

**DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA, EMATOLOGIA E
PATOLOGIA**

CICLO XXXV

Settore Scientifico Disciplinare: MED/15 Malattie del sangue

*Policitemia Vera: scoperta di saggi di
biopsia liquida finalizzata a identificare i
biomarcatori correlati al rischio trombotico*

Presentata dal Dott. Giuseppe Auteri

Coordinatrice Dottorato
Prof.ssa Manuela Ferracin

Relatore Chiar.mo
Prof. Michele Cavo

Correlatrice
Dott.ssa Francesca Palandri

Esame finale anno 2023

SOMMARIO

1. ABSTRACT	4
2. LA POLICITEMIA VERA	5
2.1 Definizione ed epidemiologia della PV	6
2.2 Patogenesi	7
2.2.1 Patogenesi della malattia trombotica nelle MPN	11
2.3 Manifestazioni Cliniche	15
2.4 Diagnosi	20
2.5 Stratificazione del rischio trombotico	21
2.6 Terapia	22
2.6.1 Idrossiurea	25
2.6.2 Ropoginterferon Alfa-2b	26
2.6.3 Ruxolitinib.....	27
2.7 Criteri dirisposta alla terapia e definizione di resistenza e intolleranza all'idrossiurea.	28
3. LE MICROVESCICOLE	32
4. IL MICROBIOTA	36
4.1 Microbiota e sistema immunitario ed emopoietico	38
4.2 Microbiota e trombosi	39
5. LO STUDIO CLINICO	43
5.1 RAZIONALE DELLO STUDIO	43
5.2 Metodi	44
5.2.1 Pazienti e Design dello Studio.....	44
5.2.2 Raccolta di sangue periferico e piastrine e preparazione del plasma povero di piastrine	44
5.2.3 Identificazione e caratterizzazione delle vescicole extracellulari (EVs) circolanti mediante citometria a flusso	45
5.2.4 Isolamento delle EVs circolanti, enumerazione, morfologia, fenotipo e caratterizzazione	46
5.2.5 Estrazione di DNA microbico da feci e dalle EV isolate	47
5.2.6 Amplificazione del gene 16S rRNA e sequenziamento	47
5.2.7 Bioinformatica e biostatistica	48
5.3 Risultati	49
5.3.1 Caratteristiche generali	49
5.3.2 <i>Caratterizzazione delle EVs di origine piastrinica (PLT-EV), megacariocitaria (MK-EV), e contenenti lipopolisaccaride (LPS-EV)</i>	49
5.3.3 <i>Caratterizzazione del DNA microbico interno alle EVs</i>	54
5.3.4 <i>Caratterizzazione del microbioma fecale</i>	55
5.3.5 <i>Le EVs circolanti di pazienti con PV sono portatrici di un fenotipo distintivo legato alla trombosi/fibrosi</i>	56
5.3.6 <i>Le EV isolate di pazienti affetti da PV mostrano una signature di trombosi associata a LPS</i>	58
5.3.7 <i>Le EVs isolate da pazienti affetti da PV presentano caratteristiche di DNA microbico associate a trombosi e fibrosi midollare.</i>	59
5.3.8 <i>Il microbioma intestinale non differisce tra i pazienti con o senza trombosi o fibrosi midollare.</i>	61
5.4 DISCUSSIONE	62
5.5 CONCLUSIONI	65
6. Bibliografia	66

1. ABSTRACT

La Policitemia Vera (PV) è una neoplasia mieloproliferativa con un aumentato rischio di trombosi e di progressione verso la Mielofibrosi. L'infiammazione cronica è comunemente osservata nelle neoplasie mieloproliferative, compresa la PV. La rete infiammatoria, tra le varie componenti, comprende le vescicole extracellulari (EVs), che svolgono un ruolo nella comunicazione cellula-cellula. Inoltre, le componenti microbiche circolanti sono state recentemente indicate come potenziali modificatori dell'infiammazione, della coagulazione e dell'emopoiesi in generale.

Per comprendere il ruolo delle EVs nella PV, abbiamo studiato il fenotipo e il carico di DNA microbico delle EVs circolanti attraverso un'analisi multidimensionale.

Il sangue periferico e le feci sono stati raccolti da pazienti con PV (n=38) e da donatori sani (n=30). Le EVs circolanti derivate da megacariociti (MK) e piastrine (PLT) sono state analizzate mediante citometria a flusso. Dopo l'estrazione del DNA microbico dalle feci e dalle EV isolate, è stata sequenziata la regione V3-V4 del 16S rDNA.

Abbiamo riscontrato che la percentuale di EVs circolanti derivate da MK era significativamente ridotta nei pazienti con PV rispetto ai donatori sani. Al contrario, la proporzione di EVs derivate dalla PLT era aumentata. È interessante notare che la PV è stata associata anche a una firma del DNA microbico delle EVs isolate con una maggiore diversità e una composizione microbica distinta rispetto alla controparte sana. Nei pazienti con PV è stata dimostrata una maggiore proporzione di EVs isolate associate al lipopolisaccaride. Al contrario, il profilo del microbioma intestinale non ha identificato una disposizione distinta tra pazienti con PV e donatori sani.

In seconda istanza, l'aumento della proporzione di EVs derivate dai MK e la riduzione della proporzione di EVs di origine piastrinica identificavano i pazienti con storia di trombosi. È interessante notare che le EVs dei pazienti con storia di trombosi erano impoverite di DNA di *Staphylococcus* ma arricchite di DNA di *Actinobacteria* e *Anaerococcus*. Inoltre, i pazienti con storia di trombosi avevano anche livelli più bassi di EVs associate al lipopolisaccaride.

Per quanto riguarda la fibrosi, oltre a una maggiore proporzione di PE-EV, le EVs dei pazienti con fibrosi midollare erano arricchite in DNA di *Collinsella* e *Flavobacterium*.

In conclusione, la PV è associata a EVs circolanti che presentano un fenotipo anomalo e una firma di disbiosi con un ruolo potenziale nella patogenesi della malattia. Inoltre, abbiamo identificato una firma ospite/microbica EVs specifica per la PV, associata alla storia di trombosi e alla fibrosi midollare.

Questi dati possono contribuire a perfezionare la prognosi della PV e a identificare nuovi bersagli farmacologici.

2. LA POLICITEMIA VERA

Recentemente, è stata formulata la nuova classificazione delle patologie mieloidi. Nel novero delle patologie mieloidi è possibile trovare le neoplasie mieloproliferative croniche (MPN) (tabella 1).

Neoplasie Mieloproliferative croniche
Leucemia Mieloide Cronica
Policitemia Vera
Trombocitemia Essenziale
Mielofibrosi Primaria Mielofibrosi prefibrotica Mielofibrosi <i>overt</i>
Leucemia Neutrofilica Cronica
Leucemia eosinofila cronica, non altrimenti specificata
MPN, non classificabile

Tabella 1. La classificazione delle MPN(1).

Le MPN sono delle patologie onco-ematologiche caratterizzate dall'espansione clonale di una cellula staminale di tipo mieloide.

Le MPN BCR-ABL negative più comuni, sono la Trombocitemia Essenziale (TE), la Policitemia Vera (PV) e la Mielofibrosi (MF). Queste patologie hanno in comune l'eziopatogenesi e alcune manifestazioni cliniche, come ad esempio l'aumentato rischio trombotico o la possibilità di evolvere in una Leucemia Acuta Mieloide (LAM).

La TE è caratterizzata dall'aumentata produzione piastrinica (>450.000/mmc). Il rischio trombotico, in questi pazienti è attorno 1% pazienti-anno al mentre nella popolazione generale è approssimativamente fino a 0.66% pazienti-anno.

Le manifestazioni cliniche della TE sono da riferire soprattutto alla piastrinosi e i conseguenti disturbi del microcircolo (cefalea, parestesia, acufeni, scotomi scintillanti). Raramente può essere presente splenomegalia.

La MF è caratterizzata dall'aumentata fibrosi midollare, dalla splenomegalia e dalla produzione di citochine infiammatorie che contribuiscono alle manifestazioni cliniche della patologia.

La clinica dei pazienti con MF è estremamente varia e si può caratterizzare da sintomi relati alla

splenomegalia (sazietà precoce, discomfort addominale, dolore costale), alle citopenie (astenia, necessità di supporto trasfusionale, infezioni), alla tempesta citochinica (sudorazione notturna, febbre serotina, calo ponderale).

Tra le tre patologie suddette, la PV è quella gravata dal più alto rischio trombotico (fino a 10% pazienti-anno).

Le manifestazioni cliniche includono i disturbi del microcircolo, della splenomegalia e del prurito.

Nella pratica clinica, il rischio trombotico dei pazienti affetti da PV viene definito alto dalla presenza di una storia pregressa di trombosi e/o da un'età superiore a 60 anni. La presenza di almeno uno di questi elementi pone l'indicazione a intensificare il trattamento citoriduttivo.

Con questa metodologia di definizione del rischio trombotico, non si hanno a disposizione degli elementi che proteggano il paziente nell'evitare di incorrere in un evento trombotico. Pertanto, è necessario individuare delle caratteristiche biologiche che permettano di definire meglio il paziente affetto da PV che ha, a priori, un rischio trombotico maggiore.

2.1 Definizione ed epidemiologia della PV

La PV è caratterizzata da un aumento assoluto della massa di globuli rossi ed è talvolta caratterizzata anche da leucocitosi, trombocitosi e splenomegalia. La PV è associata ad un'incrementata proliferazione di elementi eritroidi, mieloidi e megacariocitari nel midollo osseo. Vaquez fu il primo a descrivere questa entità clinica nel 1892, descrivendone gli aspetti clinici caratteristici(2).

Il programma Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER), nel 2000, ha inserito le MPN nell'elenco delle neoplasie. Nel 2001 l'incidenza delle MPN era di 1,6 casi per 100.000 persone all'anno. Tra le MPN, la PV era la più frequente con 0,8 casi per 100.000 persone all'anno; la TE e la MF mostravano stime di incidenza di 0,5 e 0,3 casi per 100.000 persone all'anno, rispettivamente(3).

La scoperta della mutazione del gene JAK2 ha determinato un miglioramento delle capacità diagnostiche di tali patologie, portandone a un aumento dell'incidenza. Nel 2016, secondo il SEER, l'incidenza delle MPN era di 2,7 casi per 100.000 abitanti all'anno(4).

L'incidenza delle MPN aumenta con l'età. L'età mediana alla diagnosi di PV, ET ed MF è di 61-65, 54-73 e 65-76 anni, rispettivamente, sulle casistiche statunitensi, europee o australiane. Le MPN sono più frequenti nel sesso maschile, con un rapporto di incidenza M/F di circa 1.4 nella PV (3,5-8).

Sebbene fino a venti anni fa l'aspettativa di vita dei pazienti con PV o ET era riferita sovrapponibile a quella della popolazione generale(6,9), con il miglioramento della definizione diagnostica di questi pazienti è stata documentata una più breve aspettativa di vita.

La sopravvivenza mediana dei pazienti negli Stati Uniti, in Europa e in Australia dopo una diagnosi di PV è stimata tra i 12 e i 14 anni(3,10).

2.2 Patogenesi

Nel 1951 William Dameshek descrisse le MPN come patologie caratterizzate da una sovrapproduzione di cellule ematiche mature tra cui elementi eritroidi, granulocitari e megacariocitari in risposta a un fattore mielostimolante sconosciuto(11).

Nel 2005 quattro gruppi di ricerca individuarono, in maniera indipendente, il ruolo centrale della mutazione V617F dell'esone 14 del gene JAK2 nella patogenesi delle MPN(12-15).

Questa mutazione può essere trovata in circa il 70% delle MPN: 95% dei pazienti con PV e dal 50% al 60% dei pazienti con TE e PMF. Le mutazioni dei geni CALR e MPL sono presenti nella maggior parte dei pazienti con TE e PMF JAK2^{V617F} negativi(16,17). I pazienti "triplo negativi" sono una parte di quelli affetti da TE e PMF(18).

La mutazione JAK2^{V617F} insorge in un progenitore ematopoietico multipotente, ed è presente in tutte le linee mieloidi. Può essere riscontrata anche nelle cellule linfoidi, principalmente nelle cellule B e NK, nelle cellule endoteliali della milza e delle vene splancniche di pazienti con MF e/o trombosi splancnica(19).

Il burden allelico della mutazione nei granulociti è estremamente vario. Tuttavia, è tendenzialmente basso nella ET e più alto nella PV per approssimarsi al 100% nelle MF secondarie(20).

I pazienti con PV non portatori della mutazione V617F di JAK2 sono rari, e nella maggior parte di questi sono identificabili delle mutazioni nell'esone 12 di JAK2. Le mutazioni più frequenti sono

N542-E543del (30%), K539L (14%), E543-D544del (12%), e F537- K539delinsL (10%)(21).

JAK2 è una tirosin chinasi citoplasmatica necessaria per la trasduzione del segnale dei recettori delle citochine emopoietiche. Il recettore dell'eritropoietina (EPOR), il recettore della trombopoietina (MPL) e il recettore del fattore stimolante le colonie dei granulociti (G-CSFR) regolano rispettivamente l'eritropoiesi, la trombopoiesi e la granulopoiesi. Tali recettori mancano di attività chinasi intrinseca e quindi dipendono dall'attività tirosin-chinasi di JAK2(22). Normalmente, l'interazione del recettore delle citochine emopoietiche con i suoi ligandi (eritropoietina, trombopoietina o G-CSF) esita in dimerizzazione recettoriale seguita da autofosforilazione e transfosforilazione del recettore e di JAK2. Il complesso JAK2-recettore attivato recluta e fosforila le molecole substrato, comprese le proteine STAT, favorendo infine la trascrizione dei geni bersaglio nel nucleo(23)(figura 1).

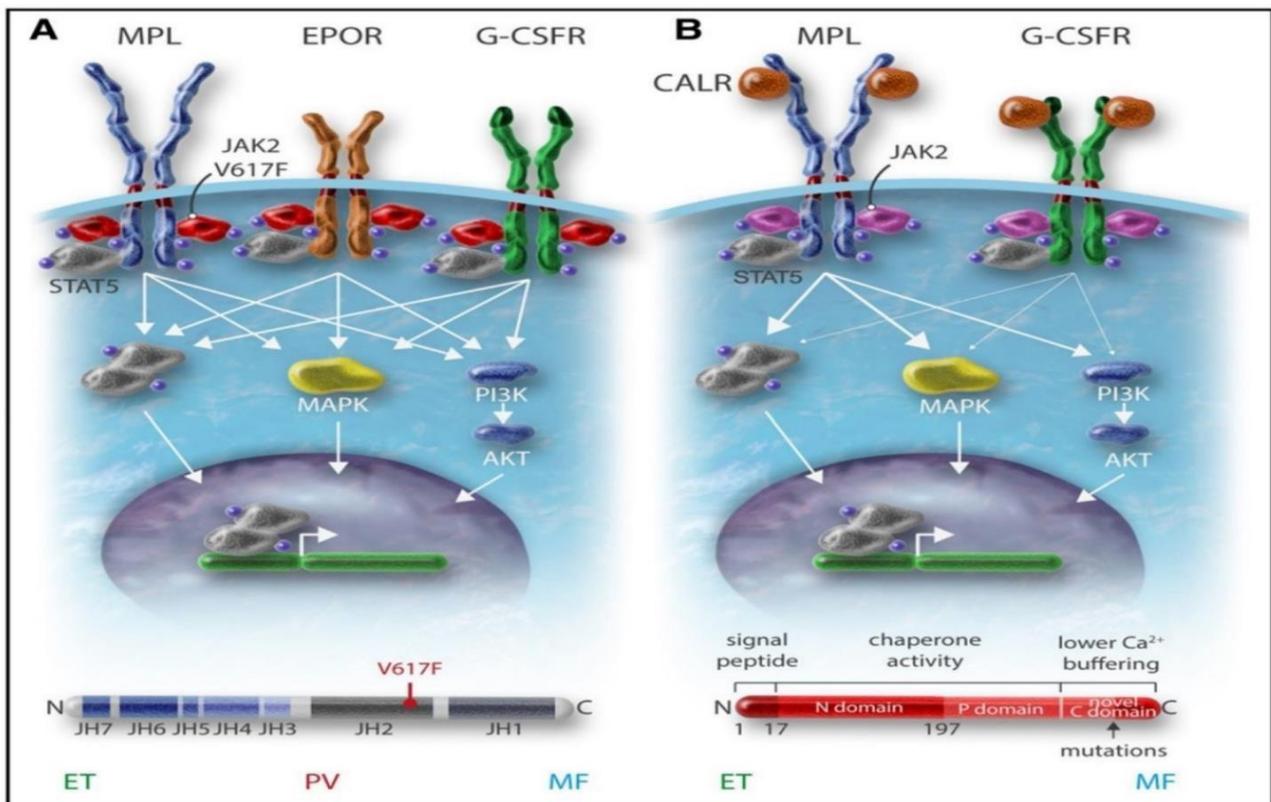


Figura 1 A. la mutazione JAK2V617F attiva la segnalazione attraverso EPOR, MPL e G-CSFR. B. La mutazione CALR attiva MPL e in misura minore G-CSFR, ma non EPOR

Le mutazioni di JAK2 promuovono l'attivazione costitutiva della via JAK-STAT. La mutazione V617F, che si verifica nel dominio pseudochinasi (Janus homology 2 [JH2]), porta alla perdita della

normale funzione autoinibitoria di JH2 attraverso cambiamenti nella conformazione JH1 (dominio chinasi) -JH2 e risulta nell'attivazione incontrollata di JAK2(24). La successiva attivazione a valle della segnalazione intracellulare avviene tramite le proteine STAT, le protein-chinasi attivate da mitogeno (MAPK) e la fosfatidilinositolo-3-chinasi (PI3K); tale via è centrale nella proliferazione e differenziazione delle cellule mieloidi.

Le mutazioni nell'esone 12 si trovano a monte del dominio JH2, all'interno della regione di collegamento tra i domini Src homology 2 (SH2) e JH2. Le mutazioni nell'esone 12 di JAK2 portano ad un aumento della fosforilazione di JAK2 e STAT rispetto alla JAK2 V617F, e risultano in un'attivazione indipendente dalle citochine di JH1(25).

Nell'ultimo decennio, lo sviluppo della Next Generation Sequencing (NGS) ha permesso l'identificazione di diverse mutazioni che agiscono di concerto in più di un terzo dei pazienti MPN(26). I geni più comunemente colpiti sono quelli coinvolti nella regolazione epigenetica come, ad esempio, nello splicing del RNA messaggero, meccanismi di trascrizione e trasduzione del segnale. Mentre le mutazioni driver sono tendenzialmente mutamente esclusive, tali mutazioni aggiuntive non lo sono e possono accumularsi determinando, tra le altre cose, un peggioramento dell'outcome.

Le mutazioni con perdita di funzione di TET2 si verificano dal 10% al 20% dei casi di MPN. Le mutazioni di DNMT3A nel 5-10% dei casi(27). Questi due tipi di mutazioni aumentano l'auto-rinnovamento delle cellule staminali portatrici di JAK2^{V617F} e sono importanti nella patogenesi della malattia. Infatti, possono promuovere la progressione della malattia, specialmente se insorgono dopo le mutazioni driver(28).

Le mutazioni in ASXL1 coinvolgono un regolatore epigenetico e sono molto frequenti nelle MPN(29), seppur si presentano più tipicamente nella MF, rappresentando un fattore di rischio di trasformazione leucemica.

EZH2, una istone metiltransferasi del polycomb repressive complex 2 (PRC2) è coinvolto nella metilazione dell'istone H3. Mutazioni con perdita di funzione di EZH2 sono state descritte nelle MPN e risultano nella de-repressione di un insieme di geni che include un certo numero di oncogeni (ad esempio, LMO1 e HOXA9); queste mutazioni sono associate a un aumento dell'auto-rinnovamento delle CSE. Le mutazioni di EZH2 sono relativamente comuni nei casi di PMF (dal 5% al 10%) e sono associate a JAK2^{V617F} e a una prognosi sfavorevole(30).

Il fattore nucleare eritroide 2 (NFE2) è un fattore di trascrizione comunemente sovra espresso nei pazienti con PV, ET e MF(30,31). La fisiopatologia molecolare della sovra espressione di NFE è associata alla fosforilazione di JAK2 e alla demetilazione di JMJD1C, che è un istone-demetilasi e gene bersaglio di NFE2. Esso contribuisce alla sovra espressione di NFE nelle MPN attraverso un feedback positivo. La deplezione di JMJD1C riduce selettivamente la proliferazione cellulare JAK2^{V617F}-mediata indipendente dalle citochine, suggerendo un potenziale beneficio terapeutico per le MPN.

Mutazioni in componenti dello spliceosoma, tra cui SF3B1, SRSF2, U2AF1, e ZRSR2, sono presenti in oltre la metà dei pazienti affetti da MPN(32). Tuttavia, il ruolo di queste mutazioni nella patogenesi della malattia non è chiaro.

Alla luce delle suddette osservazioni, è evidente che la genesi clonale, nelle MPN, pur essendo delle patologie croniche, rappresenti un meccanismo fondamentale nella patogenesi delle stesse. La PV, così come la TE, ma contrariamente alla MF, è gravata meno frequentemente dalla coesistenza di multiple mutazioni, tuttavia, la ricerca di mutazioni aggiuntive sta diventando più frequentemente pratica clinica, con lo scopo di ottenere delle valutazioni prognostiche in termini di evoluzione in MF o LAM e di sopravvivenza. Ad esempio, in uno studio eseguito su 2035 pazienti, le mutazioni genetiche in TET2, SRSF2 e ASXL1 hanno contribuito a più del 50% del rischio di trasformazione fibrotica da PV o ET. Allo stesso modo, oltre un terzo del rischio di trasformazione leucemica era attribuibile a fattori genetici tra cui la mutazione TP53(33). Valutazioni prognostiche individualizzate possono ora essere ottenute alla diagnosi attraverso l'integrazione di dati genetici e clinici; i dati molecolari sono ora incorporati di routine nei sistemi di punteggio prognostico.

E' stato recentemente sviluppato uno score prognostico basato su elementi clinici e molecolari capace di predire il rischio di sopravvivenza nei pazienti con PV e TE, il mutation-enhanced international prognostic systems (MIPPS-PV/ET). Sono stati studiati 404 pazienti con PV, i quali sono stati distribuiti in 3 categorie di rischio (basso, intermedio e alto) utilizzando le seguenti categorie: presenza della mutazione di SRSF2, anomalie del cariotipo, età superiore a 67 anni e leucocitosi ($>15 \times 10^9/L$). I pazienti con uno score di 0-1 punti venivano definiti a basso rischio e non hanno raggiunto la sopravvivenza mediana, i pazienti con uno score pari a 2-4 venivano definito a rischio intermedio e avevano una sopravvivenza mediana di 10,3 anni e i pazienti con score superiore venivano definiti ad alto rischio e hanno raggiunto una sopravvivenza mediana 4,6 anni.(34)

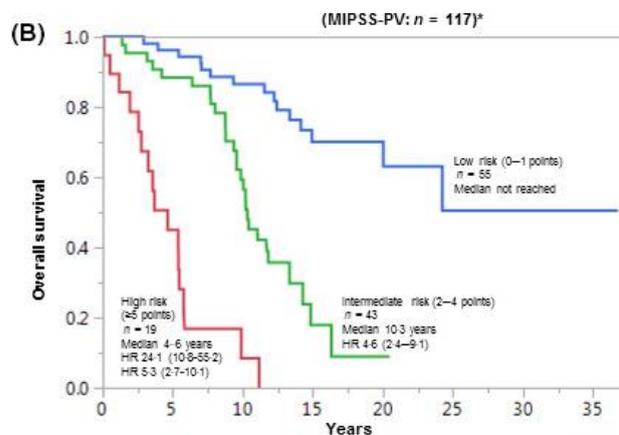


Figura 2. Il MIPSS-PV è basato su quattro fattori di rischio: presenza di mutazioni avverse (*SRSF2*) (due punti); cariotipo anormale (un punto); età >67 anni (tre punti); e conta leucocitaria $\geq 15 \times 10^9/l$ (due punti).

Anomalie citogenetiche possono essere rilevate nel 14-20% dei pazienti al momento della diagnosi iniziale di PV(35,36). Le più frequenti anomalie citogenetiche sono: gain(1q) , del(20q), trisomie nei cromosomi 8 e 9(37). Mentre alcuni studi non hanno dimostrato un significato prognostico delle anomalie citogenetiche, altre indagini, compresa quella dell'International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT), hanno registrato un rischio maggiore di progressione della malattia ed una prognosi peggiore nei pazienti con un cariotipo anomalo(10,38).

2.2.1 Patogenesi della malattia trombotica nelle MPN

Il decorso clinico delle MPN è caratterizzato non solo dalla tendenza alla evoluzione in MF o leucemia ma soprattutto da complicazioni trombotiche e talvolta emorragiche. Gli eventi trombotici possono interessare sia il sistema venoso che quello arterioso. Inoltre, può coinvolgere siti insoliti, come nel caso della trombosi venosa cerebrale (CVT) e trombosi del sistema venoso splancnico (SVT), che comprende la trombosi della vena porta, della vena mesenterica, della vena splenica e la sindrome di Budd-Chiari (vene sovra epatiche). Quando questi eventi si presentano in assenza di un fattore scatenante, la ricerca delle mutazioni molecolari associate alla MPN dovrebbe essere sempre presa in considerazione. Alcuni pazienti sviluppano trombosi, specialmente SVT, associati alla mutazione JAK2 ma con un emocromo completamente normale. Le mutazioni isolate di JAK2 si verificano in circa lo 0,1-0,2% della popolazione generale e il fenotipo mieloproliferativo può

svilupparsi solo successivamente(39). Anche nel caso di eventi trombotici più comuni nella popolazione generale come la trombosi venosa profonda (TVP), l'embolia polmonare (PE) o eventi trombotici arteriosi, è opportuno sospettare una sottostante MPN se è presente una poliglobulia o una piastrinosi che soddisfano i criteri diagnostici WHO (vedi sotto).

I pazienti affetti da MPN presentano uno stato di ipercoagulabilità, dimostrata dalle alterazioni dei marcatori plasmatici della coagulazione, ad esempio il complesso trombina-antitrombina, il frammento 1 + 2 di protrombina e il D-dimero(40). Più recentemente, la scoperta di una resistenza acquisita alla proteina C attivata (APC) ha fornito un importante strumento per rilevare lo stato protrombotico nei pazienti con MPN. Utilizzando il test di generazione della trombina, è stato dimostrato un fenotipo di resistenza all'APC nei pazienti con TE e PV, in particolare nei pazienti portatori della mutazione di JAK2(41). Una diminuzione del livello di proteina S libera sembra essere il principale determinante della resistenza alle APC e può essere dovuta alla scissione della proteina S da una proteasi delle piastrine(42). La scissione della proteina S è risultata infatti significativamente aumentata nei pazienti con TE e conta piastrinica elevata, e torna a valori normali nei soggetti con TE la cui conta piastrinica si è stabilizzata dopo il trattamento con idrossiurea(43). I risultati di diversi studi supportano l'evidenza che tutte le alterazioni emostatiche sono peggiori nei portatori di mutazione JAK2 V617F rispetto alla popolazione wild-type(44). È interessante notare che la mutazione JAK2 V617F è stata identificata nel fegato e nella milza con sindrome di Budd-Chiari(45), suggerendo uno stato protrombotico locale che contribuisce alla patogenesi della trombosi in questo speciale distretto vascolare. Oltre a questi meccanismi, nell'endotelio vascolare normale si verificano cambiamenti protrombotici in risposta agli insulti delle citochine infiammatorie, iperviscosità e di proteasi derivate dai leucociti. In particolare, l'upregolazione dei recettori di adesione endoteliale favorisce l'attaccamento di piastrine, eritrociti e leucociti alla parete vascolare, con conseguente localizzazione delle reazioni di coagulazione e deposizione di fibrina.

La European Collaboration on low-dose aspirin (ECLAP) è il più grande studio epidemiologico della PV. In questo studio, la trombosi ha rappresentato il 41% di tutte le cause di morte (1,5 morti per 100 persone all'anno), principalmente a causa della malattia coronarica, insufficienza cardiaca congestizia, ictus non emorragico, ed embolia polmonare(46). L'incidenza di eventi trombotici maggiori è risultata molto più elevata di quella della popolazione generale, in cui è stimata tra lo 0,1 e lo 0,2% l'anno(47).

Alla diagnosi di PV, l'incidenza di eventi trombotici maggiori oscilla dal 34 al 38,6%; durante il follow up è compresa tra 8,1 e il 19% per laPV. Infine, gli eventi trombotici sono più frequentemente arteriosi che venosi(48).

