. 2017;60:31-5.
34. Daver N, Cortes J, Newberry K, Jabbour E, Zhou L, Wang X, et al. Ruxolitinib in combination with lenalidomide as therapy for patients with myelofibrosis. Haematologica. 2015;100(8):1058-63.
35. Verstovsek S, Odenike O, Singer JW, Granston T, Al-Fayoumi S, Deeg HJ. Phase 1/2 study of pacritinib, a next generation JAK2/FLT3 inhibitor, in myelofibrosis or other myeloid malignancies. J Hematol Oncol. 2016;9(1):137.
36. Komrokji RS, Seymour JF, Roberts AW, Wadleigh M, To LB, Scherber R, et al. Results of a phase 2 study of pacritinib (SB1518), a JAK2/JAK2(V617F) inhibitor, in patients with myelofibrosis. Blood. 2015;125(17):2649-55.
37. Mesa RA, Vannucchi AM, Mead A, Egyed M, Szoke A, Suvorov A, et al. Pacritinib versus best available therapy for the treatment of myelofibrosis irrespective of baseline cytopenias (PERSIST-1): an international, randomised, phase 3 trial. Lancet Haematol. 2017;4(5):e225-e36.
38. Mesa RA, Kiladjian JJ, Catalano JV, Devos T, Egyed M, Hellmann A, et al. SIMPLIFY-1: A Phase III Randomized Trial of Momelotinib Versus Ruxolitinib in Janus Kinase Inhibitor-Naive Patients With Myelofibrosis. J Clin Oncol. 2017;35(34):3844-50.
39. Harrison CN, Vannucchi AM, Platzbecker U, Cervantes F, Gupta V, Lavie D, et al. Momelotinib versus best available therapy in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib (SIMPLIFY 2): a randomised, open-label, phase 3 trial. Lancet Haematol. 2018;5(2):e73-e81.
40. Tefferi A, Lasho TL, Begna KH, Patnaik MM, Zblewski DL, Finke CM, et al. A Pilot Study of the Telomerase Inhibitor Imetelstat for Myelofibrosis. N Engl J Med. 2015;373(10):908-19.
41. Passamonti F, Giorgino T, Mora B, Guglielmelli P, Rumi E, Maffioli M, et al. A clinical-molecular prognostic model to predict survival in patients with post polycythemia vera and post essential thrombocythemia myelofibrosis. Leukemia. 2017;31(12):2726-31.
42. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. Leukemia. 2013;27(9):1861-9.
43. Rotunno G, Pacilli A, Artusi V, Rumi E, Maffioli M, Delaini F, et al. Epidemiology and clinical relevance of mutations in postpolycythemia vera and postessential thrombocythemia myelofibrosis: A study on 359 patients of the AGIMM group. Am J Hematol. 2016;91(7):681-6.
44. Mesa R, Miller CB, Thyne M, Mangan J, Goldberger S, Fazal S, et al. Myeloproliferative neoplasms (MPNs) have a significant impact on patients' overall health and productivity: the MPN Landmark survey. BMC Cancer. 2016;16:167.
45. Harrison CN, Koschmieder S, Foltz L, Guglielmelli P, Flindt T, Koehler M, et al. The impact of myeloproliferative neoplasms (MPNs) on patient quality of life and productivity: results from the international MPN Landmark survey. Ann Hematol. 2017;96(10):1653-65.
46. Marchetti M, Barosi G, Cervantes F, Birgegard G, Griesshammer M, Harrison C, et al. Which patients with myelofibrosis should receive ruxolitinib therapy? ELN-SIE evidence-based recommendations. Leukemia. 2017;31(4):882-8.
47. Palandri F, Tiribelli M, Benevolo G, Tieghi A, Cavazzini F, Breccia M, et al. Efficacy and safety of ruxolitinib in intermediate-1 IPSS risk myelofibrosis patients: Results from an independent study. Hematol Oncol. 2018;36(1):285-290.
48. Al-Ali HK, Griesshammer M, le Coutre P, Waller CF, Liberati AM, Schafhausen P, et al. Safety and efficacy of ruxolitinib in an open-label, multicenter, single-arm phase 3b expanded-access study in patients with myelofibrosis: a snapshot of 1144 patients in the JUMP trial. Haematologica. 2016;101(9):1065-73.
49. Palandri F, Palumbo GA, Bonifacio M, Tiribelli M, Benevolo G, Martino B, et al. Baseline factors associated with response to ruxolitinib: an independent study on 408 patients with myelofibrosis. Oncotarget. 2017;8(45):79073-86.
50. Al-Ali HK, Stalbovskaya V, Gopalakrishna P, Perez-Ronco J, Foltz L. Impact of ruxolitinib treatment on the hemoglobin dynamics and the negative prognosis of anemia in patients with myelofibrosis. Leuk Lymphoma. 2016;57(10):2464-7.

51. Hultcrantz M, Wilkes SR, Kristinsson SY, Andersson TM, Derolf AR, Eloranta S, et al. Risk and Cause of Death in Patients Diagnosed With Myeloproliferative Neoplasms in Sweden Between 1973 and 2005: A Population-Based Study. J Clin Oncol. 2015;33(20):2288-95.
52. McLornan DP, Khan AA, Harrison CN. Immunological Consequences of JAK Inhibition: Friend or Foe? Curr Hematol Malig Rep. 2015;10(4):370-9.
53. Mead AJ, Milojkovic D, Knapper S, Garg M, Chacko J, Farquharson M, et al. Response to ruxolitinib in patients with intermediate-1-, intermediate-2-, and high-risk myelofibrosis: results of the UK ROBUST Trial. Br J Haematol. 2015;170(1):29-39.
54. Polverelli N, Breccia M, Benevolo G, Martino B, Tieghi A, Latagliata R, et al. Risk factors for infections in myelofibrosis: role of disease status and treatment. A multicenter study of 507 patients. Am J Hematol. 2017;92(1):37-41.



Megacariocita al ME a trasmissione
(Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).



Megacariocita al ME a scansione
(Archivio di G. Lambertenghi Deliliers).

Parole Chiave

Mielofibrosi, terapia, ruxolitinib.

Ringraziamenti

Gli Autori ringraziano tutti i Colleghi dell'Istituto Seràgnoli per il continuo lavoro svolto insieme a favore dei pazienti affetti da malattie ematologiche e BolognAIL per il supporto costante alle attività di ricerca sulle neoplasie mieloproliferative croniche.

Indirizzi per la corrispondenza

Francesca Palandri
Istituto di Ematologia "L. e A. Seràgnoli"
Azienda Ospedaliera-Universitaria
Sant'Orsola-Malpighi
Bologna
Tel: 051 2144569 (studio)
Fax: 051 2144069
Mail: francesca.palandri@unibo.it

Trapianto di cellule staminali



Francesca Patriarca [1,2], Roberta De Marchi [1], Alessandra Sperotto [1]

1) Clinica Ematologica e Unità di Terapie Cellulari , Azienda Sanitaria Universitaria Integrata di Udine
2) Dipartimento di Area Medica, Università di Udine

