

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

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

Ciclo XXXI

Settore Concorsuale di afferenza: 06/D3

Settore Scientifico disciplinare: MED/15

**L'impatto delle comorbidità e del BMI nei pazienti
affetti da Mielofibrosi trattati con ruxolitinib**

Presentata da: Dr. Nicola Polverelli

Coordinatore Dottorato

Supervisore

Prof. Pier Luigi Lollini

Prof. Michele Cavo

Esame finale anno 2019

Abstract della tesi di dottorato

Ruxolitinib, il primo inibitore di tirosino-chinasi JAK1/JAK2 disponibile in commercio, è stato approvato per il trattamento dei pazienti affetti da Mielofibrosi a rischio IPSS intermedio-1/intermedio-2/alto e con splenomegalia sintomatica, in considerazione dei risultati di due grandi studi registrativi (gli studi COMFORT) che ne hanno documentato l'efficacia su splenomegalia (nel 40-50% dei casi) e sintomi sistemici (in oltre l'80% dei pazienti), con probabile miglioramento della sopravvivenza. Tali studi tuttavia non hanno valutato in dettaglio l'impatto delle comorbidità e del BMI. Dal momento che l'età mediana di insorgenza della mielofibrosi è di circa 70 anni, molti pazienti che vengono avviati a terapia con ruxolitinib nella "real-life" presentano numerose comorbidità. Ad oggi, non sono disponibili dati sul trattamento con ruxolitinib in questa categoria di pazienti. In particolare, non è noto se questo subset di pazienti presenti un differente outcome o differenti profili di tossicità rispetto ai pazienti più giovani. L'obiettivo della ricerca è stato pertanto quello di analizzare in una ampia casistica di pazienti affetti da MF trattati con ruxolitinib l'impatto delle comorbidità e del BMI su risposte e sul profilo di tossicità in corso di trattamento con ruxolitinib.

Abbiamo pertanto raccolto una coorte di 402 pazienti affetti da Mielofibrosi trattati con ruxolitinib in 23 centri ematologici europei. L'età mediana della coorte era 64 anni (range, 39-89), con prevalenza del sesso maschile (52.4%). In tutto 198 pazienti (49.2%) non avevano comorbidità, 128 (31.8%) avevano un CCI di 1-2 e 76 pazienti (40.7%) avevano un CCI maggiore o uguale a 3. Le più comuni comorbidità erano rappresentate da malattia vascolare periferica (14%), precedente tumore (13.5%), diabete (10%) e epatopatia (9.6%). Secondo il BMI, il 3.2% dei pazienti era sottopeso (BMI <18.5), il 59.2% era normopeso (BMI 18.5-25), il 32.4% era sovrappeso (BMI 25-30) e il 5.2% era obeso (BMI >30).

Per quanto riguarda l'efficacia del trattamento, un CCI superiore o uguale a 3 non comportava una minore risposta in termini di riduzione della splenomegalia, ($p=0.68$) o dei sintomi ($p=0.11$). Tuttavia, i pazienti con comorbidità presentavano più frequentemente anemia durante il trattamento ($p=0.03$). Il BMI non si associava a differenze statisticamente significative in termini di risposte su milza ($p=0.57$) e sintomi ($p=0.49$) o di tossicità ($p=0.95$). La presenza di comorbidità e il sottopeso (BMI <21.9), correlavano invece significativamente con una ridotta sopravvivenza ($p<0.001$ e $p=0.02$, rispettivamente). L'ottenimento della

risposta sulla splenomegalia a 6 mesi sembrava annullare il significato prognosticamente sfavorevole delle comorbidità sull'outcome.

In conclusione, nei pazienti affetti da Mielofibrosi trattati con ruxolitinib, il BMI e il CCI, non influenzavano l'ottenimento di risposte cliniche su splenomegalia e sintomi costituzionali; tuttavia, contribuivano a identificare un gruppo di pazienti che necessita di un più attento monitoraggio.

INDICE

CAPITOLO I

Generalità

1.1	Introduzione.....	4
1.2	Epidemiologia	5
1.3	Patogenesi.....	6
1.4	Diagnosi.....	15
1.5	Aspetti Clinici.....	19
	1.5.1 Evoluzione in Leucemia Acuta	
1.6	Prognosi e Score prognostici	25
	1.6.1 International Prognostic Score System (IPSS)	
	1.6.2 Dynamic International Prognostic Score System (DIPSS)	
	1.6.3 DIPSS-plus	
	1.6.4 Modelli prognostici per Mielofibrosi secondaria (MySEC-PM)	
	1.6.5 Altri fattori prognostici indipendenti	
	1.6.6 MIPSS70, MIPSS70-plus, GIPSS	
1.7	Terapia.....	34
	1.7.1 Terapia citoreducitiva	
	1.7.2 Interferone-alfa	
	1.7.3 Talidomide e IMiDs	
	1.7.4 Androgeni e agenti stimolanti l'eritropoiesi	
	1.7.5 Splenectomia	
	1.7.6 Trapianto allogenico	
	1.7.7 Ruxolitinib	
	1.7.8 Inibitori di JAK in fase di sperimentazione	

1.7.9	Terapie sperimentali	
1.8	Obiettivi dello studio	62

CAPITOLO II

Descrizione dello studio

2.1	L'impatto delle comorbidità e del BMI sull'efficacia del trattamento con ruxolitinib nel trattamento della MF	65
2.1.1	Reclutamento dei pazienti	
2.1.2	Obiettivi	
2.1.3	Definizioni	
2.1.4	Terapia	
2.1.5	Analisi statistica	
2.2	Risultati	68
2.2.1	Caratteristiche dei pazienti alla diagnosi	
2.2.2	Impatto delle comorbidità e del BMI sulla risposta	
2.2.3	Impatto delle comorbidità e del BMI sulla tossicità	
2.2.4	Impatto delle comorbidità e del BMI sull'outcome	

CAPITOLO III

Discussione

3.1	Impatto delle comorbidità del BMI sul trattamento con ruxolitinib	78
-----	---	----

Bibliografia	80
---------------------------	----

CAPITOLO I

Generalità

1.1 INTRODUZIONE

La Mielofibrosi (MF) è una patologia appartenente al gruppo delle neoplasie mieloproliferative croniche Philadelphia-negative, che include anche la Policitemia Vera (PV) e la Trombocitemia Essenziale (TE).¹ Essa può insorgere de novo e viene pertanto definita Primaria (PMF), ovvero essere evoluzione di una precedente Policitemia Vera (MF post-PV) o di una Trombocitemia Essenziale (MF post-TE).²

Venne descritta per la prima volta dal chirurgo tedesco Gustav Heuck nel 1879, in due giovani pazienti con imponente splenomegalia, presenza di eritrociti nucleati e incremento dei globuli bianchi con morfologia atipica.³

Heuck fu il primo che evidenziò la differenza rispetto alla Leucemia Mieloide Cronica, da cui la MF si distingueva per la presenza di fibrosi midollare ed ematopoiesi extramidollare.

Fu Dameshek, nel 1951, a definire il concetto di Malattie Mieloproliferative (MPDs), che includevano Leucemia Mieloide Cronica (LMC), Trombocitemia Essenziale (TE), Policitemia Vera (PV), Mielofibrosi Primaria (MF) e Leucemia Eritroblastica.⁴ Col passare degli anni la Leucemia Eritroblastica fu ridefinita Leucemia Acuta Eritroblastica, lasciando così il gruppo delle MPDs.⁵

Nel 2001 dapprima,⁶ poi nel 2008¹ e più recentemente nel 2016,⁷ l'organizzazione mondiale della sanità ha effettuato una ampia riorganizzazione delle patologie mieloidi, ricollocando la classica famiglia delle MPDs al più ampio concetto di Neoplasie Mieloproliferative Croniche (MPNs), sottolineando la natura neoplastica di tali patologie anche alla luce delle nuove acquisizioni cliniche e nel campo della biologia molecolare.⁸ Esse includono anche la Leucemia Mieloide Cronica BCR-ABL positiva (CML), la Leucemia Cronica Neutrofila (CNL), la Leucemia Cronica Eosinofila non altrimenti specificata (CEL-NOS) e le MPN inclassificabili. (Tabella 1)

Neoplasie mieloproliferative (MPNs)
Leucemia Mieloide Cronica, BCR-ABL-positiva
Leucemia Neutrofilica Cronica
Policitemia Vera
Mielofibrosi Primaria
Mielofibrosi primaria, in stadio precoce/prefibrotica
Mielofibrosi primaria, in stadio fibrotico
Trombocitemia Essenziale
Leucemia eosinofila cronica, non altrimenti specificata
Neoplasie mieloproliferative non classificabili

Tabella 1. Classificazione delle neoplasie mieloproliferative croniche (WHO2016)⁷

1.2 EPIDEMIOLOGIA

Dodici sono gli studi disponibili che hanno riportato l'incidenza cruda della Mielofibrosi Primaria. Otto sono stati eseguiti in Europa,⁹⁻¹⁶ 2 nel Nord America^{17,18} e 2 in Oceania-Asia.^{19,20}

L'incidenza cruda annua varia dallo 0,22 a 0,99 casi per 100.000 abitanti, con una incidenza complessiva di 0,47 casi per 100.000 abitanti all'anno.²¹

L'incidenza annuale nei maschi è lievemente superiore che nelle femmine (0,59 contro 0,30 $p=0.05$). Due ulteriori studi riportano la prevalenza della Mielofibrosi primaria in 1.76 pazienti per 100.000 abitanti¹⁹ e 4.05 per 100.000 abitanti.²²

Sembra esserci una più alta incidenza di PMF in persone di origine ebraica in particolare ashkenazita.

Non è tuttavia possibile valutare in maniera precisa l'incidenza dopo il 2005, essendo disponibile un solo studio. Inoltre non sono presenti dati in letteratura riguardanti la prevalenza e l'incidenza di mielofibrosi secondarie a TE o PV.

La Mielofibrosi è una patologia dell'adulto-anziano; sulla base di un ampio numero di pazienti seguiti presso la Mayo Clinic, l'età media alla diagnosi era di circa 67 anni, con un rapporto maschi-femmine di 1,6. Nella stessa coorte di pazienti il 2, il 9 e il 29% dei pazienti era diagnosticato prima dei 30, 40, e 50 anni, rispettivamente.²³ Allo stesso modo, in altri due grandi serie di pazienti affetti da PMF, per un totale di 323 casi, solo 9 pazienti (2,8%) avevano un'età inferiore a 30 anni.^{24,25} La PMF è ancora più rara in età pediatrica.²⁶ Esiste poi una predisposizione genetica, dato suggerito dalla ricorrenza di malattie mieloproliferative all'interno della stessa famiglia.²⁷ Tale osservazione clinica ha trovato conferme biologiche nella documentazione di una incrementata incidenza di malattie mieloproliferative croniche con mutazione di JAK2 in soggetti portatori di un particolare alplotipo di JAK2, definito come "46/1" o "GGCC".²⁸ Tale alplotipo risulta presente nel 24% della popolazione europea e induce un rischio aumentato di circa 3-4 volte di sviluppare una malattia mieloproliferativa cronica.

Per quanto riguarda l'associazione di fattori ambientali con la MF, ad oggi, non vi sono risultati conclusivi, anche se non state suggerite correlazioni con il benzene e altri solventi industriali.²⁹⁻³¹

1.3 PATOGENESI

La MF è una malattia clonale della cellula staminale emopoietica. Alterazioni a carico dei megacariociti sembrano giocare un ruolo patogenetico primario nella genesi della fibrosi. Si osserva infatti una proliferazione clonale di megacariociti

con evidenti atipie morfologiche e reazione stromale a livello midollare con fibrosi reattiva.^{32,33}

La MF è caratterizzata da:

- clonalità dell'emopoiesi: la presenza degli stessi marcatori di clonalità sulle cellule di tutte e tre le linee emopoietiche (eritroide, granulocitaria e megacariocitaria) dimostra l'origine clonale della malattia nei pazienti con MF
- fibrosi midollare reattiva: nella MF il midollo presenta un'elevata proliferazione fibroblastica con aumentata produzione di fibre collagene e conseguente fibrosi midollare. Poiché i fibroblasti non sono clonali, si tratta di un processo reattivo secondario alla secrezione di varie citochine (PDGF, TGF β , VEGF, bFGF) da parte delle cellule del clone neoplastico, in particolare da parte dei megacariociti e dei monociti. Alcune di queste citochine (VEGF, bFGF) sono responsabili anche di aumentata neoangiogenesi midollare.
- emopoiesi extramidollare: nella MF si verifica il fenomeno della egressione di cellule staminali/progenitori emopoietici dal midollo nel sangue periferico e la colonizzazione di sedi extramidollari (metaplasia mieloide). Gli organi più spesso sede di questa emopoiesi extramidollare sono la milza ed il fegato. Il coinvolgimento epatosplenico è responsabile dell'epatosplenomegalia. In casi più rari è possibile l'interessamento di altri organi o tessuti, quali i tessuti paravertebrali, i linfonodi, il polmone, le sierose, l'apparato genitourinario (metaplasia mieloide non epatosplenica).

La patogenesi infiammatoria

La MF è tipicamente caratterizzata da un elevato livello di citochine proinfiammatorie, sia a livello midollare che sistemico. Varie citochine pro-

infiammatorie quali TNF-alpha, IL-6, IL-8 sono elevate nel siero di pazienti affetti da MF. È stato inoltre dimostrato che l'IL-8, l'IL-12, l'IL-15 e il recettore per IL-2 (IL-2R) sono degli indicatori prognostici di minor sopravvivenza e di trasformazione leucemica. In particolare, IL-8 può contribuire allo sviluppo del microambiente tumorale attraverso il suo ruolo importante nell'angiogenesi e nella proliferazione delle cellule endoteliali. Un recente lavoro di Skov et al., basato sullo studio del profilo di espressione genica su sangue intero in pazienti con MF, ha dimostrato l'up-regolazione di geni coinvolti nella infiammazione e nell'immunità; tra cui VEGF, HGF, G-CSF. In particolare, elevati livelli di fattore di crescita come PDGF, FGFB e VEGF sono stati implicati nella fibrosi e nell'angiogenesi.³⁴

Inoltre, il TNF-alpha, una citochina nota per essere associata con l'evoluzione clonale e la selezione delle cellule staminali preleucemiche nell'anemia di Fanconi, è anche associata all'espansione clonale nella MF e quindi alla splenomegalia. Molte altre citochine, tra cui il fattore di crescita degli epatociti (HGF), MIG e IL-1RA sono state associate a marcata splenomegalia.