La trombosi arteriosa, che rappresenta dal 60 al 70% degli eventi trombotici MPN-relati, comprende l'ictus ischemico, attacco ischemico transitorio (TIA), angina, infarto miocardico acuto e occlusione arteriosa periferica che può presentarsi come ischemia/clauidatio intermittens e/o gangrena digitale. Nelle MPN anche manifestazioni cliniche come disturbi della concentrazione, cefalea, nausea, vomito, sincope, o anche convulsioni possono essere secondari ad eventi trombotici. Infine, le complicazioni microvascolari ischemiche e trombotiche, come eritromelalgia, parestesia periferica, cefalea simile all'emigrania, attacchi ischemici transitori e difetti transitori della vista o dell'udito possono dominare il quadro clinico alla presentazione della MPN. Questi sintomi spesso rispondono alla somministrazione di aspirina a basso dosaggio(49).

La patogenesi della trombosi nei pazienti MPN è complessa e multifattoriale. Fattori legati alla malattia, come l'aumento della cellularità ematica, e, soprattutto, la presenza della mutazione JAK2^{V617F}, interagiscono con fattori di rischio del paziente, come l'età, la storia precedente di eventi trombotici, obesità, ipertensione, iperlipidemia, fattori genetici come fattore V Leiden, mutazioni del gene della protrombina e uso di contraccettivi orali, con conseguente aumento del rischio di eventi trombotici(48). Nello studio ECLAP, l'età superiore a 65 anni e l'anamnesi patologica remota positiva per eventi di trombotici sono emersi come i più importanti elementi predittivi di futuri eventi cardiovascolari(46). Una volta instaurata la terapia citoriduttiva, gli eventi cardiovascolari si verificano più frequentemente nei pazienti con scarso controllo dell'Hct e quando la conta dei WBC rimane elevata (al di sopra di $11 \times 10^9/L$). Gli stessi autori non hanno identificato una relazione tra la conta delle piastrine (alla diagnosi o durante il follow-up) e il rischio trombotico. Tuttavia, una severa trombocitosi (superiore a $1.500 \times 10^9/L$) è associata ad un aumentato rischio di sanguinamento a causa della sindrome di von Willebrand acquisita (aVWS).

La presenza della mutazione JAK2^{V617F} è un fattore indipendente di rischio di eventi trombotici sia arteriosi che venosi. In uno studio italiano che ha incluso 1.235 pazienti con diagnosi di ET o PV, l'incidenza di trombosi era simili tra i pazienti PV o ET JAK2^{V617F} mutati (7,1 e 10,5% l'anno, rispettivamente), superiore a quella stimata nei pazienti con ET con mutazione del gene CALR (2,8% l'anno). L'incidenza della trombosi associata alle mutazioni JAK2 esone-12 e MPL non è ben

documentata a causa del piccolo numero di pazienti con queste mutazioni(20).

È stato dimostrato che la mutazione di JAK2 può portare ad anomalie strutturali e funzionali in tutte e tre le linee cellulari ematologiche (globuli rossi, globuli bianchi e piastrine), così come nelle cellule endoteliali. Conseguentemente, determina un aumento dell'aggregazione cellulare, del legame e dell'attivazione dell'endotelio, causando un aumento del rischio di trombosi.

Le cellule endoteliali che esprimono JAK2^{V617F} possono promuovere la trombosi attraverso l'induzione dell'espressione della P-selectina endoteliale, la terapia con HU sembra invece contrastare tale fenomeno. Inoltre, le cellule del sangue attivate esprimono proprietà procoagulanti e proprietà proteolitiche, secernono citochine infiammatorie ed esprimono molecole di adesione, che insieme contribuiscono ad aumentare la probabilità di eventi trombotici. Le piastrine attivate esprimono P-selectina, fattore tissutale (TF) e rilasciano microvescicole.

L'aumento dell'espressione di CD11b sulla superficie dei neutrofili ne permette l'adesione alle cellule endoteliali e alle piastrine. Anomalie nei dei globuli rossi, compresi i cambiamenti biochimici nella membrana, possono compromettere indipendentemente il flusso ematico, attraverso la formazione di aggregati eritrocitari(50). Inoltre, gli aggregati eritrocitari facilitano l'interazione delle piastrine e dei leucociti con l'endotelio. Nei grandi vasi, la viscosità aumenta esponenzialmente con l'ematocrito, il che può spiegare l'aumento del rischio cardiovascolare osservato con aumenti relativamente piccoli di ematocrito. Lo studio CYTO-PV (Cyto-reductive therapy in Polycythemia Vera) ha dimostrato che la flebotomia terapeutica con l'obiettivo di mantenere l'ematocrito < 45% è associata a un rischio di trombosi quasi quattro volte inferiore a quello dei pazienti con ematocrito tra 45 e 50%(51).

Il rapporto neutrofili-linfociti (NLR) è predittore di trombosi nella PV, nello specifico nelle trombosi venose. È stato dimostrato che nei pazienti che avevano avuto trombosi venose le conte assolute di neutrofili e linfociti al basale erano in media rispettivamente più alte (mediana: $6,8 \times 10^9/L$, $p = 0,002$) e più basse (mediana: $1,4 \times 10^9/L$, $p = 0,001$), con conseguente aumento dei valori di NLR (mediana: 5,1, $p = 0,002$). All'analisi multivariata, il rischio di trombosi venosa era indipendentemente associato a precedenti eventi venosi ($HR = 5,48$, $p \leq 0,001$) e a valori di NLR ≥ 5 ($HR = 2,13$, $p = 0,001$). Inoltre, il rischio relativo in entrambi i gruppi a basso e alto rischio standard era quasi raddoppiato in presenza di valori di NLR ≥ 5 (52).

Di fondamentale importanza, nei pazienti con PV, è controllare i comuni fattori di rischio trombotico. Uno studio retrospettivo su 604 pazienti con PV a basso rischio ha riportato che l'ipertensione arteriosa è un fattore di rischio per lo sviluppo di eventi trombotici arteriosi(53).

Tra i parametri di laboratorio, il livello di proteina C-reattiva, un marcatore dell'infiammazione, è elevato nei pazienti con PV e può anche essere associato a un aumento del rischio di trombosi, in particolare infarto del miocardio, ictus e trombosi venosa(54). In uno studio di Barbui e colleghi, tassi più elevati di trombosi maggiore erano associati a livelli crescenti di CRP ($P = .001$), con il livello più alto di CRP che raddoppiava il rischio di trombosi. Un livello più elevato di CRP è anche correlato significativamente con un carico dell'allele JAK2 V617F $> 50\%$ ($p = .003$)(55).

2.3 Manifestazioni Cliniche

Si stima che la splenomegalia sia presente nel 30-40% dei pazienti affetti da PV. Inoltre, è stato dimostrato che l'incremento delle dimensioni spleniche durante il follow-up è significativamente associato a un aumento del rischio di progressione a PPV-MF e leucemia acuta(56).

Più del 95% dei pazienti con PV presenta la mutazione JAK2^{V617F}(13), mentre circa il 2% dei pazienti con PV non presenta tale mutazione, ma inserzioni o delezioni nell'esone 12(21). Alla diagnosi, i pazienti con mutazioni nell'esone 12 mostrano livelli di emoglobina più alti e una minore conta delle piastrine e dei leucociti; tuttavia, l'incidenza di trombosi, di evoluzione in PPV-MF o in leucemia acuta e la mortalità sono simili in entrambi i gruppi(21).

Il primo studio dedicato all'impatto dei sintomi delle MPN sulla qualità di vita dei pazienti ha incluso 1179 pazienti con PV, ET e MF nel 2007(57). Gli strumenti di valutazione dei sintomi utilizzatierano il Functional Assessment Cancer Therapy Anaemia (FACT-An) e il Brief Fatigue Inventory (BFI). Questo studio ha riportato che i sintomi più frequentemente riferiti dai pazienti affetti da MPN sono: astenia (81%), prurito acquagenico (53%), sudorazione notturna (50%), dolori ossei (44%), febbre (14%), perdita di peso indesiderata (13%) e dolore addominale (6%).

Lo studio ha evidenziato come l'impatto dei sintomi condizionasse molti ambiti della vita quotidiana. Inoltre, è stato notato un ridotto livello di attività fisica principalmente secondario all'astenia, dispnea, dolore e sintomi addominali. Da notare che la fatica è stata riportata indipendentemente dalla gravità della condizione e in tutti e tre i sottotipi di MPN, compreso i pazienti con PV che non presentavano complicazioni, come trombosi, emorragia e/o splenomegalia. Questo sondaggio ha supportato l'evidenza che le MPN, indipendentemente dal fenotipo della malattia, si associano ad un burden sintomatico che impatta negativamente sulla qualità della vita dei pazienti che ne sono affetti.

Uno studio ha riportato, utilizzando il questionario sulla qualità della vita della Organizzazione Europea per la ricerca e il trattamento del cancro (EORTC QLQC30), una significativa riduzione della qualità della vita (QoL) nella PV e nella TE durante il trattamento con interferone alfa (IFN)(58).

Gli strumenti di valutazione BFI, FACT-An e EORTC QLQC30 non colgono però sintomi specifici riferiti dai pazienti MF relativi a cachessia, febbre, sudorazione notturna e splenomegalia. Dalla necessità di uno strumento specifico di valutazione dei sintomi nella MF, fu sviluppato il Myelofibrosis Symptom Assessment Form (MF-SAF) nel 2009(59). Questo strumento è costituito da 20 items ed è stato convalidato rispettivamente a strumenti analoghi quali il Memorial Symptom Assessment Scale (MSAS), Brief Pain Inventory (BPI) e BFI per cogliere i sintomi delle MPN più pertinenti in una scala da 0 (assente) a 10 (il peggiore immaginabile). Gli items inclusi nello score comprendono sudorazione notturna, disagio addominale, dolore addominale, dolore, prurito, perdita di peso, febbre, tosse, inattività, affaticamento, dolore osseo, sazietà precoce e qualità della vita.

Nel 2012, l'MF-SAF è stato modificato per risultare applicabile sia all'ET che alla PV e ora è noto come Modulo di valutazione dei sintomi delle MPN (MPN-SAF)(60). Questo score, composto da 27 items, comprende anche la valutazione dei disturbi microvascolari, tra cui vertigini, cefalea, insonnia, disfunzioni sessuali e parestesie acrali. Il modulo è stato da allora convalidato in più lingue ed è stato utilizzato in una serie di importanti studi clinici, tra cui il COMFORT(61) e RESPONSE(62).

Nel 2013, è stato rilasciato il questionario MPN-SAF TSS, noto anche come MPN-10(63). Questa versione ridotta del MPN-SAF è uno strumento di punteggio a dieci voci che contiene i sintomi MPN più rappresentativi, consentendo una facile somministrazione in contesti clinici e di sperimentazione. I sintomi includono la peggiore stanchezza, la sazietà precoce, il discomfort addominale, inattività, prurito, problemi di concentrazione, sudorazione notturna, febbre, dolore alle ossa e perdita di peso. Una variazione di questo strumento (MPN-SAF TSS Cytokine) è stata usata nello studio RELIEF che ha evidenziato l'efficacia del ruxolitinib sui sintomi della PV in pazienti precedentemente in terapia con HU(64).

Una valutazione prospettica di 1470 pazienti ha valutato se l'eterogeneità del burden sintomatico osservata all'interno dei sottotipi di MPN fosse indicativa di sottocluster distinti(65). Lo studio ha identificato vari cluster che si differenziavano per elementi come età, sesso, lingua, anomalie di laboratorio, precedenti emorragie, dimensioni della milza e punteggi MPN-SAF TSS. In particolare, le variabili degli scores di rischio delle MPN non correlavano con il grado di burden sintomatico sia

nella PV che nella TE. Tale mancanza di associazione tra sintomi e scores di rischio suggerisce che i sintomi si manifestano indipendentemente dalle comorbidità e che gli attuali strumenti di valutazione del rischio non dovrebbero essere utilizzati come unici surrogati della gravità della malattia.

Recentemente l'attenzione si è rivolta alla comprensione di come la malattia MPN viene percepita dal punto di vista dei pazienti. L'indagine MPN Landmark aveva lo scopo di indagare come i pazienti affetti da MPN percepissero il burden sintomatico in relazione alla produttività, alla QoL e alle attività della vita quotidiana (ADL). Questa indagine su 813 pazienti ha rilevato che la maggior parte dei pazienti riferisce ansia o preoccupazione per la propria condizione (MF, 91%; PV, 78%; ET, 74%), e i sintomi MPN riducono la loro QoL (MF, 81%; PV, 66%; ET, 57%). È stato notato che i pazienti avevano ridotto le ore di lavoro, aumentato i giorni di malattia, il lavoro volontario ed il pensionamento anticipato, con impatto negativo sulle ADL. Da notare che il 25%-33% dei pazienti a basso rischio trombotico ha riferito di aver saltato almeno 1 giorno di lavoro o cancellato almeno 1 giorno di attività programmate, nei 30 giorni precedenti l'esecuzione di questo sondaggio(66).

La correlazione tra sintomi e le caratteristiche della malattia, tra cui la gravità clinica, il tipo di terapia e le complicanze, è diventata un'area di crescente interesse clinico.

L'astenia è stata studiata spesso e si correla con il grado di anemia, la dipendenza dalle trasfusioni e le precedenti complicanze trombo-emorragiche. Uno studio ha definito una relazione tra la gravità dell'astenia e il livello di istruzione, BMI, sesso femminile, depressione e uso attivo di alcool e tabacco(67).

Anche i dati demografici dei pazienti contribuiscono al burden sintomatico percepito dai pazienti. Uno studio del 2014 sulle differenze di genere nelle MPN ha rivelato che le donne lamentano un maggior grado di astenia, pur essendo di più giovani, con minor esigenza trasfusionale rispetto alla loro controparte maschile. Inoltre, riferiscono maggior grado di discomfort addominale indipendentemente dal grado di trombosi addominale. L'integrazione degli strumenti di valutazione dei sintomi nel follow-up dei pazienti richiede un'ulteriore valutazione. L'MPN Quartile Study ha stratificato i pazienti nei seguenti quartili in base allo score MPN-10 riferito per monitorare le variazioni nel tempo: MPN-10 Q1: <8; MPN-10 Q2: 8- 17; MPN-10 Q3: 18-31; MPN-10 Q4: >32. Tale strategia ha fornito una prova quantitativa oggettiva del miglioramento o dell'intensificazione dei sintomi(68).

Il ruolo delle citochine nello sviluppo e nella gravità dei sintomi è stato valutato attraverso un'analisi di 309 pazienti con MF, dove è stata dimostrata una stretta relazione tra citochine e il burden sintomatico della MF nei pazienti trattati con Ruxolitinib. Tra le citochine implicate sono comprese VCAM1, leptina, TIMP1, B2MICG, e TNFR2(69). Nella TE e nella PV, l'analisi delle citochine ha dimostrato che tali patologie sono associate a livelli significativamente elevati di IL-4, IL-6, IL-8, IL-11, fattore di crescita degli epatociti (HGF), fattore stimolante le colonie di macrofagi granulociti (GCSF), interferone- γ (IFN- γ), proteina chemiotattica dei monociti (MCP-1), fattore di crescita derivato dalle piastrine-BB (PDGFBB), fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) e fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF- α), con patterns specifici di incremento che permettono la differenziazione tra i due disturbi. TNF- α e PDGF-BB inoltre correlano con l'allele burden di JAK2^{V617F} nella PV e nella TE, rispettivamente, implicando l'esistenza di vie infiammatorie sia dipendenti che indipendenti da JAK2^{V617F}(70).

Il ruolo dell'infiammazione cronica nello sviluppo dei sintomi è stato oggetto di un'indagine recente in seguito al rilascio di strumenti di valutazione specifici per le MPN (MF-SAF, MPN-SAF, MPN-10). L'astenia è di origine multifattoriale e può essere correlata a una varietà di condizioni associate all'aumento delle citochine, tra cui l'anemia, l'ipocortisolismo, la depressione e lo stile di vita sedentario(70). I disturbi addominali (sazietà precoce, disagio/dolore addominale, dolore) sono stati in gran parte attribuiti a problemi strutturali come la splenomegalia, infarti splenici, ipertensione portale e ostruzione intestinale. Nella MF, la presenza di splenomegalia è stata associata a una particolare serie di citochine, tra cui monochine indotte dall'interferone gamma (MIG), HGF, e IL1RA(71). Uno studio recente sulle cellule positive a JAK2V617F ha notato che TNF- α promuove l'espansione clonale che può contribuire all'emopoiesi extramidollare(72). Nella PV e nella TE, gli eventi trombotici maggiori sono stati associati ad alti livelli di proteina C-reattiva e bassi livelli di pentrossina 3, che sono a loro volta correlati con l'allele burden di JAK2^{V617F}(55). Una recente indagine su pazienti MF ha dimostrato un'associazione tra livelli elevati di IL-8 e sintomi costituzionali. Allo stesso modo, una revisione dei dati dello studio COMFORT-II ha mostrato che i livelli più bassi di leptina erano correlati alla perdita di peso, e alti livelli di CD40L erano correlati alla perdita di appetito(73).

L'astenia è il sintomo più comunemente riportato che colpisce frequentemente i pazienti con PV (85%) ed è di origine multifattoriale. Può essere uno dei sintomi più debilitanti e persistere nonostante la terapia citoriduttiva nei pazienti ad alto rischio; infatti, il trattamento con flebotomia

per la PV e la conseguente carenza marziale iatrogena possono aggravarlo. Possono inoltre contribuire fenomeni microtrombotici nei vasi cardiopolmonari e la sindrome depressiva(57).

Il prurito è presente fino al 65% della popolazione con PV e riduce la qualità della vita, nonostante studi recenti lo identifichino come un fattore di rischio favorevole per la sopravvivenza. Il sintomo può essere scatenato da una varietà di stimoli, tra cui l'esposizione all'acqua (prurito acquagenico), attività fisica/sudorazione, consumo di alcol o anche variazioni di temperatura(74).

Sebbene la fisiopatologia del prurito rimanga sconosciuta, si pensa che i mastociti e i basofili giochino un ruolo importante. Studi recenti hanno identificato che il numero dei mastociti costitutivamente attivati e dei basofili circolanti è aumentato nella PV e inoltre che l'entità di tale aumento è correlato al grado di prurito acquagenico(75). Altri studi hanno suggerito che la degranolazione dei mastociti è indotta dai cambiamenti di temperatura e rilasciano livelli maggiori di fattori pruritogeni tra cui l'istamina, i leucotrieni e l'interleuchina, rispetto ai pazienti senza MPN(76). Le biopsie cutanee dei pazienti affetti da PV hanno identificato un significativo aumento dei mastociti sia nelle aree cutanee affette che in quelle non affette da prurito. La terapia è richiesta in almeno il 17% dei pazienti con PV e molte combinazioni di trattamenti sono stati provati con una misura variabile di successo. Si è ipotizzato che la carenza di ferro giochi un ruolo e la supplementazione possa fornire un beneficio in tal senso. Uno studio retrospettivo su 397 pazienti affetti da PV con una storia documentata di prurito ha dimostrato che la presenza di questo sintomo era significativamente associato a un più basso volume corpuscolare medio (MCV) e una conta leucocitaria più alta(74). Tuttavia, la supplementazione controllata di ferro per il prurito rimane controversa poiché non tutti gli studi hanno dimostrato l'efficacia. L'uso di antistaminici e inibitori della ricaptazione della serotonina, come la paroxetina, ha mostrato un beneficio(77). In casi estremi, la fototerapia B ultravioletta a banda stretta (PUVA) è stata clinicamente utile per alcuni pazienti. Uno studio tedesco su 441 pazienti affetti da prurito acquagenico ha riportato che i pazienti con prurito sperimentano un peggioramento significativo della QoL rispetto a quelli senza prurito, misurato utilizzando il EORTC QLQ30. Il peggioramento della QoL era associato a riduzione delle funzioni cognitive, emotive e sociale con il 50,5% dei pazienti che dichiarava che il prurito non era migliorato in seguito a fototerapia.

La disfunzione sessuale è un sintomo della PV spesso trascurato ma descritto fino al 57% dei pazienti di sesso maschile e femminile(60). Una indagine su 1908 pazienti MPN ha identificato che il 64% riferiva preoccupazioni legate alla sessualità e che i sintomi erano gravi nel 38% della

popolazione(68). Tali disturbi sono stati correlati alla presenza di anemia, leucopenia, trombocitopenia e necessità di trasfusioni. Inoltre, correlano con le capacità emotive, cognitive, fisiche e sociali. Di particolare interesse è la recente evidenza che collega tali disturbi ad altri sintomi, tra cui insonnia, depressione, sudorazione notturna e qualità della vita. La fisiopatologia sembra complessa e correlata a fattori biologici e psicologici. Oltre alle complicazioni indotte dagli eventi trombotici arteriosi e venosi, la vasodilatazione endotelio-dipendente e mediata dal flusso è stata trovata compromessa anche in pazienti affetti da PV senza evidenza clinica di malattia arteriosa(78). Infine, anche la vasodilatazione mediata dall'ossido nitrico (NO) è risultata compromessa nei pazienti con PV. NO svolge un ruolo nella dilatazione dei vasi e nella protezione dell'endotelio dall'aggregazione piastrinica e dall'adesione dei leucociti. Fino ad oggi, nessuno studio ha indagato terapie specifiche per i disturbi legati alla sessualità.

2.4 Diagnosi

La World Health Organization (WHO) ha recentemente riclassificato le patologie mieloidi, senza sostanziali differenze, rispetto ai criteri del 2016, per quanto riguarda la PV(1,79).

Per porre la diagnosi di PV è necessario che sia presente un incremento dell'emoglobina o dell'ematocrito, la dimostrazione di una clonalità (con la presenza delle mutazioni di JAK2 o altre mutazioni), la panmielosi a livello midollare. È possibile porre diagnosi di PV in assenza di una biopsia osteomidollare, qualora i livelli di emoglobina ed ematocrito dovessero essere particolarmente alti, tuttavia è fondamentale dimostrare, in questo caso, livelli sierici soppressi di eritropoietina (tabella 2).

Criteri diagnostici della Policitemia Vera
1. emoglobina >16,5 g/dL (M), >16,0 g/dL (F), o HCT >49% (M), >48% (F), o aumento della RCM 25%.
2. Ipercellularità per l'età con crescita trilineare (panmielosi), inclusa proliferazione eritroide, granulocitaria e megacariocitaria con megacariociti pleomorfi e maturi.
3. JAK2 ^{V617F} , mutazioni dell'esone 12 di JAK2
4. Bassa eritropoietina sierica

Tabella 2. Criteri diagnostici della PV. La biopsia del midollo osseo può non essere necessaria nei pazienti con eritrocitosi assoluta sostenuta (concentrazioni di emoglobina >18,5 g/dL negli uomini o >16,5 g/dL nelle donne e

valori di ematocrito >55,5% negli uomini o >49,5% nelle donne) e presenza di una mutazione JAK2 V617F o JAK2 esone 12. In questo caso è fondamentale la presenza del criterio 4.

Seppur la biopsia, in taluni casi, non è mandatoria, è sempre suggeribile, al fine di valutare la fibrosi(80). L'impatto clinico e la rilevanza prognostica della presenza di fibrosi midollare alla diagnosi sono stati dimostrati in più di 500 pazienti con diagnosi di PV. In questo studio, la fibrosi reticolinica di grado 1 è stata trovata nel 14% dei pazienti. In generale, le caratteristiche cliniche e di laboratorio non differivano tra i pazienti con o senza fibrosi midollare, tuttavia, una significativa maggiore prevalenza di splenomegalia palpabile è stata osservata nei casi con fibrosi e, soprattutto, i pazienti che presentavano fibrosi midollare alla diagnosi avevano un maggior rischio di evoluzione mielofibrotica(81).

Più del 95% dei pazienti con livelli di emoglobina/ematocrito anormalmente aumentati a causa di una PV sottostante sono positivi alla mutazione JAK2^{V617F}; la distribuzione della frazione allelica mutante (VAF) è ampia, variando dallo 0,1% a quasi il 100%, con un livello mediano intorno al 50%(82). L'omozigosi della mutazione JAK2^{V617F} (burden allelico >50%) è quindi considerato un segno suggestivo di PV piuttosto che di TE, dove l'omozigosi è poco frequente e il burden allelico mediano nella popolazione complessiva dei pazienti è più basso.

I livelli di eritropoietina (EPO) ridotti sono inclusi come criterio diagnostico minore nella classificazione della WHO; Tuttavia, in almeno il 15% dei pazienti con PV JAK2-mutata, i livelli sierici di EPO alla diagnosi rientrano nel range di normalità(83).

2.5 Stratificazione del rischio trombotico

Non c'è ancora alcuna prova definitiva che uno qualsiasi dei trattamenti impiegati per i pazienti con PV abbia il potenziale per curare la malattia. E' stato riportato che l'interferone può indurre una remissione molecolare della mutazione JAK2V617F almeno in alcuni casi, sebbene persistano cloni che ospitano altre mutazioni mieloidi(84). Oltre all'assenza di dimostrazione di una cura con i farmaci attualmente disponibili, manca anche la prova che le terapie possano ritardare sensibilmente la progressione verso la PPV-MF o prevenire la trasformazione leucemica.

Pertanto, gli scopi principali degli attuali trattamenti della PV sono rappresentati dalla riduzione del rischio trombotico e della sintomatologia relata alla patologia, come indicato nelle raccomandazioni

ELN(85) e nelle linee guida ESMO(86).

Al fine di personalizzare il più possibile il trattamento individuale e bilanciare al meglio gli obiettivi terapeutici e gli effetti collaterali legati alla terapia, i criteri utilizzati per la stratificazione del rischio dei pazienti con PV e TE sono basati sulla combinazione di variabili che si ritiene siano predittive del rischio di trombosi in questa popolazione.

L'età avanzata (>60 anni) e i precedenti episodi trombotici sono le due variabili classiche utilizzate per stratificare i pazienti nelle due categorie di rischio trombotico. La presenza di almeno uno dei due elementi pone il paziente nella categoria "ad alto rischio trombotico". Altri fattori di rischio cardiovascolare, in particolare l'ipertensione, il fumo e la leucocitosi, contribuiscono al rischio complessivo trombotico, ma non sono formalmente inclusi nel sistema di stratificazione del rischio dei pazienti PV finalizzato ad individuare l'indicazione all'inizio di una terapia citoreducente(40).

Ad esempio, nella PV l'ipertensione aumenta il rischio di trombosi dallo 0.85% di pazienti/anno al 2.05% pazienti/anno e dal 2.4% pazienti/anno al 3.65% pazienti/anno nelle categorie a basso e alto rischio, rispettivamente.

La leucocitosi, in un'analisi dello studio ECLAP (n=1.638 pazienti), una conta dei leucociti $>15 \times 10^9/L$ ha aumentato l'hazard ratio (HR) della trombosi maggiore di 1.71 volte in confronto ai pazienti con leucociti $<10 \times 10^9/L$.

Inoltre, nello studio CYTO-PV, uno studio prospettico randomizzato, che ha arruolato 365 pazienti con PV, volto a testare gli effetti dell'intensità della citoreduzione sul tasso di trombosi, una conta leucocitaria $>11 \times 10^9/L$ rappresentava un HR per trombosi di 3.90 (95%CI, 1.24-12.03) rispetto ai pazienti con leucociti $<7 \times 10^9/L$ (87).

2.6 Terapia

In assenza di agenti che modifichino la sua storia naturale e prevengano la progressione, la gestione dei pazienti con PV è focalizzata sulla minimizzazione del rischio di complicazioni trombo-emorragiche che rappresentano la principale causa di morbilità e mortalità.

La terapia della PV si basa su due elementi imprescindibili per la quasi totalità dei pazienti: la terapia

antiaggregante e la salassoterapia con lo scopo di mantenere l'ematocrito al disotto del 45%(88).

Studi controllati hanno confermato il valore antitrombotico dell'aspirina a basso dosaggio (81-100 mg al giorno) nei pazienti con PV che non hanno altre controindicazioni, in tutte le categorie di rischio, compreso il basso rischio(89).

Lo studio ECLAP (European Collaboration on Low-dose Aspirin in PV) è uno studio clinico randomizzato in doppio cieco in cui 518 pazienti con PV sono stati randomizzati a ricevere aspirina 100 mg una volta al giorno o placebo. Dopo un'osservazione di 3 anni è stato visto che l'aspirina a basso dosaggio ha ridotto il rischio combinato di eventi cardio-embolici non fatali (infarto miocardico, ictus, embolia polmonare, trombosi venosa maggiore trombosi venosa maggiore) e morte cardiovascolare del 60%; non c'è stato un aumento significativo di episodi di sanguinamento maggiore nel braccio sperimentale rispetto al placebo(89).

La terapia con aspirina a basso dosaggio si è dimostrata efficace anche nell'alleviare i disturbi vasomotori (microvascolari) associati alla poliglobulia(43). Per quanto riguarda il salasso, ci sono studi controllati(90) e non controllati(91) a suo supporto, in tutti i pazienti con PV. Nello studio CYTO-PV, 365 pazienti adulti con PV sono stati trattati con un ematocrito target di <45% o 45%-50%, dopo un follow-up mediano di 31 mesi(90). Sono stati registrati 5 eventi trombotici o decessi per cause cardiovascolari su 182 pazienti del gruppo a basso ematocrito (2.7%) e in 18 dei 183 pazienti del gruppo ad alto ematocrito (9.8%) (p= 0.007).