Introduzione

Sin dalla metà degli anni Novanta dello scorso secolo il trapianto allogenico (TMO) da donatore familiare o da registro era l'unico trattamento in grado di eradicare la mielofibrosi (MF) e di guarire un piccolo gruppo di pazienti affetti da tale patologia, che a quell'epoca poteva essere altrimenti trattata solo con terapie palliative, che non incidevano sulla storia naturale della MF. Infatti, uno studio retrospettivo internazionale di Guardiola *et al.* riportò già nel 1999 che 22/55 pazienti (40%) sottoposti a TMO erano in remissione ematologica persistente con eradicazione della fibrosi nella biopsia ossea, con una mediana di sopravvivenza (OS) di circa 5 anni [1]. Tali risultati clinici sono stati confermati nella ben più numerosa serie di 289 pazienti trapiantati tra il 1989 e il 2002 e raccolta dal *Center for International Bone Marrow Transplant Research* (CIBMTR) [2]. Lo studio riportava che un terzo dei pazienti diventava lungo-sopravvivente ed identificava nei giovani con età inferiore a 40 anni, con anemia o leucocitosi isolata, senza comorbilità e con la disponibilità di un donatore familiare HLA-identico i candidati ad avvantaggiarsi della procedura di TMO, il cui condizionamento consisteva per lo più in un regime mieloablativo convenzionale, basato sul busulfano oppure sulla *total body irradiation* (TBI). Gli studi clinici sul trapianto mieloablativo convenzionale riassunti in Tabella 1 da un lato fanno emergere alcuni limiti peculiari del TMO nella MF, rappresentati da un elevato tasso di mortalità da trapianto (TRM) (27-48%) e di non attecchimento o di perdita dell'attecchimento dopo un iniziale recupero ematologico (*graft failure* primaria o secondaria) (9-18%), dall'altro evidenziano come il trapianto non sia applicabile alla maggior parte dei pazienti con MF, che sono per lo più anziani, con comorbilità e con elevato carico di malattia [2-8]. La platea dei candidati al TMO si amplia quando i regimi di condizionamento a ridotta intensità (RIC) si sostituiscono a quelli convenzionali. L'esperienza pioneristica è quella di Rondelli *et al.* [9] che riporta l'outcome di 21 pazienti trapiantati con

Autore, riferimento bibliografico	Guardiola [1]	Daly [5]	Ditschkowski [6]	Kerbauy [4]	Patriarca [8]	Stewart [7]	Ballen [2]
N. pazienti	55	25	20	104	100	51	289
Età mediana (*range*)	42 (4-53)	48 (46-50)	45 (22-57)	49 (18-70)	49 (21-68)	49 (19-64)	47 (18-73)
Condizionamento	mielo 100%	mielo 100%	mielo 100%	mielo 91%	mielo 49%	mielo 52%	mielo 86%
Donatori Fam/Registro	49/6	15/10	16/4	59/45	82/18	33/18	162/127
Graft failure	9%	9%	nv	10%	12%	0%	18%
TRM	27% (1 aa)	48% (1 aa)	40% (3 aa)	34% (5 aa)	43% (5 aa)	41% mielo 32% RIC (3 aa)	36% (5 aa)
Ricaduta	23% (5 aa)	nv	15% (2 aa)	10% (3 aa)	41% (2 aa)	15% mielo 46% RIC	32% (fam) 23% (registro)
Sopravvivenza	47% (5 aa)	41% (2 aa)	38% (3 aa)	51% (5 aa)	42% (5 aa)	44% mielo 31% RIC (3 aa)	36% (5 aa)

***Tabella 1** - Risultati clinici del trapianto allogenico con condizionamento mieloablativo. (N.: numero; TRM: mortalità da trapianto; mielo: condizionamento mieloablativo; fam: familiare; aa: anni; nv: non valutato; RIC: condizionamento a ridotta intensità).*

condizionamento RIC, di cui 20 hanno dimostrato un recupero ematologico e un chimerismo allogenico completo a favore del donatore, solo 3 sono deceduti per infezione o *graft versus host disease* (GvHD) e 17 rimangono in remissione completa a 3 anni dal trapianto. Questi risultati sono stati in parte ridimensionati dagli studi pubblicati negli anni successivi, che hanno il limite di essere per lo più di tipo retrospettivo [9-16]. Tuttavia, questi studi confermano che il TMO RIC è fattibile, in pazienti fino a 70 anni di età, riportando TRM tra 24 e 54%, *graft failure* tra 5 e 10% e OS del 34-70% a 5 anni (Tabella 2). Di conseguenza, non ci sono evidenze da singoli studi e dai pochi studi comparativi di una superiorità di una procedura sull'altra, ma emerge chiaramente che il trapianto mieloablativo e il trapianto RIC sono applicabili a gruppi di pazienti diversi per età e comorbilità. Sono stati inoltre condotti 3 studi prospettici di trapianto RIC nella MF [17-19], i cui schemi di trattamento sono riassunti nella tabella 3 e i cui risultati clinici saranno discussi nei paragrafi successivi.

Autore, riferimento bibliografico	Rondelli [9]	Merup [12]	Snyder [10]	Bacigalupo [15]	Nagi [16]	Samuelson [13]	Gupta [14]
N. pazienti	21	10	9	46	11	30	233
Età mediana (*range*)	54 (27-68)	40 (5-63)	54 (46-68)	55 (32-68)	51 (46-62)	65 (60-78)	55 (19-79)
Condizionamento	Flu-Bu Thiotepa-Cy Flu-Mel Flu-TBI	Flu-Bu Flu-Cy-Mel	Flu-TBI Flu-Mel	Thiotepa-Cy+/-Mel	Flu-Bu-Alentuzumab	Flu-Bu Flu-Mel Flu-TBI	Flu-Bu Flu-Mel Flu-TBI
Donatore Fam/Registro	19/2	7/3	2/7	32/14	11	15/15	79/154
TRM	9% (1 aa)	29% (4 aa)	44% (3 aa)	24% (1 aa)	54% (2 aa)	30% (1 aa)	24% (5 aa)
Ricaduta	9% (3 aa)	nv	0% (3aa)	19% (3 aa)	0	30% (3 aa)	48% (5aa)
Sopravvivenza	78% (2 aa)	70% (4 aa)	56% (3 aa)	45% (5 aa)	46% (2aa)	45% (3aa)	47% (5aa)

Tabella 2 *- Risultati clinici del trapianto allogenico con condizionamento a ridotta intensità. (N.: numero; TRM: mortalità da trapianto; fam: familiare; aa: anni; nv: non valutato; Bu, busulfano; Cy: ciclofosfamide; Flu: fludarabina; Mel: melphalan; TBI: irradiazione corporea totale).*

Autore, riferimento bibliografico	Kroger [17]	Rondelli [18]	Patriarca [19]
N. pazienti	103	66	60
Età mediana (*range*)	55 (32-68)	54 (28-70)	56 (36-66)
Regime di condizionamento	Flu-Bu-ATG	Flu-Mel +/- ATG	Flu-Bu versus Flu-Thiotepa +/- ATG
Profilassi della GvHD	ATG Fresenius 30 mg/Kg in tutti I trapianti	ATG Thymoglobulin 5 mg/Kg nel caso di donatori da registro	ATG Thymoglobulin 7 mg/Kg nel caso di donatori da registro
Donatore Fam/Registro	33/70	32/34	25/35
TRM	16% (1aa)	22% fam 59% registro (2 aa)	21% (2 aa)
Graft failure	2%	36% registro	8%
Sopravvivenza	67% (5 aa)	75% fam 32% registro (2 aa)	54% (Flu-Bu) 70% (Flu-Thiotepa) (2 aa)

Tabella 3 *- Risultati clinici degli studi prospettici di trapianto allogenico. (N.: numero; TRM: mortalità da trapianto; fam: familiare; aa: anni; Bu: busulfano; Flu: fludarabina; Mel: melphalan; ATG: siero antilinfocitario; GvHD: graft versus host disease).*

Indicazioni

La scelta di procedere al TMO deve bilanciare da un lato la prognosi della MF e l'efficacia delle terapie non trapiantologiche, dall'altro il rischio di mortalità e di morbilità del trapianto (Figura 1). Riguardo alla prognosi, il clinico ha a disposizione negli ultimi anni modelli prognostici sempre più raffinati da applicare non solo alla diagnosi ma anche nel corso dell'evoluzione della malattia, integrando elementi clinici, genetici e molecolari, per predire la storia naturale del singolo paziente. Riguardo alle terapie non trapiantologiche, l'introduzione degli inibitori delle tirosinchinasi JAK1/JAK2 nella terapia della MF ha ridotto in Europa solo temporaneamente il ricorso al TMO [20], che è poi continuato ad aumentare a partire dal 2013, nella convinzione che ruxolitinib è un farmaco potenzialmente efficace per preparare i pazienti al trapianto, ma non ha un effetto eradicante sul clone della MF. Di conseguenza attualmente ruxolitinib non è considerata una terapia alternativa al TMO, ma complementare, in quanto deve essere integrato nella piattaforma del TMO nei pazienti splenomegalici o con sintomi sistemici. Sull'altro piatto della bilancia, è necessario pesare i rischi di mortalità, di *graft failure* e di GvHD severa, che dipendono dall'età del paziente, dalle sue comorbilità, dal tipo del donatore e dalla compatibilità HLA e che saranno trattati nei prossimi paragrafi.