I sintomi frequenti, riportati dai pazienti con MF, come sudorazione notturna e prurito, sono causati dai livelli elevati di citochine, e più in particolare, l'aumento dei livelli di IL-8 è stato associato a gravi sintomi costituzionali.

In seguito a studi *in vitro* e nel modello animale è stato ipotizzato che le citochine, ed in particolare l'infiammazione cronica, svolgano un ruolo importante nell'iniziazione e progressione della malattia. È stato infatti ipotizzato che l'infiammazione cronica possa promuovere l'instabilità genetica e quindi la formazione di mutazioni. Oltre a contribuire a sintomi MF-correlati, si pensa che l'infiammazione cronica e i livelli eccessivi di citochine proinfiammatorie possano contribuire a selezionare cloni maligni e quindi favorire la progressione della malattia verso una evoluzione leucemica.

A riprova di ciò, malattie infiammatorie pregresse, come il morbo di Crohn o malattie autoimmuni, sono associate ad un significativo aumento del rischio di

sviluppare una MF. Inoltre, i pazienti con MF hanno un rischio elevato di sviluppare tumori secondari.

La patogenesi molecolare

Anomalie cromosomiche non casuali, come 9p, 20q-, 13q-, la trisomia 8 o 9, o parziale trisomia dell'1q sono reperti comuni, ma nessuna di queste anomalie è specifica della mielofibrosi.³⁵⁻³⁸

A partire dal 2005, tuttavia, grazie alle potenzialità offerte dalle nuove tecnologie di analisi 'genome-wide', sono state individuate in rapida successione numerose mutazioni geniche, che come i tasselli di un puzzle, hanno permesso di delineare un quadro molto dettagliato, anche se non ancora completo, delle alterazioni alla base della patogenesi delle malattie mieloproliferative croniche Philadelphia negative. L'anno che rappresenta la pietra miliare per lo studio molecolare di queste patologie è il 2005, quando, 4 gruppi di ricercatori indipendenti, individuarono la presenza di una mutazione puntiforme (V617F) a carico del gene JAK2.³⁹⁻⁴² Il gene JAK2, localizzato sul braccio corto del cromosoma 9, codifica per una tirosin-chinasi che riveste un ruolo centrale nella trasduzione dei segnali indotti dai fattori di crescita emopoietici. La proteina Jak2 si trova associata, in forma inattiva, alla porzione intra-citoplasmatica dei recettori per le citochine di tipo I (eritropoietina, trombopoietina, G-CSF, GM-CSF, interleuchina-3). La stimolazione di questi recettori da parte dei rispettivi ligandi determina la dimerizzazione e la conseguente trans-fosforilazione di Jak2 (figura 1); Jak2, così attivato, innesca a sua volta una cascata di eventi fosforilativi a carico di diverse molecole citoplasmatiche, tra cui le proteine della famiglia di fattori di trascrizione STAT3/5 (Signal Transducers and Activators of Transcription) e le protein-chinasi MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) e PI3K (Phosphatidyl-inositole 3 kinase). L'attivazione di questi percorsi sfocia nella stimolazione della proliferazione, del differenziamento e della sopravvivenza cellulare (figura 2).⁴³

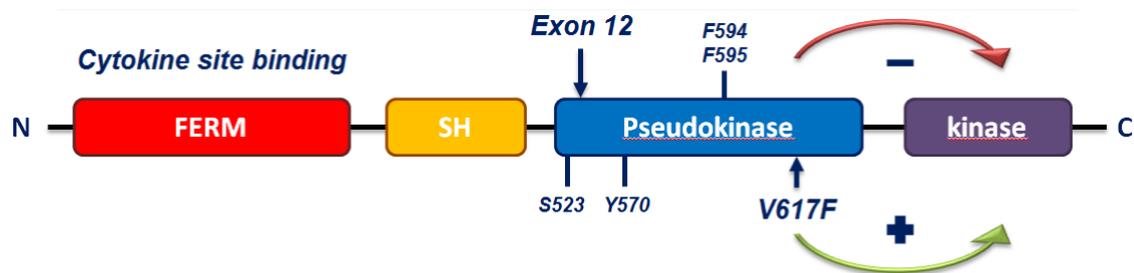


Figura 1. La mutazione V617F del gene JAK2

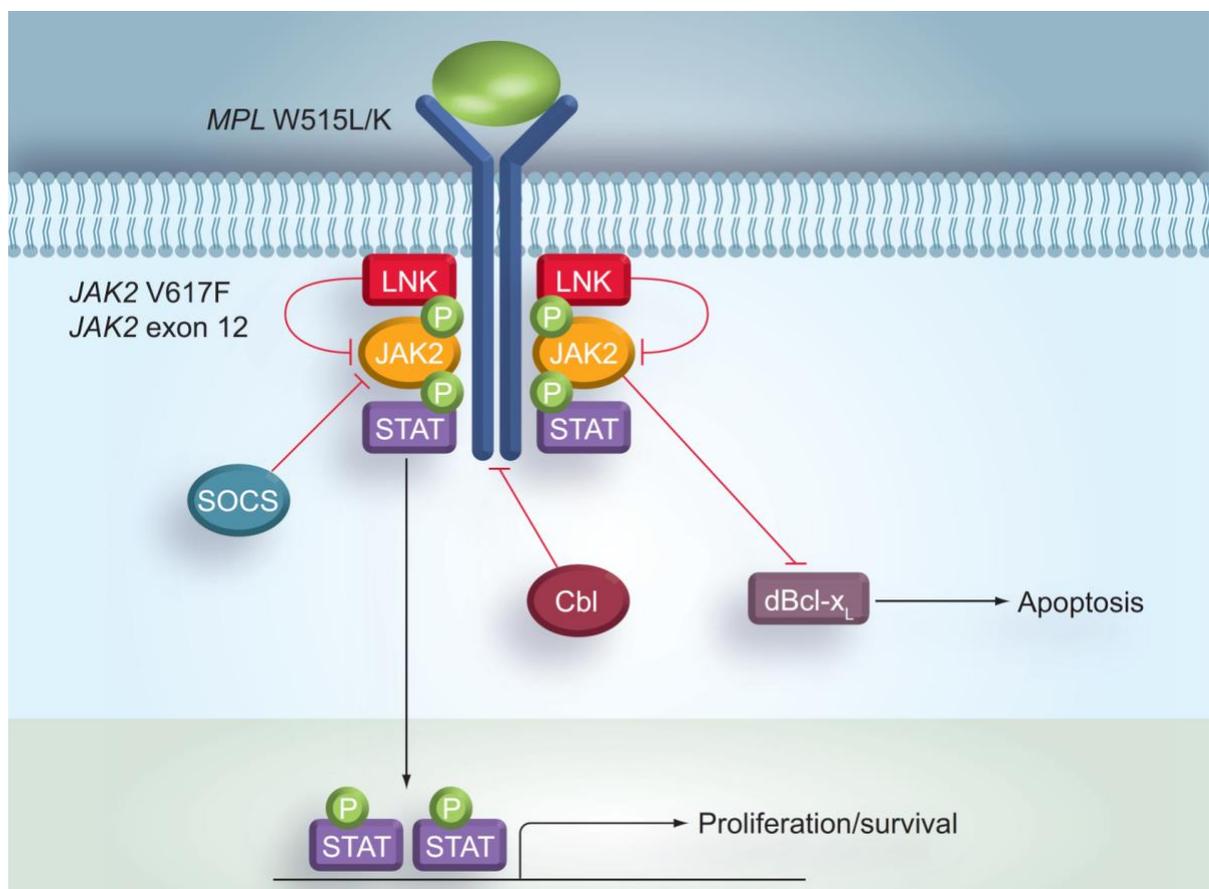


Figura 2. Il pathway di JAK/STAT.⁴⁴

La proteina Jak2 mutata viene inattivata in minor misura e quindi trasduce più efficientemente il segnale indotto dal legame dei fattori di crescita ai loro specifici recettori, con un maggior grado di proliferazione e differenziamento ed

una minor apoptosi delle cellule emopoietiche.^{45,46} La mutazione insorge spontaneamente in una cellula staminale emopoietica pluripotente, ma si manifesta solo nella progenie mieloide (linea eritroide, linea granulocitaria-macrofagica, linea megacariocitaria) perché i recettori per l'eritropoietina, la trombopoietina ecc. sono espressi solo sulle cellule mieloidi. La mutazione V617F del gene JAK2 si può osservare sia allo stato eterozigote (un solo allele è portatore della mutazione) che allo stato omozigote (entrambi gli alleli sono portatori della mutazione). Quest'ultimo evento si origina in seguito a perdita di eterozigosi (LOH, Loss of Heterozigosity) della regione cromosomica 9p (un frammento cromosomico viene perso e sostituito da una copia del cromosoma omologo in seguito a ricombinazione mitotica).⁴¹ Le cellule omozigoti per la mutazione acquistano un ulteriore vantaggio proliferativo sia rispetto alle cellule eterozigoti sia rispetto alle cellule wild-type. Nel complesso, mutazioni di JAK2 sono osservabili nel 96% dei pazienti con PV e nel 60% circa dei pazienti con TE e MF.

Nel 2006, in pazienti con MF e TE negativi per mutazioni del gene JAK2, sono state individuate mutazioni 'gain-of-function' (attivanti) a carico del gene MPL, che codifica per un altro componente chiave del pathway di Jak2: il recettore per la trombopoietina.⁴⁷ Le mutazioni interessano essenzialmente il codone 515 (W515L, W515K) e, più raramente, il codone 505 (S505N). Pazienti con mutazioni di MPL (che rappresentano circa il 3-10% dei casi di ET e MF) hanno generalmente livelli emoglobinici più bassi; nell'ambito delle TE, mutazioni del gene MPL sono state inoltre associate ad una più elevata conta piastrinica, ridotta cellularità midollare e ridotta eritropoiesi, rispetto ai casi positivi per mutazioni di JAK2. Il pathway chiave di Jak-Stat può, in casi più rari, risultare upregolato per mutazioni "loss-of-function" (inattivanti) a carico dei geni LNK (che codifica per un regolatore negativo di JAK2 e MPL)⁴⁸ e CBL (che codifica per una proteina ad attività ubiquitin-ligasica, responsabile della degradazione di Jak, Mpl ed altri recettori tirosin-chinasici).⁴⁹

La ricerca di alterazioni a carico di altri geni coinvolti nel signaling citochinico, nel 40% circa di quei pazienti che risultano negativi per tutte le suddette mutazioni, è rimasta infruttuosa fino al 2013.

Alla fine del 2013, un approccio di next-generation sequencing che ha permesso di scansionare l'intero "esoma" (ossia la porzione codificante del genoma) di pazienti con TE ed MF, ha consentito di arricchire le conoscenze a riguardo, documentando la presenza di inserzioni e delezioni ricorrenti nell'ultimo esone (esone 9) del gene CALR, codificante per la proteina calreticulina.^{50,51} La calreticulina è una proteina localizzata nel reticolo endoplasmatico e coinvolta principalmente nel folding delle glicoproteine neosintetizzate e nell'omeostasi del calcio (figura 3).

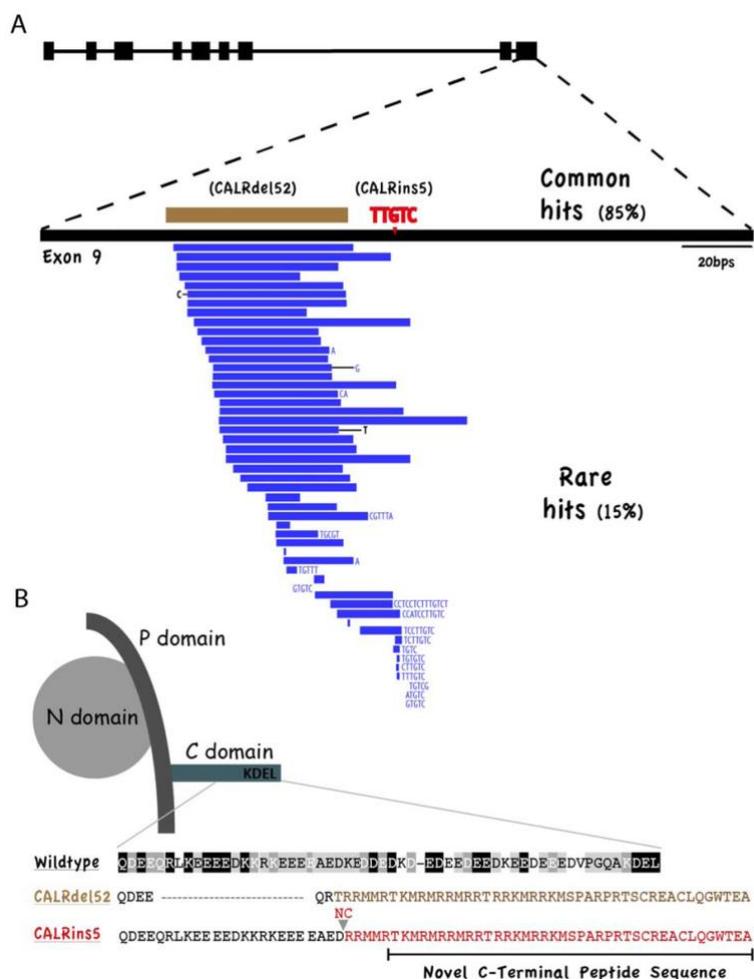


Figura 3. Mutazioni a carico del gene CALR

Il suo ruolo nella patogenesi delle TE e MF è pertanto enigmatico ed è attualmente oggetto di intenso studio. Tutte le mutazioni osservate determinano uno slittamento del codice di lettura (frameshift), che si traduce in una proteina neomorfa con una diversa porzione C-terminale. Questo potrebbe alterarne la stabilità, la funzione e/o la compartimentalizzazione intracellulare. Evidenze iniziali sembrano indicare che l'espressione di calreticulina mutata in linee cellulari possa indurre indipendenza proliferativa e ipersensibilità a citochine emopoietiche, attivando la via di segnalazione JAK/STAT.⁵² Clinicamente, pazienti con TE positivi per mutazioni del gene CALR, hanno una ridotta incidenza di trombosi e pazienti con MF hanno una sopravvivenza globale significativamente più lunga, rispetto ai casi positivi per la V617F o per le mutazioni del gene MPL.⁵³ Nel complesso mutazioni di JAK2, MPL e CALR, forniscono oggi un marcatore genetico utile per la diagnosi del 99% delle PV e dell'85% delle TE e MF (figura 4).