L'aspirina è considerata adeguata e potenzialmente utile per prevenire le complicanze durante la gravidanza, soprattutto nei casi in cui è presente JAK2^{V617F}(92). Il tasso di aborto spontaneo nel primo trimestre nella PV (>30%) è significativamente più alto rispetto al 15% previsto nella popolazione di controllo e non sembra essere influenzato da un trattamento specifico(93).

Per quanto riguarda il prurito, nel contesto della malattia a basso rischio, la gestione dovrebbe iniziare con semplici misure non farmacologiche, come evitare le condizioni precipitanti, asciugare la pelle e controllare la temperatura del proprio ambiente e dell'acqua utilizzata per il bagno. L'eziologia del prurito associato alla PV rimane da determinare e le risposte al trattamento con antistaminici sono state imprevedibili e variabili(94). Al contrario, è riportato un tasso di risposta superiore al 50% nel prurito associato alla PV trattato con paroxetina (20 mg/die), che è un inibitore selettivo della ricaptazione della serotonina. Altre modalità di trattamento che sono state segnalate come utili nel prurito associato alla PV includono gli inibitori di JAK(62), l'IFN-alfa e la fototerapia a

banda stretta ultravioletta B(95,96).

Nei pazienti ad alto rischio (precedente trombotico e/o età superiore a 60 anni) è indicato aggiungere, alla terapia antitrombotica e al salasso, anche una terapia citoriduttiva (vedi schema).

In prima linea è consigliabile utilizzare idrossiurea o, in alternativa ropeg-interferon-alfa-2b. Quest'ultimo è particolarmente raccomandato nelle donne in età fertile con desiderio di gravidanza. Nei pazienti intolleranti, resistenti o refrattari ai farmaci di prima linea può essere suggerito l'utilizzo di ropeg-interferon-alfa-2b, se non utilizzato in prima linea, o il ruxolitinib. Il paziente non responsivo a tutti i suddetti trattamenti è candidabile a terapia citoriduttiva con busulfano o a clinical trials (figura 3).

Current Treatment Recommendations in Polycythemia Vera

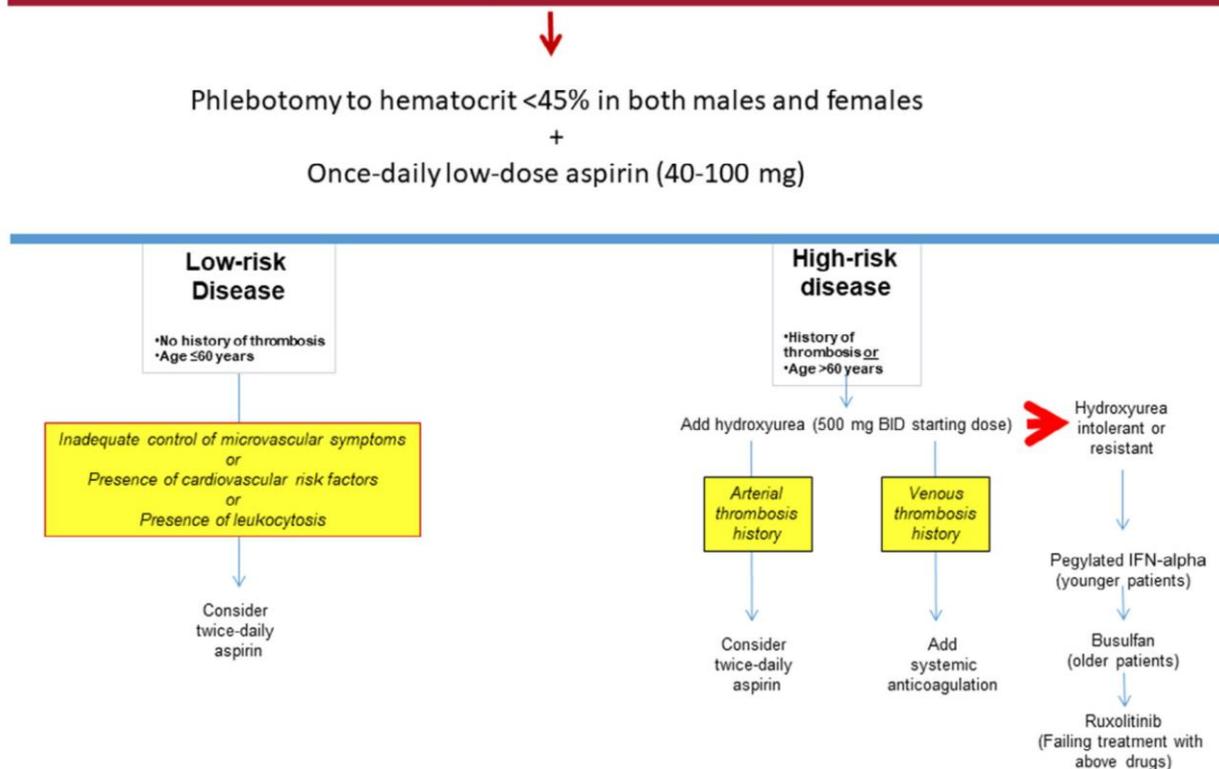


Figura 3. Flow-chart terapeutica secondo Tefferi e Barbui(97).

La terapia citoriduttiva trova un'indicazione anche nei pazienti a basso rischio in cui sussistono

determinate caratteristiche cliniche. Un recente consensus di opinion leader ha proposto di aggiungere una terapia citoriduttiva nei seguenti casi: intolleranza soggettiva ai salassi, splenomegalia progressiva sintomatica, leucocitosi progressiva ($>15 \times 10^9/L$) un incremento almeno del 50% se al baseline erano $>10 \times 10^9/L$, trombocitosi estrema ($<1500 \times 10^9/L$), controllo inadeguato dell'ematocrito nonostante i salassi, rischio cardiovascolare elevato, persistenza di sintomatologia correlata alla PV(98).

2.6.1 Idrossiurea

Nessuno studio randomizzato che confronti l'idrossiurea (HU) alla flebotomia in pazienti PV ad alto rischio è stato eseguito. L'uso dell'HU nella PV è stato introdotto dal Polycythemia Vera Study group (PVSG) che, in un piccolo studio randomizzato (PVSG-01) che confrontava l'HU alla flebotomia e fosforo radioattivo, ha osservato un vantaggio dell'HU per quanto riguarda la riduzione di eventi cardiovascolari, anche se non c'era un beneficio significativo nella sopravvivenza globale(99). In un successivo piccolo studio di osservazione, il PVSG-08, 51 pazienti PV trattati con HU hanno sperimentato meno trombosi rispetto a quanto atteso basandosi su un gruppo di controllo storico(100). Inoltre, dall'analisi dei dati dello studio ECLAP, il tasso di eventi cardiovascolari fatali/non fatali è stato inferiore, dal 13.2% nei pazienti trattati con solo flebotomia al 7.9% in quelli che ricevevano l'HU; tale effetto protettivo è risultato maggiore per gli eventi arteriosi rispetto a quelli venosi, che infatti si sono verificati con un tasso simile nei due gruppi di trattamento(46).

Il potenziale rischio leucemogeno dell'HU è una delle principali preoccupazioni per l'uso di questo farmaco. Mentre per altri chemioterapici, tra cui il fosforo radioattivo, il clorambucile e il pipobromano, un chiaro aumento del rischio di evoluzione leucemica è stato evidenziato. Studi di follow-up a lungo termine e dati di registro non hanno dimostrato in modo convincente un aumento del tasso di leucemia acuta nei pazienti con PV che ricevono HU.

I pazienti che sviluppano resistenza o intolleranza all'HU (vedi sotto), come definito dai criteri ELN, sono candidati alla terapia di seconda linea. L'intolleranza di solito si manifesta con lesioni cutanee, comprese le ulcere orali, genitali e alle gambe; i soggetti più anziani sviluppano frequentemente cheratosi attinica e tumori della pelle non melanoma, e si deve raccomandare di evitare l'esposizione al sole. La febbre legata all'HU e la polmonite interstiziale sono complicazioni rare che portano alla sospensione del trattamento. L'HU è infatti ben nota per esser associata ad un aumento del tasso di tumori della pelle non melanoma; per quanto riguarda altri tumori solidi, in un confronto di 700 pazienti trattati con HU contro 342 gestiti solo con flebotomia nello studio ECLAP(46), non è

stato dimostrato alcun aumento dei tumori solidi.

2.6.2 Ropeginterferon Alfa-2b

Recentemente, una nuova formulazione di interferone (ropeginterferon alfa2b) ha ricevuto l'autorizzazione dall'Agenzia Europea del Farmaco (EMA) come monoterapia per il trattamento di pazienti con PV senza splenomegalia sintomatica.

Il ropeginterferon è un interferone peghilato a lunga emivita somministrato a intervalli di 2-4 settimane. Nello studio PROUD-PV, la remissione ematologica completa è stata registrata nel 70.5% dei pazienti rispetto al 51.4% del braccio di controllo. Inoltre, nel braccio sperimentale si è osservato un maggior controllo dei sintomi, nel 52.6% dei pazienti contro il 37.8% dei pazienti nel braccio non sperimentale(101). Un risultato degno di nota di questo follow-up a lungo termine è stato che il tasso di risposte ematologiche, cliniche e molecolari sono aumentate progressivamente nel tempo con ropeginterferon rispetto al braccio di controllo. La risposta molecolare è stata osservata nel 66% di pazienti trattati con ropeginterferon rispetto al 27% del braccio di controllo, con una riduzione media del VAF di 45% rispetto al 5%; da notare che la riduzione della frequenza dell'allele della variante JAK2^{V617F} era correlata alla risposta ematologica, in linea con precedenti studi di correlazione tra VAF e fenotipo della malattia(82).

Questa nuova formazione di interferone può avere un vantaggio in termini di efficacia e tollerabilità rispetto alle forme convenzionali e peghilate di interferone, che si sono dimostrate in grado di indurre una risposta ematologica, miglioramento delle manifestazioni cliniche e riduzione del clone JAK2^{V617F} mutato in misura variabile in diversi piccoli studi di fase 2(102).

Più recentemente, ropeg-interferon-alfa-2b è stato valutato anche in pazienti con PV a basso rischio arruolati nello studio randomizzato di fase III "Low PV" (NCT030030025)(103). In questo studio, la terapia con flebotomia (braccio standard) è stata confrontata con Ropeginterferon alfa-2b somministrato per via sottocutanea ogni 2 settimane alla dose di 100 µg, in aggiunta alla terapia standard. L'endpoint primario, cioè il mantenimento del target di ematocrito <45%, è stato raggiunto nell'84% dei casi di Ropeginterferon contro il 60% nel braccio standard (p= 0.008). Per quanto riguarda la sicurezza, nessuna differenza statisticamente significativa di eventi avversi (AEs) di grado 3 o maggiore è stata evidenziata.

Infine, l'interferone è il farmaco di scelta per la gestione della gravidanza in pazienti con PV nei casi in cui la gravidanza è considerata ad "alto rischio" per storia pregressa di complicazioni, precedenti

trombosi, scarso controllo dei valori ematologici e/o dei sintomi(104).

2.6.3 Ruxolitinib

Il ruxolitinib è un farmaco approvato per i pazienti affetti da PV, in seconda linea. È un inibitore tirosin chinasi di JAK1/2, approvato dalla FDA nel 2014 per i pazienti con PV con una risposta inadeguata o una tossicità inaccettabile da HU, sulla base dei risultati dei 2 studi randomizzati RESPONSE e RESPOSE-2(105,62).

Lo studio di fase III RESPONSE è stato disegnato per valutare l'efficacia e la sicurezza di ruxolitinib rispetto alla miglior terapia disponibile (BAT) in 222 pazienti dipendenti dalla salassoterapia che sono stati randomizzati a ricevere ruxolitinib o BAT. L'endpoint primario, definito come la proporzione di pazienti che hanno ottenuto sia il controllo dell'ematocrito che una riduzione di almeno il 35% del volume della milza alla settimana 32, è stato ottenuto nel 21% dei pazienti nel gruppo ruxolitinib contro l'1% nel gruppo BAT. Il controllo dell'ematocrito (60% contro 20%) e la riduzione del volume della milza (38% contro 1%) hanno entrambi favorito il gruppo che ha ricevuto ruxolitinib. Inoltre, un migliore controllo dei sintomi della PV è stato registrato nel braccio con ruxolitinib. Oltre ad anemia e trombocitopenia di grado 3/4 (2% e 5%, rispettivamente), la riattivazione dell'Herpes zoster è stata la complicazione infettiva più comune, riportata nel 6% dei soggetti trattati con ruxolitinib. A 80 settimane, l'83% dei pazienti randomizzati a ruxolitinib è rimasto in terapia, mentre l'88% del gruppo BAT è stato sottoposto a crossover. La probabilità di mantenere l'endpoint primario e una risposta ematologica completa (CHR) per ≥ 80 settimane era del 92% contro il 69% nel gruppo ruxolitinib e BAT, rispettivamente. Un tasso di eventi tromboembolici di 1.8 contro 8.2 per 100 pazienti-anno, rispettivamente, è stato riportato. Nel braccio ruxolitinib, è stato osservato un rischio maggiore di cancro della pelle non melanoma.

A 5 anni di follow-up, il 98% dei pazienti inizialmente assegnati al braccio BAT è passato a ruxolitinib, con una probabilità di sopravvivenza a 5 anni del 91.9% con ruxolitinib e del 91.0% con la BAT.

Nello studio RESPONSE-2, studio in aperto di fase IIIb, sono state valutate l'efficacia e la sicurezza di ruxolitinib rispetto alla BAT in 149 pazienti PV senza splenomegalia resistenti o intolleranti all'HU; la BAT comprendeva HU (49% dei soggetti), IFN o PEG-IFN (13% dei soggetti). L'endpoint primario, cioè il controllo dell'ematocrito alla settimana 28, è stato raggiunto dal 62% contro il 19% dei pazienti nel gruppo ruxolitinib e BAT, rispettivamente. Nessun caso di anemia di grado 3/4 o trombocitopenia si sono verificati con ruxolitinib, mentre nel gruppo BAT, essi sono stati riportati in 1 paziente e 3 pazienti, rispettivamente. Alla settimana 80, il 93% dei soggetti randomizzati a

ruxolitinib stava ricevendo questo trattamento, mentre nessun paziente era rimasto in BAT. Allo stesso tempo, una risposta ematologica completa durevole è stata raggiunta nel 24% dei pazienti nel braccio ruxolitinib contro il 3% nel braccio BAT.

Nello studio RELIEF di fase IIIb in doppio cieco, 110 pazienti con PV con un adeguato controllo dell'ematocrito con HU, ma con persistenza di sintomi legati alla PV, sono stati randomizzati a ricevere ruxolitinib o a continuare HU. L'endpoint primario, cioè la proporzione di pazienti che ottengono una riduzione $\geq 50\%$ dal basale del punteggio TSS alla settimana 16, non era significativamente superiore nel gruppo ruxolitinib (43,4% contro il 29,6%)(64).

È interessante notare che in una recente meta-analisi che ha considerato quattro studi randomizzati, comprendenti 663 pazienti, il numero di eventi trombotici riportati con ruxolitinib era costantemente inferiore alla BAT, ma, globalmente, la differenza non ha raggiunto la significatività(106).

Sulla base dei risultati che suggeriscono che ruxolitinib aumenti l'efficacia e la tollerabilità di PEG-IFN alfa-2, uno studio di fase II ha studiato la combinazione di ruxolitinib con PEG-IFN alfa-2 in 32 pazienti con PV e 18 con MF precedentemente intolleranti o refrattari al PEG-IFN alfa-2. Per quanto riguarda i soggetti con PV, il 9% ha raggiunto una remissione completa e il 22% una parziale; inoltre, il burden allelico di JAK2^{V617F} è diminuito dal 47% al 12%. Su 36 pazienti precedentemente intolleranti a PEG-IFN alfa-2, l'86% ha completato lo studio con una tossicità accettabile(107).

2.7 Criteri di risposta alla terapia e definizione di resistenza e intolleranza all'idrossiurea.

Nel 2009, l'ELN ha sviluppato raccomandazioni per la valutazione della risposta per i pazienti con PV(108). Tuttavia, nel tempo sono divenuti evidenti i limiti di questi criteri, sulla base dell'evidenza che essi non forniscono una misura diretta del beneficio raggiunto dai pazienti in corso di terapia. Infatti, il raggiungimento di una risposta completa secondo questi criteri non è correlato a una minore incidenza di trombosi o a una maggior sopravvivenza. Inoltre, la scoperta della mutazione JAK2^{V617F} e di altre anomalie molecolari ha posto nuovi obiettivi per le terapie che hanno portato allo sviluppo di nuovi agenti sperimentali volti a modificare la storia naturale di queste malattie. Queste considerazioni hanno reso evidente la necessità di una revisione dei criteri di risposta. Di conseguenza, il Consorzio ELN insieme al Gruppo di lavoro internazionale per la ricerca e il

trattamento delle neoplasie mieloproliferative (IWG-MRT) ha elaborato una revisione dei suddetti criteri nel 2013(85).

Le nuove raccomandazioni si sono basate sul concetto che i criteri standardizzati per misurare la risposta alle terapie in pazienti con PV dovrebbero misurare principalmente l'attività antiproliferativa e cogliere gli effetti a lungo termine dei farmaci nuovi e sperimentali. Il pannello di esperti ha innanzitutto definito quattro categorie dei criteri di risposta per la valutazione della risposta parziale e completa. La definizione di risposta richiedeva la normalizzazione dei sintomi e dei segni della malattia, normalizzazione dell'emocromo, assenza di eventi vascolari senza segni di progressione della malattia, e anomalie istologiche del midollo osseo. Uno strumento di qualità della vita riferito dal paziente è stato utilizzato per la definizione della normalizzazione dei sintomi attraverso un questionario specifico (MPN-SAF TSS)(63).

La remissione parziale differiva dalla remissione completa a causa della mancanza di correzione delle anomalie istologiche, indicando che il farmaco candidato non era stato in grado di interferire con il processo patologico sottostante. Oltre alla risposta, la valutazione a lungo termine dei pazienti comprendeva anche la definizione di mancata risposta e di progressione della malattia. Anche se alcuni degli agenti terapeutici in uso oggi si sono dimostrati in grado di ridurre il carico allelico della mutazione JAK2^{V617F} nella PV, la remissione molecolare non è stata inclusa nella definizione di remissione completa e parziale data la bassa sensibilità al cambiamento di questo parametro. Per questo motivo, l'uso del termine "remissione completa" non deve essere interpretato come equivalente alla completa eradicazione del clone maligno.

Il monitoraggio dei cambiamenti nell'istologia del midollo osseo dopo il trattamento non è attualmente di routine nella pratica clinica. Tuttavia, i farmaci che sono in grado di cambiare il corso naturale della malattia devono essere valutati per il loro impatto sull'istopatologia del midollo. Le definizioni di risposta istologica sono basate sugli effetti sulla cellularità e la fibrosi della reticolina per la PV. La variabilità nell'esperienza dei patologi in diverse istituzioni, aggravata dalla variabilità nella qualità dei campioni, può risultare in una vasta gamma nell'interpretazione e significato dei referti del midollo osseo (tabella 3).

Criteri	
Remissione completa	
A	Risoluzione completa e durevole (almeno 12 settimane) dei sintomi relati alla PV, E
B	Ematocrito <45% senza salassi, conta piastrinica <400 x10 ⁹ /L, conta leucocitaria <10 x10 ⁹ /L per almeno 12 settimane, E
C	Assenza di progressione della PV ed eventi trombotici o emorragici, E
D	Remissione istologica
Remissione parziale	
A	Risoluzione completa e durevole (almeno 12 settimane) dei sintomi relati alla PV, E
B	Ematocrito <45% senza salassi, conta piastrinica <400 x10 ⁹ /L, conta leucocitaria <10 x10 ⁹ /L per almeno 12 settimane, E
C	Assenza di progressione della PV ed eventi trombotici o emorragici
D	Senza remissione istologica
Nessuna risposta	Nessuno dei criteri sovrastanti
Progressione	Evoluzione in Mielofibrosi, Mielodisplasia o Leucemia

Tabella 3. Criteri di risposta nella PV.

La risposta inadeguata o la resistenza all'HU si verifica nel 5-11% dei pazienti con PV ed è associata a una sopravvivenza ridotta(109).

Una definizione unificata di resistenza e intolleranza all'HU è stata proposta ELN(110). Questi criteri sono stati inizialmente definiti per identificare un sottogruppo di pazienti che potrebbero beneficiare del trattamento di seconda linea. Gli effetti avversi all'HU includono febbre, ulcere dolorose alle gambe e muco cutanee, e polmonite. La resistenza all'HU comprende la continua necessità di flebotomia per mantenere l'ematocrito <45%, la mieloproliferazione incontrollata (conta dei globuli bianchi >10 × 10⁹/L o conta delle piastrine >400 × 10⁹/L) e/o la mancata riduzione della splenomegalia del 50%, nonostante 3 mesi di terapia con ≥2 g al giorno di HU (tabella 4).

Criteri di resistenza/intolleranza all'HU (almeno 1 dei sottostanti)
Necessità di flebotomia per mantenere l'ematocrito <45% dopo 3 mesi di almeno 2 g/die di HU
Mieloproliferazione incontrollata, ossia conta piastrinica >400-10 ⁹ /L E conta dei globuli bianchi >10-10 ⁹ /L dopo 3 mesi di almeno 2 g/die di HU
Mancata riduzione della splenomegalia massiva (>10 cm dall'arcata costale) di oltre il 50% misurata alla palpazione, OPPURE mancata completa attenuazione dei sintomi correlati alla splenomegalia, dopo 3 mesi di almeno 2 g/die di HU
Conta assoluta dei neutrofili <1.0 x10 ⁹ /L o conta piastrinica <100 x10 ⁹ /l o emoglobina <100 g/L alla dose più bassa di HU necessaria per ottenere una risposta clinico-ematologica completa o parziale
Presenza di ulcere alle gambe o di altre tossicità non ematologiche inaccettabili correlate all'HU, come manifestazioni muco cutanee, sintomi gastrointestinali, polmonite o febbre a qualsiasi dose di HU

Tabella 4. Definizione di resistenza/intolleranza all'idrossicarbamide in pazienti con policitemia vera

La tossicità ematologica (conta assoluta dei neutrofili <1,0 × 10⁹/L o conta delle piastrine <50 × 10⁹/L) alla dose più bassa che mantiene la risposta clinico-ematologica è anche inclusa nella definizione di resistenza all'HU, ed è noto che i pazienti con tale resistenza abbiano un rischio maggiore di trasformazione in MF o in LAM(111).

3. LE MICROVESCICOLE

Le vescicole extracellulari (EVs) vengono rilasciate da varie cellule durante l'omeostasi e l'attivazione cellulare, con effetti pleiotropici sulla segnalazione tra le cellule. Sono state rilevate in diversi liquidi biologici, tra cui plasma, urina e saliva. Le stesse cellule possono essere destinatarie o effettrici del targeting delle EVs e sono stati descritti in precedenza vari meccanismi di rilascio o di assorbimento(112). Le EVs sono arricchite in acidi nucleici, proteine e lipidi. Studi incentrati sull'impacchettamento dei carichi delle EVs in condizioni diverse sono stati riportati in banche dati pubbliche, tra cui ExoCarta(113), Vesiclepedia(114) ed EVpedia(115). In breve, la International Society of Extracellular Vesicles ha classificato le EV in tre gruppi principali(116):

- (1) esosomi, vescicole di piccole dimensioni con diametro $\leq 100-150$ nm che si formano all'interno di corpi multivescicolari;
- (2) microvescicole, vescicole di medie dimensioni di origine della membrana plasmatica con diametri fino a 1000 nm;
- (3) corpi apoptotici, vescicole di grandi dimensioni con diametri >1000 nm prodotte dalle cellule apoptotiche.

Reviews sulle caratteristiche biomolecolari e funzionali delle EVs e sulle tecniche di isolamento e caratterizzazione delle EVs sono state pubblicate di recente. Le EVs influenzano l'emopoiesi normale e patologica e sono attori critici nella regolazione dell'infiammazione e dell'immunità(107–109).

In particolare, le EVs derivate dai tumori ematologici hanno un impatto profondo sulla trasformazione delle cellule stromali, sull'angiogenesi e sulla soppressione immunitaria trasportando mRNA, microRNA (miR), lipidi e proteine e trasferendo il contenuto a cellule bersaglio, tra cui cellule stromali, cellule endoteliali e cellule immunitarie. Di solito, questi effetti mirano a promuovere la trasformazione, lo sviluppo e la progressione patologica(120). Pertanto, l'importanza delle EVs in queste patologie ematologiche è principalmente attribuita al loro ruolo nel modificare il microambiente tumorale, inducendo l'evasione immunitaria e la chemioresistenza nei tumori e nel determinare lo stato di ipercoagulabilità.

Recentemente, il numero e il contenuto, tra cui proteine, microRNA (miR), e RNA lunghi non codificanti (lncRNA), sono stati segnalati come upregolati nelle EVs di pazienti con tumori del

sangue, suggerendo che le EVs circolanti potrebbero essere un marker diagnostico per questi disturbi. Infatti, grazie alla loro localizzazione nel sangue, la diagnostica basata sulle EVs può rappresentare un candidato ottimale per la diagnosi non invasiva. Inoltre, analizzando il carico delle EVs deregolate, si potrà disporre di uno strumento per la diagnosi rapida della ricaduta della malattia e per la selezione della terapia personalizzata più appropriata. Tuttavia, sebbene la ricerca abbia dimostrato l'utilità delle EVs, la sfida è ancora quella di stabilire e integrare i biomarcatori derivati dalle EVs nella pratica clinica.

In ambito onco-ematologico, è interessante notare che, oltre al contatto cellula-cellula e ai segnali sierici, la generazione/rilascio di vescicole extracellulari da parte delle cellule del sangue e/o della nicchia del microambiente è stata descritta come una strategia di successo nella comunicazione intercellulare complessa (121). Infatti, l'invio di informazioni racchiuse in una membrana plasmatica rappresenta una "strategia intelligente" per evitare la degradazione e promuovere la segnalazione intercellulare, non solo fisiologicamente, ma anche nel cancro. In particolare, la "strategia intelligente" guidata dalle EVs assicura l'attività funzionale e la sopravvivenza delle cellule tumorali del sangue e la generazione di una nicchia con effetti di promozione del cancro. In altre parole, dal momento che la priorità strategica del clone ematologico è la diffusione dei segnali tumorali, le EVs rappresentano uno strumento biologico "sostenibile" ed efficace con cui perseguire questi obiettivi. La nicchia midollare e i sistemi immunitario e di coagulazione sono stati indicati come aree principali per rafforzare le sinergie e la collaborazione nei tumori del sangue attraverso la comunicazione basata sulle EVs.

Diversi studi hanno identificato le EV come veicoli di trasporto dei componenti rilasciati dal tumore del sangue nel sangue periferico, evidenziando la loro rilevanza clinica nella diagnosi e nella prognosi. Da notare che, nell'ambito della medicina di precisione, le EVs potrebbero essere considerate un ulteriore e promettente strumento per la biopsia liquida nel monitoraggio della progressione della malattia. Inoltre, grazie alle loro proprietà e funzioni biologiche, le EVs hanno attirato l'attenzione non solo come potenziale bersaglio terapeutico, ma anche come veicoli per la somministrazione di farmaci(122–125).

Uno dei primi studi, condotto da Caivano et al., ha dimostrato che le EVs circolanti possono rappresentare un nuovo biomarcatore(126), poiché elevati livelli sierici di EVs sono rilevati nel sangue periferico di pazienti con vari tipi di neoplasia ematologica. Ad esempio, le EVs sono risultate

aumentate nella leucemia mieloide acuta, nel mieloma multiplo, nel linfoma di Hodgkin, nella macroglobulinemia di Waldenstrom e alcune neoplasie mieloproliferative. Inoltre, le EVs delle suddette neoplasie erano talvolta caratterizzate da dimensioni inferiori.

In particolare, le EVs esprimevano in modo specifico antigeni correlati al cancro (ad esempio, CD19 nelle neoplasie a cellule B, CD38 nei MM, CD13 nelle MPN, CD30 nel HL), rivelando che la conta totale e la specificità antigenica delle EVs erano correlate alle caratteristiche cliniche della neoplasia.