Secondo il consenso di esperti dell'*European Bone Marrow Transplantation* e dell'*European Leukemia Network* (EBMT/EMN) pubblicato nel 2015 [21] e rivisto nel 2018 [22], il TMO è indicato nelle seguenti categorie di pazienti:

- età inferiore a 70 anni e MF con score intermedio-2 o alto secondo IPSS, DIPSS o DIPSS plus;
- pazienti con score intermedio-1, età inferiore a 65 anni e uno dei seguenti elementi clinici di prognosi sfavorevole: anemia trasfusione dipendente, blasti maggiori del 2% nel sangue periferico o comparsa di un'alterazione sfavorevole nel cariotipo.

I pazienti con score MF a basso rischio non devono procedere al trapianto, ma devono essere monitorati clinicamente e valutati per la procedura in caso di progressione. I pazienti che presentano una evoluzione blastica dovrebbero ricevere una chemioterapia antileucemica in grado di ridurre il carico di malattia e solo successivamente procedere al trapianto.

Le indicazioni formulate dagli esperti hanno trovato una loro validazione nello studio retrospettivo di Kröger *et al.* [23], che confronta l'outcome di pazienti di età inferiore ai 65 anni sottoposti a TMO con quello di pazienti trattati con terapia non trapiantologica (escluso ruxolitinib) nelle diverse categorie di rischio DIPSS. Lo studio conferma che una differenza significativa di OS a favore dei pazienti trapiantati compare entro 5 anni dalla procedura nei pazienti con score DIPSS intermedio-2 ed alto, entro 10 anni dal trapianto nei pazienti con DIPSS intermedio-1, mentre per i pazienti a basso rischio la sopravvivenza dei pazienti non trapiantati rimane sempre migliore rispetto a quella dei pazienti che procedono al TMO.

Il rischio molecolare non è stato formalmente considerato nelle raccomandazioni degli esperti del 2015, ma molte evidenze, che si sono accumulate in letteratura negli ultimi anni, indicano che il profilo mutazionale basato su mutazioni *driver* e trasformanti ha un significato prognostico indipendente rispetto al rischio clinico convenzionale. Di conseguenza, il TMO può essere considerato in pazienti che si trovino ancora all'interno della classe di rischio intermedio-1 e che presentino un profilo mutazionale associato a rischio sfavorevole, in particolare i pazienti tripli negativi e quelli con mutazioni di ASXL1, SRSF2 o una combinazione di altre mutazioni, che comprendono EZH2, IDH1/2 e DNMT3A [22-25].

Modelli prognostici

I fattori prognostici che influenzano l'outcome trapiantologico possono dipendere dal paziente, dal donatore o dalla procedura.

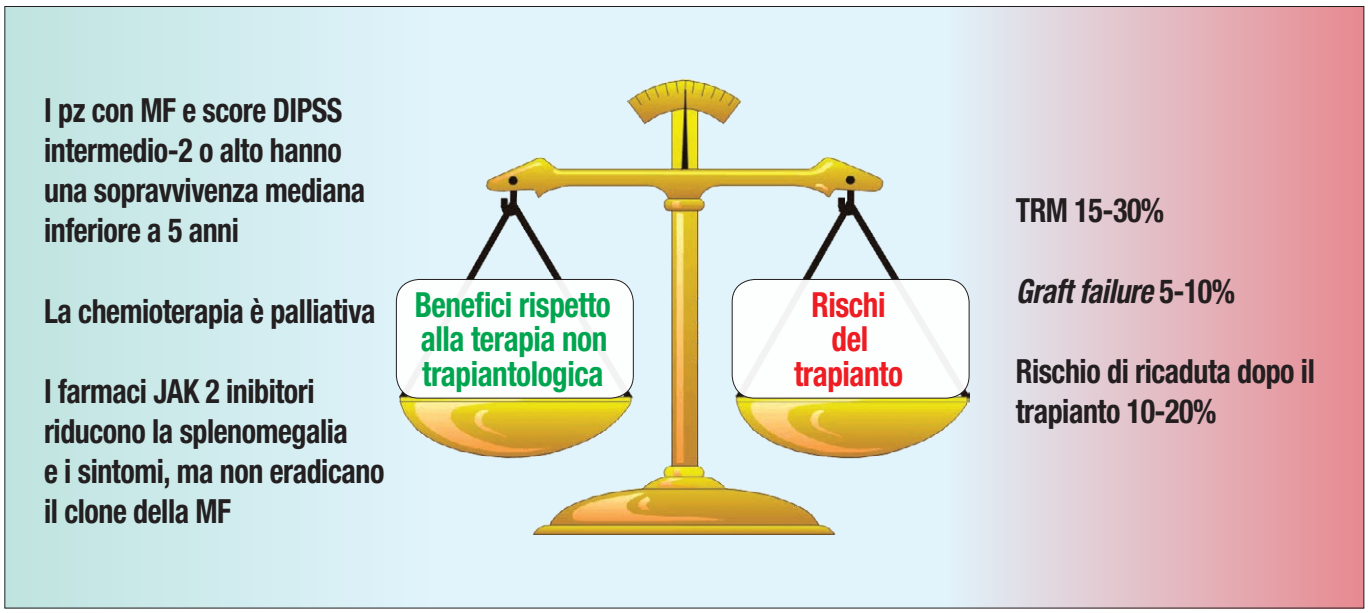


Figura 1 - Valutazione del rapporto rischio/beneficio nel trapianto allogenico (MF: mielofibrosi; DIPSS: Dynamic Prognostic Staging System; TRM: mortalità da trapianto).

Riguardo al paziente e alla sua MF, l'età, la splenomegalia pre-trapianto, lo score della MF e il profilo mutazionale sono stati riconosciuti come fattori in grado di influenzare l'outcome clinico post-trapianto.
Riguardo al donatore, il grado di compatibilità del HLA e il tipo di donatore (familiare o da registro) hanno un impatto significativo sull'outcome in molti studi, modificando in modo particolare la mortalità da trapianto.
Riguardo alla procedura, si rimanda la trattazione al paragrafo riportato di seguito (Scelta del regime di condizionamento e del donatore).