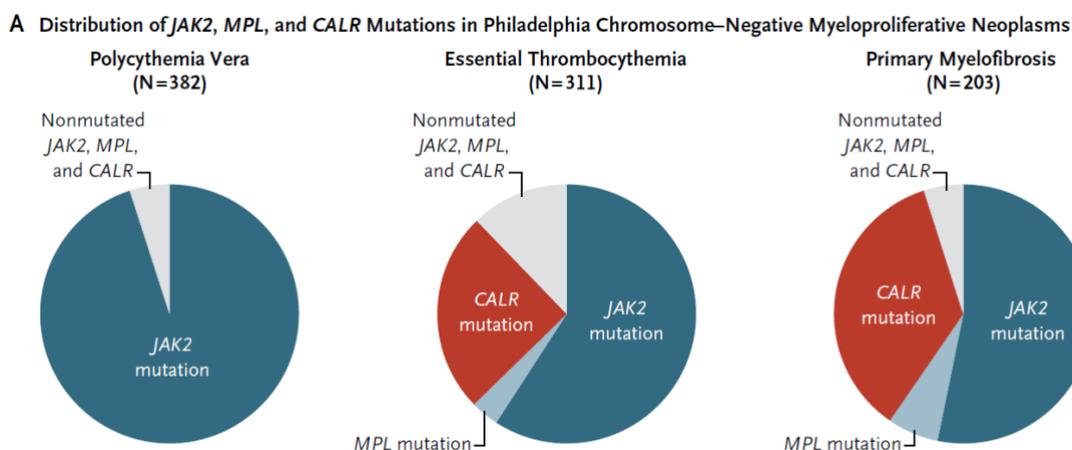


Figura 4. Frequenza delle mutazioni di JAK2, CALR e MPL tra le neoplasie mieloproliferative croniche (tratto da Krampfl et al. *New England Journal of Medicine*, 2013;369:2379-90).⁵¹

Possono essere presenti in aggiunta mutazioni addizionali a carico di geni coinvolti nel controllo epigenetico del DNA e/o di geni implicati nello splicing dell'RNA messaggero (Tabella 2).⁵⁴ Tutte queste mutazioni non sono specifiche per le MPN Ph-negative, essendo comunemente osservabili anche in altre forme mieloidi (leucemie acute, mielodisplasie, crisi blastiche mieloidi di LMC) e contrariamente alle mutazioni di JAK2, MPL e CALR, non rappresentano elementi diagnostici specifici, ma sono eventi cooperanti nella patogenesi delle MPN Ph-negative. Tra tutte, degne di nota per frequenza, sono mutazioni 'loss-of-function' a carico del gene TET2, che codifica per un enzima coinvolto nella demetilazione del DNA attraverso la conversione della 5-metilcitosina a 5-idrossimetilcitosina.⁵⁵

Gene	Chronic Phase	Blastic phase
TET2	PV: 7-16%, ET: 4-11%, PMF: 8-17%	
ASXL1	PV: 2-5 %, ET: 5-8%, PMF: 7-17%	19%
DNTMT3A	PV: 7 %, ET: 3%, PMF: 7-15%	17%
CBL	PV, ET: rare, PMF: 6%	
LNK	PV, ET, PMF: < 5%	10%
IDH 1/2	PV,ET: 2%,PMF: 4%	21%
IKZF1	PV, ET, PMF: rare	19%
EZH2	PV, ET: rare, PMF: 13%	
P53	MPNs: < 1%	27%
SRSF2	MPNs: < 1%, PMF: 17%	19%

Tabella2. Mutazioni non driver presenti in MPN.

Pazienti diversi possono presentare diverse combinazioni di mutazioni. A complicare ulteriormente il quadro, studi di clonalità hanno dimostrato che non esiste una gerarchia precisa di acquisizione di tali mutazioni (ad esempio, l'insorgenza di mutazioni in TET2 può precedere l'insorgenza della mutazione V627F di JAK2 in alcuni pazienti e seguirla in altri; mutazioni di TET2 e JAK2 possono inoltre ritrovarsi nello stesso clone in alcuni pazienti, ed in cloni distinti in altri).⁵⁶ A tutt'oggi è dunque difficile delineare un modello univoco che spieghi come assetti mutazionali distinti possano contribuire, in pazienti diversi, a determinare lo stesso fenotipo clinico. È evidente pertanto, che la patogenesi delle MPN Ph-negative è un processo multi-step a cui contribuiscono eventi molecolari diversi ma equivalenti: 1) acquisizione di una mutazione che innesci l'espansione clonale di una cellula staminale ematopoietica; 2) acquisizione di una mutazione che influenza la proliferazione ed il differenziamento delineando il fenotipo della MPN Ph-negativa; 3) possibile acquisizione di ulteriori mutazioni che determinino un'eterogeneità clonale; 4) possibile acquisizione di ulteriori mutazioni che inneschino la progressione a leucemia acuta.

1.4 DIAGNOSI

La diagnosi di Mielofibrosi deve integrare dati clinici, laboratoristici ed anatomico-patologici e richiede l'esclusione di altre malattie mieloproliferative croniche (leucemia mieloide cronica, policitemia vera e trombocitemia essenziale) (tabella 3). La nuova classificazione del 2016, ha integrato le nuove conoscenze di biologia molecolare e ha suddiviso le forme prefibrotiche, caratterizzate da una fibrosi midollare di grado 0-1 dalle forme francamente fibrotiche ("overt"), con fibrosi 2-3.⁷ Sono suggestivi, ma non patognomonicamente, di una diagnosi di mielofibrosi: 1) la presenza in circolo di precursori mieloidi ed eritroidi, in assenza di blastosi periferica (cellule blastiche mieloidi inferiori al

10%); 2) l'anisopoichilocitosi e la dacriocitosi delle emazie; 3) l'epato-splenomegalia; 4) la presenza di sintomi generali aspecifici. La conta delle cellule CD34+ circolanti risulta aumentata in larga parte dei pazienti (>15.000 CD34+/ul).⁵⁷ Inoltre, la lattico-deidrogenasi (LDH) è aumentata nella maggior parte dei casi. La valutazione molecolare dello stato mutazionale dei geni JAK2, MPL e CALR, così come l'esclusione del riarrangiamento di BCR-ABL, sono fondamentali come conferma diagnostica e per escludere una LMC. La biopsia osteomidollare ha un ruolo centrale nella diagnosi della mielofibrosi: la valutazione del grado di fibrosi, della cellularità totale e delle caratteristiche dei megacariociti, identificano la malattia dal punto di vista anatomo-patologico e confermano il sospetto diagnostico. L'analisi citogenetica fornisce indicazioni prognostiche aggiuntive.⁵⁸

Moltissime sono le condizioni ematologiche ed extraematologiche che si accompagnano ad una componente mielofibrotica. In particolare, la diagnosi differenziale può comportare alcune difficoltà nel caso della leucemia mieloide cronica, della leucemia a cellule capellute e di metastasi ossee da tumori epiteliali.

	Mielofibrosi in fase fibrotica	Mielofibrosi in fase prefibrotica
Criteri maggiori		
	Proliferazione atipica dei megacariociti documentata su biopsia ossea	
	Fibrosi midollare di grado 2-3	Fibrosi midollare di grado 0-1
	Assenza di criteri compatibili con diagnosi di Leucemia Mieloide Cronica, Policitemia vera, Trombocitemia essenziale, Mielodisplasia o altre neoplasie mieloidi	
	Dimostrazione di un marcatore molecolare (JAK2V617F, MPL, CALR) o in assenza, presenza di un altro marker clonale, o non evidenza di fibrosi midollare reattiva	
Criteri minori		
	Anemia	
	Leucocitosi $\geq 11 \times 10^9/L$	
	Splénomegalia palpabile	
	Aumentato LDH sierico	
	Leucoeritroblastosi	

Tabella 3. I criteri diagnostici per mielofibrosi primaria secondo la classificazione WHO 2016. La diagnosi di Mielofibrosi Primaria richiede la presenza di tutti e 3 i criteri maggiori e di almeno 1 criterio minore.⁷

La Mielofibrosi oltre che insorgere de novo (forma primaria), può essere anche l'evoluzione di una precedente Trombocitemia Essenziale o Policitemia Vera. Un gruppo di esperti ha redatto dei criteri diagnostici per poter documentare l'evoluzione in mielofibrosi di una precedente TE e PV (tabella 4-5).²

MF post Trombocitemia Essenziale (Criteri IWG-MRT)	
Criteri maggiori	
	Precedente diagnosi di TE secondo WHO
	Fibrosi midollare grado 2-3 (su scala da 0-3)
Criteri aggiuntivi (almeno 2 necessari)	
	Anemia e un calo di almeno 2 g di emoglobina rispetto al basale
	Leuco-eritroblastosi periferica
	Aumento di splenomegalia di almeno 5 cm rispetto al basale o comparsa di splenomegalia palpabile
	Aumento delle LDH
	Comparsa di almeno 1 sintomo costituzionale (febbre non spiegabile, perdita di peso di oltre il 10% in 6 mesi, sudorazioni)

Tabella4. Criteri diagnostici per MF post-TE secondo l'IWG-MRT

MF post Policitemia Vera (Criteri IWG-MRT)	
Criteri maggiori	
	Precedente diagnosi di PV secondo WHO
	Fibrosi midollare grado 2-3 (su scala da 0-3)
Criteri aggiuntivi (almeno 2 necessari)	
	Anemia o calo della necessità di salassoterapia o di terapia citoreducitiva per la poliglobulia
	Leuco-eritroblastosi periferica
	Aumento di splenomegalia di almeno 5 cm rispetto al basale o comparsa di splenomegalia palpabile
	Comparsa di almeno 1 sintomo costituzionale (febbre non spiegabile, perdita di peso di oltre il 10% in 6 mesi, sudorazioni)

Tabella 5. Criteri diagnostici per MF post-PV secondo l'IWG-MRT

1.5 ASPETTI CLINICI

La mielofibrosi è una malattia tumorale con aspetti clinici molto variabili da paziente a paziente. Il sintomo di presentazione più frequente è una grave astenia, presente all'esordio fino al 90% dei pazienti (Figura 5).^{17,29,59-61} I sintomi riferibili all'espansione della milza vengono riportati in oltre il 50% dei pazienti, mentre un progressivo calo ponderale è riportato dal 20 al 50% dei casi.⁶²

Possono essere presenti inoltre altri segni, relati ad uno stato ipercatabolico quali febbricola, dolori ossei e sudorazioni notturne.

Circa il 15-30% dei pazienti tuttavia non avverte sintomi e la diagnosi viene fatta a seguito di accertamenti per una splenomegalia, epatomegalia legati

all'emopoiesi extramidollare o anomalie del quadro emocromocitometrico o di altri parametri biochimici (LDH).⁶¹

In taluni pazienti è possibile documentare una ipertensione polmonare, spesso asintomatica, ma quando presente associata ad una ridotta sopravvivenza globale.⁶³⁻⁶⁵

Un altro sintomo presente in una larga quota di pazienti è il prurito, riferito spesso insorgere al contatto con l'acqua (acquagenico) e che può rappresentare una condizione invalidante, con necessità di utilizzo estensivo di antistaminici, corticosteroidi, con gli effetti collaterali che ne derivano (osteoporosi, rischio infettivo, cataratta).⁶⁶

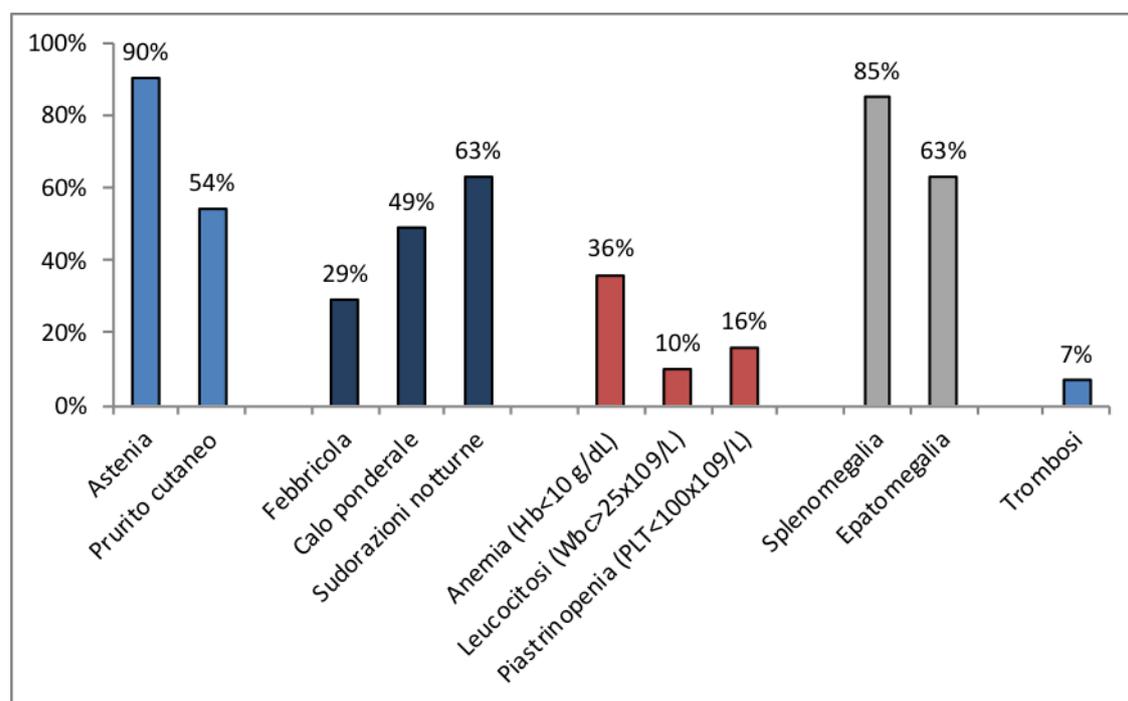


Figura 5. Dati ricavati da numerosi studi multicentrici.⁶⁷⁻⁷⁰

Per documentare con migliore precisione l'impatto che la sintomatologia comporta sulla qualità di vita del paziente con mielofibrosi, sono stati sviluppati

molti questionari, ed in particolare il MPN-SAF TSS a 10 punti si è dimostrato uno strumento utile (figura 6).⁷¹

**Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form
Total Symptom Score (MPN-SAF TSS)**

Symptom	1 to 10 (0 if absent) ranking 1 is most favorable and 10 least favorable
Please rate your fatigue (weariness, tiredness) by circling the one number that best describes your WORST level of fatigue during past 24 hours*	(No Fatigue) 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (Worst Imaginable)
Circle the one number that describes how, during the past week how much difficulty you have had with each of the following symptoms	
Filling up quickly when you eat (Early satiety)	(Absent) 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (Worst Imaginable)
Abdominal discomfort	(Absent) 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (Worst Imaginable)
Inactivity	(Absent) 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (Worst Imaginable)
Problems with concentration - Compared to prior to my MPD	(Absent) 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (Worst Imaginable)
Numbness/ Tingling (in my hands and feet)	(Absent) 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (Worst Imaginable)
Night sweats	(Absent) 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (Worst Imaginable)
Itching (pruritus)	(Absent) 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (Worst Imaginable)
Bone pain (diffuse not joint pain or arthritis)	(Absent) 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (Worst Imaginable)
Fever (>100 F)	(Absent) 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (Daily)
Unintentional weight loss last 6 months	(Absent) 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (Worst Imaginable)

Figura 6. MPN-SAF TSS.⁷¹

Un altro aspetto clinico importante riguarda l'aumentata frequenza di eventi trombotici. L'incidenza di eventi trombotici arteriosi e venosi nella PMF (2 per 100 pazienti-anno) è approssimativamente uguale a quello osservato nella

Trombocitemia Essenziale (TE) (1 a 3/100 pazienti-anno) e significativamente inferiore a quello visto nella Policitemia Vera (PV) (5.5 / 100 pazienti-anni).⁶⁸ In un'analisi retrospettiva di 205 pazienti con PMF, 13,2% aveva sperimentato un evento trombotico al momento o precedente alla diagnosi, e il 10,7% sviluppava una trombosi nel corso del follow-up. All'analisi multivariata, l'anamnesi positiva per trombosi era l'unica variabile predittiva di aumentato rischio trombotico.⁷²

La splenomegalia rappresenta un segno distintivo della Mielofibrosi.⁷³ La milza può essere così grande che il suo limite inferiore può raggiungere la fossa iliaca sinistra e occupare la maggior parte dei quadranti addominali. In due serie di pazienti con MF, il 38% aveva una splenomegalia che si estendeva oltre 10 cm sotto il margine costale sinistro³⁶ e il 23% oltre 16 cm.⁵⁹

I sintomi dovuti alla splenomegalia sono spesso predominanti; i pazienti possono notare una sensazione di peso localizzata in ipocondrio sinistro, la milza inoltre può comprimere lo stomaco del paziente, portando a sazietà precoce. Episodi acuti di dolore severo ai quadranti di sinistra, che può irradiarsi alla spalla omolaterale, possono derivare da ricorrenti e multipli infarti splenici.

Una epatomegalia palpabile oltre la linea costale è presente nel 40-70% dei pazienti.

Un quadro di ipertensione portale può svilupparsi come conseguenza di un iperafflusso splancnico, a causa della splenomegalia e/o della epatomegalia, con ostruzione intraepatica dovuta all'emopoiesi extramidollare.⁷⁴

Le complicazioni dell'ipertensione portale includono ascite, varici esofagee e gastriche, con aumentato rischio di sanguinamento gastrointestinale ed encefalopatia epatica.

Un aspetto peculiare delle neoplasie mieloproliferative croniche ed in particolare della Mielofibrosi, è rappresentato dalla trombosi venosa portale. Tale manifestazione può precedere la manifestazione clinica della malattia.⁷⁵

Possono inoltre essere presenti foci di emopoiesi extramidollare, che possono localizzarsi in qualsiasi organo.^{76,77} Oltre a determinare un coinvolgimento della milza e del fegato (organi embriogeneticamente sede di emopoiesi), possono essere interessati anche linfonodi, le sierose (pleure, pericardio, peritoneo), con presenza di essudato.⁷⁸ Più raramente vi è il coinvolgimento del tratto gastrointestinale o genito-urinario o polmonare, con sintomi quali disuria e distress respiratorio.⁷⁸⁻⁸² Il coinvolgimento del sistema nervoso centrale, può essere associato ad un aumento della pressione intracranica, con sensorio alterato, disturbi motori e/o sensitivi, compresi sintomi da compressione spinale.^{83,84}

Il coinvolgimento della cute è raro, ma si può presentare con placche eritematose, noduli, ulcere o bolle.^{85,86} In una revisione della letteratura di 13 casi, l'esame istologico di tali lesioni evidenziava la presenza di tutte e tre le linee di cellule ematopoietiche (mieloide, eritroide e megacariocitaria).⁸⁷

I foci di emopoiesi extra-midollare possono svilupparsi e/o incrementare in modo significativo dopo splenectomia, forse a causa della perdita di funzione di filtraggio della milza sulle cellule staminali neoplastiche circolanti.^{88,89}

Questo fenomeno può essere particolarmente critico nel fegato.^{80,90} In uno studio condotto su 10 pazienti con mielofibrosi sottoposti a splenectomia e a biopsia epatica intraoperatoria, è stata documentata nel fegato emopoiesi extramidollare in tutti i casi.⁹⁰ Dopo l'intervento, si è assistito ad un significativo aumento delle dimensioni del fegato e delle concentrazioni sieriche di fosfatasi alcalina, bilirubina, e/o Gammaglutammiltransferasi in tutti i pazienti.

La mielofibrosi può anche associarsi a interessamento scheletrico ed osteoarticolare, come accompagnamento alla fibrosi midollare. Queste anomalie possono essere asintomatiche, ma possono anche causare algie, localizzati tipicamente alle estremità inferiori e di difficile trattamento.

Può essere presente un quadro di osteosclerosi, caratterizzato da un diffuso o irregolare aumento della densità ossea, evidenziato da studi radiologici o dalla biopsia ossea, che mostra una maggiore rappresentazione di trabecole ossee.

Possono inoltre essere presenti attacchi gottosi monoarticolari o poliarticolari ricorrenti, legati all'iperuricemia secondaria allo stato catabolico.

1.5.1 EVOLUZIONE IN LEUCEMIA ACUTA

L'evoluzione in leucemia acuta si verifica come evento terminale in una minoranza di pazienti con mielofibrosi, molti dei quali non sottoposti a precedente trattamento con agenti alchilanti o radioterapia.⁹¹⁻⁹⁵

La maggior parte delle trasformazioni leucemiche hanno origine mieloide; tuttavia, sono state descritte anche leucemie a genesi linfoide, eritroide, megacariocitica, e leucemie bifenotipiche. Raramente sono state riportate localizzazioni extramidollari di blasti leucemici (tipo sarcoma mieloide o cloroma).

La più grande esperienza riportata, viene da una serie di 2333 pazienti consecutivi con PMF seguiti presso la Mayo Clinic, 91 dei quali (3,9%) risultava essere evoluto in leucemia acuta; tutti i casi di trasformazione erano di origine mieloide.⁹¹ Una anomalia clonale era presente in 49 dei 51 pazienti in cui era stata eseguita la valutazione citogenetica e una evoluzione citogenetica era stata documentata nella maggior parte dei pazienti che aveva eseguito una valutazione seriale prima e dopo l'evoluzione.

Dall'analisi di 311 pazienti con PMF, è emerso come la presenza di $\geq 3\%$ di blasti circolanti e la piastrinopenia $< 100.000/\text{mmc}$ alla diagnosi, siano predittivi di trasformazione leucemica.⁹⁶

In questa serie il 77, il 19, e il 4% dei pazienti aveva rispettivamente nessuno, uno, o entrambi questi fattori di rischio, con tassi di trasformazione leucemica di 6 (0 fattori di rischio) e 18% (1 o 2 fattori di rischio). Il rischio di trasformazione leucemica era inoltre aumentato nei pazienti trattati con agenti stimolanti l'eritropoiesi (eritropoietina e danazolo).

Diagnosticare la trasformazione leucemica nei pazienti con MF può essere difficile, dal momento che la presenza di cellule immature nel sangue periferico è caratteristica di base della patologia. Inoltre, la biopsia del midollo osseo può talvolta non rivelare una chiara evidenza di affezione leucemica sostitutiva.

La prognosi legata a questa evenienza è estremamente sfavorevole. Nella serie di 91 pazienti della Mayo Clinic, il trattamento con terapia “AML-like” ha indotto un tasso di remissione completa pari a zero e una mortalità correlata al trattamento del 33%.⁹¹ La sopravvivenza globale era piuttosto bassa, con una mediana di sopravvivenza di 2,6 mesi (range: 0 a 24 mesi), senza differenze di outcome nei pazienti sottoposti a chemioterapia di induzione, contenitiva o solo di supporto.

1.6 PROGNOSI E SCORE PROGNOSTICI

In uno studio epidemiologico di pazienti seguiti all'interno di Olmsted County, il tasso di sopravvivenza a tre anni era del 52%.¹⁷ Tassi di sopravvivenza migliori sono stati riportati in diversi studi non basati su popolazione, tra cui la serie utilizzata per la costruzione del sistema di score prognostico internazionale (IPSS) per mielofibrosi primaria (PMF), in cui la sopravvivenza mediana è stata di 69 mesi.⁹⁷

Sono attualmente disponibili alcuni modelli prognostici per valutare la prognosi della MF.^{36,67,97-104}

1.6.1 INTERNATIONAL PROGNOSTIC SCORE SYSTEM (IPSS)

L'IWG-MRT ha messo a punto un sistema di score prognostico (IPSS)⁹⁷ sulla base di una casistica 1054 pazienti consecutivi, affetti da mielofibrosi primaria seguiti in sette diversi centri ematologici. All'analisi multivariata sono state isolate cinque caratteristiche associate a una prognosi sfavorevole:

- Presenza di sintomi costituzionali (quali la perdita di peso maggiore del 10%, sudorazione notturna o febbre)
- Età superiore a 65 anni
- Emoglobina inferiore a 10 g/dl
- Conta leucocitaria superiore a 25.000 /ml
- La presenza di blasti circolanti ($\geq 1\%$)

I soggetti con zero (basso rischio), uno (rischio intermedio-1), due (rischio intermedio-2), o maggiore di 3 (rischio elevato) caratteristiche alla diagnosi avevano una sopravvivenza mediana 135, 95, 48 e 27 mesi, rispettivamente.

1.6.2 DYNAMIC INTERNATIONAL PROGNOSTIC SCORE SYSTEM (DIPSS)

L'IPSS è stato successivamente modificato per tener conto degli effetti prognostici avversi che derivano dall'acquisizione di questi fattori di rischio nel corso della storia della malattia, così come l'età nei pazienti con meno di 65 anni (DIPSS aggiustato per età).⁶⁷

Il DIPSS viene calcolato come segue:

- Età superiore a 65 anni (1 punto)
- Conta leucocitaria superiore a 25.000 /ml (1 punto)
- Emoglobina inferiore a 10 g/dl (2 punti)
- La presenza di blasti circolanti ($\geq 1\%$) (1 punto)
- Presenza di sintomi costituzionali (1 punto)

I soggetti con zero, da uno a due, da tre a quattro, da cinque a sei punti sono stati considerati rispettivamente, a basso, intermedio-1, intermedio-2 o alto rischio.

In un'analisi separata, il DIPSS correlava anche con il rischio di progressione a leucemia acuta dei pazienti con PMF.⁶⁹ L'incidenza di trasformazione blastica era 0.3, 0.7, 2.6, e 8.6 per 100 pazienti-anno, rispettivamente per pazienti a basso rischio, intermedio-1, intermedio-2 e ad alto rischio. Anche un peggioramento del DIPSS nel corso del follow-up risultava associato ad un rischio significativamente maggiore di sviluppare una fase blastica.

1.6.3 DIPSS-plus

Altri fattori prognostici indipendenti sono stati identificati oltre a quelli dell'IPSS, questi sono rappresentati da:

- Cariotipo sfavorevole (cariotipo complesso o presenza di una o due anomalie, che comprendono +8, -7 / 7q-, i(17q), -5/5q, 12p-, inv(3), o riarrangiamento 11q23).¹⁰⁵⁻¹⁰⁹
- La necessità di supporto trasfusionale per globuli rossi.¹¹⁰
- Piastrinopenia inferiore a $100 \times 10^9/L$.¹¹¹

Questi tre fattori di rischio aggiuntivi sono stati aggiunti al DIPSS per sviluppare il DIPSS-plus,¹¹² come segue:

- DIPSS basso rischio (0 punti)
- DIPSS rischio intermedio-1 (1 punto)
- DIPSS rischio intermedio-2 (2 punti)
- DIPSS alto rischio (3 punti)
- cariotipo sfavorevole (1 punto)
- Conta piastrinica inferiore a 100.000/ml (1 punto)
- necessità trasfusionale (1 punto)

Quando il sistema di punteggio DIPSS-plus è stato applicato ad un gruppo di 793 pazienti consecutivi con PMF seguiti presso la Mayo Clinic, quelli con zero punti (basso rischio), un punto (rischio intermedio-1), due o tre punti (rischio intermedio-2), da quattro a sei punti (alto rischio), hanno avuto una sopravvivenza mediana di 15.4, 6.5, 2.9, e 1.3 anni, rispettivamente.