Nell'ambito delle MPN, è stato dimostrato che nei pazienti con MF e TE si osserva un aumento/diminuzione della proporzione di EVs di origine piastrinica (CD61+CD62P+) /megacariocitaria (CD61+CD62P-). Inoltre, ruxolitinib normalizza il profilo delle EVs circolanti nei pazienti con MF e spleen-responder. È importante notare che un valore di cut-off del 19,95% per le EVs derivate dai megacariociti identifica i responder e i non responder, dimostrando che le EVs circolanti di megacariociti, come test di biopsia liquida, potrebbe essere uno strumento potenziale per predire la risposta alla terapia con ruxolitinib(127). Inoltre, nelle EVs derivate dal plasma di pazienti affetti da MF, è stato identificato un profilo distinto di miR e componenti mitocondriali, suggerendo che le EVs sono potenziali marcatori di malattia aggressiva, soprattutto nei pazienti con MF triplo-negativa(128).

Alle EVs vengono riconosciute altre azioni specifiche, tra le principali, il conferimento alle cellule tumorali della capacità di eludere la sorveglianza immunitaria, meccanismo chiave per il loro sviluppo e mantenimento.

Recenti rapporti supportano l'evidenza che le EVs provenienti da pazienti affetti da tumore del sangue contribuiscono allo sviluppo di un microambiente immunosoppressivo per creare una nicchia " tumor-friendly". Questi effetti delle EVs sono stati riportati in diversi tumori del sangue, tra cui AML, MM e linfomi(129).

Inoltre, è stato dimostrato che i monociti circolanti di pazienti affetti da MF con mutazione di JAK2^{V617F} sono disregolati e mostrano una ridotta capacità in vitro di produrre/secernere citochine infiammatorie in risposta a uno stimolo infettivo. Sorprendentemente, ruxolitinib promuove la segnalazione di citochine infiammatorie da parte delle EVs(130).

Il ruolo procoagulante delle EVs circolanti nelle neoplasie ematologiche è sempre più riconosciuto. La genesi della trombosi in questi disturbi è multifattoriale e deriva da un'interazione funzionale tra cellule del sangue, endotelio e il sistema di coagulazione. Ad esempio, la leucemia mielomonocitica cronica (CMML) è una neoplasia ematologica mieloide con caratteristiche sovrapposte a MDS e MPN. È stato riportato che le EVs dei monociti della CMML conferiscono un'attività procoagulante alle cellule mesenchimali di donatori sani, che può essere addirittura invertita da un anticorpo anti-TF(131).

Nella MPN, elevati livelli plasmatici di EVs procoagulanti rappresentano un nuovo fattore di rischio per la trombosi. Duchemin et al. hanno descritto per la prima volta che nella PV e nella TE, la comparsa di una "resistenza alla trombomodulina" acquisita è in parte dovuta alle EVs circolanti. Questa resistenza alla trombomodulina potrebbe contribuire allo stato di ipercoagulabilità osservato nei pazienti con MPN(132). Coerentemente, i pazienti con PV sono caratterizzati da un aumento delle EVs circolanti procoagulanti(133). Un'aumentata attività procoagulante legata alle EVs è stata confermata anche nei pazienti con TE. In particolare, l'attività procoagulante legata alle EVs era significativamente maggiore nei pazienti positivi per JAK2^{V617F} rispetto ai pazienti non mutati e ai soggetti normali. Tuttavia, non è stata osservata alcuna differenza tra il gruppo con trombosi e quello senza trombosi(134).

Confrontando TE, PV e MF, è stato riscontrato un aumento dell'attività procoagulante delle EVs circolanti nei pazienti con MPN, con il livello più alto nei pazienti con PV rispetto a quelli con TE e MF.

È sorprendente che i pazienti con anamnesi di trombosi venosa presentino un'attività procoagulante delle EVs più elevata. Inoltre, la presenza della mutazione JAK2^{V617F} è associata a un aumento della coagulazione, così come un maggiore burden allelico(135).

Inoltre, Taniguchi et al. hanno descritto che i livelli plasmatici di EVs procoagulanti che esprimono fattore tissutale (TF) erano più alti nei pazienti con eventi trombotici rispetto a quelli senza tali eventi. Tra i pazienti che hanno sviluppato una trombosi, indipendentemente dall'emocromo dei pazienti, le EVs TF+ erano più rappresentate, così come in coloro che non assumevano terapia citoriduttiva. Questi risultati suggeriscono che un aumento dei livelli circolanti di EVs TF+ potrebbero essere considerati un marker di eventi trombotici nei pazienti con MPN(136).

4. IL MICROBIOTA

I microrganismi che vivono in associazione con il corpo umano costituiscono il microbiota, e la maggior parte delle interazioni microbo-ospite sono simbiotiche e non patogene(137,138). In un uomo ci sono da 10 a 100 trilioni di microbi; le cellule e le particelle microbiche superano quindi le cellule umane in un rapporto di 10:1.3. I microbi risiedono in molte superfici dell'organismo, tra cui la pelle, le narici, l'orofaringe, la vagina e l'intestino. La maggior parte dei microbi associati all'uomo risiede nel colon e tale flora si stabilisce nei primi 3 anni di vita(139). Di questi microbi della parte inferiore dell'intestino, la maggior parte dei batteri appartengono a 2 dei 70 phyla: Bacteroidetes e Firmicutes.

Gli sforzi maggiori per catalogare la composizione e le funzioni potenziali del microbiota di vari siti corporei sono stati condotti dal Progetto Microbioma Umano (HMP), un'iniziativa sostenuta dal Fondo Comune degli Istituti Nazionali di Sanità, e il progetto Metagenomics of the Human Intestinal Tract (Metagenomica del tratto intestinale umano), sostenuto dalla Commissione europea. Sono stati condotti studi basati sul sequenziamento ad alta velocità per caratterizzare i geni e i genomi umani e microbici, con questa combinazione collettiva di geni denominata metagenoma(140).

La genetica dell'ospite svolge un ruolo importante nel definire e plasmare il microbiota. I polimorfismi a singolo nucleotide in loci genomici specifici dell'ospite sono ritenuti in grado di influenzare la composizione del microbiota(141). Al contrario, studi metagenomici su gemelli monozigoti hanno rivelato una notevole variabilità nella composizione delle comunità microbiche in individui sani, con gemelli che condividono il 50% dei taxa batterici a livello di specie(142). Questo dato suggerisce un ruolo significativo dei fattori ambientali e di altri fattori nella formazione delle strutture comunitarie del microbiota.

La complessa interazione tra l'ospite e i fattori ambientali è fondamentale per la formazione del microbiota.

La nostra comprensione del ruolo del microbiota nella salute umana e nelle malattie è basata su esperimenti epidemiologici, osservazionali, molecolari e di esperimenti di modellazione animale. Il microbiota svolge un ruolo importante nella salute e nella malattia umana. Il microbiota è coinvolto nell'energetica e nell'immagazzinamento, oltre che in una serie di funzioni metaboliche quali fermentare e assorbire i carboidrati non digeriti(143). In particolare, il microbiota modella il repertorio globale delle cellule immunitarie, alterando in questo modo la suscettibilità dell'ospite all'infiammazione e all'infezione nei siti di colonizzazione.

L'invecchiamento, lo stile di vita e i cambiamenti nutrizionali, lo stress, i farmaci influenzano la composizione del microbiota con conseguente alterazione degli stati infiammatori e fisiopatologici dell'intestino e di numerosi organi e tessuti. Una dieta povera di fibre e ricca di grassi determina un'alterazione dei metaboliti associati al microbiota, come le vitamine B7 e B12, correlata a un aumento dello stato infiammatorio e della fragilità che ha causato una diminuzione della mobilità intestinale. La restrizione calorica prolungata produce un aumento di *Lactobacillus*, mentre durante la disbiosi si verifica una diminuzione di *Proteobacteria*, *Lentisphaerae*, *Bacteroides*, *Parabacteroides*. Queste condizioni migliorano i livelli sierici di $TNF\alpha$, IL8, IL1 β e proteina C-reattiva(144). Gli antigeni derivati da varie specie di batteri (come i lipopolisaccaridi o il peptidoglicano) e dal metabolismo batterico generano una risposta da parte di vari tipi di cellule immunitarie. Le cellule più attivate sono i linfociti T regolatori della lamina propria che producono il fattore di crescita trasformante (Transforming Growth Factor- β , TGF- β) e una popolazione speciale di cellule dendritiche che producono IL-10 attraverso i recettori Toll-Like (TLR) presenti su di esse(145). I linfociti T regolatori downregolano le risposte delle cellule T-helper pro-infiammatorie, come le T-helper di tipo 1 (Th1), le T-helper di tipo 17 (Th17) e le T-helper di tipo 2 (Th2), mentre le cellule dendritiche sono in grado di polarizzare i linfociti T-helper naïve (Th0) per trasformarli in cellule regolatorie che producono IL4, IL10 e Tumor Growth Factor- β ; inoltre, stimolano anche i linfociti B a produrre IgA commensali specifiche(146,147). Questi linfociti non solo hanno un ruolo diretto nell'eliminare lo stato infiammatorio, ma i peptidi antimicrobici (AMP) secreti nello strato di muco sono molecole fondamentali per controllare il microbiota enterico in diversi modi. Gli AMP possono uccidere direttamente gli agenti patogeni, regolare i simbionti enterici e la risposta immunitaria, inoltre hanno la capacità chemiotattica di reclutare le cellule immunitarie dei linfociti e dei monociti(148,149). Diversi fattori esterni, come il trattamento antibiotico, i cambiamenti nella dieta, i patogeni gastrointestinali e gli effetti endogeni, possono alterare o deregolare il sistema immunitario intestinale, causando una potenziale disfunzione o una drammatica alterazione della comunità microbica(150,151). Durante la disbiosi, diversi parametri come il volume dell'acqua, le concentrazioni di ioni, la pressione osmotica e il pH potrebbero essere al di fuori dei valori fisiologici della popolazione microbica(152). Questo squilibrio omeostatico potrebbe determinare un'enorme crescita di diversi batteri e portare a un'infiammazione cronica aggressiva(150). Questa infiammazione cronica può danneggiare la mucosa e il sistema immunitario che gradualmente non dialoga correttamente con il microbiota e non induce una corretta tolleranza immunologica responsabile di diverse possibili malattie. È stato dimostrato che le alterazioni del

rapporto tra sistema immunitario e microbiota contribuiscono all'insorgenza di malattie a patogenesi infiammatoria. In condizioni di infiammazione, il sistema immunitario intestinale induce fattori pro-infiammatori che down-regolano le cellule T-Regs e stimolano Th1 e Th17 a secernere citochine e chemochine pro-infiammatorie. Alcune di esse, come IFN γ e IL17A, sono anche considerate in grado di promuovere la proliferazione cellulare e/o di inibire l'apoptosi, mentre le cellule immunologiche regolatorie vengono down-regolate(153). La via di segnalazione TLR (Toll-Like Receptors) è utile per modulare la composizione microbica e impostare il rapporto sistema immunitario-microbiota; i TLR possono essere considerati come un'interfaccia tra la barriera epiteliale intestinale, il microbiota e il sistema immunitario. L'attivazione della via da parte degli agenti patogeni è coinvolta nella patogenesi di diverse malattie(154). Come è stato dimostrato, il TLR4 (Toll-Like Receptor 4), un recettore di superficie cellulare che percepisce i lipopolisaccaridi batterici, aumenta gli effetti proliferativi e anti-apoptotici attraverso l'espressione dell'epiregulina epatomitogena nello sviluppo del tumore al fegato; mentre il TLR2 (Toll-Like Receptor 2), espresso sulla superficie delle cellule T-Reg, ha una via che può promuovere la tolleranza immunologica e permettere al sistema immunitario di discriminare tra batteri commensali e patogeni(155,156).

4.1 Microbiota e sistema immunitario ed emopoietico

La comprensione del microbiota intestinale funzionale potrebbe essere importante per chiarire la relazione con il sistema immunitario e l'omeostasi dell'ospite. L'immunità mucosale interagisce (cross-talk) con l'ambiente batterico stabilendo una tolleranza simbiotica che seleziona i batteri utili da quelli patogeni(157).

È ormai ben accettato che le funzioni essenziali per lo sviluppo dei mammiferi, come la corretta formazione e maturazione del sistema immunitario, richiedono la presenza di microrganismi benefici, noti come commensali(158).

Si ritiene che la disbiosi, o uno squilibrio nella composizione del microbiota, sia il principale fattore di una serie di malattie umane, come le malattie infiammatorie intestinali, la malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD) e l'infezione acuta da HIV(159).

Come è stato chiaramente dimostrato, il microbiota è fondamentale per la corretta maturazione delle cellule immunitarie e dei tessuti immunitari e svolge un ruolo di protezione contro i patogeni infettivi.

Inoltre, alcune composizioni del microbiota intestinale sono associate a disturbi dell'autoimmunità,

tra cui le malattie infiammatorie intestinali, diabete, asma e allergie(158,160).

Sebbene l'associazione tra il microbiota e il suo impatto diretto o indiretto del microbiota sull'emopoiesi sia limitata, è stato dimostrato che la dimensione del pool di cellule mieloidi del midollo osseo è fortemente correlata alla complessità del sistema emopoietico(161).

Date le evidenze a sostegno di un ruolo del microbiota nella normale emopoiesi, non sorprende che le alterazioni del microbiota, così come quelle di specifici microbi, siano associate a disturbi ematologici.

In alcuni casi, si ritiene che siano gli agenti patogeni a scatenare i disturbi ematologici; in altri casi, l'alterazione dell'omeostasi del microbiota è associata a esiti clinicamente significativi nei pazienti con patologie ematologiche.

È stato dimostrato che gli organismi microbici abbiano, in qualche modo, un impatto su ogni compartimento del sistema ematopoietico.

4.2 Microbiota e trombosi

In condizioni fisiologiche, la funzione di barriera intestinale è mantenuta da fattori fisici, tra cui le giunzioni strette tra le cellule epiteliali, la produzione di muco e l'immunità della mucosa. Nei pazienti con insufficienza cardiaca si osserva spesso un edema della parete intestinale e un'alterazione della funzione di barriera(162,163). Seguendo il concetto di leaky gut, un'alterata funzione di barriera intestinale porta alla traslocazione di prodotti batterici nella circolazione dell'ospite, con conseguente stato proinfiammatorio. Numerosi studi dimostrano che i pazienti con insufficienza cardiaca presentano alterazioni dell'integrità intestinale e che livelli elevati di citochine proinfiammatorie nel sangue siano correlati alla gravità dei sintomi e a esiti peggiori(164,165). In presenza di insufficienza cardiaca, il sovraccarico di fluidi venosi, l'attivazione simpatica adattativa con conseguente redistribuzione della circolazione sistemica e la bassa gittata cardiaca contribuiscono all'edema della parete intestinale e alla ridotta perfusione della mucosa(166). L'ipoperfusione intestinale nell'insufficienza cardiaca altera la funzione della mucosa, come evidenziato dall'aumento della permeabilità paracellulare e dalla maggiore formazione di biofilm batterici intestinali(167). Quando la barriera intestinale è compromessa, il lipopolisaccaride (LPS) proveniente da batteri Gram-negativi può entrare nella circolazione dell'ospite, dove viene riconosciuto principalmente dai TLR (toll-like receptor) sulla superficie delle cellule immunitarie(168). Al legame dei ligandi batterici, la segnalazione dei TLR induce il rilascio di

citochine proinfiammatorie che orchestrano uno stato proinfiammatorio nell'ospite.

L'aumento dei livelli di LPS e di altri prodotti della parete batterica, presumibilmente derivati dal microbiota intestinale, è stato collegato meccanicamente alla modulazione dell'infiammazione, dell'immunità e della funzione vascolare (figura 4). I pazienti con insufficienza cardiaca scompensata presentano livelli di endotossina più elevati nel sangue rispetto ai pazienti stabili(169). La traslocazione di LPS dall'intestino in questo contesto è supportata da concentrazioni di endotossina più elevate nella vena epatica rispetto al sangue prelevato direttamente dai ventricoli(170). Il rilevamento di microbiota intestinale e di metaboliti meta-organismici a livelli più elevati nei soggetti con malattie cardiovascolari o a rischio di eventi cardiovascolari può, in parte, riflettere alterazioni della funzione di barriera dell'ospite (Figura 4).

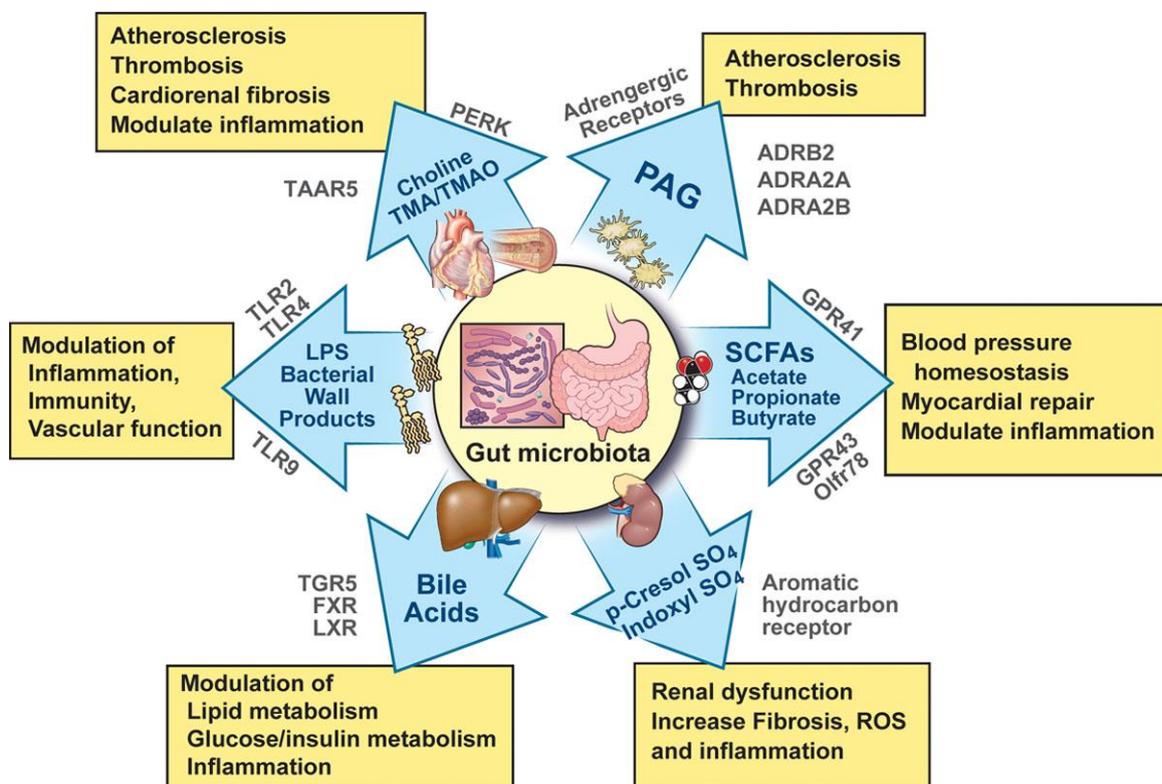


Figura 4. Vie molecolari e recettori dell'ospite che collegano prodotti e metaboliti derivati dal microbiota intestinale con fenotipi di malattie cardiovascolari. ADRA, recettore adrenergico alfa; ADRB, recettore adrenergico beta; FXR, recettore farnesolo X; GPR, recettore accoppiato a proteine G; LPS, lipopolisaccaride; LXR, recettore X epatico; Olfr, recettore olfattivo; PAG, fenilacetilglutammina; PERK, protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase; ROS, specie reattive dell'ossigeno; SCFA, acidi grassi a catena corta; TAAR, trace amine-associated receptor; TGR, takeda G-protein-coupled receptor; TLR, toll-like receptor; TMA, trimethylamine; e TMAO, trimethylamine N-oxide. (171)

In un recente studio osservazionale, le concentrazioni circolanti di LPS sono risultate predittive di eventi cardiaci avversi maggiori in una coorte di pazienti con fibrillazione atriale, suggerendo che la

traslocazione dell'endotossina ha un impatto sulle complicanze cardiovascolari(172).

È interessante notare che le differenze strutturali dei sottotipi di LPS di diverse specie microbiche intestinali sono state associate a un alterato riconoscimento dei TLR e ai loro effetti sull'immunità innata dell'ospite(173).

Il contributo causale del microbiota intestinale alla suscettibilità all'aterosclerosi è stato dimostrato per la prima volta con la scoperta della trimetilammina-N-ossido (TMAO) come fattore derivato dal microbiota intestinale e con i primi studi funzionali che hanno dimostrato sia che l'apporto diretto di TMAO accelerava l'aterosclerosi in modelli murini sia che la soppressione della conversione dipendente dal microbiota intestinale dei precursori dei nutrienti (colina) in TMA e TMAO (con antimicrobici/antibiotici) bloccava l'aumento dell'aterosclerosi dipendente dalla dieta a base di colina (figure 5 e 6)(174). Nei topi ApoE^{-/-} predisposti all'aterosclerosi, l'integrazione dietetica con colina ha portato a un aumento del carico di lesioni aterosclerotiche, a una maggiore espressione aortica dei recettori scavenger (CD36 e recettore scavenger A), a un aumento della formazione di cellule schiumose macrofagiche cariche di colesterolo e a un'alterazione del trasporto inverso del colesterolo in vivo. Inoltre, la TMAO ha soppresso le dimensioni del pool di BA e, di conseguenza, la clearance del colesterolo nell'ospite(175).

Studi recenti hanno dimostrato che, oltre a influenzare la funzione piastrinica, la TMAO induce l'espressione del TF - l'inziatore della coagulazione estrinseca - nelle cellule endoteliali in vitro(176). Il TF vascolare promuove la trombosi e l'infiammazione vascolare(177).

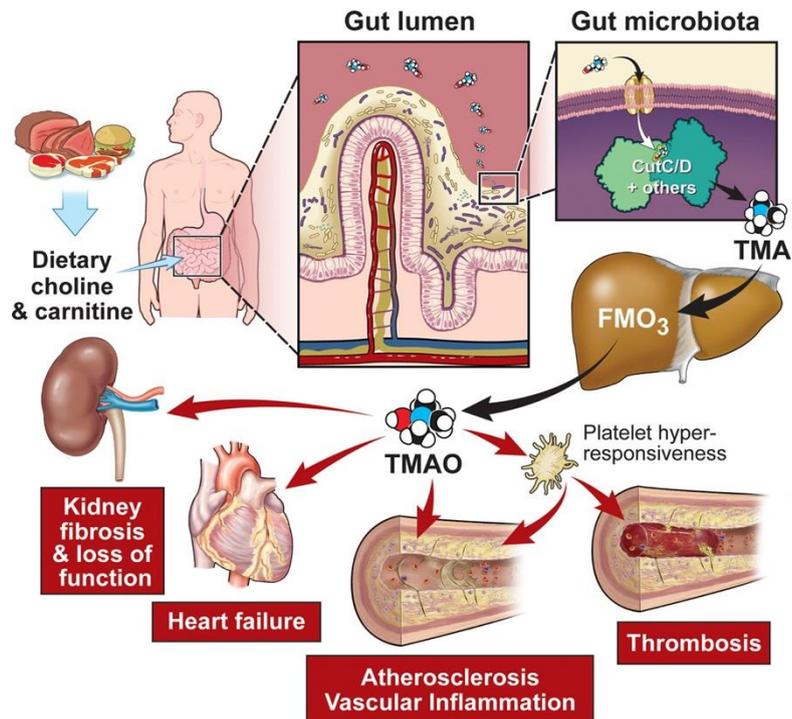


Figura 5. I precursori alimentari, come la colina e la carnitina, vengono metabolizzati in trimetilammina (TMA) dal microbiota intestinale attraverso geni specifici, tra cui i membri del cluster di geni cut (choline utilization) C/D. Le FMO (flavin monoossigenasi) epatiche dell'ospite ossidano la TMA in N-ossido di TMA (TMAO), che promuove cambiamenti metabolici e funzionali nell'ospite, tra cui danni agli organi finali cardiovascolari e renali.

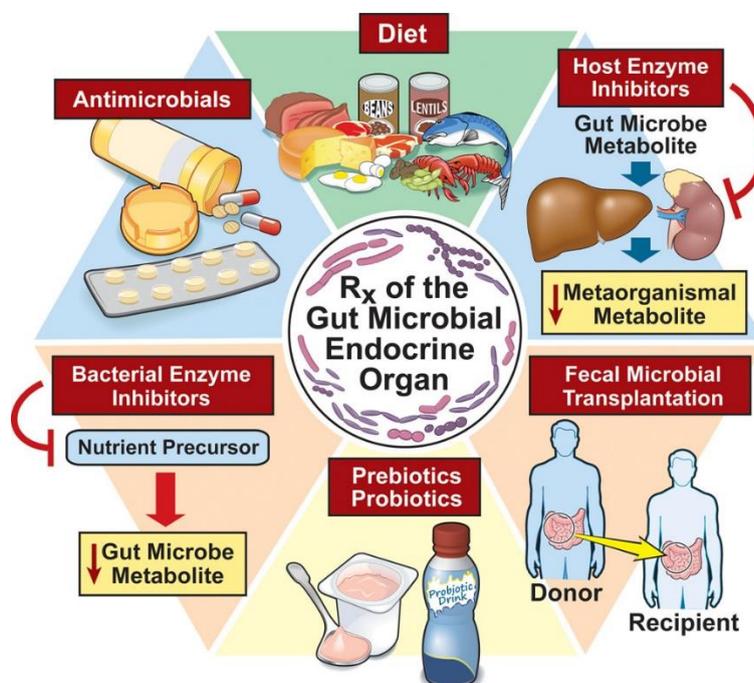


Figura 6. Illustrazione delle strategie attuali per migliorare le malattie cardiovascolari manipolando il microbiota intestinale, compresi gli interventi dietetici, gli enzimi dell'ospite coinvolti nella generazione di metaboliti metaorganismici, il trapianto di microbi fecali, i pre/probiotici, gli inibitori degli enzimi batterici e gli antimicrobici.

5. LO STUDIO CLINICO

5.1 RAZIONALE DELLO STUDIO

La gestione della PV si concentra principalmente sulla minimizzazione del rischio trombotico, che rappresenta la principale causa di morbilità e mortalità (178).

Negli ultimi anni, le vescicole extracellulari (EVs) sono emerse come modulatori chiave dell'immunità e dell'infiammazione, che giocano un ruolo fondamentale nella genesi trombotica(179). Le EVs provenienti da cellule immunitarie e non, come le cellule staminali mesenchimali e le cellule endoteliali, contribuiscono alla regolazione immunitaria antigene-specifica e non specifica.

Recentemente, è stato riportato che il numero e il carico, tra cui proteine, microRNA e RNA lunghi non codificanti, sono upregolati nelle EVs di pazienti con tumori del sangue, suggerendo che le EVs circolanti potrebbero essere un marcatore diagnostico per questi disturbi (121,129).

È interessante notare che si stanno accumulando prove indicative della presenza di una componente microbica nel sangue di individui umani sani (180,181). Inoltre, le EVs possono contenere una serie di molecole immunostimolanti associate ai microbi, tra cui il lipopolisaccaride (LPS) derivato dai batteri Gram-negativi. È stato ipotizzato che il carico peculiare di componenti del microbioma nelle EVs possa controllare il loro potenziale infiammatorio complessivo.

Per quanto riguarda le trombosi, queste possono verificarsi prima o al momento della diagnosi e/o dopo la diagnosi (51,182), tuttavia, i fattori di rischio convenzionali (età e precedente trombotico) non sono specifici per la PV e predicono un aumentato rischio trombotico solo dopo che uno o due di questi elementi si sia realizzato.

La fibrosi midollare nei pazienti con PV è capace di predire il rischio di evoluzione in MF(81), tuttavia, l'unico modo per poter eseguire una valutazione della fibrosi è la biopsia osteomidollare. Non esistono metodi non invasivi associati ad una aumentata fibrosi midollare, all'infuori dell'omozigosi della mutazione V617F di JAK2(183).

In questo studio abbiamo cercato di identificare una "signature" nei pazienti con PV analizzando il fenotipo e il carico di DNA microbico delle EVs circolanti e indagando la composizione del microbiota intestinale.

Secondo obiettivo dello studio è quello di individuare delle caratteristiche fenotipiche delle EVs e

del DNA microbico in esse presente associate ad un aumentato rischio trombotico e alla fibrosi midollare.

5.2 Metodi

5.2.1 Pazienti e Design dello Studio

Lo studio "EV-PV" è uno studio clinico-biologico monocentrico promosso dall'Istituto di Ematologia "L. e A. Seràgnoli", S. Orsola-Malpighi di Bologna, ed è stato realizzato in collaborazione con il Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie dell'Università di Bologna.

Dopo l'approvazione del Comitato Etico locale, lo studio EV-PV è stato condotto secondo la dichiarazione di Helsinki. Il consenso informato è stato ottenuto da parte di tutti i soggetti partecipanti.

La diagnosi di PV è stata eseguita secondo i criteri dell'OMS 2016(79). I pazienti con PV sono stati trattati secondo la pratica clinica standard e sono stati valutati retrospettivamente per eventi trombotici e altri parametri di outcome (emorragie, infezioni, seconda neoplasia, evoluzione in Mielofibrosi post-PV, in leucemia mieloide acuta, morte).