Fattori legati al paziente

Nella casistica più numerosa di trapianto nella MF preceduto in oltre l'80% dei casi da condizionamento mieloablativo e riportata dal CIBMTR, fattori prognostici indipendenti correlati ad una migliore sopravvivenza erano rappresentati da un'età inferiore o uguale a 40 anni e dall'assenza di comorbilità [2]. Nell'ambito del trapianto RIC, anche se è stata riportata la fattibilità del trapianto in casistiche di pazienti con età mediana di 65 anni e con limite superiore di età di 78 anni [13], i pazienti più anziani di 55 anni hanno presentato una sopravvivenza più breve rispetto ai più giovani nello studio prospettico dell'EBMT ed il fattore età ha confermato un valore prognostico indipendente anche in analisi multivariata [17].
L'impatto della splenomegalia pre-trapianto è controverso. La splenomegalia pre-trapianto può teoricamente influire negativamente sull'outcome del trapianto in diversi modi. In primo luogo, può rallentare il recupero ematologico dopo il trapianto o indurre *graft failure*. In secondo luogo, la splenomegalia, pur non contribuendo agli score prognostici della MF, è più frequente nella malattia avanzata e può associarsi ad alterazioni funzionali o vascolari del fegato, aumentando rispettivamente il rischio di ricaduta o di tossicità post-trapianto. Ciurea *et al.* [26] nel 2008 pubblicarono una piccola casistica di 10 pazienti con diametro splenico di almeno 30 cm al momento del trapianto, dimostrando la fattibilità del trapianto RIC senza eventi fatali, anche se i pazienti presentavano un significativo ritardo del recupero dei leucociti e delle piastrine e una lenta riduzione della splenomegalia, che era ancora presente nel 50% dei pazienti dopo oltre 2 anni dal trapianto. Studi successivi su casistiche più numerose sono in genere concordi nell'assegnare un impatto negativo della milza di grandi dimensioni sul trapianto [27-29]. In particolare, Bacigalupo *et al.* [15] individuano 3 fattori indipendenti che influenzano la sopravvivenza dopo il trapianto, che sono rappresentati dalla milza con diametro superiore a 22 cm, un supporto trasfusionale precedente al trapianto con almeno 20 unità di emazie concentrate e un trapianto da donatore da registro. I ricercatori elaborarono uno score altamente predittivo della sopravvivenza a 5 anni post-trapianto variabile dal 77% per i pazienti con score 0-1 al 8% per i pazienti con score 2-3. In particolare, i pazienti con grande splenomegalia avevano un aumento significativo della TRM post-trapianto (41% vs 8%) (Tabella 4). Al contrario, lo stesso gruppo descrisse 28 pazienti splenectomizzati prima del trapianto, riportando complicazioni trombotiche nel 21% dei casi dopo l'intervento chirurgico risolte senza sequele ed un outcome post-trapianto senza significative differenze in termini di ricaduta e di complicanze del trapianto rispetto ai pazienti non splenectomizzati [15].
Lo score della MF e il suo profilo mutazionale non rappresentano solo un'indicazione al trapianto, ma hanno anche un impatto sull'outcome del trapianto. In analogia a quanto è stato dimostrato in tutte le patologie onco-ematologiche, tanto più limitata è la malattia pre-trapianto, tanto migliore è la sopravvivenza. Anche nella MF, uno score di rischio alto è predittivo di una OS significativamente inferiore rispetto ai pazienti con rischio basso o intermedio sia dopo trapianto mieloablativo [2] che dopo trapianto RIC [17]. È chiaro che tale prospettiva di OS nei pazienti ad alto rischio deve essere controbilanciata dal rischio di mortalità legato alla malattia di base. I dati pubblicati in letteratura sull'impatto del profilo mutazionale sull'outcome post-trapianto indicano che il TMO non annulla il significato prognostico sfavorevole di alcune mutazioni trasformanti, come ASXL1 e IDH2 [28-31], mentre è più consolidata la prognosi favorevole dopo il trapianto nei pazienti con mutazione V617F del gene JAK2 [32-33] e con mutazione CALR [30], legata sia ad una ridotta TRM che ad un minor rischio di ricaduta.

Fattori legati al donatore

Il trapianto da donatore da registro ha dimostrato un maggior rischio di tossicità e di TRM nei confronti del trapianto da donatore familiare HLA-identico nella maggior parte degli studi clinici. In alcuni studi l'aumento del rischio era legato alla disparità HLA e quindi limitato solo ai trapianti da donatori con una o più differenze alleliche o antigeniche tra donatore o ricevente (donatori *mismatched*), in altri studi è stato osservato anche dopo trapianti da donatori da registro HLA compatibili (donatori HLA *matched*). Lo studio clinico che ha evidenziato in modo particolare i rischi associati al trapianto da donatore non consanguineo è stato lo studio prospettico di fase 2 dell'*International Myeloproliferative*

Fattori prognostici	Punteggio
Trasfusioni emazie> 20 Unità	1
Dimensioni della milza > 22 cm	1
Donatore alternativo	1

Rischio	Punteggio totale	TRM	Sopravvivenza a 5 anni
Basso	0-1	8%	77%
Alto	2-3	41%	8%

***Tabella 4** - Score di rischio trapiantologico [15] (TRM: mortalità da trapianto).*

Disorder Research Consortium (MDPC), che ha riportato una sopravvivenza a 2 anni del 36% nei trapianti da donatore da registro e una TRM del 59%, in parte legata all'elevato tasso di *graft failure* osservato (35%) e in parte causato da complicazioni infettive ed emorragiche [18]. Per spiegare l'outcome sfavorevole riportato in questa casistica, si è ipotizzato un ruolo del regime di condizionamento basato sull'associazione fludarabina-melphalan e della profilassi immunosoppressiva con dosi intermedie (5 mg/kg) di siero linfocitario thymoglobulin. I ricercatori di Genova, riportando in modo retrospettivo la loro esperienza di trapianto nella MF tra il 2007 e il 2016 [34], hanno osservato nell'ultimo quinquennio una significativa riduzione della TRM dopo trapianto da donatore alternativo, che non si discosta in modo significativo dalla TRM dei trapianti da donatore familiare HLA-identico. Tale miglioramento dell'outcome è stato attribuito al cambiamento della strategia trapiantologica che riguardava sia il regime di condizionamento che il tipo di donatore utilizzato. Infatti, il protocollo di preparazione al trapianto era stato intensificato utilizzando un'associazione di 3 farmaci (fludarabina, thiotepa, busulfano); inoltre, vi era stata una riduzione del ricorso ai donatori da registro *mismatched* e un aumento dei donatori familiari aploidentici, che avevano richiesto l'utilizzo della ciclofosfamide post-trapianto al posto del convenzionale siero antilinfocitario come piattaforma di profilassi della GvHD. Queste osservazioni, che al momento rimangono ipotesi da confermare in uno studio controllato, suggeriscono che la valutazione dell'impatto del donatore sull'outcome del trapianto sia molto complessa e debba essere interpretata all'interno dello specifico contesto trapiantologico, che include un determinato condizionamento e una determinata profilassi immunosoppressiva.

Scelta del regime di condizionamento e del donatore

Per i pazienti giovani, al di sotto dei 40-45 anni e senza comorbilità, che costituiscono la minoranza dei candidati al TMO, può essere indicato il ricorso ad un condizionamento mieloablativo con busulfano (alla dose di 12,8 mg/kg) in associazione a ciclofosfamide o fludarabina. Gli studi clinici della fine degli anni '90 utilizzando busulfano orale sottolineavano la necessità di valutare la concentrazione sierica del farmaco in tempo reale, correggendo eventualmente le dosi di busulfano successive alla prima; tale necessità è stata superata dall'utilizzo del busulfano endovena, che mantiene livelli ematici stabili nella maggior parte dei pazienti.

Nei pazienti al di sopra dei 45 anni oppure più giovani con comorbilità, è indicata la scelta di un regime RIC, anche se non è possibile individuare un condizionamento *golden standard* tra quelli che sono stati utilizzati negli ultimi 10-15 anni negli studi clinici retrospettivi e prospettici. Sono stati condotti 3 trial prospettici nella MF utilizzando una preparazione RIC al trapianto allogenico. Lo studio pubblicato per primo in ordine di tempo e che rimane finora quello con il campione più numeroso (103 pazienti arruolati) e con il migliore outcome riportato è quello dell'EBMT, che utilizza l'associazione di fludarabina con busulfano alla dose di 10 mg/kg per os o 8 mg/kg ev [17]. Lo studio prospettico successivamente pubblicato è quello dell'MDPC, in cui il regime RIC è rappresentato da fludarabina e da melphalan alla dose di 140 mg/m^2 [18]. L'unico studio prospettico comparativo, con il disegno statistico di un trial di fase II randomizzato, è quello condotto dal GITMO [19] e confronta il braccio convenzionale dello studio EBMT busulfano-fludarabina con un braccio sperimentale che consiste nell'associazione di fludarabina e thiotepa. Tra gli studi retrospettivi più recenti che utilizzano regimi RIC uniformi, si deve citare l'esperienza di Genova, con l'associazione di farmaci, che includono fludarabina, thiotepa e busulfano [34]. I pochi confronti disponibili tra i diversi alchilanti inclusi nei condizionamenti, quello retrospettivo di Robin tra busulfano o melphalan [35] o quello prospettivo del GITMO tra busulfano o thiotepa [19], non hanno evidenziato significative differenze nella sopravvivenza dei pazienti dopo il TMO. La Tabella 3, che riassume i protocolli di preparazione al trapianto e gli outcome clinici dei condizionamenti sopracitati, ci permette di fare alcune ulteriori osservazioni. In primo luogo, vi è una differenza nei farmaci utilizzati nella profilassi della GvHD, in termini di indicazioni, dosi e tipo di siero antilinfocitario usato. In secondo luogo, vi è in tutti gli studi un tasso non trascurabile di *graft failure*, che rende necessari in alcuni casi successive infusioni di linfociti del donatore (DLI) o un secondo trapianto. Infine, una mortalità da trapianto molto alta (59%) è stata osservata dopo melphalan e fludarabina e trapianto da donatore da registro, in parte legata al *graft failure*, per cui questo condizionamento non è raccomandabile, almeno in caso di donatore non familiare.