Quando questo score è stato applicato a 299 pazienti con età inferiore a 60 anni seguiti alla Mayo Clinic, le sopravvivenze mediane (dal momento della prima

visita) erano state di 20, 14.3, 5.3, e 1,7 anni rispettivamente, confermando la prognosi migliore dei pazienti più giovani con PMF.²³

Una categoria di pazienti a rischio "molto alto", con una sopravvivenza mediana di nove mesi e un tasso di mortalità a due anni del 83% è stata evidenziata in pazienti portatori di cariotipo monosomico o con inv(3)/ i(17q), o due qualsiasi alterazioni fra blasti circolanti maggiori del 9%, conta leucocitaria superiore a 40.000/ml o presenza di altre caratteristiche citogenetiche sfavorevoli (ossia, cariotipo complesso o presenza di una o due anomalie tra cui +8, 12p-, riarrangiamento 11q23).

La differenza nella sopravvivenza tra le categorie a rischio "molto alto" e "alto" è spiegabile, in parte, da una differenza nel rischio di trasformazione leucemica, con incidenza a 2 anni del 31 e 7%, rispettivamente.

1.6.4 MODELLI PROGNOSTICI PER MIELOFIBROSI SECONDARIA (MySEC-PM)

Questi strumenti decisionali, appena descritti, sono stati sviluppati in grandi coorti di pazienti affetti da MF primaria, tuttavia non appaiono altrettanto efficaci nel suddividere la prognosi dei pazienti affetti da MF secondaria. In uno studio condotto presso l'MD Anderson, sia l'IPSS che il DIPSS non erano in grado di predire la sopravvivenza in questa categoria di pazienti. In particolare, non venivano distinti i pazienti a rischio intermedio-2/alto nella MF post-Policitemia Vera e gli intermedio-1/bassi e intermedio-2 nella MF post-TE, inducendo una erronea valutazione prognostica dei pazienti.¹¹³

Da questa esigenza è nato il MySEC prognostic model, sviluppato dal gruppo cooperatore italiano, che ha raccolto 685 pazienti con mielofibrosi secondaria ed ha identificato i seguenti parametri come prognosticamente rilevanti:

- Emoglobina inferiore a 11 g/dl (2 punti)
- La presenza di blasti circolanti ($\geq 3\%$) (2 punti)
- Assenza di mutazioni di CALR (2 punti)
- Piastrinopenia inferiore a $150 \times 10^9/L$ (1 punto)
- Presenza di sintomi costituzionali (1 punto)
- Età come variabile continua (0.15 punti per ogni anno di età)

Questo modello prognostico si è rivelato molto efficace nel suddividere i pazienti affetti da MF secondaria a differente prognosi.¹¹⁴

1.6.5 ALTRI FATTORI PROGNOSTICI INDIPENDENTI

Altri fattori di prognostici indipendenti si sono rilevati associati ad una peggiore sopravvivenza.

Questi sono rappresentati dalla presenza di elevati livelli di citochine circolanti.

In un'ampia casistica di 127 pazienti affetti da PMF, è stato documentato un aumento dei livelli di un certo numero di citochine.¹¹⁵

È stato poi sviluppato un modello di rischio in base ai livelli di due di queste citochine (IL-8 e IL-2R) e in base ai livelli aumentati o meno si sono delineati gruppi a diversa prognosi all'interno del DIPSS-plus a rischio intermedio-1 e intermedio-2.¹¹⁵

In un secondo studio di 184 pazienti con MF primaria o secondaria a TE e PV, livelli di proteina C-reattiva superiore a 7 mg/l, l'età superiore a 65 anni e la presenza di blasti circolanti superiori all'1 % erano indipendentemente associati ad un aumentato rischio di sviluppo di trasformazione leucemica.¹¹⁶

Nel corso degli ultimi anni poi sono stati condotti molti studi volti a valutare l'impatto prognostico delle diverse mutazioni genetiche nel decorso della malattia.

A partire dal 2008, due studi hanno dimostrato che una bassa carica allelica della mutazione V617F del gene JAK2 in pazienti con mielofibrosi primaria, potrebbe indicare la presenza di un clone JAK2^{V617F}-negativo predominante, che conferisce un fenotipo di malattia più aggressivo, con una ridotta sopravvivenza globale, sebbene i meccanismi biologici alla base di questo fenomeno rimangano ancora da chiarire.^{117,118}

Inoltre, hanno valenza a fini prognostici anche l'analisi mutazionale della calreticulina (CALR) e del Myeloproliferative Leukemia Virus Oncogene (MPL).

Infatti, i pazienti con mutazione di CALR hanno la prognosi migliore, mentre la prognosi è peggiore nei pazienti che non presentano alcuna mutazione (JAK2 MPL e CALR, ossia "triplo-negativi").

L'impatto clinico delle mutazioni di JAK2, CALR e MPL è stato studiato in un'analisi retrospettiva di 428 pazienti con diagnosi di PMF effettuata prima del 2011.⁵³

Mutazioni a carico di JAK2, CALR, e MPL sono state riscontrate nel 60, 21 e 6% dei pazienti, rispettivamente. Il 12% dei pazienti risultava "triplo-negativo" (cioè era negativa la ricerca delle mutazioni di JAK2, CALR, e MPL).

La sopravvivenza mediana dei pazienti JAK2 mutati, CALR-mutati, MPL-mutati, e dei "triplo negativi" erano 5.9, 15.9, 9.9, e 2.3 anni, rispettivamente.

In un altro studio, soggetti "triplo-negativi" affetti da forma familiare di mielofibrosi primaria, avevano una sopravvivenza significativamente peggiore rispetto a quelli con PMF familiare e mutazioni sia di JAK2 o di CALR.¹¹⁹

Numerose altre mutazioni non fondanti sono risultate associate ad un impatto prognostico. Un'ampia casistica di pazienti, divisi in una coorte europea e una

della Mayo Clinic, che comprendeva 879 pazienti, è stata studiata per determinare la rilevanza prognostica di alcune mutazioni somatiche nella mielofibrosi.⁵⁴

I campioni di sangue della coorte europea, raccolti al momento della diagnosi, sono stati analizzati per mutazioni in ASXL1, SRSF2, EZH2, TET2, DNMT3A, CBL, IDH1, IDH2, MPL e JAK2. Di queste, le mutazioni ASXL1, SRSF2 ed EZH2 predicevano in modo indipendente una sopravvivenza ridotta. Tuttavia, solo la mutazione di ASXL1 (Hazard Ratio 2.02) è rimasta significativa nel contesto dello score IPSS.

Queste osservazioni sono state poi convalidate nella coorte della Mayo Clinic, dove le mutazioni e l'analisi della sopravvivenza erano state effettuate al momento della prima visita del paziente presso il centro. Le mutazioni di ASXL1, SRSF2, e EZH2 erano risultate indipendentemente associate con una ridotta sopravvivenza, ma solo la mutazione di ASXL1 manteneva la rilevanza prognostica negativa indipendentemente dallo score DIPSS-plus, che incorpora l'analisi citogenetica.

Il rischio di evoluzione in leucemia acuta inoltre, era influenzato negativamente nella coorte europea da mutazioni di IDH1/2, SRSF2, ASXL1.

Un'analisi ulteriore di 797 pazienti con mielofibrosi primaria, ha poi valutato l'effetto sulla sopravvivenza globale, da parte di una serie limitata di mutazioni "prognosticamente sfavorevoli" in 5 geni (ASXL1, EZH2, SRSF2 e IDH1/IDH2). La sopravvivenza mediana era rispettivamente di 12.3, 7.0, e 2.6 anni per quelli senza, con una o con due o più mutazioni in questi cinque geni.¹²⁰

L'analisi delle mutazioni di ASXL1, EZH2, SRSF2, IDH e per la perdita di eterozigosi (LOH) di TP53,¹²¹ sembrano identificare pazienti con mielofibrosi primaria a maggior rischio di morte prematura o trasformazione leucemica (i cosiddetti soggetti "a rischio molecolare alto", con una o più mutazioni presenti o "a rischio molecolare basso", in assenza di mutazioni molecolari). Una

ulteriore mutazione a carico del gene U2AF1Q157 è stata recentemente descritta come prognosticamente rilevante dal gruppo della Mayo Clinic.¹²²

1.6.6 MIPSS70, MIPSS70+, GIPSS

Alla luce di tutte queste acquisizioni molecolari, nuovi modelli prognostici sono stati introdotti nella pratica clinica, per una moderna stratificazione prognostica. Il “mutation-enhanced IPSS” (MIPSS70 e il MIPSS70-plus) è stato il primo score che abbia integrato le nuove scoperte molecolari ed è stato validato in coorti di pazienti con età inferiore a 70 anni, al fine di essere particolarmente utile a scopo trapiantologico.¹²³ Il MIPSS70/MIPSS70-plus individuano le seguenti variabili clinico-laboratoristiche, molecolari (MIPSS70) e citogenetiche (MIPSS70-plus)

- Conta leucocitaria superiore a 25.000 /ml (1 punto)
- Emoglobina inferiore a 10 g/dl (1 punto)
- Piastrinopenia inferiore a $100 \times 10^9/L$
- La presenza di blasti circolanti ($\geq 2\%$) (1 punto)
- Presenza di sintomi costituzionali (1 punto)
- Fibrosi midollare ≥ 2
- Assenza di mutazioni di CALR tipo1 o simil-tipo1 (2 punti)
- mutazioni a carico di ASXL1, EZH2, SRSF2, IDH1/2 (1 o 2 punti se presente una o più mutazioni)
- Cariotipo sfavorevole (qualunque alterazione eccetto 20q-, 13q-, +9, traslocazioni/duplicazioni del cromosoma 1, -Y o altre alterazioni dei cromosomi sessuali) (3 punti)

La somma di tali punteggi caratterizza un rischio basso (0-2), intermedio (3), alto (4-6) o molto alto (>6) caratterizzato da una sopravvivenza a 5 anni pari al 100%, 90%, 76% e 46.5% per le quattro categorie rispettivamente.

Un secondo strumento prognostico introdotto è stato pubblicato nel 2018 e considera unicamente variabili genetiche, il “Genetically inspired prognostic scoring system” (GIPSS):

- Cariotipo molto sfavorevole (2 punti)
- Cariotipo sfavorevole (1 punto)
- Assenza di mutazioni di CALR tipo1 o simil-tipo1 (1 punto)
- Mutazioni di ASXL1, SRSF2 o U2AF1Q157 (1 punto)

Questo strumento stratifica i pazienti a rischio basso (0 punti), intermedio-1 (1 punto), intermedio-2 (2 punti) o alto rischio (3 punti), con aspettativa di vita mediana pari a 26.4, 8, 4.2 e 2 anni, rispettivamente.

1.7 TERAPIA

La mielofibrosi fino al 2005 era una malattia orfana, il cui trattamento era orientato alle necessità del malato, che potevano differire notevolmente da paziente a paziente. L'unico trattamento eradicante la malattia è il trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche, tuttavia tale procedura è condizionata da un'importante morbilità e mortalità e da riservare solamente a una parte minoritaria di pazienti.

La scoperta della mutazione di JAK2 e della deregolazione del pathway JAK-STAT, ha consentito lo sviluppo di piccole molecole inibitori delle tirosin-chinasi, di cui ruxolitinib rappresenta il capostipite e primo ad essere introdotto in commercio, a partire dal 2012 negli USA e dal 2015 in Italia.

Qui di seguito verranno elencate tutte le terapie convenzionali impiegate nella mielofibrosi e le prospettive terapeutiche future.

1.7.1 TERAPIA CITORIDUTTIVA

La terapia antiproliferativa citoreducitrice è utilizzata con il fine di ridurre l'epatospленomegalia, con miglioramento dei sintomi da ingombro splenico, per alleviare i sintomi quali febbre e perdita di peso, o ridurre un'eventuale piastrinosi.

1) Idrossiurea

A causa della sua efficacia dimostrata nelle altre neoplasie mieloproliferative croniche (Policitemia Vera e Trombocitemia Essenziale), l'idrossiurea è diventato il farmaco chemioterapico di scelta per il trattamento della MF.¹²⁴ L'idrossiurea si è dimostrata utile nel ridurre le dimensioni della milza, nel controllo della trombocitosi e leucocitosi e dei sintomi costituzionali (ad esempio osteoartralgie, febbre, prurito).¹²⁴⁻¹²⁸ In una serie di 59 pazienti con neoplasie mieloproliferative croniche (di cui 10 con MF) associate a trombocitosi, la terapia cronica con idrossiurea ha consentito la riduzione della conta piastrinica (inferiore a 500.000/ml) in 6 dei 10 pazienti con PMF (e oltre l'80% di quelli con PV o ET).¹²⁴ In un altro rapporto dagli stessi autori, l'idrossiurea ha anche consentito la riduzione del grado di fibrosi midollare.¹²⁵ Sebbene la dose iniziale del farmaco suggerita per il trattamento di PV e ET è di 15 mg/kg al giorno (dose giornaliera per un uomo adulto di media corporatura è di 500 mg due volte al giorno), la dose iniziale nelle forme di MF dovrebbe essere inferiore, data la coesistenza in molti pazienti di anemia. La dose orale iniziale di 500 mg al giorno, con successive modifiche in base all'evoluzione del quadro ematologico periferico, appare l'approccio terapeutico più prudente in queste circostanze.