I criteri di esclusione erano la malattia in fase acuta e il trattamento antibiotico nei due mesi precedenti lo studio. Gli eventi trombotici sono stati oggettivamente identificati in base alla diagnostica per immagini. Sono stati considerati solo gli eventi trombotici maggiori (trombosi arteriose: infarto miocardico acuto, angina pectoris, ictus ischemico, attacco ischemico transitorio, arteropatia cronica periferica; trombosi venose: embolia polmonare, trombosi venosa profonda, trombosi splancnica, trombosi del seno cerebrale).

Le trombosi dopo la diagnosi sono state definite come eventi verificatisi a più di quattro settimane dalla diagnosi.

Le categorie di fibrosi midollare sono state identificate secondo i criteri dell'OMS 2016(79).

5.2.2 Raccolta di sangue periferico e piastrine e preparazione del plasma povero di piastrine

In breve, sono stati raccolti campioni di sangue periferico in EDTA e di feci dai pazienti affetti da PV, indipendentemente dal momento della diagnosi, e da donatori sani appaiati per età e sesso (HD).

Dopo aver scartato i primi 2 ml di sangue, il plasma povero di piastrine (PPP) è stato ottenuto (entro

2 ore dal prelievo) dopo due centrifugazioni consecutive a 2500 × g per 15 minuti a temperatura ambiente. Il PPP è stato quindi aliquotato e conservato a -80°C fino al momento dell'analisi.

5.2.3 Identificazione e caratterizzazione delle vescicole extracellulari (EVs) circolanti mediante citometria a flusso

Le EV circolanti di origine megacariocitaria (caratterizzate dall'essere CD61+/CD62P-) e di origine piastrinica (CD61+/CD62P+), contenenti fattore tissutale [TF] (CD142+) e le fosfatidiletanolamina [PE] (duramicina+) sono state analizzate mediante citometria a flusso (Navios, Beckman Coulter, Milano, Italia), dopo scongelamento del PPP a 37°C. Il PPP (100 µl) è stato incubato a 4°C per 15 minuti con gli anticorpi, quindi diluito 1:3 e acquisito immediatamente (l'elenco degli anticorpi monoclonali in base al sottotipo di EVs è riportato nella Tabella 4).

Sottotipi di EVs	Identificati come	Reagenti e anticorpi monoclonali
EVs di origine megacariocitaria	CD61+/CD62P-	Anti-CD61 (Clone: SZ21; FITC-conjugated; Catalog number IM1758); Anti- CD62P (Clone: CLB-THROMB/6; PE-coniugated; Catalog number IM1759U). All antibodies from Beckman Coulter S.r.l.
EVs di origine piastrinica	CD61+/CD62P+	Anti-CD61 (Clone: SZ21; FITC-conjugated; Catalog number IM1758); Anti- CD62P (Clone: CLB-THROMB/6; PE-coniugated; Catalog number IM1759U). All antibodies from Beckman Coulter S.r.l.
EVs tetraspanine +	CD81+/CD9+/CD63+	Anti-CD81 (Clone: REA513; APC-conjugated; Catalog number 130-119-825) from Miltenyi Biotec; Anti-CD9 (Clone: REA1071; FITC-conjugated; Catalog number 130-118-806) from Miltenyi Biotec; Anti-CD63 (Clone: H5C6; PE-coniugated; Catalog number 130-100-158) from Miltenyi Biotec.
EVs lipopolisaccaridi +	LPS+	Anti-Lipopolysaccharide (LPS) (FITC-conjugated; Catalog number LAB526Ge82) from Cloud-Clone Corp.
EV fattore tissutale +	CD142+	Anti-CD142 (Clone: NY2; APC-conjugated; Catalog number 365206) from BioLegend
EVs fosfatidiletanolamine +	Duramicin+	number 130-113-852) from Miltenyi Biotec;

Tabella 4. Lista degli anticorpi monoclonali e dei reagenti divisi per sottotipi di EV.

Per rilevare le EVs, lo strumento è stato calibrato con le microsferi MegaMix (Stagò, Marsiglia,

Francia).

Sono state utilizzate microsfere di polistirene di diverse dimensioni, con gate a fluorescenza per distinguere le EVs grandi (500-900 nm), piccole (200-300 nm) e nane (100-160 nm). Il laser Violet Side Scatter (VSSC) è stato utilizzato come segnale di attivazione per discriminare il rumore.

La nostra analisi si è concentrata sulle EVs di grandi dimensioni che sono state identificate in base alle dimensioni e alla capacità di legare specifici anticorpi monoclonali. Per selezionare il cut-off sono stati utilizzati controlli isotipici corrispondenti.

Utilizzando il gate definito per le EVs di grandi dimensioni, sono stati registrati tutti gli eventi positivi per la colorazione del marcatore.

5.2.4 Isolamento delle EVs circolanti, enumerazione, morfologia, fenotipo e caratterizzazione

Le EVs sono state isolate dal PPP scongelato (2 ml a 37°C) mediante ultracentrifugazione a 100.000 × g per 2 ore a 4°C con ultracentrifuga Optima L-90 K (Beckman Coulter) dotata di rotore tipo 50.2 Ti. Dopo centrifugazione, le EVs sono state risospese e filtrate due volte (dimensione dei pori del filtro, 0.22 µm) e lavate con PBS di Dulbecco (DPBS; Sigma Aldrich). Infine, le EVs sono state risospese in soluzione tampone salina con l'1% di DMSO e conservate a - 80°C fino al momento dell'uso. La purezza delle vescicole è stata valutata con la tecnologia NanoSight (NanoSight NS300-Malvern Panalytical Ltd., Royston, Regno Unito) e l'analisi di tracciamento delle nanoparticelle (NTA Proprietary Software-Malvern Panalytical Ltd.).

È stata eseguita anche un'analisi al microscopio elettronico a trasmissione delle EVs isolate. I campioni sono stati trattati per la colorazione negativa mediante fasi di adsorbimento, lavaggio e colorazione. La sospensione (10 µl) è stata posta su una griglia rivestita di carbone e dopo 30 secondi di adsorbimento, è stata rimossa lentamente e delicatamente da pezzi di carta bibula senza toccare direttamente la griglia.

In seguito, sono state utilizzate una serie di gocce di acqua distillata per rimuovere i sali interferenti. Dieci microlitri di acqua all'1% di soluzione di acetato di uranile, pH 4.4, sono stati utilizzati per la colorazione negativa, per 5-10 secondi.

Le gocce di colorante sono state rimosse delicatamente come descritto sopra. Dopo asciugatura, i reticoli sono stati osservati con un microscopio Philips CM 100 (TSS, Hillsboro, OR, USA), registrati con una fotocamera digitale (Olympus, Milano, Italia) e misurati digitalmente con il software iTEM. Le EVs isolate sono state caratterizzate mediante analisi citofluorimetrica utilizzando anticorpi

monoclonali contro le tetraspanine (CD9, CD63, CD81), CD61, CD62P e lipopolisaccaridi (LPS).

Le IgG isotipiche di topo coniugate sono state utilizzate come controllo.

5.2.5 Estrazione di DNA microbico da feci e dalle EV isolate

I campioni fecali sono stati immediatamente congelati a -20 °C e poi consegnati all'Unità di Ecologia Microbica della Salute (Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie, Università di Bologna), dove sono stati conservati a -80 °C fino alla lavorazione.

Il DNA microbico è stato estratto dalle feci (250 mg) e dalle EV isolate (2 ml di PPP).

EVs isolate (2 ml di PPP) utilizzando il metodo della ripetizione del bead-beating e delle colonne. In breve, tutti i campioni sono stati sospesi in 1 ml di tampone di lisi (500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM EDTA e 4% (p/v) SDS), con quattro microsfere di vetro da 3 mm e 0,5 g di microsfere di zirconio da 0,1 mm (BioSpec Products, Bartlesville, OK) e battuti in uno strumento FastPrep (MP Biomedicals, Irvine, CA) a 5,5 movimenti/sec per 1 minuto. È stata eseguita una sola fase di omogeneizzazione per i campioni di EVs, mentre per i campioni di feci è stata ripetuta tre volte, incubando i campioni in ghiaccio per 5 min tra un trattamento e l'altro. Dopo l'incubazione a 95°C per 15 minuti, tutti i campioni sono stati centrifugati a 13.000 rpm per 5 minuti. Gli acidi nucleici sono stati precipitati aggiungendo 260 µl di acetato di ammonio 10 M e un volume di isopropanolo. I pellet sono stati poi lavati con etanolo al 70% e sospesi in 100 µl di tampone TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8). L'RNA è stato rimosso mediante trattamento con 2 µl di RNasi senza DNasi 10 mg/ml a 37°C per 15 minuti. La rimozione delle proteine e la purificazione del DNA su colonna sono state eseguite utilizzando il kit DNeasy Blood and Tissue (QIAGEN, Hilden, Germania) e seguendo le istruzioni del produttore.

Sono stati processati anche i controlli privi di template (cioè il terreno RPMI e i reagenti del kit di estrazione) e sono stati trattati allo stesso modo dei campioni.

Il DNA è stato quantificato con lo spettrofotometro NanoDrop ND-10000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE).

5.2.6 Amplificazione del gene 16S rRNA e sequenziamento

La regione ipervariabile V3-V4 del gene 16S rRNA è stata amplificata da DNA estratto da EV isolate, campioni di feci e controlli senza piastra, utilizzando i primer 341F e 785R con adattatore Illumina con sequenze di adattamento overhang Illumina. Le reazioni di PCR sono state eseguite utilizzando KAPA HiFi HotStart ReadyMix (Roche, Mannheim, Germania), in un Thermal Cycler T

(Biometra, Göttingen, Germania) con il seguente gradiente: 3 min a 95°C per la denaturazione iniziale, 25 cicli di denaturazione a 95°C per 30 secondi, annealing a 55°C per 30 secondi e allungamento a 72°C per 30 secondi e una fase finale di elongazione a 72°C per 5 minuti.

I prodotti di PCR di circa 460 bp sono stati purificati con un sistema a microsferi magnetiche (Agencour AMPure XP, Beckman Coulter), e una PCR a ciclo limitato con la tecnologia Nextera è stata eseguita per ottenere la libreria indicizzata. Le librerie indicizzate sono state raggruppate a una concentrazione equimolare di 4 nM, denaturate con NaOH 0,2 N e diluite a 5 ppm prima di essere caricate sulla cella a flusso Illumina MiSeq. Il protocollo di sequenziamento 2 × 250 bp paired-end è stato eseguito secondo le istruzioni del produttore (Illumina, San Diego, CA). Le letture del sequenziamento sono state depositate nel Centro nazionale per l'informazione biotecnologica (NCBI SRA, National Center for Biotechnology Information Sequence Read Archive) con il seguente progetto numero di progetto: PNRxxx.

5.2.7 Bioinformatica e biostatistica

L'analisi statistica è stata eseguita presso il Dipartimento di Farmacia e Biotecnologie e presso il laboratorio di biostatistica dell'Unità MPN dell'Istituto di Ematologia "L. e A. Seràgnoli", IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna.

Le sequenze grezze sono state elaborate utilizzando una pipeline che combina PANDAseq(184) e QIIME 2(185). Dopo aver valutato la lunghezza (min/max = 350/500 bp) e il filtraggio della qualità (parametri predefiniti), le letture pulite sono state suddivise in varianti di sequenza degli ampliconi (ASV) utilizzando DADA2(186,187). La tassonomia è stata assegnata mediante l'algoritmo VSEARCH(188), utilizzando come riferimento il database Greengenes (versione maggio 2013). Tutti gli ASV singleton sono stati scartati.

Inoltre, per le EVs, le ASV sono state considerate contaminanti putativi e quindi rimossi quando la loro abbondanza relativa media non superava il 20% di quella dei controlli, in modo simile a quanto precedentemente applicato da Dash e colleghi(189). La diversità alfa è stata valutata utilizzando due diverse metriche: Shannon e l'inverso di Simpson (1/D). L'indice di similarità di Jaccard è stato utilizzato per costruire i grafici dell'analisi delle coordinate principali (PCoA).

Le analisi statistiche sono state eseguite con R 3.6.1, utilizzando R Studio 1.2.1335 e i pacchetti vegan, made4 e stats. La significatività della separazione dei dati nella PCoA è stata verificata mediante un test di permutazione con pseudo-F ratio (funzione adonis del pacchetto vegan). Il test Wilcoxon rank-sum è stato utilizzato per valutare le differenze significative tra i gruppi (per diversità

intra- e inter-individuale e per l'abbondanza relativa dei taxon), mentre il test di Kruskal-Wallis è stato utilizzato per i confronti multipli. I valori P sono stati corretti per i test multipli utilizzando il metodo di Benjamini-Hochberg, e un tasso di falsa scoperta (FDR) $\leq 0,05$ è stato considerato statisticamente significativo.

Per quanto riguarda il fenotipo delle EVs, l'analisi statistica è stata eseguita con GraphPad (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA). Le differenze tra i gruppi sono state analizzate con Mann-Whitney, Chi-quadro o test di correlazione di Spearman, a seconda dei casi. I valori di P sono stati considerati significativi quando $\leq 0,05$ (a 2 code).

5.3 Risultati

5.3.1 Caratteristiche generali

Trentotto pazienti con PV (35 JAK2V617F e 3 JAK2Exon12- mutati) sono stati inclusi nello studio dopo un tempo mediano dalla diagnosi di PV di 2,6 anni (range 0,1-13,6). Al momento dell'arruolamento, tutti i pazienti erano in terapia con salasso e antiaggregante (principalmente aspirina a basso dosaggio); l'idrossiurea era in corso nell'81,6% dei pazienti. Nessun paziente aveva ricevuto una terapia con anagrelide, busulfano, interferoni o ruxolitinib. Sono stati inoltre raccolti campioni di sangue periferico e fecale in 30 donatori sani (healthy donors, HD).

Rispetto ai pazienti con PV, gli HD hanno presentato livelli di piastrine/leucociti/ematocrito significativamente più bassi ed erano meno frequentemente trattati con aspirina a basso dosaggio.

5.3.2 Caratterizzazione delle EVs di origine piastrinica (PLT-EV), megacariocitaria (MK-EV), e contenenti lipopolisaccaride (LPS-EV)

Il profilo delle PLT-EV e delle MK-EV è stato valutato mediante citometria a flusso nel plasma di pazienti e HD (figura 6).

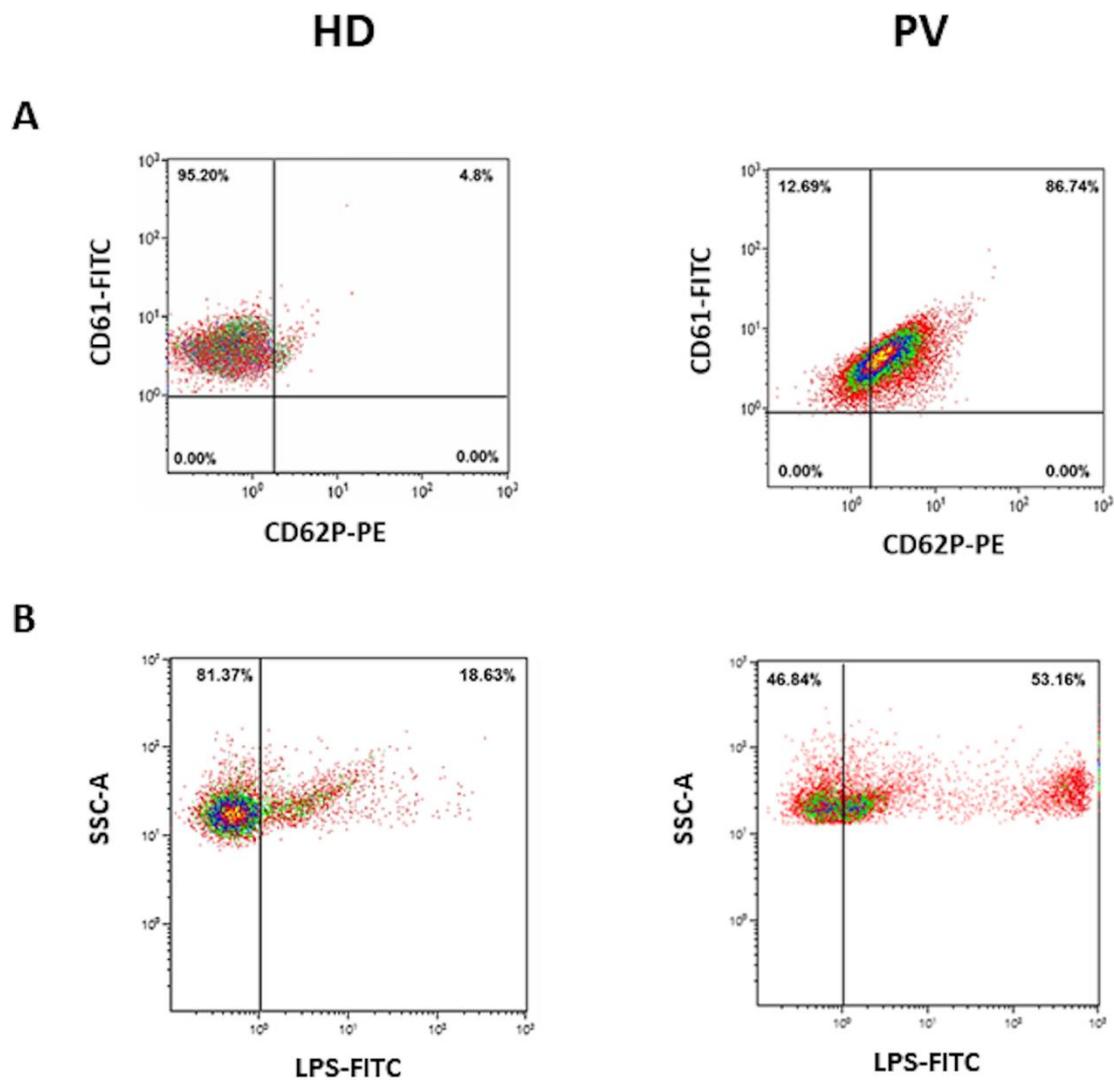


Figura 6. Profilo delle EVs nei pazienti con PV e nei donatori sani.

Le MK-EV plasmatiche sono risultate significativamente ridotte nei pazienti con PV ($p < 0,001$; Figura 7A); al contrario, le PLT-EV erano significativamente aumentate ($p < 0,001$; Figura 7B). Sia nei pazienti che nei HD, la proporzione di MK-EV e PLT-EV plasmatiche non era influenzata dal sesso o dall'età >60 anni. Non sono state inoltre osservate differenze tra i pazienti con/senza precedente trombosi o trattati/non trattati con idrossiurea.

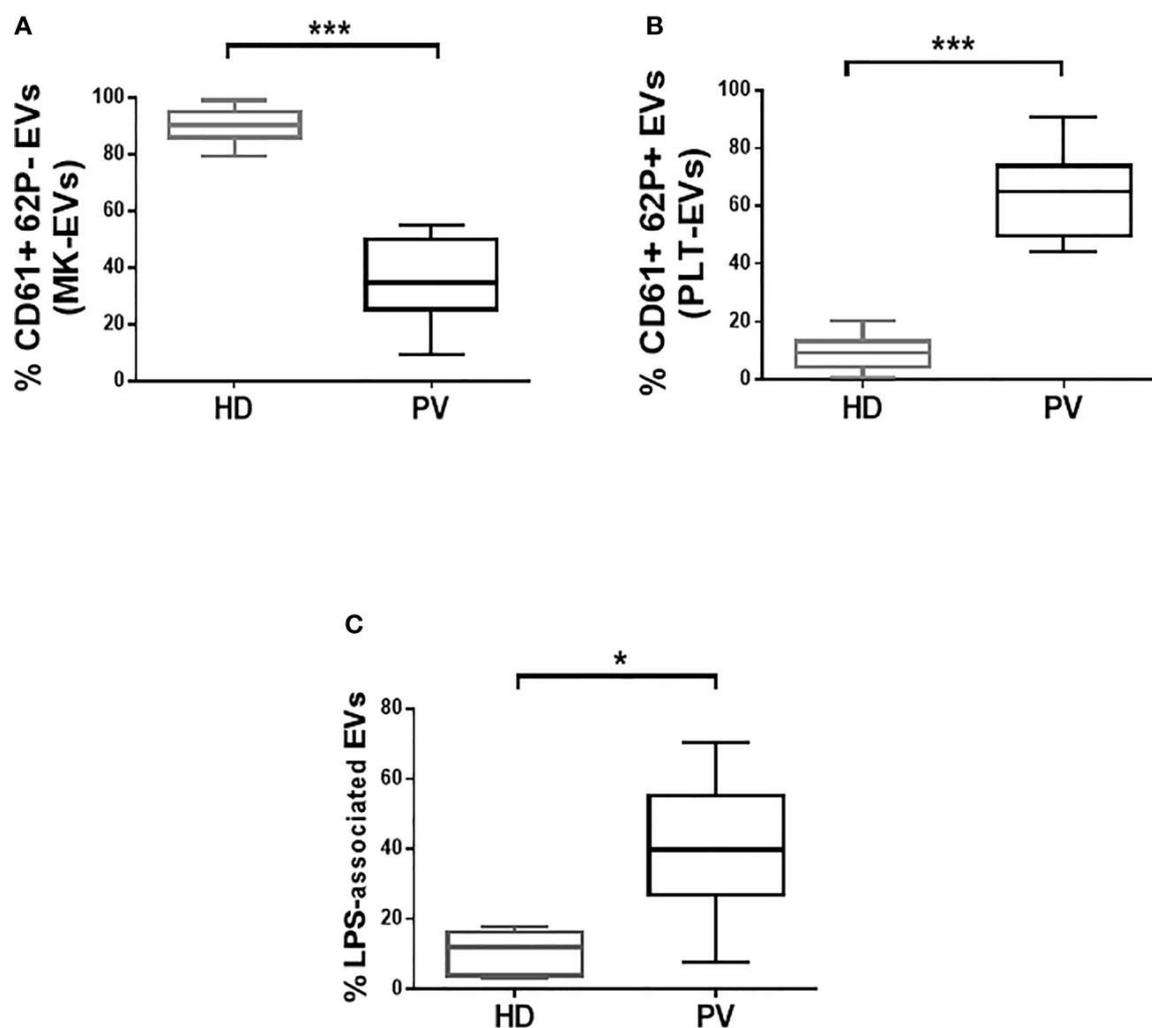


Figura 7. Proporzioe di MK- e PLT-EV plasmatiche e di EV isolate associate a LPS in pazienti con PV e HD. (A, B) Profilo di MK-EVs e PLT-EVs in pazienti con PV (n = 38) e HD (n = 30). I dati sono espressi come percentuale di MK-EVs e PLT-EVs e presentati da min a max con mediana (test di Mann-Whitney; *p < 0,05; ***p < 0,001). (C) Proporzioe di EV isolate associate a LPS di pazienti PV (n = 28) e HD (n = 20).

Abbiamo anche analizzato il fenotipo, le dimensioni e la morfologia delle EVs isolate. È interessante notare che, rispetto ai HD, i pazienti con PV hanno mostrato una maggiore proporzioe di EVs isolate associate a LPS (p<0,05; Figura 7C).

Le tetraspanine (CD9, CD81 e CD63) sono state altamente espresse dalla maggior parte delle EVs isolate sia da pazienti che da HD (figura 8 A-D).

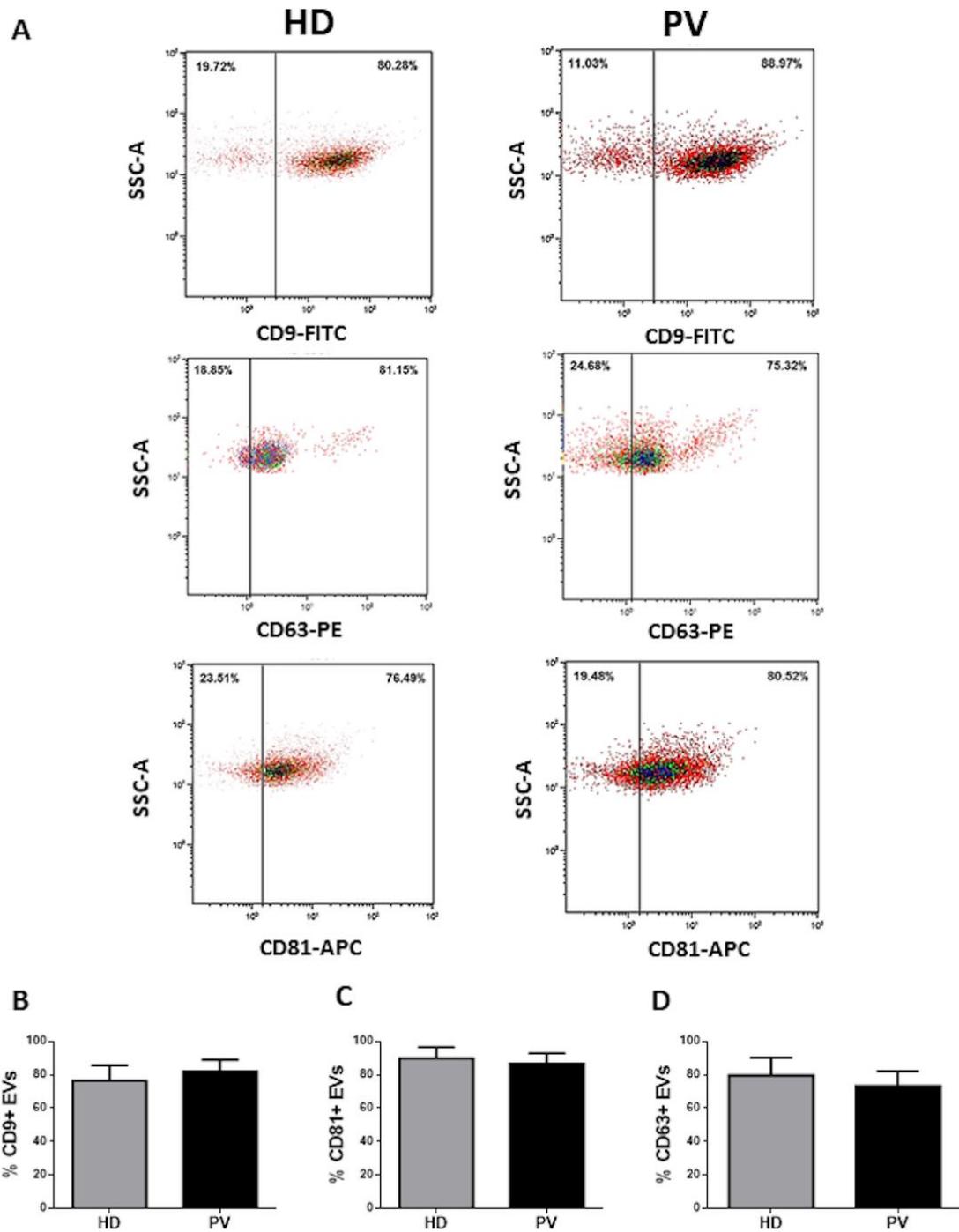


Figura 8. Valutazione delle EVs esprimenti tetraspanine.

A differenza della concentrazione (figura 9A), le EV isolate dai pazienti con PV erano significativamente più piccole della controparte HD ($p < 0,001$; figura 9B-C). L'analisi al microscopio elettronico a trasmissione ha mostrato EV di forma rotonda sia nei pazienti PV che HD (figura 9D).