Per quanto riguarda la scelta del donatore, la prima opzione è rappresentata da un familiare HLA compatibile. Nel caso che tale opzione non sia disponibile, è necessario avviare una ricerca di un donatore da registro, con l'obiettivo di selezionare un donatore compatibile ai loci dell'HLA A,B,C,DR e possibilmente DQ (compatibilità 8/8 o 10/10). Alcuni studi ci suggeriscono che il rischio di *graft failure* e/o mortalità da trapianto è significativamente aumentato in caso di trapianti da un donatore con un singolo *mismatch* allelico o antigenico [2, 15,17], per cui se quest'ultimo è l'unico donatore disponibile, il medico trapiantatore e il paziente devono pesare sulla bilancia del rapporto rischio/beneficio del TMO un aumentato rischio di mortalità da trapianto. Dal momento che Bregante *et al.* [34] hanno riportato una netta riduzione della mortalità da trapianto sostituendo il siero antilinfocitario con la ciclofosfamide post-trapianto ed optando per donatori familiari aploidentici a scapito di donatori da registro *mismatched*, si può prendere in considerazione una o entrambe le modifiche del protocollo trapiantologico, nel caso che il paziente abbia un'indicazione irrinunciabile al trapianto e non abbia disponibilità di un donatore familiare e da registro HLA-compatibili. È necessario tuttavia tener conto che tali suggerimenti derivano da un'esperienza monocentrica retrospettiva, anche se è in corso uno studio che utilizza nei trapianti da donatore convenzionale una piattaforma di profilassi della GvHD che comprende la ciclofosfamide post-trapianto [36].

Preparazione al trapianto

In considerazione dell'aumentato rischio di *graft failure* e di TRM correlato alle splenomegalia massiva, è indicato un tentativo di ridurre le dimensione della milza prima del trapianto. La definizione di splenomegalia massiva potrebbe basarsi sullo score trapiantologico di Bacigalupo, che correla una milza con diametro ecografico superiore a 22 cm ad una significativa riduzione di OS [15]. Prima dell'introduzione del ruxolitinib, l'unica opzione nel caso di splenomegalia refrattaria alla terapia medica con idrossiurea o altri alchilanti era la splenectomia, dopo la quale una mortalità post-chirurgica variabile dallo 0 al 10% viene riportata a causa di eventi emorragici e trombotici. Le complicanze post-chirurgiche possono essere minimizzate dal controllo della piastrinosi prima e dopo l'intervento e dalla tecnica chirurgica utilizzata. Il ruolo della splenectomia pre-trapianto è fortemente ridimensionato dopo l'introduzione nell'armamentario terapeutico della MF del ruxolitinib, potenzialmente efficace come *bridge* al trapianto nel trattamento della splenomegalia e dei sintomi sistemici della MF. Considerando il loro meccanismo d'azione e i loro effetti biologici, gli inibitori della via del JAK2 potrebbero integrarsi nella piattaforma del trapianto allogenico in diversi punti, con un teorico impatto favorevole sull'outcome del trapianto, ma anche con possibili conseguenze negative (Figura 2). Innanzitutto, se tali farmaci vengono somministrati nel periodo pre-trapianto, possono incrementare la fattibilità della procedura trapiantologica migliorando il performance status e riducendo la splenomegalia. D'altra parte, i pazienti responsivi al trattamento con i JAK2 inibitori, potrebbero differire o evitare il trapianto, almeno temporaneamente, e potrebbero successivamente essere sottoposti alla procedura in seguito alla perdita della risposta e in presenza di una malattia più avanzata. In secondo luogo, l'associazione dei JAK2 inibitori con il regime di condizionamento potrebbe ridurre le citochine infiammatorie e il rischio di GvHD, ma, allo stesso tempo, potrebbe modificare la dinamica dell'attecchimento. Infine, l'impiego dei JAK2 inibitori dopo il trapianto come consolidamento o mantenimento, potrebbe eradicare la malattia minima residua, ma con un possibile ipotetico impatto sulla ricostituzione linfocitaria.

Al momento attuale le informazioni cliniche più consolidate derivano da alcuni i studi retrospettivi che utilizzano ruxolitinib nella fase pre trapiantologica come *bridge* al trapianto (Tabelle 5 e 6).

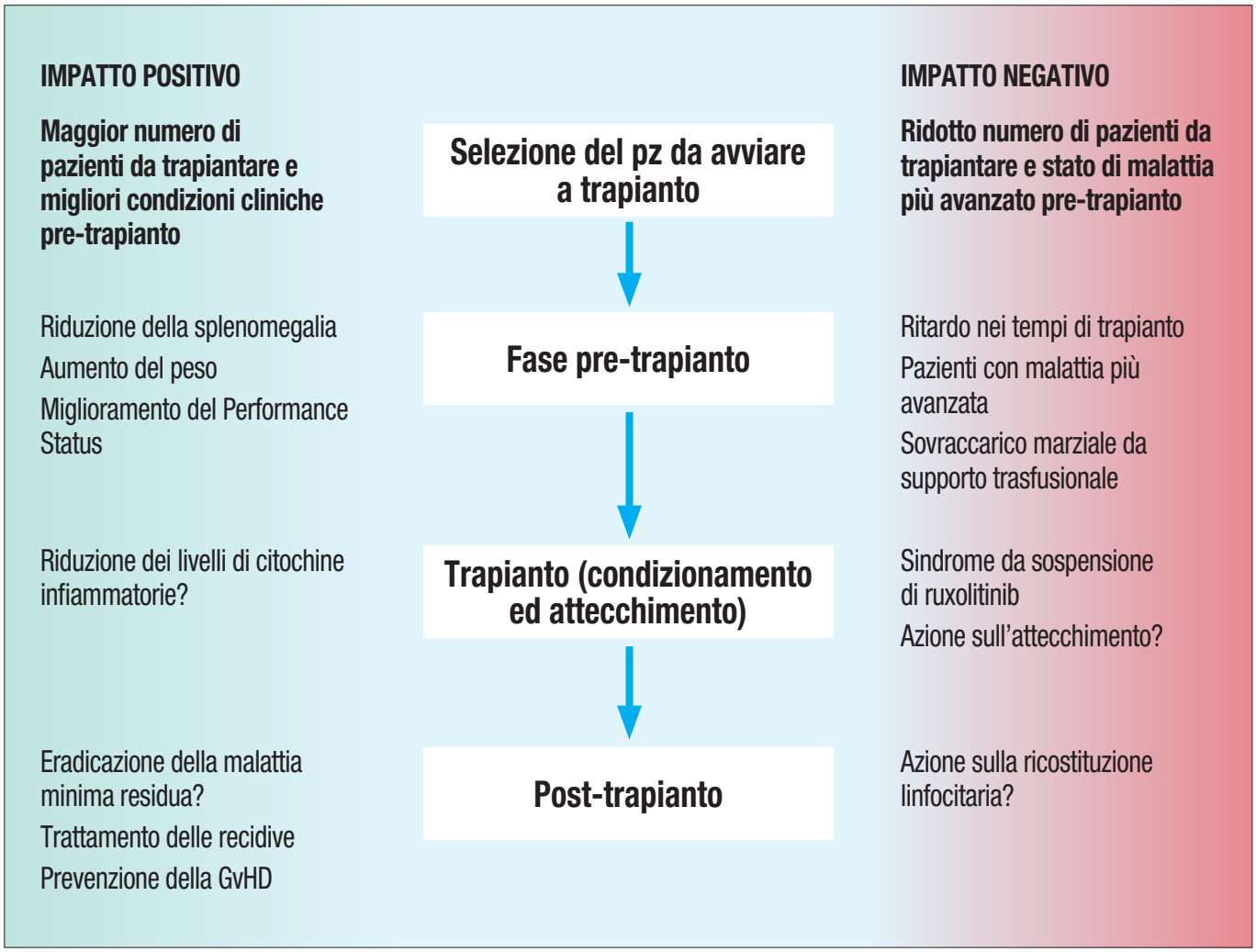


Figura 2 - Impatto potenziale dei farmaci JAK2 inibitori nella piattaforma di trapianto allogenico.