L'efficacia dell'idrossiurea sembra essere correlata allo stato mutazionale. Infatti in una casistica di 69 pazienti con MF, la risposta al trattamento era

rispettivamente del 48 contro l'8% nei pazienti con o senza mutazione V617F del gene JAK2.¹²⁹

2) Busulfano e agenti alchilanti

Il busulfano e altri agenti alchilanti sono stati utilizzati in passato. Tuttavia, i pazienti con MF sono estremamente sensibili a questi agenti, con possibili citopenie severe e prolungate, anche dopo sospensione del farmaco.

Uno studio italiano ha valutato l'impiego del melfalan a basse dosi (dose iniziale di 2,5 mg tre volte alla settimana, da poter incrementare fino a 2,5mg al giorno) in 104 pazienti con PMF associata a splenomegalia, anemia trasfusione-dipendente, leucocitosi e/o trombocitosi.¹³⁰ Tutti i pazienti elegibili al trattamento venivano pretrattati con danazolo (200 mg/die) o prednisone (0,25 mg/kg/die) per almeno due mesi. È stata osservata una risposta ematologica in 66 dei 99 pazienti valutabili, dopo un tempo mediano di 6,7 mesi. La splenomegalia, la leucocitosi e la trombocitosi si sono normalizzati nel 23, 86 e 93% dei pazienti, rispettivamente. L'anemia è migliorata in 12 dei 20 pazienti con anemia severa non trasfusione-dipendente; dei 16 pazienti che necessitavano di supporto trasfusionale, 6 hanno ottenuto la trasfusione-indipendenza. Tuttavia è stata frequentemente osservata una tossicità ematologica, anche se reversibile alla interruzione o alla riduzione del trattamento.

Il potenziale leucemogenico del farmaco ha limitato l'impiego di tale terapia in questa malattia.

1.7.2 INTERFERONE-ALFA

L'IFN α ha molteplici effetti sulla riduzione della proliferazione di fibroblasti e sui progenitori emopoietici in vitro, suggerendo una potenziale efficacia anche nei pazienti con MF.¹³¹⁻¹³⁷

L'interferone alfa (IFN α) ha dimostrato efficacia nell'indurre risposte ematologiche e citogenetiche in pazienti con leucemia mieloide cronica in fase cronica e ha inoltre dimostrato utilità nella TE e PV.

L'efficacia di IFN α è stata valutata in una serie di 54 pazienti affetti da neoplasie mieloproliferative (PV, ET, PMF), che sono stati trattati con somministrazione sottocutanea al dosaggio di 5 MUI (milioni di unità internazionali) al giorno.¹³¹

Il controllo della trombocitosi è stato ottenuto in 24/24 pazienti, il controllo della iperleucocitosi è stato raggiunto in 14/14 pazienti. Si è poi osservata la riduzione di almeno il 10% della splenomegalia in 26/39 pazienti splenomegalici.

Tuttavia, il punto debole di tale terapia è rappresentato dall'elevata percentuale di pazienti che sono costretti ad interrompere il trattamento (circa il 50%), a causa degli effetti collaterali (dolori osteoarticolari, febbre, comparsa di fenomeni autoimmuni).^{132,133} In uno studio di fase II, che ha coinvolto 11 pazienti con mielofibrosi ad espressione iperproliferativa non precedentemente trattati, sono state somministrate dosi settimanali fino a 15 milioni di unità di IFN α , per la durata complessiva di un anno.¹³⁴ In 7/11 pazienti è stata osservata una tossicità inaccettabile, con necessità di interruzione del trattamento. Nessuna risposta significativa è stata osservata, in termini di riduzione della splenomegalia e della fibrosi midollare.

Risultati migliori sono stati ottenuti, in termini di riduzione degli effetti collaterali, con l'impiego di interferone- α 2A peghilato.^{135,136,138}

1.7.3 TALIDOMIDE E IMIDS

Gli agenti immunomodulanti (IMIDs), sono una classe di farmaci ad azione pleiotropica caratterizzati da proprietà anti-proliferative, pro-apoptotiche, anticitochiniche, anti-infiammatorie, anti-angiogeniche e immunomodulanti sui linfociti NK e T. Essi rappresentano il cardine del trattamento del mieloma

multiplo e hanno dimostrato di migliorare la citopenia, in particolare anemia e trombocitopenia, in pazienti con MF. Il capostipite della famiglia è rappresentato dalla talidomide, cui sono seguiti agenti di seconda generazione caratterizzati da una maggiore attività terapeutica e ridotta tossicità, quali lenalidomide e pomalidomide.

1) Talidomide

La talidomide è stata valutata principalmente in subset di pazienti affetti da MF pretrattati.

Risposte alla terapia, in termini di scomparsa di sintomi costituzionali, riduzione della splenomegalia, incremento della concentrazione di emoglobina con ottenimento di trasfusione-indipendenza, normalizzazione dei globuli bianchi e delle piastrine, sono stati osservate nel 20-40% dei casi.¹³⁹⁻¹⁴³

In questi studi, solo pochi pazienti sono riusciti a tollerare dosi superiori a 400 mg al giorno, a causa degli effetti collaterali, che comprendevano sonnolenza, stipsi, astenia, neuropatia periferica e neutropenia.¹⁴⁴ In uno studio condotto su 63 pazienti, la mediana della dose massima tollerata era di 100 mg al giorno e il 51% dei pazienti sospendeva il trattamento a causa degli effetti collaterali.¹⁴¹

Risultati preliminari hanno suggerito che basse dosi iniziali (ovvero 50 mg/die), con possibile graduale aumento della dose, possono essere egualmente efficaci ma più tollerabili.^{142,145,146} Effetti collaterali ematologici sono stati osservati in 4/15 pazienti (ad esempio, trombocitosi, leucocitosi e tamponamento pericardico da ematopoiesi extramidollare).

Al fine di migliorare la tolleranza alla talidomide, è stato condotto uno studio di associazione in pazienti con MF sintomatici, con talidomide a basso dosaggio (50 mg/die), associato a prednisone (dose iniziale di prednisone 0,5 mg/kg al giorno, da sospendere nel corso di 3 mesi).^{145,147} Venti dei 21 pazienti trattati con questo schema sono stati in grado di completare la terapia, con una risposta clinica valutata in 13. Tra le risposte si era osservato un miglioramento

dell'anemia in 13 pazienti, ottenimento di trasfusione-indipendenza in 4, miglioramento della piastrinopenia in 6 e riduzione di almeno il 50% della splenomegalia palpabile al disotto dell'arcata costale in 4. Tale regime terapeutico risultava meglio tollerato rispetto agli studi precedenti, che utilizzano dosi maggiori di talidomide come agente singolo.

Tra gli effetti collaterali, nel 38% dei pazienti è stata osservata una leucocitosi e nel 19% una trombocitosi. Inoltre, si è registrato un episodio di trombosi venosa profonda (TVP), complicazione già osservata in altri subset di pazienti trattati con talidomide (mieloma multiplo). Gli eventi avversi associati all'utilizzo del prednisone sono stati lievi e transitori.

Ad un follow-up mediano di 25 mesi per i 36 pazienti complessivi trattati presso la Mayo Clinic con talidomide, il tasso di risposta complessiva a lungo termine è stato del 28%.^{142,145,147} Risposte durature si sono osservate in termini di miglioramento dell'anemia e della piastrinopenia, ma non per quanto riguarda la riduzione della splenomegalia.

2) Lenalidomide

Un certo numero di studi di fase II è in corso per valutare l'efficacia della lenalidomide, analogo della talidomide, come singolo agente o in associazione al prednisone nei pazienti con MF.

In un report di 68 pazienti trattati con lenalidomide agente singolo (dose iniziale di 10 mg al giorno o 5 mg, se conta piastrinica basale inferiore alle 100.000/ml), i tassi di risposta complessivi sono stati rispettivamente del 22, 33 e 50%, per quanto riguarda rispettivamente l'anemia, la splenomegalia e la trombocitopenia.¹⁴⁸ Gli eventi avversi di grado 3-4 includevano neutropenia e piastrinopenia nel 31 e nel 19% dei pazienti.

In un secondo report, la lenalidomide (allo stesso dosaggio del precedente studio nei giorni da 1 a 21 in cicli di 28 giorni per 6 cicli) più prednisone (30 mg/die

durante il ciclo 1, 15 mg/die durante il ciclo 2 e 15 mg/giorno dal terzo ciclo) è stata somministrata a 40 pazienti con PMF.¹⁴⁹

I tassi di risposta globale sono stati del 30 e del 42% per l'anemia e la splenomegalia, con un tempo mediano alla risposta di 12 settimane. È stato inoltre possibile osservare una certa riduzione della fibrosi midollare e della carica allelica della mutazione V617F del gene JAK2. Gli eventi avversi di grado 3-4 sono stati rappresentati da neutropenia, anemia e piastrinopenia rispettivamente nel 58, 42, e il 13% dei pazienti.

Uno studio multicentrico di fase II condotto dall'Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG), ha valutato poi la combinazione di lenalidomide (10 mg/die) più prednisone (dose iniziale di 30 mg/die) in 42 soggetti con MF, ottenendo un tasso di risposta globale del 23%, con un miglioramento clinicamente significativo dell'anemia nel 19% e/o riduzione della splenomegalia nel 10% dei casi.¹⁵⁰ Lo studio seriale del midollo osseo tuttavia, non ha mostrato alcuna risoluzione della fibrosi. In termini di effetti collaterali, la tossicità ematologica era preponderante con l'88% dei soggetti che presentava effetti avversi di grado 3-4.

Una menzione particolare meritano i pazienti con MF associata a delezione del braccio lungo del cromosoma 5 (5q-), i quali mostrano un tasso di risposta completa ematologica maggiore.

In una casistica della Mayo Clinic, tutti e 3 i pazienti affetti da MF con 5q-, hanno ottenuto una risposta ematologica completa alla terapia con lenalidomide, al dosaggio di 10mg al giorno.¹⁵¹

Tale dato supporta fortemente la valutazione citogenetica in tutti i pazienti con MF sia primaria che secondaria. Qualora riscontrata tale delezione, la terapia con lenalidomide può essere valutata e proseguita a tempo indeterminato, se ben tollerata.

3) Pomalidomide

Il terzo agente della famiglia degli IMiDs, la pomalidomide, in associazione o meno ad un breve ciclo corticosteroidico, ha dimostrato utilità nel trattamento dei pazienti con anemia associata a MF, in uno studio di fase II¹⁵². Tuttavia la sua efficacia si è dimostrata molto limitata in termini di riduzione della splenomegalia.¹⁵³

In uno studio della Mayo Clinic comprendente 94 pazienti affetti da mielofibrosi, che hanno partecipato a due studi clinici consecutivi con dosi variabili di pomalidomide (da 0,5 a 3,5 mg al giorno), la risposta sull'anemia è stata del 53% nei pazienti JAK2^{V617F} positivi con una splenomegalia palpabile inferiore a 10 centimetri e con meno del 5% di blasti circolanti. Il trattamento è risultato inefficace in coloro che erano JAK2 wild type, con splenomegalia superiore a 10 cm o con più del 5% di cellule blastiche circolanti.¹⁵⁴ Il trattamento è stato globalmente ben tollerato, con unico effetto collaterale osservato rappresentato da una neuropatia sensoriale sviluppatasi in 4 dei 30 pazienti trattati per più di un anno.

1.7.4 ANDROGENI E AGENTI STIMOLANTI L'ERITROPOIESI

I pazienti anemici si possono giovare di terapia con preparati ad azione androgenica (fluoxymesterone, danazolo). La combinazione di un androgeno e corticosteroidi può consentire un miglioramento dell'anemia in alcuni pazienti. Dopo un mese di terapia, nei pazienti responsivi, il trattamento con il corticosteroidico viene scalato, mentre l'androgeno viene continuato.

Tutti i pazienti trattati con androgeni dovrebbero eseguire un controllo periodico dei test di funzionalità epatica. I pazienti di sesso maschile, dovrebbero essere valutati per escludere un tumore prostatico prima dell'inizio della terapia. Nei

pazienti di sesso femminile dovranno essere sottolineati gli effetti collaterali virilizzanti.

I tassi di risposta sull'anemia nei pazienti trattati con androgeni sono variabili da casistica a casistica, tra il 29 e il 57%.^{155,156}

In una casistica di 23 pazienti, la presenza di un profilo cromosomico normale correlava con la percentuale di risposta: 92% rispetto al 22% in pazienti con anomalie citogenetiche.¹⁵⁶

In uno studio controllato su 24 pazienti affetti da neoplasie mieloproliferative (più della metà dei quali con mielofibrosi), una risposta al trattamento con fluoxymesterone è stato osservato in 4/14 (29%) pazienti.¹⁵⁵

Analoghe risposte sono state documentate con un altro farmaco androgeno, il danazolo, a dosaggio variabile da 200 a 800mg al giorno.^{157,158}

Risultati non conclusivi sono riportati con l'utilizzo di eritropoietina o darbepoetina in pazienti con PMF,^{159,160} anche se alcuni gruppi hanno riportato risposte più spesso in pazienti con anemia non-trasfusione dipendente e/o con livelli di eritropoietina sierica inappropriatamente bassi.¹⁶¹⁻¹⁶³

Il loro impiego è sconsigliato in pazienti con splenomegalia, per il rischio che possano determinare un incremento dell'organomegalia.

1.7.5 SPLENECTOMIA

La splenomegalia è una caratteristica distintiva della mielofibrosi, spesso di grandi dimensioni, può arrivare ad occupare una buona porzione di addome.

La rimozione chirurgica della milza deve essere considerata per i pazienti che hanno una splenomegalia sintomatica, cioè con sintomi da ingombro meccanico, infarti splenici ricorrenti, anemia trasfusione-dipendente, trombocitopenia refrattaria, cachessia o ipertensione portale.¹⁶⁴⁻¹⁶⁸

Tale procedura tuttavia è gravata da una certa morbilità e mortalità, anche nei centri esperti, il tasso di mortalità della procedura è valutabile attorno al 10%.