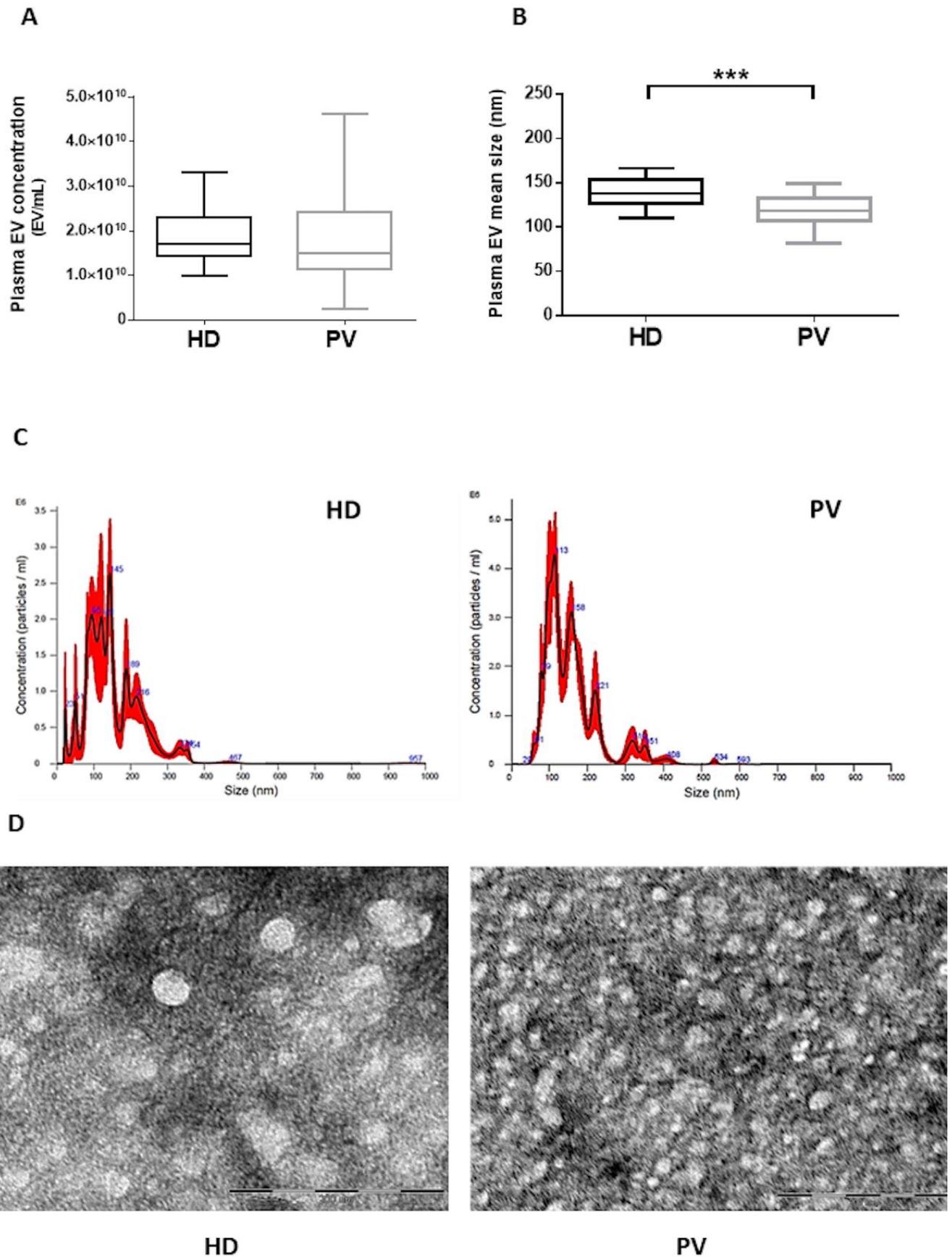


Figura 9. Valutazione della concentrazione (A), dimensione (B-C) delle EVs e osservazione al microscopio ottico (D).

5.3.3 Caratterizzazione del DNA microbico interno alle EVs

Le EVs isolate sono state sottoposte a NGS basato sul gene 16S rRNA per valutare se il DNA microbico potesse essere rilevato e se potesse essere identificata una signature specifica per la PV. Un totale di 1.799.864 letture di sequenza, con una media di 22.220 (\pm 5.974, SD) per campione, sono state ottenute e analizzate. Secondo indice di Simpson e di Shannon, la diversità microbica associata alle EVs è risultata più elevata nei pazienti con PV ($p < 0,001$, Figura 10).

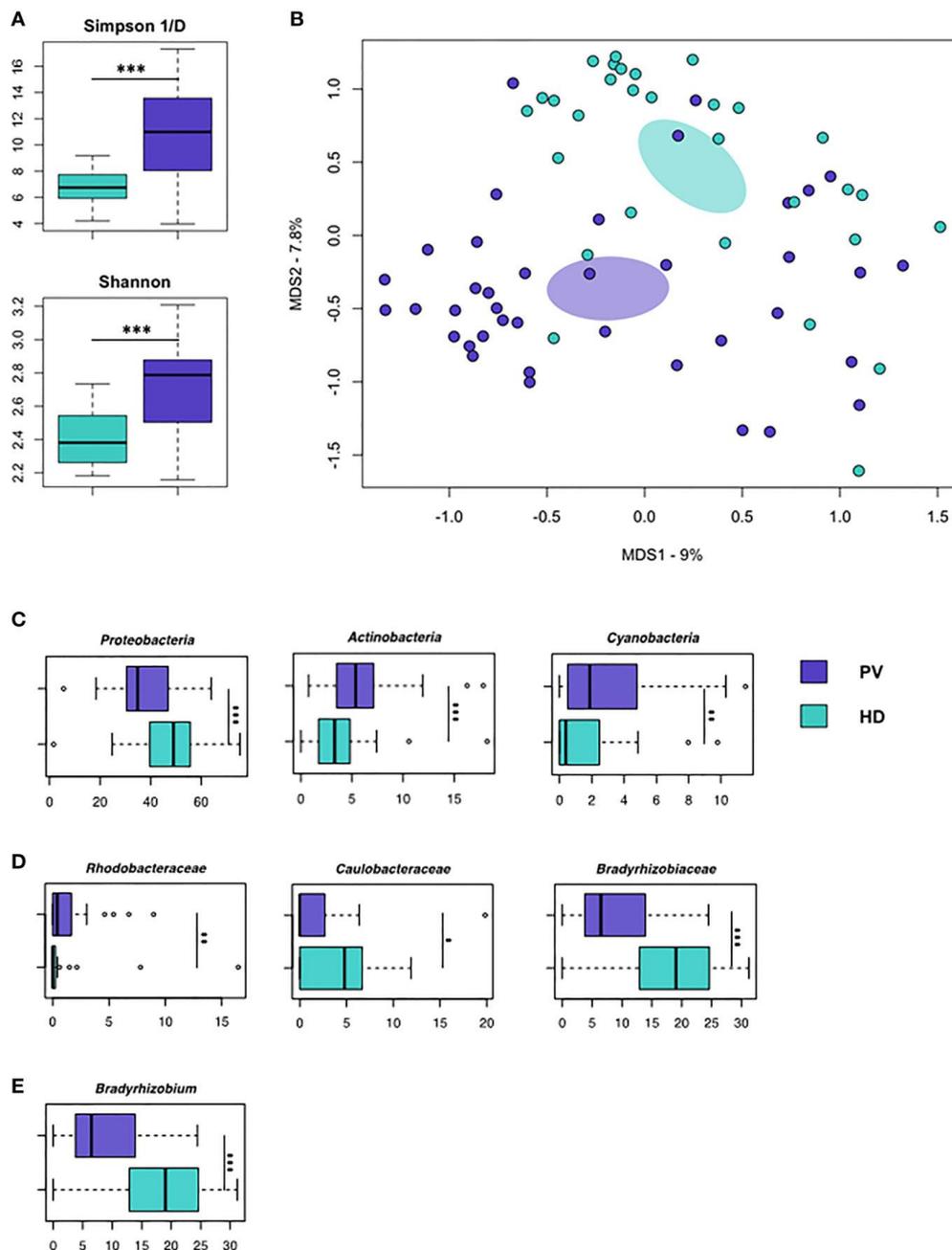


Figura 10. Carico di DNA microbico delle EV isolate in pazienti con PV e HD. (A) Diversità alfa stimata secondo gli indici inversi di Simpson (in alto) e Shannon (in basso). (B) Analisi delle coordinate principali (PCoA) basata sulla similarità di Jaccard tra i profili a livello di genere delle EV di pazienti con PV e HD. (C-E) Distribuzione dell'abbondanza relativa di phyla, famiglie e generi. Sono mostrati solo i taxa batterici con abbondanza relativa media $\geq 1\%$ in almeno uno dei gruppi di confronto.

Analisi delle coordinate principali (PCoA) basata sulla similarità di Jaccard tra i profili a livello di genere ha mostrato una separazione tra pazienti con PV e HD ($p=0,001$; Figura 10B). È interessante notare che i confronti tassonomici hanno rivelato numerose differenze tra il DNA microbico associato alle EVs dei pazienti con PV e HD.

I pazienti con PV erano impoveriti in DNA legato ai proteobatteri, mentre si sono arricchiti di quello di Actinobacteria e Cyanobacteria, rispetto agli HD ($p<0,001$; $p<0,01$; Figura 10C). A livello di famiglia, i taxa più rappresentati (con un'abbondanza relativa media $\geq 1\%$ in almeno uno dei gruppi di studio) sono stati i Rhodobacteraceae ($p<0,01$), le Caulobacteraceae ($p<0,05$) e le Bradyrhizobiaceae ($p<0,05$), le cui proporzioni erano maggiori nei pazienti con PV (figura 10D).

I dati a livello di genere hanno mostrato un impoverimento di Bradyrhizobium nei pazienti con PV ($p<0,001$; Figura 10E).

5.3.4 Caratterizzazione del microbioma fecale

Anche i campioni fecali dei pazienti con PV e HD sono stati profilati mediante 16S rRNA gene-based NGS. Un totale di 2.296.462 letture di sequenza, con una media di 33.772 (± 11.228 , SD) letture per ogni campione.

Il confronto dei profili del microbioma a livello di phylum, famiglia e genere non ha rivelato alcuna differenza significativa tra pazienti con PV e HD, dimostrando un microbioma intestinale complessivamente eubiotico nella PV (Figura 11A-B).

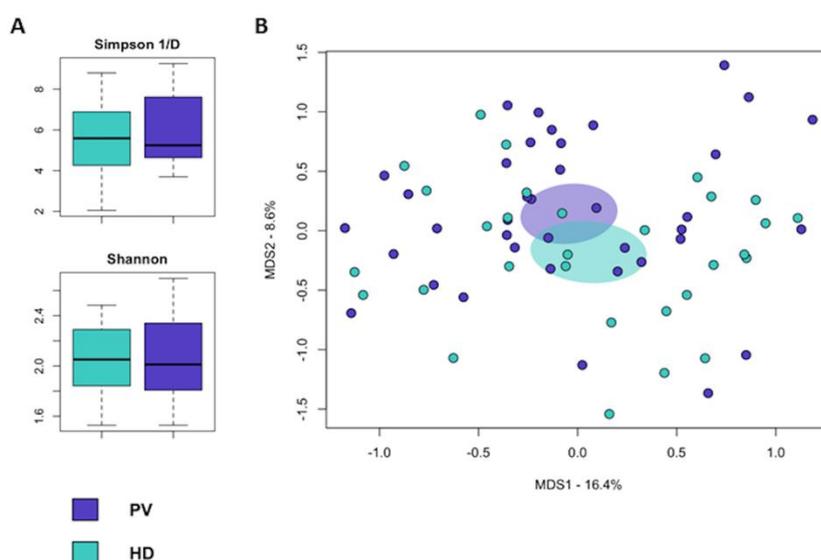


Figura 11. Diversità del microbiota fecale dei pazienti con PV e dei HD.

5.3.5 Le EVs circolanti di pazienti con PV sono portatrici di un fenotipo distintivo legato alla trombosi/fibrosi

Abbiamo confrontato il fenotipo delle EVs di pazienti affetti da PV con o senza trombosi o fibrosi midollare.

I pazienti con anamnesi di trombosi hanno mostrato una proporzione significativamente aumentata e ridotta proporzione di MK-EVs e PLT-EVs, rispettivamente, rispetto ai pazienti senza trombosi ($p < 0,05$; figura 12A-B). Non sono state osservate differenze nelle proporzioni di MK-EV e PLT-EV tra i pazienti con PV ad alto rischio trombotico e quelli con PV a basso rischio.

Abbiamo poi analizzato le PE-EV circolanti. In particolare, non è stata osservata alcuna differenza significativa nel confronto tra pazienti con e senza trombosi. Tuttavia, analizzando i fattori di rischio cardiovascolare (fumo, ipertensione, diabete e dislipidemia), la proporzione di TF-EV è risultata significativamente aumentata solo nei pazienti affetti da PV con ipertensione ($p < 0,05$; figura 12C) e correlata positivamente con l'età ($p < 0,05$; figura 12D). Inoltre, solo la proporzione di TF-EV era significativamente correlata con il burden allelico di JAK2^{V617F} ($r = 0,33$, $p < 0,05$; Figura 12E).

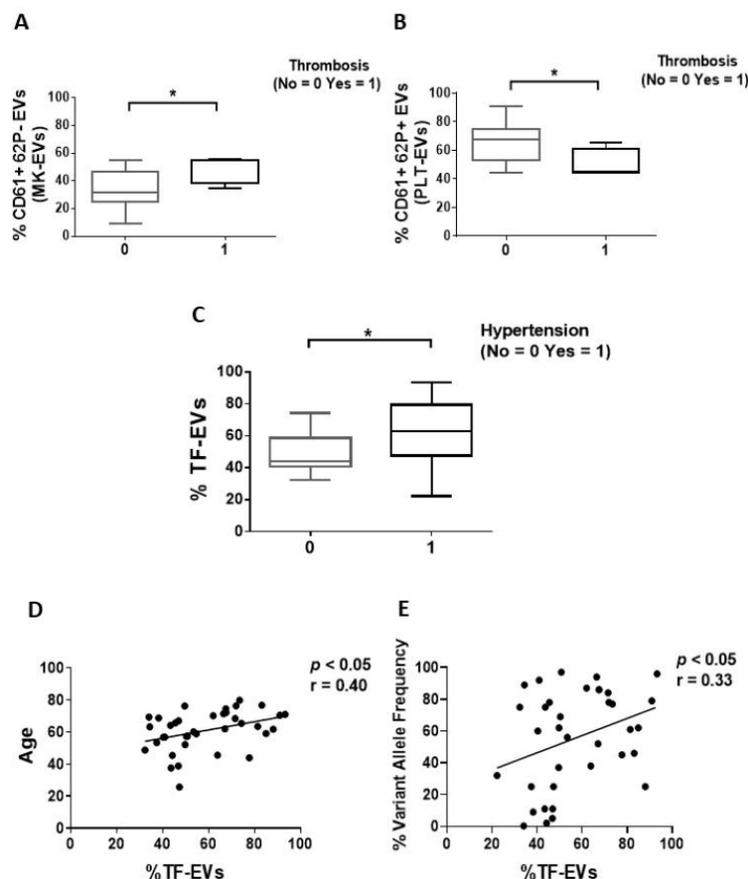


Figura 12. Proporzioni di MK-, PLT- e TF-EV circolanti nei pazienti con PV. (A, B) Frequenza di MK- e PLT-EV in pazienti con PV con ($n = 14$) o senza storia di trombosi ($n = 24$). (C) Frequenza di TF-EV nei pazienti con PV con ($n = 24$) o senza ($n = 14$) ipertensione. (D, E) Le percentuali di TF-EV dei pazienti con PV sono correlate positivamente con l'età e la frequenza del burden allelico di JAK2^{V617F}.

La proporzione di PE-EV era significativamente aumentata nei pazienti con PV ad alto rischio ($p < 0,05$; Figura 13A) e nei pazienti affetti da PV con ipertensione ($p < 0,05$; Figura 13B) e correlata positivamente con l'età ($p < 0,05$; Figura 13C).

Valutando la fibrosi midollare, solo le PE-EV sono risultate significativamente aumentate nei pazienti con fibrosi rispetto ai pazienti senza fibrosi ($p < 0,05$; Figura 13D).

Da notare che non sono state osservate differenze quando le EVs sono state confrontate tra i pazienti con mutazione JAK2^{V617F} e quelli mutati nell'esone 12.

Nel loro insieme, questi risultati dimostrano che un fenotipo distinto delle EV isolate è associato a una storia di trombosi o di fibrosi midollare nei pazienti con PV.

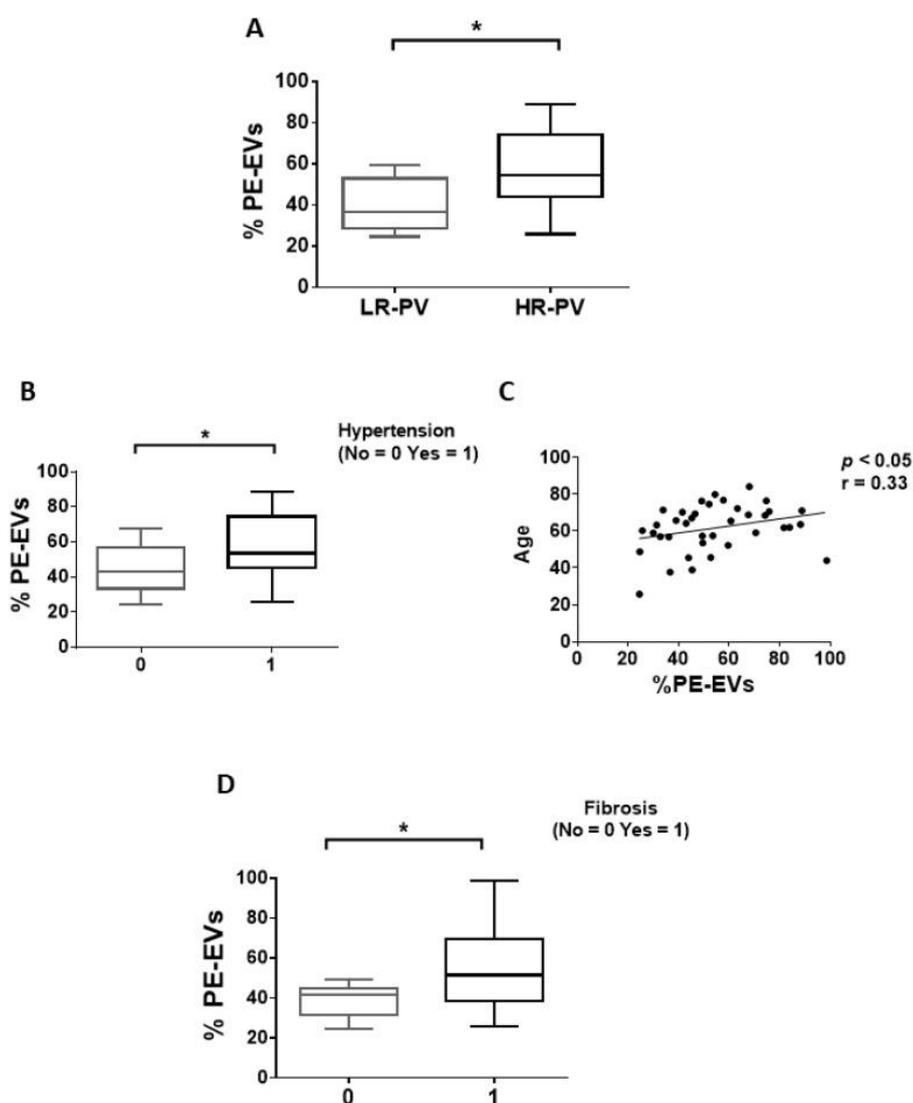


Figura 13. Proporzioe di PE-EV circolanti nei pazienti con PV. (A) Frequenza di PE-EV in pazienti con PV a basso rischio (LR-PV; $n = 11$) vs. alto (HR-PV; $n = 27$). (B) Proporzioe di PE-EV di pazienti con PV con ($n = 24$) o senza ($n = 14$) ipertensione. (C) Le percentuali di PE-EV dei pazienti con PV sono correlate positivamente con l'età (test di correlazione di Spearman). (D) Frequenza di PE-EV nei pazienti con PV con ($n = 10$) o senza ($n = 28$) fibrosi midollare.

5.3.6 Le EV isolate di pazienti affetti da PV mostrano una signature di trombosi associata a LPS

Abbiamo quindi cercato di analizzare se le EVs isolate dal plasma di pazienti affetti da PV mostrassero un fenotipo microbico (espressione di LPS) e se questo fenotipo potesse essere correlato all'outcome. È interessante notare che l'analisi citometrica a flusso ha rivelato che i pazienti con PV e trombosi mostrassero livelli ridotti di EVs associate a LPS rispetto ai pazienti senza trombosi ($p < 0,05$; Figura 14A-B). Da notare che l'espressione delle tetraspanine, ovvero CD81, CD63 e CD9, e il numero/dimensione delle EV isolate non erano significativamente differenti tra i pazienti con PV con o senza storia di trombosi).

Nel complesso, questi risultati dimostrano che la proporzione di EVs associate a LPS distingue i pazienti affetti da PV con o senza storia di trombosi, essendo significativamente più bassa nei pazienti che hanno avuto un evento trombotico.

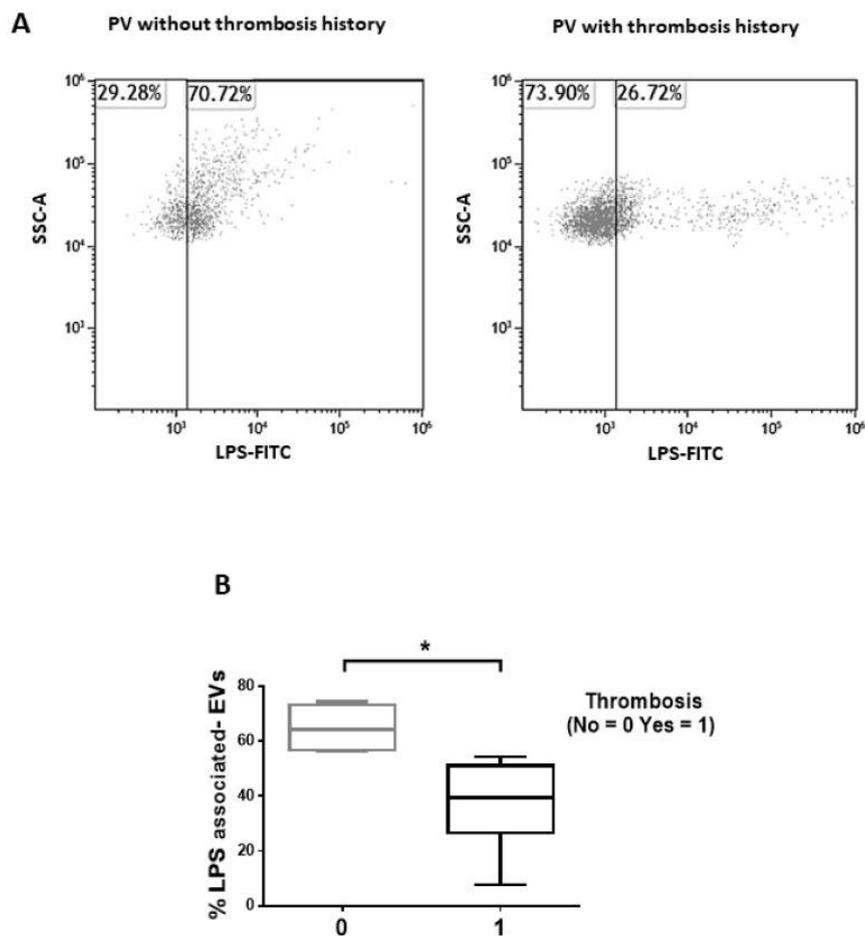


Figura 14. Proporzioni di EVs associate a LPS dopo l'isolamento dal plasma di pazienti con PV. (A) EVs associate a LPS di 1 paziente con PV e storia di trombosi e di 1 paziente senza storia di trombosi. (B) Proporzioni di EVs isolate associate a LPS di pazienti con PV con ($n = 14$) o senza trombosi ($n = 24$).

5.3.7 *Le EVs isolate da pazienti affetti da PV presentano caratteristiche di DNA microbico associate a trombosi e fibrosi midollare.*

In esperimenti paralleli, abbiamo analizzato se tracce di DNA microbico potessero essere rilevate nelle EV isolate dal plasma di pazienti affetti da PV e se potessero rappresentare una signature di outcome specifico per la PV. A questo scopo, le EVs isolate sono state sottoposte a sequenziamento di nuova generazione basato sul gene 16S rRNA. Un totale di 941.230 letture di sequenza, con una media di 24.134 (± 5059 , SD) letture paired-end per campione, sono state ottenute e analizzate.

Secondo gli indici inversi di Simpson e Shannon, non sono state osservate differenze nella diversità alfa quando si sono confrontati i microbiomi delle EVs di pazienti affetti da PV con o senza storia di trombosi o fibrosi midollare (figura 15A). Analogamente, l'analisi delle coordinate principali (PCoA) basata sulla somiglianza di Jaccard tra i profili compositivi complessivi del microbioma a livello di genere non ha mostrato alcuna segregazione tra i pazienti con PV con o senza storia di trombosi o di fibrosi midollare (figura 15B).

Tuttavia, a livello di famiglia, le EV dei pazienti con PV si sono distinte per le proporzioni di componenti specifici del microbioma, come Staphylococcaceae, Propionibacteriaceae, e Bifidobacteriaceae, di cui la prima era aumentata nei pazienti senza trombosi ($p < 0,01$, Wilcoxon) e le ultime due erano aumentate nei pazienti con trombosi ($p < 0,05$) (figura 15C). Come per la fibrosi midollare, le EVs dei pazienti senza precedenti trombotici era arricchito di DNA di Staphylococcus rispetto a quelle di pazienti con trombosi ($p < 0,01$) (figura 15D). Al contrario, le EV di pazienti affetti da PV con storia di trombosi erano arricchite in DNA assegnato ai generi Actinobacteria (cioè Propionibacterium, Bifidobacterium e Microbacterium) e Anaerococcus, rispetto a quelli senza trombosi ($p < 0,05$; figura 15D). Per quanto riguarda la fibrosi midollare, l'arricchimento del DNA di Collinsella e Flavobacterium è stato significativo rispetto ai pazienti senza fibrosi midollare ($p < 0,05$; Figura 15D).

Collettivamente, sono emerse firme di DNA microbico associate alle EVs per la storia di trombosi e la fibrosi midollare, tra cui un DNA di Collinsella e Flavobacterium, oltre a una diminuzione specifica di stafilococchi per la trombosi.

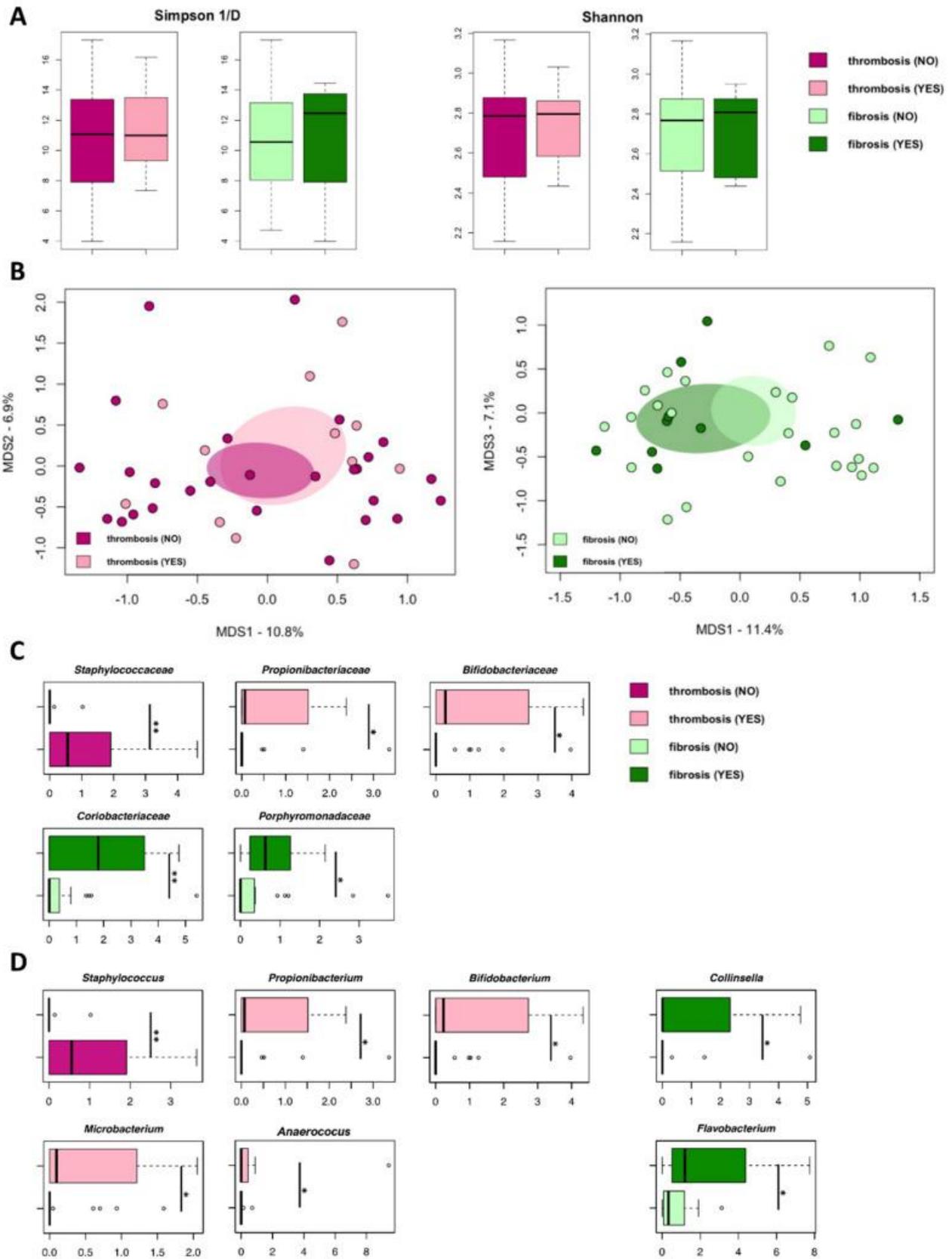


Figura 15. Firme del DNA microbico nelle EVs dei pazienti con PV differenziati per storia trombotica e fibrosi midollare. (A) Diversità alfa, secondo gli indici inversi di Simpson e Shannon, del carico di DNA microbico delle EVs. (B) Analisi delle coordinate principali (PCoA) basata sulla similarità di Jaccard tra i profili a livello di genere. Boxplot che mostrano la distribuzione dell'abbondanza relativa delle famiglie (C) e dei generi (D).