Autore, riferimento bibliografico	Lebon [37]	Stubig [38]	Jaekel [39]	Shanavas [40]
N. pazienti	11	22	14	100
Età mediana (*range*)	54 (44-66)	59 (42-74)	58 (33-68)	59 (32-72)
Indicazioni per ruxolitinib	Splenomegalia (11) Sintomi (8)	Splenomegalia (22) Sintomi (21)	Splenomegalia (14) Sintomi (14)	\
Tempo mediano inizio ruxolitinib - trapianto (giorni)	80	133 (27-324)	175	150
Tempo mediano fine ruxolitinib - trapianto (giorni)	10.5	0 (82% dei pz)	0	30 (30% dei pz)
Dose giornaliera di ruxolitinib	\	10 mg (5) 30 mg (5) 40 mg (12)	15 mg (1) 30 mg (7) 40 mg (6)	\
Risposta al ruxolitinib	Riduzione splenomegalia (8)	Riduzione splenomegalia (16) Riduzione sintomi (19)	Riduzione splenomegalia (7) Riduzione sintomi (10)	Riduzione splenomegalia (23)
Tossicità di grado 3-4	Ematologica (1)	Ematologica (1)	Ematologica (2)	Ematologica (49)

Tabella 5 - Risultati clinici degli studi di trattamento con ruxolitinib seguiti da trapianto allogenico: efficacia e tossicità di ruxolitinib (N.: numero; TRM: mortalità da trapianto; fam: familiare; aa: anni mielo: condizionamento mieloablativo; RIC: condizionamento a ridotta intensità).

Autore, riferimento bibliografico	Lebon [37]	Stubig [38]	Jaekel [39]	Shanavas [40]
N. pazienti	11	22	14	100
Regime di condizionamento	RIC (11)	Busulfano (16) Treosulfano (3) Melphalan (3)	RIC (11) Mielo (3)	RIC (56) Mielo (44)
Sorgente di cellule staminali: sangue periferico	10	21	14	93
Fam/registro	4/7	2/20	3/11	36/64
Attecchimento	11	22	13	96
GvHD acuta Grado 2-4	5	11	6	53
TRM	9%	14%	7% (1 aa)	28% (2 aa)
Sopravvivenza	80%	81% (1 aa)	50% (1 aa)	61% (2 aa)

Tabella 6 - Risultati clinici degli studi di trattamento con ruxolitinib seguiti da trapianto allogenico: efficacia e tossicità del trapianto (N.: numero; TRM: mortalità da trapianto; fam: familiare; aa: anni; mielo: condizionamento mieloablativo; RIC: condizionamento a ridotta intensità).

Un allarme era stato inizialmente lanciato nel 2013 dal gruppo francese, che aveva sospeso precocemente uno studio di fase II che includeva pazienti con splenomegalia o sintomi sistemici, a causa di un eccesso di eventi avversi severi, talora fatali [36]. Queste complicanze, che includevano sindrome da lisi tumorale, shock cardiogeno e sepsi e si manifestavano durante il condizionamento o nelle prime fasi successive alla reinfusione di cellule staminali emopoietiche allogeniche, avevano in parte caratteristiche cliniche simili alla sindrome da sospensione improvvisa di ruxolitinib, legata ad un rapido incremento delle citochine infiammatorie, che può insorgere nei pazienti anche al di fuori del setting trapiantologico. Inoltre, tali effetti collaterali potevano essere evitati riducendo progressivamente il ruxolitinib piuttosto che sospendendolo improvvisamente.
Successivi studi retrospettivi [37-40], infatti, non hanno riportato nessuna tossicità severa dopo lenta riduzione del farmaco e sua sospensione il giorno o nei giorni precedenti l'avvio del condizionamento, evidenziando inoltre che il ruxolitinib ha ridotto la splenomegalia o controllato la sintomatologia nella maggior parte dei pazienti prima del trapianto con occasionali tossicità ematologiche severe, con incidenza di TRM, *graft failure* e GvHD acuta in linea con i dati attesi negli altri pazienti sottoposti a trapianto allogenico per MF.
Il più numeroso studio retrospettivo svolto in diversi centri canadesi e americani [39] ha incluso 100 pazienti trattati con ruxolitinib prima del trapianto e l'outcome del trattamento può essere suddiviso in 5 diversi quadri: miglioramento clinico (23 pz), malattia stabile (31 pz), citopenia o intolleranza (15 pz), splenomegalia progressiva (18 pz) e trasformazione leucemica (13 pz).
In questo studio, i pazienti che avevano ottenuto un miglioramento clinico prima del trapianto avevano una significativa riduzione della TRM e delle ricadute e un significativo aumento dell'OS dopo trapianto. La riposta al JAK2 inibitore, lo score DIPSS e le caratteristiche del donatore si sono dimostrati dei fattori predittivi indipendenti di outcome favorevole.
Gli eventi avversi associati alla sindrome da sospensione di ruxolitinib sono stati significativamente più comuni nei pazienti che hanno iniziato il *tapering* o hanno sospeso il farmaco da più di 6 giorni prima dell'inizio del condizionamento.
Il consenso dell'EBMT/ENL [21] ha proposto alcune linee guida riguardanti l'utilizzo del ruxolitinib nel setting trapiantologico. Gli esperti infatti concordano nel trattamento con ruxolitinib pretrapianto per i pazienti con splenomegalia sintomatica e/o sintomi costituzionali.
La terapia dovrebbe essere iniziata almeno 2 mesi prima del trapianto con raggiungimento della massima dose tollerata. Lo scalo dovrebbe iniziare 5-7 giorni prima del condizionamento con la sospensione il giorno precedente l'avvio, in modo tale da cercare di evitare la sindrome da rebound.
I farmaci JAK2 inibitori riducono la splenomegalia e i sintomi costituzionali, ma non ci sono evidenze che possano agire sulla modulazione del chimerismo e sull'eradicazione della malattia minima residua, per cui non ci sono indicazioni al loro utilizzo post trapianto per la prevenzione della recidiva della MF.
Inoltre, grazie agli effetti biologici di tipo inibitorio sui linfociti T e sulle citochine infiammatorie, ruxolitinib ed altri JAK2 inibitori hanno dimostrato di essere efficaci nella GvHD sperimentale dell'animale [41]. Quindi, ruxolitinib è stato utilizzato in pazienti con GvHD acuta e cronica refrattaria allo steroide, dimostrando una risposta clinica completa o parziale in oltre la metà dei essi [42], che dovrà essere confermata negli studi prospettici controllati attualmente in corso [43].