Due grandi serie hanno analizzato le indicazioni, l'efficacia e le complicazioni in oltre 300 casi di mielofibrosi sottoposti ad intervento chirurgico.^{165,166}

Le principali indicazioni alla procedura chirurgica sono state: l'anemia trasfusione-dipendente (25%) e splenomegalia con sintomi da ingombro (49%).¹⁶⁶ Un miglioramento della sintomatologia dolorosa da ingombro è stata osservata nel 97% dei casi, nel 83% vi è stato un miglioramento del quadro di ipertensione portale, nel 70% vi è stato un miglioramento dell'anemia e nel 56% della piastrinopenia.¹⁶⁵ Tuttavia, i risultati a lungo termine sono stati meno soddisfacenti nella seconda serie, rispettivamente del 49, 40, 50, e 30%.¹⁶⁶

La mortalità operatoria dopo splenectomia variava dal 7,5 al 9%, aumentando al 26% dopo tre mesi dalla procedura; la morbilità operatoria andava dal 31 al 46%. Nella prima serie i pazienti a maggior rischio di morte perioperatoria erano quelli con milza di peso superiore a 2 Kg e con conta piastrinica inferiore a 70.000/microl.¹⁶⁵ Nella seconda serie, la mortalità operatoria era compresa tra il 5,5 e 7,6%, con una morbilità del 25%.¹⁶⁶

Una trombocitosi postsplenectomia superiore alle 450.000 e al 1.000.000 /ml si è verificata nel 29 e nel 5% dei pazienti rispettivamente, ed era significativamente associata a trombosi postoperatoria e a ridotta sopravvivenza.

Non è stato evidenziato un effetto della splenectomia in termini di incremento della sopravvivenza globale, con mediana di 13 e 19 mesi dopo l'intervento nelle due serie. Le principali cause di morte sono state le infezioni, eventi cardiaci o trombotici, il sanguinamento e la trasformazione leucemica (che si è verificata nel 11-16% dei pazienti).

La splenectomia non è una procedura banale nella MF ed è associata a complicanze postoperatorie sia a breve che a lungo termine. Le complicanze post-chirurgiche includono l'emorragia intra-addominale, la formazione di ascesso subfrenico, la sepsi, la trombocitosi massiva che può causare trombosi

(ad esempio, ictus, embolia polmonare, trombosi portale) e incremento dell'epatomegalia, quale sede di emopoiesi extramidollare o sede di emocateresi nel 16-24% dei casi.^{166,167}

La trombocitosi e l'epatomegalia possono essere transitoriamente controllate con piastrinoafèresi e farmaci citotossici (per esempio idrossiurea o vinblastina). Al fine di ridurre il rischio di trombosi venosa splancnica è ragionevole eseguire una profilassi antitrombotica (ad esempio, un mese di terapia anticoagulante con eparina a basso peso molecolare).

Grande discussione c'è stata nella comunità scientifica internazionale, circa il potenziale della splenectomia nell'indurre la trasformazione leucemica.¹⁶⁹ Tutto nasce dall'analisi di una serie retrospettiva di pazienti splenectomizzati, rispetto ad un gruppo di "controllo" di pazienti che non erano stati sottoposti a splenectomia. Tuttavia non è possibile trarre dati conclusivi a riguardo, anche in considerazione del fatto che i pazienti splenectomizzati, per le stesse proprie caratteristiche, sono i pazienti a maggior rischio di sviluppare una evoluzione blastica.

1.7.6 TRAPIANTO ALLOGENICO

Il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche, rappresenta l'unica terapia potenzialmente in grado di guarire i pazienti affetti da MF.

Tale procedura, in considerazione dei rischi intrinseci che comporta, è indicata preferibilmente, a pazienti con età inferiore a 60 anni. Considerando che la mielofibrosi è una patologia tipica dell'età avanzata, diagnosticata in meno del 30% nei pazienti al disotto di questa età, si capisce come tale approccio sia riservabile ad una quota molto minoritaria di pazienti.

La possibilità di eseguire il trapianto è anche limitata dalla disponibilità di un donatore HLA-compatibile e dal rischio di complicazioni legate alla tossicità

della chemioterapia sopramassimale impiegata e al rischio di malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD) acuta e cronica. D'altro canto, l'effetto immunologico della GVHD diretto contro la malattia, è ben documentato dalla risposta alla reinfusione dei linfociti (DLI) nei pazienti ricaduti post-trapianto, dato che supporta la presenza di una graft versus MF.¹⁷⁰⁻¹⁷⁴

Data la morbilità e mortalità legate alla procedura trapiantologica, è fondamentale la selezione del paziente.

Per tale motivo i pazienti giovani a rischio intermedio-2 o alto secondo l'IPSS,^{98,175} dovrebbero essere considerati per il trapianto fin dalla diagnosi. Nei pazienti a basso rischio, che hanno una aspettativa di vita di 10-15 anni con terapia di supporto, con mortalità correlata al trapianto di almeno l'8%, non vi è chiara indicazione al trapianto.¹⁷⁶ Fino a quando non saranno disponibili studi specifici su questa categoria di pazienti, una valida strategia è quella di proporre il trapianto in caso di comparsa di un ulteriore fattore di rischio, ossia quando l'aspettativa di vita si riduca a 5 anni.^{164,170,177,178}

Uno dei più importanti studi condotti a riguardo è rappresentato da un'analisi retrospettiva su 147 pazienti affetti da mielofibrosi sia primaria che secondaria (età media 53 anni, range: 20-68); il 59% dei quali trapiantati da donatore familiare compatibile e condizionati con regime mieloablativo nel 31% dei casi. Il 54% dei pazienti trattati con regime di condizionamento ad intensità ridotta (RIC) erano a rischio IPSS intermedio-2 e alto e il 24% era stato avviato a trapianto in fase blastica. Di quelli che invece avevano ricevuto un condizionamento mieloablativo, il 39% era a rischio intermedio-2/alto e il 15% era evoluto a franca leucemia acuta. Non si è osservata alcuna differenza tra i due regimi di trattamento in termini di overall survival e non-relapse mortality.

Il 90% dei soggetti ha attecchito; i fattori che hanno influenzato favorevolmente l'engraftment sono stati: splenectomia eseguita prima del trapianto, un donatore

familiare HLA-identico, l'utilizzo di cellule staminali emopoietiche prelevate da sangue periferico e l'assenza di piastrinopenia prima del trapianto.

A distanza di 4 anni dal trapianto l'overall survival, la sopravvivenza libera da progressione e la non-relapse mortality sono stati del 39, 32, e 39%, rispettivamente. All'analisi multivariata, il donatore familiare HLA-identico, la fase cronica di malattia e la splenectomia pretrapianto nei maschi, correlavano con una migliore overall survival.

La sopravvivenza a 4 anni era significativamente migliore nei pazienti con MF secondaria a PV ed ET (52%) piuttosto che nei portatori di forma primaria (33%).

Un altro studio ha valutato 55 pazienti con mielofibrosi primaria (età media 42 anni) sottoposti a trapianto allogenico; il 90% dei quali aveva attecchito.¹⁷⁵ La sopravvivenza globale a cinque anni è stata del 47%; 22 pazienti (40%) hanno ottenuto la remissione completa ematologica e istologica, con regressione della fibrosi. A 5 anni erano vivi l'83, il 43, e il 31% dei pazienti a basso, intermedio e alto rischio (Lille-score).³⁶ Il livello di emoglobina superiore a 10 g/dl e l'assenza di osteomielosclerosi, sono risultati predittivi di migliore sopravvivenza a cinque anni; il cariotipo anormale, l'assenza di GVHD acuta grado 2-4 e l'età superiore a 45 anni al momento del trapianto, sono risultati predittivi di fallimento.¹⁷⁹

Sebbene l'ultimo degli studi citati indichi una sopravvivenza stimata a 5 anni del 14% in pazienti trapiantati con età superiore a 45 anni,^{175,179} un report preliminare di Seattle, mostra per i pazienti in quella fascia di età, tassi di sopravvivenza libera da malattia a tre e cinque anni rispettivamente del 63 e 50%.¹⁸⁰

Il sottogruppo MPN del Chronic Malignancies Working Party dell'European Group for Blood and Marrow Transplantation, ha riportato una casistica di 250

pazienti consecutivi con una diagnosi iniziale di PV (n = 120) o ET (n = 130), sottoposti a trapianto allogenico tra il 1994 e il 2010. Di questi, 193 sono stati sottoposti ad allo-trapianto per progressione a mielofibrosi; il 46% è stato trapiantato da donatore familiare e condizionato con regime mieloablativo nel 30% dei casi.¹⁸¹

L'età media dei soggetti al momento del trapianto era 56 anni (range: 22-75), l'intervallo diagnosi-trapianto era maggiore ai 10 anni nel 52% dei soggetti.

La sopravvivenza stimata a tre anni, il tasso di recidiva e la mortalità senza recidiva per i pazienti trapiantati perché evoluti in franca mielofibrosi è stata del 62, 28 e del 27%, rispettivamente, con un follow-up mediano di 13 mesi dal momento del trapianto.

I principali fattori che hanno inciso negativamente sull'outcome sono stati l'età superiore ai 55 anni e la presenza di un donatore non familiare.

Alcuni studi iniziali sembravano deporre per un attecchimento ritardato nei pazienti con fibrosi midollare molto avanzata. Tuttavia, studi successivi hanno documentato che l'attecchimento non rappresenta un problema nella maggior parte dei pazienti con MF.

Ciò è stato confermato anche in uno studio su 33 pazienti con severa fibrosi midollare, confrontati con 33 controlli senza mielofibrosi; non vi era alcuna differenza tra i due gruppi in termini di attecchimento.¹⁸²

Mentre i primi dati provenienti da due diversi studi non mostravano alcun vantaggio significativo nell'eseguire la splenectomia pre-trapianto,^{183,184} lo studio citato sopra rilevava un vantaggio in termini di sopravvivenza, nei pazienti di sesso maschile splenectomizzati pre-trapianto (HR 0,29; 95 % CI 0,17-0,48).¹⁸²

Un altro punto importante di discussione sul trapianto è la scelta del regime di condizionamento, mieloablativo o a intensità ridotta.

Una serie di studi ha riportato dei buoni risultati, con l'uso di regimi ad intensità ridotta nei pazienti con PMF; nella maggior parte dei report, le risposte erano migliori quando venivano impiegati donatori familiari, rispetto ai donatori da registro.^{170,171,185-194}

In tre serie di pazienti (età media 55-56 anni; range: 32-73), la mortalità correlata al condizionamento è stata riportata dal 16 al 22% ad un anno, con event-free survival e overall survival stimati a 5 anni dal 46 al 51 e dal 62 al 67%, rispettivamente.^{189,191,194}

Anche pazienti più anziani, selezionati in maniera accurata, hanno potuto beneficiarsi del trapianto allogenico. Ciò è stato dimostrato in un'analisi retrospettiva di 30 pazienti con un'età media di 65 anni (range: 60-78), nella maggior parte dei quali è stato impiegato un regime di condizionamento al trapianto ad intensità ridotta.¹⁹⁵ La mortalità al giorno +100 post-trapianto è stata del 13%, con progression-free survival e overall survival a 3 anni del 45 e del 40%, rispettivamente.

Sono stati inoltre valutati score predittivi di una peggiore prognosi trapiantologica nella mielofibrosi.

In uno studio su 46 pazienti con PMF e un'età media di 51 anni, i fattori negativi per la sopravvivenza includevano il precedente supporto trasfusionale con più di 20 unità di globuli rossi, una milza di dimensioni superiore a 22 cm e l'uso di un donatore non familiare.¹⁹⁰ I soggetti con zero o un fattore (basso rischio), o due o più (alto rischio) fattori avversi, avevano sopravvivenze a 5 anni del 77 e 8%, rispettivamente. Altre caratteristiche prognosticamente sfavorevoli per i pazienti sottoposti a trapianto condizionato con regimi a ridotta intensità, erano la negatività per la mutazione di JAK2, un'età superiore a 57 anni e la presenza di sintomi costituzionali.¹⁹³

Il condizionamento non mieloablativo ha dimostrato la possibilità di ottenere il chimerismo completo, con negativizzazione della mutazione JAK2 quando presente (remissione completa molecolare).^{196,197} Questo è stato dimostrato in maniera convincente in uno studio su 162 pazienti con mielofibrosi, sottoposti a trapianto condizionato con regime ad intensità ridotta, in cui la mutazione JAK2^{V617F} era presente in 139 soggetti.¹⁹¹ All'analisi multivariata, la sopravvivenza globale a cinque anni era significativamente più lunga nei pazienti mutati per JAK2 rispetto ai non mutati (70 contro 44%). Nessuna differenza di risultato è stata osservata in base alla carica allelica. L'ottenimento della negativizzazione di JAK2^{V617F} nel sangue periferico a sei mesi dopo il trapianto era significativamente associata a una ridotta incidenza di recidiva (5 contro 35%).

Per i pazienti che falliscono o ricadono post-trapianto, l'esperienza è limitata e non vi sono linee guida specifiche. In uno studio condotto su 26 pazienti con mielofibrosi recidivati post-trapianto o con mancato attecchimento dopo trapianto, trattati con la DLI, 10 hanno raggiunto la remissione completa.¹⁷³ Tredici dei 16 che non hanno risposto alla DLI e quattro che non erano stati sottoposti a tale procedura, sono stati sottoposti ad un secondo trapianto, con risposta osservata in 12/17. Dopo un follow-up mediano di 27 mesi, l'overall survival e la progression-free survival a due anni per tutti i 30 pazienti è stata del 70 e 67%, rispettivamente. Tali dati suggeriscono la possibile efficacia della DLI e dell'impiego di un secondo trapianto come terapia di salvataggio in questi pazienti.

1.7.7 RUXOLITINIB

La scoperta della mutazione V617F della tirosin-chinasi JAK2, ha dato il via allo sviluppo di piccole molecole che inibiscono tale proteina, i cosiddetti inibitori di JAK.