5.3.8 Il microbioma intestinale non differisce tra i pazienti con o senza trombosi o fibrosi midollare.

Quando i campioni fecali dei pazienti con PV sono stati profilati mediante sequenziamento di prossima generazione basato sul gene 16S rRNA, sono state ottenute in totale 1.375.982 letture di sequenza, con una media di 36.210 (± 10.765 , sd) letture paired-end per campione.

Da notare che non sono state osservate differenze significative nella biodiversità quando si sono stratificati i pazienti PV in base alla storia di trombosi o alla fibrosi midollare (figura 16A). Coerentemente, la PCoA basata su Jaccard non ha mostrato alcuna segregazione tra pazienti con PV con o senza storia di trombosi o fibrosi midollare (figura 16B). Il confronto dei profili del microbioma a livello di phylum, famiglia e genere non ha rivelato alcuna differenza significativa tra i pazienti affetti da PV o senza storia di trombosi. Solo i pazienti con PV con fibrosi midollare erano più ricchi di Veillonellaceae rispetto a quelli senza fibrosi ($p < 0,01$; figura 16C)

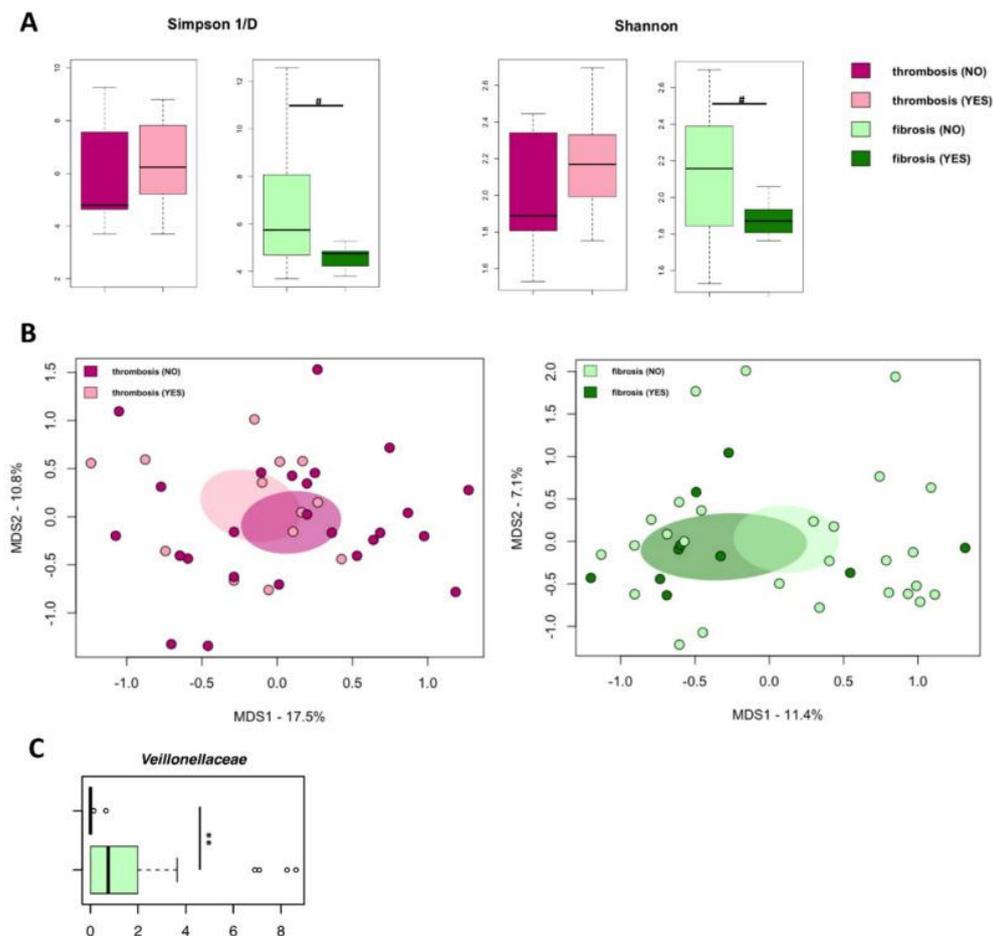


Figura 16. Il microbioma intestinale dei pazienti con PV con o senza storia di trombosi e con o senza fibrosi midollare. (A) Diversità alfa secondo gli indici inversi di Simpson (in alto) e Shannon (in basso). (B) Analisi delle coordinate principali (PCoA) basata sulla somiglianza di Jaccard tra i profili del microbiota a livello di genere. (C) Abbondanza relativa dei generi rappresentati in modo differenziato.

5.4 DISCUSSIONE

Rapporti precedenti hanno dimostrato che le microparticelle sieriche provenienti da piastrine, eritrociti, granulociti e cellule endoteliali di pazienti affetti da PV sono elevate rispetto ai controlli sani(133). Inoltre, è stato descritto che i pazienti con MPN che avevano la mutazione JAK2^{V617F} avevano concentrazioni plasmatiche significativamente più alte di microparticelle positive al fattore tissutale(190). In questo studio abbiamo cercato di identificare una signature di PV analizzando il fenotipo e il carico di DNA microbico delle EVs circolanti.

In primo luogo, abbiamo osservato che la PV è associata a un profilo anormale delle EVs circolanti di origine megacariocitaria e piastrinica. Poiché la produzione di EVs megacariociti si basa su un meccanismo costitutivo, ma solo le piastrine attivate possono produrre EVs CD62P+(191), i nostri risultati confermano ulteriormente l'aberrante megacariocitopoiesi e l'attivazione delle piastrine, come precedentemente descritto nelle MPN, compresi i pazienti con PV(192,193).

Tuttavia, questo schema di MK-/PLT-EVs circolanti nella PV rispecchia il profilo precedentemente descritto per i pazienti affetti da MF e TE(127), e suggerisce che tale anomalia sia comune a tutte le MPN, indipendentemente dalla malattia e dallo stato di mutazione.

In secondo luogo, nonostante le nostre analisi non siano state in grado di discriminare se le EVs fossero di origine batterica o umana, abbiamo riscontrato che i pazienti con PV presentavano una proporzione maggiore di EVs associate a LPS rispetto ai HD.

Questi risultati suggeriscono non solo un'aumentata permeabilità intestinale nella PV, ma anche che le EVs giochino un ruolo sullo stato infiammatorio dell'ospite e la conseguente attivazione delle risposte immunitarie innata(194). Pertanto, possiamo ipotizzare che nella PV la proporzione di EVs associate a LPS rappresenti uno stimolo per il sistema immunitario, potenziando cellule chiave quali monociti/macrofagi, cellule dendritiche e cellule T, stimolando in tal modo il rilascio di citochine infiammatorie/fibrogeniche e contribuendo al mantenimento dell'infiammazione cronica.

Infine, la PV è stata associata a una firma del DNA microbico di EVs isolate con una maggiore diversità e una composizione microbica distinta rispetto alle controparti sane, tra cui una maggiore quantità di DNA di Rhodobacteraceae e proporzioni ridotte di DNA legato a Caulobacteraceae e Bradyrhizobium.

Va sottolineato che, sebbene nella nostra coorte la maggior parte dei pazienti affetti da PV fosse in trattamento al momento dello studio, siamo stati in grado di dimostrare un DNA microbico

anormale quando sono state analizzate le EVs circolanti.

Non sono state osservate differenze significative tra pazienti e controlli quando è stato analizzato il microbioma intestinale, suggerendo che le EVs circolanti nella PV, indipendentemente dalla terapia citotossica, siano biomarcatori della malattia.

Nella seconda parte dello studio, rivolta esclusivamente ai pazienti con PV, per individuarne una signature associata alla trombosi e alla fibrosi, abbiamo identificato con successo un fenotipo distinto associato alle EVs e di una signature microbiologica.

In primo luogo, confrontando i pazienti con o senza storia di trombosi, abbiamo riscontrato che una minore proporzione di PLT-EV e una maggiore proporzione di MK-EV erano associate a pazienti con storia di trombosi. Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che i pazienti con storia di trombosi siano trattati con farmaci antiaggreganti e terapie citoriduttive, determinando una ridotta attivazione piastrinica e conseguente minore generazione di PLT-EV. In alternativa, lo stato procoagulante potrebbe favorire il consumo o la rimozione delle EVs di origine piastrinica. Al contrario, abbiamo riscontrato che la proporzione di TF-EV o PE-EV non era significativamente diversa tra i due gruppi di pazienti.

In secondo luogo, con specifico riguardo alla trombosi e alle differenze tassonomiche nelle tracce di DNA, le EVs isolate dal plasma di pazienti affetti da PV con una storia di trombosi hanno mostrato un'aumentata proporzione di DNA assegnate a diversi Actinobacteria (Propionibacterium, Bifidobacterium e Microbacterium) e ad Anaerococcus. È interessante notare che Propionibacterium sembrerebbe essere coinvolto nell'attivazione e nell'aggregazione piastrinica(195). D'altra parte, Anaerococcus isolati dall'ambiente intestinale hanno dimostrato di produrre trimetilamina dalla colina in vitro, contribuendo così potenzialmente ai livelli di trimetilamina-N-ossido protrombotico(196). Sebbene non si sappia se le EVs contengano altre sequenze di geni microbici potenzialmente esprimibili o altre molecole di derivazione microbica, è allettante ipotizzare che alcune delle firme microbiche rilevate possano essere direttamente coinvolte in eventi trombotici. Coerentemente, sulla base dello studio del microbioma umano circolante, è stato precedentemente dimostrato che i pazienti con malattie cardiovascolari mostrano un aumento della diversità microbica e della concentrazione di DNA batterico. In particolare, in questi pazienti, a livello di phylum, è stata osservata una dominanza di Actinobacteria.

Pertanto, possiamo ipotizzare che l'arricchimento di DNA derivato da Actinobacteria nelle EVs di

pazienti con PV e storia di trombosi potrebbe essere la causa o la conseguenza della trombosi(197). Inoltre, i pazienti con PV e storia di trombosi mostrano anche una deplezione di DNA relativo al genere *Staphylococcus* a cui appartengono patogeni nosocomiali ma anche colonizzatori commensali della pelle e delle mucose umane. In particolare, lo *Staphylococcus aureus* è stato recentemente definito come manipolatore del sistema emostatico umano(198). Va inoltre notato che la presenza simultanea di *Staphylococcus aureus* e di LPS ha dimostrato in vitro la capacità di indurre una tolleranza omologa ma un priming eterologo, portando alla soppressione dell'eccesso di mediatori proinfiammatori della risposta immunitaria adattativa/innata(199).

Sebbene non si sappia a quale specie appartengano le tracce di DNA stafilococcico, ciò potenzialmente supporta il parallelismo tra i ridotti livelli di EVs associati a LPS e quelli associati a DNA di stafilococco nei pazienti con storia di trombosi e suggerisce un'alterata risposta immunitaria, che probabilmente contribuiscono al mantenimento dell'infiammazione.

È interessante notare che i nostri risultati dimostrano che solo il DNA di batteri Gram positivi è differenzialmente espresso nelle EVs circolanti di pazienti con o senza storia di trombosi. Tuttavia, anche se non possiamo discriminare se le EVs siano di origine batterica o umana, abbiamo anche scoperto che la proporzione di EVs associate a LPS distingue i pazienti PV con o senza storia di trombosi, essendo diminuita in presenza di trombosi.

Il LPS batterico, il glicolipide presente sulla membrana esterna dei batteri Gram-negativi, è uno dei legami tra il microbioma e l'ipercoagulabilità. Il LPS si lega ai recettori toll-like per attivare le cellule endoteliali e le piastrine, portando all'attivazione della cascata della coagulazione(200). Si potrebbe sostenere che nei pazienti con storia di trombosi, la minore proporzione di EVs associate a LPS potrebbe essere dovuta al consumo/eliminazione di EV nel microambiente procoagulante. Inoltre, LPS svolge un ruolo chiave nell'attivazione piastrinica e nella produzione di PLT-EV(201). Dal momento che solo le piastrine attivate danno origine alle EVs, possiamo ipotizzare che, nei pazienti con anamnesi di trombosi, i livelli più bassi di PLT-EV potrebbero essere dovute alla diminuzione della proporzione di EVs associate a LPS.

Infine, un'aumentata proporzione di PE-EV è stata associata alla fibrosi midollare, suggerendo un ruolo delle PE-EV nel rimodellamento fibrotico del midollo. È stato dimostrato che stress cellulare, come le condizioni di stress lipotossico e/o del reticolo endoplasmatico, inducono riarrangiamenti nei fosfolipidi della membrana cellulare e gioca un ruolo cruciale nel determinare quali lipidi vengono rilasciati attraverso le EV(202). Pertanto, possiamo ipotizzare che le elevate proporzioni di PE-EV siano correlate all'infiammazione e allo stress cellulare del microambiente del midollo osseo

nei pazienti con PV.

Si potrebbe anche ipotizzare che, poiché i pazienti affetti da PV con fibrosi midollare hanno maggiori probabilità di progredire verso la mielofibrosi, la proporzione di PE-EV potrebbe essere considerata come biomarcatore dell'evoluzione fibrotica e della gravità della malattia.

Abbiamo inoltre identificato potenziali biomarcatori batterici della fibrosi midollare nella PV. In particolare, i pazienti con fibrosi midollare hanno mostrato un arricchimento di EVs associate a DNA di *Collinsella* e *Flavobacter*. Anche se questi batteri non sono mai stati associati con la fibrosi midollare, sulla base dei nostri risultati, potremmo ipotizzare un loro coinvolgimento nella genesi o nella risoluzione della fibrosi.

Come ultimo punto, va notato che i profili del microbiota intestinale dei pazienti affetti da PV con/senza eventi trombotici o fibrosi midollare non differivano tra loro. Sebbene questo supporti ulteriormente il ruolo delle EVs circolanti come validi biomarcatori di malattia, dall'altro potrebbe anche suggerire che altri ecosistemi, non (o non solo) l'intestino, siano la fonte delle firme microbiche delle EV circolanti rilevate nel presente studio.

5.5 CONCLUSIONI

In conclusione, i nostri dati dimostrano che la PV è associata a uno specifico comportamento delle EVs circolanti che ospitano marcatori eucariotici e procariotici distintivi. Inoltre, è stato possibile individuare delle caratteristiche fenotipiche associate alla complicità principale della PV, cioè la trombosi, e come caratteristica predittiva della trasformazione della MF, cioè la fibrosi midollare.

È interessante notare che la firma microbica era specifica per le EVs circolanti, poiché l'analisi del microbiota intestinale non è riuscita a identificare differenze tra pazienti e donatori sani o pazienti con o senza trombosi/fibrosi midollare.

Pertanto, anche se questo dato deve essere confermato in una coorte più ampia, per la prima volta, qui, abbiamo descritto che, insieme a un fenotipo distinto, tracce di DNA batterico sono state associate alle EVs circolanti nell'uomo e, nello specifico, nei pazienti affetti da PV. Questi risultati supportano il ruolo delle EVs come biomarcatori di biopsia liquida nella PV. Ulteriori studi, possibilmente longitudinali e che integrino altri approcci -omici (ad esempio, metagenomica, transcriptomica e metabolomica) e studi in vitro, sono necessari per convalidare queste ipotesi e indagare a fondo sui meccanismi alla base dello smistamento selettivo del DNA batterico nei

pazienti affetti da PV e quelli di interazione con l'ospite.

Tali studi dovrebbero includere anche la caratterizzazione di altre comunità microbiche associate all'uomo (ad esempio, quelle della bocca o della pelle) da cui provengono i DNA circolanti all'interno delle EVs.

Infine, questi dati possono contribuire non solo a perfezionare la prognosi dei pazienti affetti da PV, ma anche a identificare nuovi bersagli per terapie personalizzate incentrate sulla prevenzione/trattamento della trombosi e della fibrosi midollare.

6. Bibliografia

1. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 2022 Sep 15;140(11):1200–28.
2. Stone MJ. Polycythaemia vera: Osler-Vaquez disease. *J Med Biogr*. 2001 May;9(2):99–103.
3. Rollison DE, Howlader N, Smith MT, Strom SS, Merritt WD, Ries LA, et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. *Blood*. 2008 Jul 1;112(1):45–52.
4. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Podoltsev NA, Zeidan AM. Epidemiology of the classical myeloproliferative neoplasms: The four corners of an expansive and complex map. *Blood Rev*. 2020 Jul;42:100706.
5. Baade PD, Ross DM, Anderson LA, Forsyth C, Fritschi L. Changing incidence of myeloproliferative neoplasms in Australia, 2003-2014. *Am J Hematol*. 2019 Apr;94(4):E107–9.
6. Passamonti F, Rumi E, Pungolino E, Malabarba L, Bertazzoni P, Valentini M, et al. Life expectancy and prognostic factors for survival in patients with polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Am J Med*. 2004 Nov 15;117(10):755–61.
7. Moulard O, Mehta J, Fryzek J, Olivares R, Iqbal U, Mesa RA. Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *Eur J Haematol*. 2014 Apr;92(4):289–97.
8. Penna D, Lasho TL, Finke CM, Vallapureddy RR, Hanson CA, Ketterling RP, et al. 20+ Years and alive with primary myelofibrosis: Phenotypic signature of very long-lived patients. *Am J Hematol*. 2019 Mar;94(3):286–90.

9. Tefferi A, Fonseca R, Pereira DL, Hoagland HC. A long-term retrospective study of young women with essential thrombocythemia. *Mayo Clin Proc.* 2001 Jan;76(1):22–8.
10. Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, Gisslinger H, Vannucchi AM, Rodeghiero F, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia.* 2013 Sep;27(9):1874–81.
11. Ugo V, James C, Vainchenker W. [A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera]. *Med Sci (Paris).* 2005;21(6–7):669–70.
12. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell.* 2005 Apr;7(4):387–97.
13. 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 Mar 19;365(9464):1054–61.
14. 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 Apr 28;352(17):1779–90.
15. James C, Ugo V, Casadevall N, Constantinescu SN, Vainchenker W. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends Mol Med.* 2005 Dec;11(12):546–54.
16. 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 Jul;3(7):e270.
17. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med.* 2013 Dec 19;369(25):2391–405.
18. Michail O, McCallion P, McGimpsey J, Hindley A, Greenfield G, McAllister R, et al. Mutational profiling in suspected triple-negative essential thrombocythaemia using targeted next-generation sequencing in a real-world cohort. *J Clin Pathol.* 2021 Dec;74(12):808–11.
19. Sozer S, Fiel MI, Schiano T, Xu M, Mascarenhas J, Hoffman R. The presence of JAK2V617F mutation in the liver endothelial cells of patients with Budd-Chiari syndrome. *Blood.* 2009 May 21;113(21):5246–9.
20. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD, et al. JAK2 or CALR

mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood*. 2014 Mar 6;123(10):1544–51.

21. 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 Mar 10;117(10):2813–6.

22. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017 Feb 9;129(6):667–79.

23. James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1144–8.

24. 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 Jun 16;5(6):e111157.

25. 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 Feb 1;356(5):459–68.

26. 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 Apr 3;123(14):2220–8.

27. Zhang X, Su J, Jeong M, Ko M, Huang Y, Park HJ, et al. DNMT3A and TET2 compete and cooperate to repress lineage-specific transcription factors in hematopoietic stem cells. *Nat Genet*. 2016 Sep;48(9):1014–23.

28. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J, Silber Y, Wedge DC, Grinfeld J, et al. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2015 Feb 12;372(7):601–12.

29. Carbuccia N, Murati A, Trouplin V, Brecqueville M, Adélaïde J, Rey J, et al. Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2009 Nov;23(11):2183–6.

30. Goerttler PS, Kreutz C, Donauer J, Faller D, Maiwald T, März E, et al. Gene expression profiling in polycythaemia vera: overexpression of transcription factor NF-E2. *Br J Haematol*. 2005 Apr;129(1):138–50.

31. Wang W, Schwemmers S, Hexner EO, Pahl HL. AML1 is overexpressed in patients with myeloproliferative neoplasms and mediates JAK2V617F-independent overexpression of NF-E2. *Blood*. 2010 Jul 15;116(2):254–66.

32. M B, J R, F B, E C, P F, N C, et al. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes, chromosomes & cancer* [Internet]. 2012 Aug [cited 2022 Dec 30];51(8). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22489043/>
33. A T. Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia* [Internet]. 2010 Jun [cited 2022 Dec 30];24(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20428194/>
34. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Coltro G, Finke CM, Loscocco GG, et al. Mutation-enhanced international prognostic systems for essential thrombocythaemia and polycythaemia vera. *Br J Haematol*. 2020 Apr;189(2):291–302.
35. Gangat N, Strand J, Lasho TL, Finke CM, Knudson RA, Pardanani A, et al. Cytogenetic studies at diagnosis in polycythemia vera: clinical and JAK2V617F allele burden correlates. *Eur J Haematol*. 2008 Mar;80(3):197–200.
36. Sever M, Quintás-Cardama A, Pierce S, Zhou L, Kantarjian H, Verstovsek S. Significance of cytogenetic abnormalities in patients with polycythemia vera. *Leuk Lymphoma*. 2013 Dec;54(12):2667–70.
37. Swolin B, Rödger S, Westin J. Therapy-related patterns of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome post polycythemia vera: single center experience and review of literature. *Ann Hematol*. 2008 Jun;87(6):467–74.
38. Dingli D, Schwager SM, Mesa RA, Li CY, Dewald GW, Tefferi A. Presence of unfavorable cytogenetic abnormalities is the strongest predictor of poor survival in secondary myelofibrosis. *Cancer*. 2006 May 1;106(9):1985–9.
39. Kiladjian JJ, Cervantes F, Leebeek FWG, Marzac C, Cassinat B, Chevret S, et al. The impact of JAK2 and MPL mutations on diagnosis and prognosis of splanchnic vein thrombosis: a report on 241 cases. *Blood*. 2008 May 15;111(10):4922–9.
40. Landolfi R, Di Gennaro L, Barbui T, De Stefano V, Finazzi G, Marfisi R, et al. Leukocytosis as a major thrombotic risk factor in patients with polycythemia vera. *Blood*. 2007 Mar 15;109(6):2446–52.
41. Marchetti M, Castoldi E, Spronk HMH, van Oerle R, Balducci D, Barbui T, et al. Thrombin generation and activated protein C resistance in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Blood*. 2008 Nov 15;112(10):4061–8.

42. Brinkman HJM, Mertens K, van Mourik JA. Proteolytic cleavage of protein S during the hemostatic response. *J Thromb Haemost.* 2005 Dec;3(12):2712–20.
43. Michiels JJ, Berneman Z, Schroyens W, Koudstaal PJ, Lindemans J, Neumann HAM, et al. Platelet-mediated erythromelalgic, cerebral, ocular and coronary microvascular ischemic and thrombotic manifestations in patients with essential thrombocythemia and polycythemia vera: a distinct aspirin-responsive and coumadin-resistant arterial thrombophilia. *Platelets.* 2006 Dec;17(8):528–44.
44. Robertson B, Urquhart C, Ford I, Townend J, Watson HG, Vickers MA, et al. Platelet and coagulation activation markers in myeloproliferative diseases: relationships with JAK2 V617 F status, clonality, and antiphospholipid antibodies. *J Thromb Haemost.* 2007 Aug;5(8):1679–85.
45. Rosti V, Villani L, Riboni R, Poletto V, Bonetti E, Tozzi L, et al. Spleen endothelial cells from patients with myelofibrosis harbor the JAK2V617F mutation. *Blood.* 2013 Jan 10;121(2):360–8.
46. Landolfi R, Marchioli R. European Collaboration on Low-dose Aspirin in Polycythemia Vera (ECLAP): a randomized trial. *Semin Thromb Hemost.* 1997;23(5):473–8.
47. White RH. The epidemiology of venous thromboembolism. *Circulation.* 2003 Jun 17;107(23 Suppl 1):I4-8.
48. Tefferi A, Elliott M. Thrombosis in myeloproliferative disorders: prevalence, prognostic factors, and the role of leukocytes and JAK2V617F. *Semin Thromb Hemost.* 2007 Jun;33(4):313–20.
49. Michiels JJ, Berneman Z, Gadisseur A, Lam KH, De Raeve H, Schroyens W. Aspirin-responsive, migraine-like transient cerebral and ocular ischemic attacks and erythromelalgia in JAK2-positive essential thrombocythemia and polycythemia vera. *Acta Haematol.* 2015;133(1):56–63.
50. Guy A, Gourdou-Latyszenok V, Le Lay N, Peghaire C, Kilani B, Dias JV, et al. Vascular endothelial cell expression of JAK2V617F is sufficient to promote a pro-thrombotic state due to increased P-selectin expression. *Haematologica.* 2019 Jan;104(1):70–81.
51. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Masciulli A, Mennitto MR, Barbui T. The CYTO-PV: A Large-Scale Trial Testing the Intensity of CYTOreductive Therapy to Prevent Cardiovascular Events in Patients with Polycythemia Vera. *Thrombosis.* 2011;2011:794240.
52. Carobbio A, Vannucchi AM, De Stefano V, Masciulli A, Guglielmelli P, Loscocco GG, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio is a novel predictor of venous thrombosis in polycythemia vera. *Blood Cancer J.* 2022 Feb 10;12(2):28.
53. Barbui T, Vannucchi AM, Carobbio A, Rumi E, Finazzi G, Gisslinger H, et al. The effect of

arterial hypertension on thrombosis in low-risk polycythemia vera. *American Journal of Hematology*. 2017;92(1):E5–6.

54. Quist-Paulsen P, Næss IA, Cannegieter SC, Romundstad PR, Christiansen SC, Rosendaal FR, et al. Arterial cardiovascular risk factors and venous thrombosis: results from a population-based, prospective study (the HUNT 2). *Haematologica*. 2010 Jan 1;95(1):119–25.

55. Barbui T, Carobbio A, Finazzi G, Vannucchi AM, Barosi G, Antonioli E, et al. Inflammation and thrombosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: different role of C-reactive protein and pentraxin 3. *Haematologica*. 2011 Feb;96(2):315–8.

56. 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 Oct 16;124(16):2507–13; quiz 2615.

57. Merup M, Aberg W, Löfvenberg E, Svensson E, Engman K, Paul C, et al. Symptoms, symptom distress and health-related quality of life in patients with polycythaemia vera or essential thrombocythaemia during treatment with interferon-alpha. *Acta Oncol*. 2002;41(1):50–5.

58. Samuelsson J, Hasselbalch H, Bruserud O, Temerinac S, Brandberg Y, Merup M, et al. A phase II trial of pegylated interferon alpha-2b therapy for polycythemia vera and essential thrombocythemia: feasibility, clinical and biologic effects, and impact on quality of life. *Cancer*. 2006 Jun 1;106(11):2397–405.

59. Mesa RA, Schwager S, Radia D, Chevillat A, Hussein K, Niblack J, et al. The Myelofibrosis Symptom Assessment Form (MFSAF): an evidence-based brief inventory to measure quality of life and symptomatic response to treatment in myelofibrosis. *Leuk Res*. 2009 Sep;33(9):1199–203.

60. Scherber R, Dueck AC, Johansson P, Barbui T, Barosi G, Vannucchi AM, et al. The Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF): international prospective validation and reliability trial in 402 patients. *Blood*. 2011 Jul 14;118(2):401–8.

61. 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 2-year follow-up of COMFORT-I. *Haematologica*. 2013 Dec;98(12):1865–71.

62. Kiladjian JJ, Zachee P, Hino M, Pane F, Masszi T, Harrison CN, et al. Long-term efficacy and safety of ruxolitinib versus best available therapy in polycythaemia vera (RESPONSE): 5-year follow up of a phase 3 study. *Lancet Haematol*. 2020 Mar;7(3):e226–37.

63. Emanuel RM, Dueck AC, Geyer HL, Kiladjian JJ, Slot S, Zweegman S, et al. Myeloproliferative

neoplasm (MPN) symptom assessment form total symptom score: prospective international assessment of an abbreviated symptom burden scoring system among patients with MPNs. *J Clin Oncol*. 2012 Nov 20;30(33):4098–103.

64. Mesa R, Vannucchi AM, Yacoub A, Zachee P, Garg M, Lyons R, et al. The efficacy and safety of continued hydroxycarbamide therapy versus switching to ruxolitinib in patients with polycythaemia vera: a randomized, double-blind, double-dummy, symptom study (RELIEF). *Br J Haematol*. 2017 Jan;176(1):76–85.