Monitoraggio post-trapianto

Il follow up del paziente dopo il trapianto ha l'obiettivo di prevenire la GvHD acuta e cronica, le infezioni e la ricaduta.
È raccomandato l'utilizzo del siero antilinfocitario (ATG) nella profilassi della GvHD del trapianto da donatore da registro. Nel caso di un donatore familiare HLA-identico, l'ATG è un'opzione soprattutto nel caso che le cellule staminali reinfuse siano mobilizzate da sangue periferico.
Per quanto riguarda la modulazione della profilassi con inibitori della calcineurina (ciclosporina o tacrolimus), non ci sono raccomandazioni specifiche per la MF, per cui in genere la riduzione progressiva delle dosi avviene dopo 100-120 giorni dal trapianto in assenza di GvHD e la sospensione avviene al giorno + 180, in modo simile a quanto è raccomandato nei pazienti affetti da leucemia acuta. La modulazione della profilassi immunosoppressiva si basa anche sulla valutazione seriata del chimerismo allogenico e della fibrosi midollare. In caso di positività di una o più mutazioni geniche pre-trapianto, è possibile ampliare la valutazione della malattia minima residua (MMR) anche con la valutazione qualitativa o meglio, se disponibile, quantitativa della mutazione.
La valutazione del chimerismo, della fibrosi e della MMR sono raccomandate dopo 30, 100, 180 e 360 giorni dal TMO. La persistenza di un chimerismo misto dopo trapianto RIC non è un'evenienza infrequente ed è un'indicazione a ridurre o sospendere la ciclosporina oppure, nel caso che l'immunosoppressione sia già stata completamente sospesa senza evidenza di GvHD, a somministrare le DLI. Una fibrosi midollare di grado parziale può persistere a lungo nella biopsia ossea post-trapianto, anche anni dopo il TMO, in pazienti che hanno una remissione completa, con emogramma normale e chimerismo allogenico completo. I dati più consistenti sulla valutazione della MMR post trapianto riguardano la valutazione quantitativa della mutazione V617F del gene JAK2 [32-33], del gene MPL [44] e più recentemente delle mutazioni della calreticulina dopo trapianto RIC [45]. La persistenza della mutazione del gene JAK2 a 3 o 6 mesi dopo trapianto è associata ad un aumentato rischio di ricaduta, che può essere efficacemente prevenuto dalla precoce sospensione della ciclosporina oppure dall'infusione delle DLI, nei pazienti che hanno già sospeso la profilassi immunosoppressiva [32-33]. Il gruppo di Kröger ha riportato l'efficacia delle DLI e del secondo TMO in un gruppo di 30 pazienti ricaduti dopo la prima procedura. Ventisei pazienti hanno ricevuto una mediana di 3 DLI con dosi variabili da 1,2 a 40 x 10^6/kg, 10 pazienti (39%) hanno risposto, compresi tutti e

5 i pazienti che avevano presentato una ricaduta molecolare, una GvHD acuta o cronica si è sviluppata nel 12 e nel 36% dei pazienti rispettivamente, senza nessun caso fatale. Nello stesso studio viene descritto l'outcome di 17 pazienti che hanno eseguito un secondo TMO o per una ricaduta della MF dopo il primo TMO già trattata con DLI (13 pazienti) o dopo fallimento del primo TMO per *graft failure* (3 pazienti) o ricaduta della MF accompagnata da evoluzione leucemica (1 paziente). Due dei 17 pazienti sono deceduti per TRM, mentre 12 hanno presentato una risposta prolungata, per cui i ricercatori propongono una strategia di trattamento della ricaduta dopo il primo TMO basata su immunoterapia con DLI, seguita in caso di resistenza, da un secondo TMO [46].

Bibliografia

1. Guardiola P, Anderson JE, Bandini G, Cervantes F, Runde V, Arcese W, et al. Allogeneic stem cell transplantation for agnogenic myeloid metaplasia: a European Group for Blood and Marrow Transplantation, Sociètè Francaise de Greffe de Moelle, Gruppo Italiano per il Trapianto di Midollo Osseo and Fred Hutchinson Cancer Research Center Collaborative Study. Blood. 1999;93(9):2831-2838.
2. Ballen KK, Shrestha S, Sobocinski KA, Zhang MJ, Bashey A, Bolwell BJ, et al. Outcome of transplantation for myelofibrosis. Biol Blood Marrow Transplant. 2010;16(3):358-367.
3. Deeg HJ, Gooley TA, Flowers ME, Sale GE, Slattery JT, Anasetti C, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. Blood 2003;102(2):3912-3918.
4. Kerbauy DM, Gooley TA, Sale GE, Flowers ME, Doney KC, Georges GE, et al. Hematopoietic cell transplantation as curative therapy for idiopathic myelofibrosis, advanced polycythemia vera and essential thrombocythemia. Biol Blood Marrow Transplant. 2007;13(3):355-365.
5. Daly A, Song K, Nevill T, Nantel S, Toze C, Hogge D, et al. Stem cell transplantation for myelofibrosis: a report from two Canadian centers. Bone Marrow Transplant. 2003;32(1):35-40.
6. Ditschkowski M, Beelen DW, Trenschel R, Koldehoff M, Elmaagacli AH. Outcome of allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. Bone Marrow Transplant. 2004,34(12):807-813.
7. Stewart WA, Pearce R, Kirkland KE, Bloor A, Thomson K, Apperley J. The role of allogeneic SCT in primary myelofibrosis: a British Society for Blood and Marrow Transplantation study. Bone Marrow Transplant. 2010;45(11):1587-1593.
8. Patriarca F, Bacigalupo A, Sperotto A, Isola M, Soldano F, Bruno B. et al; on behalf of GITMO. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in myelofibrosis: the 20-year experience of the Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo (GITMO). Haematologica. 2008;93(10):1514-1522.
9. Rondelli D, Barosi G, Bacigalupo A, Prchal JT, Popat U, Alessandrino EP, et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation with reduced-intensity conditioning in intermediate- or high-risk patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. Blood. 2005;105(10):4115-4119.
10. Snyder DS, Palmer J, Stein AS, Pullarkat V, Sahebi F, Cohen S, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation following reduced intensity conditioning for treatment of myelofibrosis. Biol Blood Marrow Transplant. 2006;12(11):1161-1168.
11. Devine SM, Hoffman R, Verma A, Shah R, Bradlow BA, Stock W, et al. Allogeneic blood cell transplantation following reduced-intensity conditioning is effective therapy for older patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. Blood. 2002;99(6):2255-2258.
12. Merup M, Lazarevic V, Nahi H, Andreasson B, Malm C, Nilsson L, et al. Different outcome of allogeneic transplantation in myelofibrosis using conventional or reduced- intensity conditioning regimens. Br J Haematol. 2006;135(3):367-373.
13. Samuelson S, Sandmaier BM, Heslop HE, Popat U, Carrum G, Champlin RE Allogeneic haematopoietic cell transplantation for myelofibrosis in 30 patients 60-78 years of age. Br J Haematol. 2011;153(1):76-82.
14. Gupta V, Malone AK, Hari PN, Ahn KW, Hu ZH, Gale RP, et al. Reduced-intensity hematopoietic cell transplantation for patients with primary myelofibrosis: a cohort analysis from the center for international blood and marrow transplant research. Biol Blood Marrow Transplant. 2014;20(1):89-97.
15. Bacigalupo A, Soraru M, Dominietto A, Pozzi S, Geroldi S, Van Lint MT, et al. Allogeneic hemopoietic SCT for patients with primary myelofibrosis: a predictive transplant score based on transfusion requirement, spleen size and donor type. Bone Marrow Transplant. 2010;45(3):458-463.
16. Nagi W, Lim ZY, Krishnamurthy P, Potter V, Tindell V, Reiff-Zall L, et al. Alemtuzumab based reduced intensity conditioning allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. Leuk Res. 2011;35(8):998-1000.
17. Kröger N, Holler E, Kobbe G, Bornhäuser M, Schwerdtfeger R, Baurmann H, et al. Allogeneic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning in patients with myelofibrosis: a prospective, multicenter study of the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Blood. 2009;114(26):5264-5270.
18. Rondelli D, Goldberg JD, Isola L, Price LS, Shore TB, Boyer M, et al. MPD-RC 101 prospective study of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. Blood. 2014;124(7):1183-1191.
19. Patriarca F, Masciulli A, Bacigalupo A, Pavoni C, Finazzi MC, Bosi A, et al. Final results of a multicenter phase II randomized trial comparing fludarabine-busulfan versus fludarabine-thiotepa as reduced intensity preparative regimen for allogeneic transplantation in patients with myelofibrosis. EBMT meeting 2018.
20. Passweg JR, Baldomero H, Bader P, Bonini C, Cesaro S, Dreger P, et al. Impact of drug development on the use of stem cell transplantation: a report by the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). Bone Marrow Transplant. 2017;52(2):191-196.
21. Kröger N, Deeg JH, Olavarria E, Niederwieser D, Bacigalupo A, Barbui T, et al Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: a consensus process by an EBMT/ELN international working group. Leukemia. 2015;29(11):2126-2133.
22. Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, Passamonti F, Silver RT, Hoffman R, et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. Leukemia. 2018;32(5):1057-1069.
23. Kröger N, Giorgino T, Scott BL, Ditschkowski M, Alchalby H, Cervantes F, et al Impact of allogeneic stem cell transplantation on survival of patients less than 65 years of age with primary myelofibrosis. Blood. 2015;125(21):3347-3350.
24. Palmer R, Mesa R. Transplantation in Myelofibrosis Reaches the Molecular Age. Biol Blood Marrow Transplant. 2017;23(7):1043-1045.
25. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Myeloproliferative Neoplasms Version 2.2018 - September 7, 2017.
26. Ciurea SO, Sadegi B, Wilbur A, Alagiozian-Angelova V, Gaitonde S, Dobogai LC, et al. Effects of extensive splenomegaly in patients with myelofibrosis undergoing a reduced intensity allogeneic stem cell transplantation. Br J Haematol. 2008;141(1):80-3.

27. Alchalby H, Yunus DR, Zabelina T, Ayuk F, Kröger N. Incidence and risk factors of poor graft function after allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis. Bone Marrow Transplant. 2016;51(9):1223-1227.

28. Hart C, Klatt S, Barop J, Müller G, Schelker R, Holler E, et al .Splenic pooling and loss of VCAM-1 causes an engraftment defect in patients with myelofibrosis after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Haematologica. 2016;101(11):1407-1416.

29. Gergis U, Kuriakose E, Shore T, Mayer S, Mark T, Pearse R, et al. Allogeneic transplant for patients with advanced myelofibrosis: splenomegaly and high Serum LDH are Adverse Risk Factors for Successful Engraftment. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2016;16(5):297-303.

30. Christopeit M, Badbaran A, Zabelina T, Zeck G, Fehse B, Ayuk F, et al. Similar outcome of calreticulin type I and calreticulin type II mutations following RIC allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis Bone Marrow Transplant. 2016;51(10):1391-1393.

31. Kröger N, Panagiota V, Badbaran A, Zabelina T, Triviai I, Araujo Cruz MM, et al. Impact of Molecular Genetics on Outcome in Myelofibrosis Patients after Allogeneic Stem Cell Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2017;23(7):1095-1101.

32. Kröger N, Badbaran A, Holler E, Hahn J, Kobbe G, Bornhäuser M, et al. Monitoring of the JAK2-V617F mutation by highly sensitive quantitative real-time PCR after allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. Blood 2007;109(3):1316-1321.

33. Alchalby H, Badbaran A, Zabelina T, Kobbe G, Hahn J, Wolff D, et al. lmpact of JAK2V617F mutation status, allele burden, and clearance after allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis. Blood. 2010;116(18):3572-3581.

34. Bregante S, Dominietto A, Ghiso A, Raiola AM, Gualandi F, Varaldo R, et al. Improved Outcome of Alternative Donor Transplantations in Patients with Myelofibrosis: From Unrelated to Haploidentical Family Donors. Biol Blood Marrow Transplant. 2016;22(2):324-329.

35. Robin M, Porcher R, Wolschke C, Sicre de Fontbrune F, Alchalby H, Christopeit M, et al. Outcome after Transplantation According to Reduced-Intensity Conditioning Regimen in Patients Undergoing Transplantation for Myelofibrosis. Biol Blood Marrow Transplant. 2016; 22(7):1206-1211.

36. Morozova EV, Moiseev IS, Barabanshikova MV, Darskaya EI, Bondarenko SN, Zubarovskaya LS et al. Graft-Versus-Host Disease Prophylaxis with Posttransplantation Cyclophosphamide and Ruxolitinib in Patients with Myelofibrosis Blood. 2017;130(S1):4492;

37. Lebon D, Rubio MT, Legrand F, Kiladjian JJ, Mohty M, Cahn YJ, et al. Ruxolitinib For Patients With Primary Or Secondary Myelofibrosis before Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation (allo-HSCT): A Retrospective Study Of The Société Française De Greffe De Moelle Et De Thérapie Cellulaire (SFGM-TC). Blood. 2013;122(21):2111.

38. Stübig T, Alchalby H, Ditschkowski M, Wolf D, Wulf G, Zabelina T, et al. JAK inhibition with ruxolitinib as pretreatment for allogeneic stem cell transplantation in primary or post-ET/PV myelofibrosis. Leukemia. 2014;28(8):1736-1738.

39. Jaekel N, Behre G, Behning A, Wickenhauser C, Lange T, Niederwieser D, et al. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for myelofibrosis in patients pretreated with the JAK1 and JAK2 inhibitor ruxolitinib. Bone Marrow Transplant. 2014;49(2):179-184.

40. Shanavas M, Popat U, Michaelis LC, Fauble V, McLornan D, Klisovic R, et al. Outcomes of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Patients with Myelofibrosis with Prior Exposure to Janus Kinase 1/2 Inhibitors. Biol Blood Marrow Transplant. 2016;22(3):432-440.

41. Okiyama N, Furumoto Y, Villarroel VA, Linton JT, Tsai WL, Gutermuth J, et al. Reversal of CD8 T-cell-mediated mucocutaneous graft-versus-host-like disease by the JAK inhibitor tofacitinib. J Invest Dermatol. 2014;134(4):992-1000.

42. Zeiser R, Burchert A, Lengerke C, Verbeek M, Maas-Bauer K, Metzelder SK, et al. Ruxolitinib in corticosteroid-refractory graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation: a multicenter survey. Leukemia. 2015;29(10):2062-2068.

43. Jagasia M, Zeiser R, Arbushites M, Delaite P, Gadbaw B, Bubnoff NV. Ruxolitinib for the treatment of patients with steroid-refractory GVHD: an introduction to the REACH trials Immunotherapy. 2018;10(5):391-402.

44. Alchalby H, Badbaran A, Bock O, Fehse B, Bacher U, Zander AR, et al. Screening and monitoring of MPL W515L mutation with real-time PCR in patients with myelofibrosis undergoing allogeneic-SCT. Bone Marrow Transplant. 2010;45(9):1404-7.

45. Mansier O, Migeon M, Saint-Lézer A, James C, Verger E, Robin M, et al. Quantification of the Mutant CALR Allelic Burden by Digital PCR: Application to Minimal Residual Disease Evaluation after Bone Marrow Transplantation. J Mol Diagn. 2016;18(1):68-74.

46. Klyuchnikov E, Holler E, Bornhäuser M, Kobbe G, Nagler A, Shimoni A, et al. Donor lymphocyte infusions and second transplantation as salvage treatment for relapsed myelofibrosis after reduced-intensity allografting. Br J Haematol. 2012;159(2):172-181.

Parole Chiave

Trapianto allogenico, condizionamento a ridotta intensità, *graft failure*, donatore da registro.

Indirizzi per la corrispondenza

Patriarca Francesca
Tel. 0432 559662-9618-9513
Fax 0432 559661
francesca.patriarca@asuiud.sanita.fvg.it

La rivista è consultabile anche sui siti web:

Ematologia oncologica
www.ematologiaoncologica.it

Fondazione Matarelli
www.fondazionematarelli.it

Società Italiana di Ematologia (SIE)
www.siematologia.it

Società Italiana di Ematologia Sperimentale (SIES)
www.siesonline.it

Fondazione Beat Leukemia Dr Alessandro Cevenini
www.beat-leukemia.com

Nel prossimo numero: Anno 5 - Numero 3 - 2018

Controversie nel Mieloma Multiplo

Tecniche di imaging alla diagnosi

Mieloma *smouldering*

Remissione molecolare

Trapianto di cellule staminali

Terapia continuativa

Con il supporto non condizionante di

Celgene