65. Mesa R, Miller CB, Thyne M, Mangan J, Goldberger S, Fazal S, et al. Impact of Myeloproliferative Neoplasms (MPNs) on Patients' Overall Health and Productivity: Results from the MPN LANDMARK SURVEY in the United States. *Blood*. 2014 Dec 6;124(21):3183.

66. Scherber RM, Kosiorek HE, Senyak Z, Dueck AC, Clark MM, Boxer MA, et al. Comprehensively understanding fatigue in patients with myeloproliferative neoplasms. *Cancer*. 2016 Feb 1;122(3):477–85.

67. Geyer HL, Kosiorek H, Dueck AC, Scherber R, Slot S, Zweegman S, et al. Associations between gender, disease features and symptom burden in patients with myeloproliferative neoplasms: an analysis by the MPN QOL International Working Group. *Haematologica*. 2017 Jan;102(1):85–93.

68. Emanuel RM, Dueck AC, Geyer HL, Kiladjian JJ, Slot S, Zweegman S, et al. Myeloproliferative (MPN) Symptom Burden Response Thresholds: Assessment Of MPN-SAF TSS Quartiles As Potential Markers Of Symptom Response. *Blood*. 2013 Nov 15;122(21):4067.

69. Dueck AC, Cleeland CS, Dantzer R, Sloan J, Verstovsek S, Emanuel RM, et al. Cytokine Profile Changes In 309 Myelofibrosis Patients: Comparison Of JAK1/JAK2 Inhibitor Therapy Vs. Placebo – Correlative Analysis From The Comfort-I Trial. *Blood*. 2013 Nov 15;122(21):4074.

70. Pourcelot E, Trocme C, Mondet J, Bailly S, Toussaint B, Mossuz P. Cytokine profiles in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients: clinical implications. *Exp Hematol*. 2014 May;42(5):360–8.

71. Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, Finke C, Lasho T, Pardanani A. Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 1;29(10):1356–63.

72. Fleischman AG, Aichberger KJ, Luty SB, Bumm TG, Petersen CL, Doratotaj S, et al. TNF α facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011 Dec 8;118(24):6392–8.

73. 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.
74. Pieri L, Bogani C, Guglielmelli P, Zingariello M, Rana RA, Bartalucci N, et al. The JAK2V617 mutation induces constitutive activation and agonist hypersensitivity in basophils from patients with polycythemia vera. *Haematologica*. 2009 Nov;94(11):1537–45.
75. Wang J, Ishii T, Zhang W, Sozer S, Dai Y, Mascarenhas J, et al. Involvement of mast cells by the malignant process in patients with Philadelphia chromosome negative myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2009 Sep;23(9):1577–86.
76. Jackson N, Burt D, Crocker J, Boughton B. Skin mast cells in polycythaemia vera: relationship to the pathogenesis and treatment of pruritus. *Br J Dermatol*. 1987 Jan;116(1):21–9.
77. Tefferi A, Fonseca R. Selective serotonin reuptake inhibitors are effective in the treatment of polycythemia vera-associated pruritus. *Blood*. 2002 Apr 1;99(7):2627.
78. Bonaventura A, Vecchié A, Dagna L, Martinod K, Dixon DL, Van Tassell BW, et al. Endothelial dysfunction and immunothrombosis as key pathogenic mechanisms in COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2021 May;21(5):319–29.
79. 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 19;127(20):2391–405.
80. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Randi ML, et al. Initial bone marrow reticulin fibrosis in polycythemia vera exerts an impact on clinical outcome. *Blood*. 2012 Mar 8;119(10):2239–41.
81. Barraco D, Cerquozzi S, Hanson CA, Ketterling RP, Pardanani A, Gangat N, et al. Prognostic impact of bone marrow fibrosis in polycythemia vera: validation of the IWG-MRT study and additional observations. *Blood Cancer J*. 2017 Mar 10;7(3):e538.
82. Vannucchi AM, Pieri L, Guglielmelli P. JAK2 Allele Burden in the Myeloproliferative Neoplasms: Effects on Phenotype, Prognosis and Change with Treatment. *Ther Adv Hematol*. 2011 Feb;2(1):21–32.
83. Goldman JJ, Vandris K, Adriano F, Bourla M, Silver RT. Normal Serum-Erythropoietin (S-epo) Level at Diagnosis of Polycythemia Vera (PV) Correlates with LowJAK2V617F Mutant Allele Burden and Indicates Mild Phenotype. *Blood*. 2009 Nov 20;114(22):4978.

84. Kiladjian JJ, Cassinat B, Chevret S, Turlure P, Cambier N, Roussel M, et al. Pegylated interferon-alfa-2a induces complete hematologic and molecular responses with low toxicity in polycythemia vera. *Blood*. 2008 Oct 15;112(8):3065–72.
85. Barosi G, Mesa R, Finazzi G, Harrison C, Kiladjian JJ, Lengfelder E, et al. Revised response criteria for polycythemia vera and essential thrombocythemia: an ELN and IWG-MRT consensus project. *Blood*. 2013 Jun 6;121(23):4778–81.
86. Vannucchi AM, Barbui T, Cervantes F, Harrison C, Kiladjian JJ, Kröger N, et al. Philadelphia chromosome-negative chronic myeloproliferative neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2015 Sep;26 Suppl 5:v85-99.
87. Barbui T, Masciulli A, Marfisi MR, Tognoni G, Finazzi G, Rambaldi A, et al. White blood cell counts and thrombosis in polycythemia vera: a subanalysis of the CYTO-PV study. *Blood*. 2015 Jul 23;126(4):560–1.
88. Barbui T, Passamonti F, Accorsi P, Pane F, Vannucchi AM, Velati C, et al. Evidence- and consensus-based recommendations for phlebotomy in polycythemia vera. *Leukemia*. 2018 Sep;32(9):2077–81.
89. Landolfi R, Marchioli R, Kutti J, Gisslinger H, Tognoni G, Patrono C, et al. Efficacy and safety of low-dose aspirin in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2004 Jan 8;350(2):114–24.
90. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Cacciola R, Cavazzina R, Cilloni D, et al. Cardiovascular events and intensity of treatment in polycythemia vera. *N Engl J Med*. 2013 Jan 3;368(1):22–33.
91. Chievitz E, Thiede T. Complications and causes of death in polycythaemia vera. *Acta Med Scand*. 1962 Nov;172:513–23.
92. Bertozzi I, Rumi E, Cavalloni C, Cazzola M, Fabris F, Randi ML. Pregnancy outcome and management of 25 pregnancies in women with polycythemia vera. *Am J Hematol*. 2018 Sep;93(9):E234–5.
93. Gangat N, Joshi M, Shah S, Yogarajah M, Patnaik MM, Pardanani A, et al. Pregnancy outcomes in myeloproliferative neoplasms: A Mayo Clinic report on 102 pregnancies. *Am J Hematol*. 2020 May;95(5):E114–7.
94. Diehn F, Tefferi A. Pruritus in polycythaemia vera: prevalence, laboratory correlates and management. *Br J Haematol*. 2001 Dec;115(3):619–21.
95. Baldo A, Sammarco E, Plaitano R, Martinelli V, Monfrecola null. Narrowband (TL-01) ultraviolet B phototherapy for pruritus in polycythaemia vera. *Br J Dermatol*. 2002 Nov;147(5):979–

81.

96. Muller EW, de Wolf JT, Egger R, Wijermans PW, Huijgens PC, Halie MR, et al. Long-term treatment with interferon-alpha 2b for severe pruritus in patients with polycythaemia vera. *Br J Haematol.* 1995 Feb;89(2):313–8.

97. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol.* 2020 Dec;95(12):1599–613.

98. Marchetti M, Vannucchi AM, Griesshammer M, Harrison C, Koschmieder S, Gisslinger H, et al. Appropriate management of polycythaemia vera with cytoreductive drug therapy: European LeukemiaNet 2021 recommendations. *Lancet Haematol.* 2022 Apr;9(4):e301–11.

99. Berk PD, Goldberg JD, Donovan PB, Fruchtman SM, Berlin NI, Wasserman LR. Therapeutic recommendations in polycythemia vera based on Polycythemia Vera Study Group protocols. *Semin Hematol.* 1986 Apr;23(2):132–43.

100. Kaplan ME, Mack K, Goldberg JD, Donovan PB, Berk PD, Wasserman LR. Long-term management of polycythemia vera with hydroxyurea: a progress report. *Semin Hematol.* 1986 Jul;23(3):167–71.

101. Gisslinger H, Klade C, Georgiev P, Krochmalczyk D, Gercheva-Kyuchukova L, Egyed M, et al. Ropoginterferon alfa-2b versus standard therapy for polycythaemia vera (PROUD-PV and CONTINUATION-PV): a randomised, non-inferiority, phase 3 trial and its extension study. *Lancet Haematol.* 2020 Mar;7(3):e196–208.

102. Kiladjian JJ, Giraudier S, Cassinat B. Interferon-alpha for the therapy of myeloproliferative neoplasms: targeting the malignant clone. *Leukemia.* 2016 Apr;30(4):776–81.

103. Barbui T, Vannucchi AM, De Stefano V, Masciulli A, Carobbio A, Ferrari A, et al. Ropoginterferon alfa-2b versus phlebotomy in low-risk patients with polycythaemia vera (Low-PV study): a multicentre, randomised phase 2 trial. *Lancet Haematol.* 2021 Mar;8(3):e175–84.

104. Alimam S, Bewley S, Chappell LC, Knight M, Seed P, Gray G, et al. Pregnancy outcomes in myeloproliferative neoplasms: UK prospective cohort study. *Br J Haematol.* 2016 Oct;175(1):31–6.

105. Passamonti F, Griesshammer M, Palandri F, Egyed M, Benevolo G, Devos T, et al. Ruxolitinib for the treatment of inadequately controlled polycythaemia vera without splenomegaly (RESPONSE-2): a randomised, open-label, phase 3b study. *Lancet Oncol.* 2017;18(1):88–99.

106. Masciulli A, Ferrari A, Carobbio A, Ghirardi A, Barbui T. Ruxolitinib for the prevention of thrombosis in polycythemia vera: a systematic review and meta-analysis. *Blood Adv.* 2020 Jan

28;4(2):380–6.

107. Sørensen AL, Mikkelsen SU, Knudsen TA, Bjørn ME, Andersen CL, Bjerrum OW, et al. Ruxolitinib and interferon- α 2 combination therapy for patients with polycythemia vera or myelofibrosis: a phase II study. *Haematologica*. 2020 Sep 1;105(9):2262–72.

108. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch HC, et al. Response criteria for essential thrombocythemia and polycythemia vera: result of a European LeukemiaNet consensus conference. *Blood*. 2009 May 14;113(20):4829–33.

109. Alvarez-Larrán A, Pereira A, Cervantes F, Arellano-Rodrigo E, Hernández-Boluda JC, Ferrer-Marín F, et al. Assessment and prognostic value of the European LeukemiaNet criteria for clinicohematologic response, resistance, and intolerance to hydroxyurea in polycythemia vera. *Blood*. 2012 Feb 9;119(6):1363–9.

110. Barosi G, Birgegard G, Finazzi G, Griesshammer M, Harrison C, Hasselbalch H, et al. A unified definition of clinical resistance and intolerance to hydroxycarbamide in polycythaemia vera and primary myelofibrosis: results of a European LeukemiaNet (ELN) consensus process. *Br J Haematol*. 2010 Mar;148(6):961–3.

111. Alvarez-Larrán A, Kerguelen A, Hernández-Boluda JC, Pérez-Encinas M, Ferrer-Marín F, Báez A, et al. Frequency and prognostic value of resistance/intolerance to hydroxycarbamide in 890 patients with polycythaemia vera. *Br J Haematol*. 2016 Mar;172(5):786–93.

112. van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2018 Apr;19(4):213–28.

113. Mathivanan S, Fahner CJ, Reid GE, Simpson RJ. ExoCarta 2012: database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jan;40(Database issue):D1241–1244.

114. Pathan M, Fonseka P, Chitti SV, Kang T, Sanwlan R, Van Deun J, et al. Vesiclepedia 2019: a compendium of RNA, proteins, lipids and metabolites in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jan 8;47(D1):D516–9.

115. Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, et al. Vesiclepedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol*. 2012;10(12):e1001450.

116. Russell AE, Sneider A, Witwer KW, Bergese P, Bhattacharyya SN, Cocks A, et al. Biological membranes in EV biogenesis, stability, uptake, and cargo transfer: an ISEV position paper arising from the ISEV membranes and EVs workshop. *J Extracell Vesicles*. 2019;8(1):1684862.

117. Li Q, Wang H, Peng H, Huyan T, Cacalano NA. Exosomes: Versatile Nano Mediators of Immune Regulation. *Cancers (Basel)*. 2019 Oct 14;11(10):1557.
118. Chen Z, Larregina AT, Morelli AE. Impact of extracellular vesicles on innate immunity. *Curr Opin Organ Transplant*. 2019 Dec;24(6):670–8.
119. Wang T, Nasser MI, Shen J, Qu S, He Q, Zhao M. Functions of Exosomes in the Triangular Relationship between the Tumor, Inflammation, and Immunity in the Tumor Microenvironment. *J Immunol Res*. 2019;2019:4197829.
120. Sharifi H, Shafiee A, Molavi G, Razi E, Mousavi N, Sarvizadeh M, et al. Leukemia-derived exosomes: Bringing oncogenic signals to blood cells. *J Cell Biochem*. 2019 Oct;120(10):16307–15.
121. Trino S, Lamorte D, Caivano A, De Luca L, Sgambato A, Laurenzana I. Clinical relevance of extracellular vesicles in hematological neoplasms: from liquid biopsy to cell biopsy. *Leukemia*. 2021 Mar;35(3):661–78.
122. Longjohn MN, Hudson JABJ, Smith NC, Rise ML, Moorehead PC, Christian SL. Deciphering the messages carried by extracellular vesicles in hematological malignancies. *Blood Rev*. 2021 Mar;46:100734.
123. Gargiulo E, Paggetti J, Moussay E. Hematological Malignancy-Derived Small Extracellular Vesicles and Tumor Microenvironment: The Art of Turning Foes into Friends. *Cells*. 2019 May 27;8(5):511.
124. Ball S, Nugent K. Microparticles in Hematological Malignancies: Role in Coagulopathy and Tumor Pathogenesis. *Am J Med Sci*. 2018 Mar;355(3):207–14.
125. Caivano A, La Rocca F, Laurenzana I, Trino S, De Luca L, Lamorte D, et al. Extracellular Vesicles in Hematological Malignancies: From Biology to Therapy. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun 2;18(6):1183.
126. Caivano A, Laurenzana I, De Luca L, La Rocca F, Simeon V, Trino S, et al. High serum levels of extracellular vesicles expressing malignancy-related markers are released in patients with various types of hematological neoplastic disorders. *Tumour Biol*. 2015 Dec;36(12):9739–52.
127. Barone M, Ricci F, Sollazzo D, Ottaviani E, Romano M, Auteri G, et al. Circulating megakaryocyte and platelet microvesicles correlate with response to ruxolitinib and distinct disease severity in patients with myelofibrosis. *Br J Haematol*. 2019 Jun;185(5):987–91.
128. Forte D, Barone M, Morsiani C, Simonetti G, Fabbri F, Bruno S, et al. Distinct profile of CD34+ cells and plasma-derived extracellular vesicles from triple-negative patients with Myelofibrosis reveals potential markers of aggressive disease. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021 Feb 1;40(1):49.

129. Forte D, Barone M, Palandri F, Catani L. The “Vesicular Intelligence” Strategy of Blood Cancers. *Genes (Basel)*. 2021 Mar 13;12(3):416.
130. Barone M, Catani L, Ricci F, Romano M, Forte D, Auteri G, et al. The role of circulating monocytes and JAK inhibition in the infectious-driven inflammatory response of myelofibrosis. *Oncoimmunology*. 2020 Jun 23;9(1):1782575.
131. Zannoni J, Mauz N, Seyve L, Meunier M, Pernet-Gallay K, Brault J, et al. Tumor microenvironment and clonal monocytes from chronic myelomonocytic leukemia induce a procoagulant climate. *Blood Adv*. 2019 Jun 25;3(12):1868–80.
132. Duchemin J, Ugo V, Ianotto JC, Lecucq L, Mercier B, Abgrall JF. Increased circulating procoagulant activity and thrombin generation in patients with myeloproliferative neoplasms. *Thromb Res*. 2010 Sep;126(3):238–42.
133. Tan X, Shi J, Fu Y, Gao C, Yang X, Li J, et al. Role of erythrocytes and platelets in the hypercoagulable status in polycythemia vera through phosphatidylserine exposure and microparticle generation. *Thromb Haemost*. 2013 Jun;109(6):1025–32.
134. Marchetti M, Tartari CJ, Russo L, Panova-Noeva M, Leuzzi A, Rambaldi A, et al. Phospholipid-dependent procoagulant activity is highly expressed by circulating microparticles in patients with essential thrombocythemia. *Am J Hematol*. 2014 Jan;89(1):68–73.
135. Kissova J, Ovesna P, Bulikova A, Zavřelova J, Penka M. Increasing procoagulant activity of circulating microparticles in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms: a single-centre experience. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2015 Jun;26(4):448–53.
136. Taniguchi Y, Tanaka H, Luis EJ, Sakai K, Kumode T, Sano K, et al. Elevated plasma levels of procoagulant microparticles are a novel risk factor for thrombosis in patients with myeloproliferative neoplasms. *Int J Hematol*. 2017 Nov;106(5):691–703.
137. Kamada N, Kim YG, Sham HP, Vallance BA, Puente JL, Martens EC, et al. Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. *Science*. 2012 Jun 8;336(6086):1325–9.
138. Khosravi A, Yáñez A, Price JG, Chow A, Merad M, Goodridge HS, et al. Gut microbiota promote hematopoiesis to control bacterial infection. *Cell Host Microbe*. 2014 Mar 12;15(3):374–81.
139. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007 Oct 18;449(7164):804–10.

140. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006 Dec 21;444(7122):1027–31.
141. Benson AK, Kelly SA, Legge R, Ma F, Low SJ, Kim J, et al. Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov 2;107(44):18933–8.
142. Turnbaugh PJ, Quince C, Faith JJ, McHardy AC, Yatsunencko T, Niazi F, et al. Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 20;107(16):7503–8.
143. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006 Jun 2;312(5778):1355–9.
144. Kundu P, Blacher E, Elinav E, Pettersson S. Our Gut Microbiome: The Evolving Inner Self. *Cell*. 2017 Dec 14;171(7):1481–93.
145. Forchielli ML, Walker WA. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr*. 2005 Apr;93 Suppl 1:S41-48.
146. Makita S, Kanai T, Nemoto Y, Totsuka T, Okamoto R, Tsuchiya K, et al. Intestinal lamina propria retaining CD4+CD25+ regulatory T cells is a suppressive site of intestinal inflammation. *J Immunol*. 2007 Apr 15;178(8):4937–46.
147. Tezuka H, Abe Y, Iwata M, Takeuchi H, Ishikawa H, Matsushita M, et al. Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature*. 2007 Aug 23;448(7156):929–33.
148. Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol*. 2011 May;9(5):356–68.
149. Lai Y, Gallo RL. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol*. 2009 Mar;30(3):131–41.
150. Willing BP, Russell SL, Finlay BB. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Apr;9(4):233–43.
151. Maslowski KM, Mackay CR. Diet, gut microbiota and immune responses. *Nat Immunol*. 2011 Jan;12(1):5–9.
152. Falco M, Palma G, Rea D, De Biase D, Scala S, D’Aiuto M, et al. Tumour biomarkers: homeostasis as a novel prognostic indicator. *Open Biol*. 2016 Dec;6(12):160254.

153. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol*. 2010 Mar;10(3):159–69.
154. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*. 2008 Oct 23;455(7216):1109–13.
155. Dapito DH, Mencin A, Gwak GY, Pradere JP, Jang MK, Mederacke I, et al. Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4. *Cancer Cell*. 2012 Apr 17;21(4):504–16.
156. Round JL, Lee SM, Li J, Tran G, Jabri B, Chatila TA, et al. The Toll-like receptor 2 pathway establishes colonization by a commensal of the human microbiota. *Science*. 2011 May 20;332(6032):974–7.
157. Tlaskalová-Hogenová H, Stepánková R, Hudcovic T, Tucková L, Cukrowska B, Lodinová-Zádníková R, et al. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. *Immunol Lett*. 2004 May 15;93(2–3):97–108.
158. Chow J, Lee SM, Shen Y, Khosravi A, Mazmanian SK. Host-bacterial symbiosis in health and disease. *Adv Immunol*. 2010;107:243–74.
159. Barnes MJ, Powrie F. Regulatory T cells reinforce intestinal homeostasis. *Immunity*. 2009 Sep 18;31(3):401–11.
160. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature*. 2012 Oct 4;490(7418):55–60.
161. Balmer ML, Schürch CM, Saito Y, Geuking MB, Li H, Cuenca M, et al. Microbiota-derived compounds drive steady-state granulopoiesis via MyD88/TICAM signaling. *J Immunol*. 2014 Nov 15;193(10):5273–83.
162. Polsinelli VB, Sinha A, Shah SJ. Visceral Congestion in Heart Failure: Right Ventricular Dysfunction, Splanchnic Hemodynamics, and the Intestinal Microenvironment. *Curr Heart Fail Rep*. 2017 Dec;14(6):519–28.
163. Tang WHW, Li DY, Hazen SL. Dietary metabolism, the gut microbiome, and heart failure. *Nat Rev Cardiol*. 2019 Mar;16(3):137–54.
164. Munger MA, Johnson B, Amber IJ, Callahan KS, Gilbert EM. Circulating concentrations of proinflammatory cytokines in mild or moderate heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol*. 1996 Apr 1;77(9):723–7.

165. Rauchhaus M, Doehner W, Francis DP, Davos C, Kemp M, Liebenthal C, et al. Plasma cytokine parameters and mortality in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2000 Dec 19;102(25):3060–7.
166. Fudim M, Hernandez AF, Felker GM. Role of Volume Redistribution in the Congestion of Heart Failure. *J Am Heart Assoc*. 2017 Aug 17;6(8):e006817.
167. Sandek A, Bauditz J, Swidsinski A, Buhner S, Weber-Eibel J, von Haehling S, et al. Altered intestinal function in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Oct 16;50(16):1561–9.
168. Hug H, Mohajeri MH, La Fata G. Toll-Like Receptors: Regulators of the Immune Response in the Human Gut. *Nutrients*. 2018 Feb 13;10(2):203.
169. Niebauer J, Volk HD, Kemp M, Dominguez M, Schumann RR, Rauchhaus M, et al. Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet*. 1999 May 29;353(9167):1838–42.
170. Peschel T, Schönauer M, Thiele H, Anker SD, Schuler G, Niebauer J. Invasive assessment of bacterial endotoxin and inflammatory cytokines in patients with acute heart failure. *Eur J Heart Fail*. 2003 Oct;5(5):609–14.
171. Witkowski M, Weeks TL, Hazen SL. Gut Microbiota and Cardiovascular Disease. *Circ Res*. 2020 Jul 31;127(4):553–70.
172. Pastori D, Carnevale R, Nocella C, Novo M, Santulli M, Cammisotto V, et al. Gut-Derived Serum Lipopolysaccharide is Associated With Enhanced Risk of Major Adverse Cardiovascular Events in Atrial Fibrillation: Effect of Adherence to Mediterranean Diet. *J Am Heart Assoc*. 2017 Jun 5;6(6):e005784.
173. Vatanen T, Kostic AD, d’Hennezel E, Siljander H, Franzosa EA, Yassour M, et al. Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. *Cell*. 2016 May 5;165(4):842–53.
174. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011 Apr 7;472(7341):57–63.
175. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*. 2013 May;19(5):576–85.
176. Cheng X, Qiu X, Liu Y, Yuan C, Yang X. Trimethylamine N-oxide promotes tissue factor

expression and activity in vascular endothelial cells: A new link between trimethylamine N-oxide and atherosclerotic thrombosis. *Thromb Res.* 2019 May;177:110–6.

177. Witkowski M, Landmesser U, Rauch U. Tissue factor as a link between inflammation and coagulation. *Trends Cardiovasc Med.* 2016 May;26(4):297–303.

178. Cerquozzi S, Barraco D, Lasho T, Finke C, Hanson CA, Ketterling RP, et al. Risk factors for arterial versus venous thrombosis in polycythemia vera: a single center experience in 587 patients. *Blood Cancer J.* 2017 Dec 27;7(12):662.

179. Shah R, Patel T, Freedman JE. Circulating Extracellular Vesicles in Human Disease. *N Engl J Med.* 2018 Sep 6;379(10):958–66.

180. Castillo DJ, Rifkin RF, Cowan DA, Potgieter M. The Healthy Human Blood Microbiome: Fact or Fiction? *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:148.

181. Ricci V, Carcione D, Messina S, Colombo GI, D'Alessandra Y. Circulating 16S RNA in Biofluids: Extracellular Vesicles as Mirrors of Human Microbiome? *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 25;21(23):8959.

182. Spivak JL. Polycythemia Vera. *Curr Treat Options Oncol.* 2018 Mar 7;19(2):12.

183. Sazawal S, Singh K, Chhikara S, Chaubey R, Mahapatra M, Saxena R. Influence of JAK2V617F allele burden on clinical phenotype of polycythemia vera patients: A study from India. *South Asian J Cancer.* 2019;8(2):127–9.

184. Masella AP, Bartram AK, Truszkowski JM, Brown DG, Neufeld JD. PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC Bioinformatics.* 2012 Feb 14;13:31.

185. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol.* 2019 Aug;37(8):852–7.

186. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods.* 2016 Jul;13(7):581–3.

187. Callahan BJ, McMurdie PJ, Holmes SP. Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *ISME J.* 2017 Dec;11(12):2639–43.

188. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ.* 2016;4:e2584.

189. Dash NR, Khoder G, Nada AM, Al Bataineh MT. Exploring the impact of *Helicobacter pylori* on gut microbiome composition. *PLoS One.* 2019;14(6):e0218274.

190. Zhang W, Qi J, Zhao S, Shen W, Dai L, Han W, et al. Clinical significance of circulating

- microparticles in Ph- myeloproliferative neoplasms. *Oncol Lett.* 2017 Aug;14(2):2531–6.
191. Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, et al. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood.* 2009 Jan 29;113(5):1112–21.
192. Ciurea SO, Merchant D, Mahmud N, Ishii T, Zhao Y, Hu W, et al. Pivotal contributions of megakaryocytes to the biology of idiopathic myelofibrosis. *Blood.* 2007 Aug 1;110(3):986–93.
193. Patrono C, Rocca B, De Stefano V. Platelet activation and inhibition in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood.* 2013 Mar 7;121(10):1701–11.
194. Me K, Ch H, Hh S, Enm N 't H. Pathogen-Derived Extracellular Vesicle-Associated Molecules That Affect the Host Immune System: An Overview. *Frontiers in microbiology* [Internet]. 2018 Dec 9 [cited 2022 Dec 30];9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30258429/>
195. Petersson F, Kilsgård O, Shannon O, Lood R. Platelet activation and aggregation by the opportunistic pathogen *Cutibacterium* (*Propionibacterium*) *acnes*. *PLoS One.* 2018;13(1):e0192051.
196. Zhu W, Gregory JC, Org E, Buffa JA, Gupta N, Wang Z, et al. Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell.* 2016 Mar 24;165(1):111–24.
197. Dinakaran V, Rathinavel A, Pushpanathan M, Sivakumar R, Gunasekaran P, Rajendhran J. Elevated levels of circulating DNA in cardiovascular disease patients: metagenomic profiling of microbiome in the circulation. *PLoS One.* 2014;9(8):e105221.
198. Liesenborghs L, Verhamme P, Vanassche T. *Staphylococcus aureus*, master manipulator of the human hemostatic system. *J Thromb Haemost.* 2018 Mar;16(3):441–54.
199. Peck OM, Fan H, Tempel GE, Teti G, Halushka PV, Cook JA. *Staphylococcus aureus* and lipopolysaccharide induce homologous tolerance but heterologous priming: role of interferon-gamma. *Shock.* 2004 Mar;21(3):254–60.
200. Hasan RA, Koh AY, Zia A. The gut microbiome and thromboembolism. *Thromb Res.* 2020 May;189:77–87.
201. Zarà M, Guidetti GF, Camera M, Canobbio I, Amadio P, Torti M, et al. Biology and Role of Extracellular Vesicles (EVs) in the Pathogenesis of Thrombosis. *Int J Mol Sci.* 2019 Jun 11;20(11):2840.
202. Buratta S, Shimanaka Y, Costanzi E, Ni S, Urbanelli L, Kono N, et al. Lipotoxic stress alters the membrane lipid profile of extracellular vesicles released by Huh-7 hepatocarcinoma cells. *Sci Rep.* 2021 Feb 25;11(1):4613.