L'utilizzo di questi farmaci ha consentito l'ottenimento di riduzioni significative della splenomegalia, il miglioramento dei sintomi (ad esempio prurito, stanchezza, sudorazione notturna, dolori ossei, calo ponderale) e, per taluni di questi farmaci, anche il miglioramento dell'anemia.¹⁹⁸⁻²⁰⁵

Di questi, solo ruxolitinib è disponibile in commercio e approvato per l'utilizzo nella mielofibrosi con splenomegalia sintomatica e con sintomi costituzionali.

È da notare il fatto che la risposta alla terapia è indipendente dalla presenza di mutazione di JAK2, CALR, MPL, così come nei pazienti ad alto rischio molecolare, suggerendo che l'efficacia di questi agenti è legata ad una più generale inibizione del signalling JAK/STAT.²⁰⁶⁻²⁰⁹

La maggior parte delle informazioni cliniche derivate sull'uso degli inibitori di JAK2 nella MF, deriva dall'inibitore di JAK1/JAK2 ruxolitinib (Jakavi®, Novartis). Ruxolitinib ha dimostrato l'efficacia clinica nel ridurre la splenomegalia e i sintomi nella MF, migliorando la qualità complessiva della vita.²¹⁰

I principali risultati derivanti dagli studi di fase I/II in 153 pazienti con MF primaria o secondaria, indicavano come la dose iniziale di 15mg 2 volte al giorno seguita da una titolazione personalizzata, fosse il regime di dosaggio più efficace e sicuro.

I pazienti con sintomi costituzionali (ad esempio la perdita di peso, stanchezza, sudorazione notturna, prurito) avevano un rapido miglioramento. I risultati erano associati ad una marcata diminuzione dei livelli circolanti di citochine

infiammatorie (MIP-1beta, TNF-alfa, IL-6, ecc.). La risposta alla terapia era indipendente dallo stato mutazionale di JAK2 e veniva attribuita alla soppressione della fosforilazione di STAT3, punto chiave del signalling di JAK-STAT.

I dati che hanno portato alla registrazione di ruxolitinib nel trattamento della mielofibrosi derivano da due studi di fase III (COMFORT-I condotto in America, che confrontava ruxolitinib verso il placebo e COMFORT-II in Europa, di confronto fra ruxolitinib e la terapia migliore disponibile). In questi studi una riduzione maggiore del 35% del volume della milza in risonanza magnetica (che corrisponde a circa a una riduzione del 50% di splenomegalia palpabile) è stata osservata nel 28 e nel 42% dei pazienti trattati con ruxolitinib, rispetto all'1 e 5% in quelli trattati con placebo o con la migliore terapia disponibile.^{206,207} La riduzione del volume della milza è stata mantenuta nel 73 e nel 50% dei soggetti arruolati del COMFORT-II a 48 e 144 settimane di terapia.²¹¹

Una riduzione superiore al 50% della sintomatologia si è osservata nel 46% dei pazienti trattati con ruxolitinib, rispetto al 5% di quelli trattati con placebo. L'anemia e la piastrinopenia erano frequenti effetti collaterali, di grado 3-4 nel 45 e nel 13% dei pazienti trattati con ruxolitinib. Tali tossicità sono state generalmente ben gestibili, miglioravano nel corso del tempo, con aggiustamenti di dose e solo raramente hanno portato alla sospensione del farmaco.²¹¹

A fronte di un netto miglioramento dei sintomi costituzionali e da ingombro splenico, sono stati evidenziati solo dei modesti cambiamenti istomorfologici e solo una minoranza di pazienti ha avuto una significativa riduzione della carica allelica della mutazione V617F del gene JAK2.^{211,212}

Il trattamento inoltre non sembra ridurre il rischio di trasformazione leucemica, che può essere ridotto in questo momento solo con il trapianto allogenico di cellule ematopoietiche.²¹³

I pazienti devono essere informati degli effetti collaterali (ad esempio, l'anemia e trombocitopenia) prima dell'inizio della terapia, con conseguente necessità o incremento di supporto trasfusionale, almeno all'inizio del trattamento. Se necessario, la sospensione del farmaco dovrebbe essere graduale e associata ad un breve ciclo di terapia corticosteroidica, al fine di minimizzare il rischio di esacerbazione dei sintomi costituzionali.

Sono stati inoltre riportati casi di infezioni gravi batteriche, fungine, virali e riattivazioni di TBC.²¹⁴

Ruxolitinib ha dimostrato di alterare la funzione delle cellule dendritiche, portando ad alterata attivazione delle cellule T, con conseguente alterazione della risposta immunitaria.²¹⁵ Un certo numero di case report suggeriscono un aumento del rischio di infezione opportunistica a seguito del suo utilizzo.²¹⁶⁻²²² Sono stati riportati rari casi di leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML).

Prima dell'inizio della terapia, tutti i pazienti devono essere sottoposti a screening per fattori di rischio tubercolare (es, viaggi in paesi con alta prevalenza, contatto con persone affette da tubercolosi attiva, anamnesi positiva per tubercolosi attiva o latente). I pazienti dovrebbero essere sottoposti al test per l'infezione tubercolare latente (quantiferon), prima di iniziare ruxolitinib. Quelli con tubercolosi latente dovrebbero essere riferiti all'infettivologo, per l'inizio di terapia profilattica con isoniazide.

Le dosi iniziali del farmaco attualmente raccomandate sono come da scheda tecnica in rapporto alla conta piastrinica basale, 20 mg per os due volte al giorno per una conta piastrinica superiore a 200.000/ml, 15 mg due volte al giorno per

una conta piastrinica tra 100.000 e 200.000/ml e 5 mg due volte al giorno per una conta piastrinica tra 50.000 e le 100.000/ml. Aggiustamenti del dosaggio sono necessari in caso di insufficienza renale ed epatica e per i pazienti che ricevono trattamento con inibitore del CYP3A4.

I tassi di sospensione del farmaco durante i vari studi, variavano dal 24 al 51% durante il primo anno di trattamento e sono arrivati al 46-89% a tre anni.^{211,223,224} Una grande variabilità della dose di partenza di ruxolitinib in questi studi (da 10 mg due volte al giorno fino a 200 mg una volta al giorno) potrebbe essere in parte la responsabile di questi alti tassi di sospensione (ad esempio, inefficacia farmaco alle dosi più basse, eccesso di tossicità a dosi più elevate).

Non è ancora del tutto chiaro se il miglioramento clinico in seguito all'utilizzo di ruxolitinib, si traduce anche in un miglioramento della sopravvivenza globale. Questo avviene a causa del disegno degli studi COMFORT, che prevedevano il passaggio dei pazienti dal braccio placebo/miglior terapia disponibile a ruxolitinib. Nessuno dei due studi COMFORT era in grado di mostrare un miglioramento a breve termine della sopravvivenza globale, per i pazienti trattati con ruxolitinib.

La valutazione ad un follow-up di due anni dello studio COMFORT-I, ha rivelato un significativo vantaggio di sopravvivenza per ruxolitinib rispetto al placebo (27 vs 41 decessi; HR 0,58; 95% CI 0,36-,95), con una riduzione del 42% del rischio di morte a 2 anni.²²⁵ Un vantaggio di sopravvivenza significativo in favore di ruxolitinib rispetto alla migliore terapia disponibile, è stata osservata anche nella valutazione del COMFORT-II, con follow-up di 144 settimane (19,9 contro 30,1 per cento di morti; HR 0,48; 95% CI ,28-0,85).^{209,211}

Un'analisi per sottogruppi con un follow-up di 151 settimane, in pazienti ad alto rischio molecolare (HMR) e basso rischio molecolare (LMR), arruolati nello studio COMFORT-II, ha indicato che ruxolitinib prolunga la sopravvivenza

rispetto alla migliore terapia disponibile in entrambi i gruppi, anche se le differenze non erano statisticamente significativa (HR 0,57; IC 95% 0,20-1,08 e HR 0,62; IC 95% 0,33-1,16, per l'HMR e per il LMR, rispettivamente).

Negli studi di fase I/II, in 107 pazienti con mielofibrosi intermedio-2 o alto rischio, la sopravvivenza dei pazienti trattati, corretta per lo stato di rischio IPSS era significativamente migliore rispetto alla coorte storica non trattata (HR 0,58; 95% CI 0,39-0,85).²²⁴

Una revisione retrospettiva che confrontava una coorte storica di 350 pazienti utilizzati per lo sviluppo del DIPSS mai trattati con ruxolitinib, con 100 pazienti trattati con ruxolitinib nell'ambito dello studio COMFORT-2, evidenziava un vantaggio di sopravvivenza nei pazienti trattati con ruxolitinib (3,5 contro 5 anni, HR 0.61; 95% CI 0,41-0,91).²²⁶

1.7.8 INIBITORI DI JAK IN FASE DI SPERIMENTAZIONE

Esistono numerosi altri inibitori di JAK in varie fasi di sperimentazione clinica, 2 dei quali attualmente in corso di studi di fase 3.

Momelotinib (CYT387), inibitore di JAK1/JAK2/TYK2, ha dimostrato efficacia nel ridurre la splenomegalia e i sintomi correlati alla mielofibrosi. Un aspetto molto interessante che lo differenzia da ruxolitinib è la sua capacità di indurre risposte sull'anemia. In uno studio di fase 1/2 in pazienti con MF a rischio intermedio-2/alto, momelotinib ha recentemente dimostrato di riuscire a ottenere tassi di risposta sull'anemia del 59% e sulla splenomegalia del 48%.²⁰⁴ Il 70% dei pazienti trasfusione-dipendenti per globuli rossi (1 mese prima dell'ingresso nello studio) ha ottenuto l'indipendenza trasfusionale.

Tuttavia, è stata osservata trombocitopenia di grado 3/4 nel 32% dei casi.

Il farmaco è attualmente in corso di valutazione in due studi di fase 3; uno in doppio cieco, di confronto con ruxolitinib in pazienti affetti da mielofibrosi primaria o secondaria a rischio intermedio-2/alto, mai trattati con inibitori di JAK (NCT01969838). L'altro in pazienti con MF, già trattati con ruxolitinib, con anemia e/o piastrinopenia (NCT02101268).

Pacritinib (SB1518), un inibitore di JAK2 e FLT3, si è dimostrato efficace nel ridurre la splenomegalia e migliorare i sintomi costituzionali, con scarsa tossicità ematologica, in particolare nei pazienti con piastrinopenia.

In uno studio comprendente 129 pazienti con MF trattati all'interno di 2 studi clinici di fase 1/2, il 43% dei pazienti con conta piastrinica basale inferiore a 100.000/ml e il 38% dei pazienti con conta inferiore alle 50.000/ml hanno ottenuto una riduzione di almeno il 35% del volume della milza.²²⁷

Come per altri inibitori di FLT3, la maggior parte degli eventi avversi sono stati gastrointestinali, ma per lo più lievi. Il 46% dei pazienti con conta piastrinica

inferiore a 100.000/ml, non ha evidenziato variazioni significative dei valori di emoglobina e piastrine.

Il farmaco è attualmente in fase di confronto con la miglior terapia disponibile in 2 studi di fase 3, in pazienti con MF non piastrinopenici (PERSIST-I, NCT01773187) e piastrinopenici (PERSIST-II, NCT02055781).

Lo studio di diversi inibitori di JAK è stato interrotto per effetti avversi. La sperimentazione clinica di Fedratinib (SAR302503), un inibitore di JAK2^{V617F} e FLT3 è stata interrotta, nel novembre 2013, a seguito di complicazioni neurologiche, tra cui encefalopatia di Wernicke. Tuttavia, la sua efficacia sembrava essere significativa nei pazienti con MF e documentata in uno studio di fase 3, randomizzato controllato, con placebo in doppio cieco (JAKARTA).²²⁸ Analogamente, gli sviluppi di CEP-701, XL019, LY278544, BMS-911543, e AZD1480 sono stati interrotti a causa degli effetti collaterali ematologici, gastrointestinali, neurologici e/o per insufficiente attività.

1.7.9 TERAPIE SPERIMENTALI

Come sopra descritto la patogenesi della mielofibrosi appare molto complessa e diversamente dalla leucemia mieloide cronica, dove una singola alterazione genera la malattia, in questo caso molte mutazioni concorrono allo sviluppo e all'espressione delle caratteristiche cliniche di tale patologia. Per questo motivo è intuibile come una mono-terapia non possa essere in grado di indurre la guarigione. La sfida dei prossimi anni sarà quella di trovare nuovi target terapeutici e di migliorare i risultati ottenuti con i farmaci disponibili, combinandoli con nuove molecole.

1) Inibitori dell'istone deacetilasi e ipometilanti

Molto interesse è stato posto riguardo la regolazione epigenetica. La presenza di mutazioni somatiche a carico di TET2, DNMT3A, EZH2, ASXL1 e IDH1/2, hanno suggerito come una loro alterazione funzionale possa essere concausa della patologia.

Mutazioni a carico di ASXL1, EZH e IDH1/IDH2 sono risultate essere fattori prognostici negativi indipendenti.

Per tali motivi numerosi studi sono in corso, per valutare diversi inibitori dell'istone deacetilasi e agenti ipometilanti.

Sono stati pubblicati i risultati di uno studio di fase 1 che ha impiegato panobinostat (LBH589), inibitore dell'istone deacetilasi, in 5 pazienti trattati con più di 6 cicli di terapia.²²⁹ La splenomegalia si è normalizzata in 3 su 5 pazienti, e la malattia è rimasta stabile negli altri 2. Due pazienti hanno sperimentato un miglioramento dei livelli di emoglobina; 1 paziente ha ottenuto la remissione completa e un altro paziente ha normalizzato la fibrosi midollare. È stato inoltre osservato un miglioramento dei sintomi. La tossicità ematologica è stata predominante, con piastrinopenia occorsa nella maggior parte dei pazienti; inoltre il 39 e 17% dei pazienti ha sviluppato anemia e neutropenia grado 3-4. In un altro studio di fase 2 che valutava dosi maggiori (40 volte mg tre volte a settimana), è stata osservata una riduzione della carica allelica di JAK2^{V617F} e dei livelli di citochine infiammatorie. Tuttavia, solo 1 paziente (3%) ha ottenuto una risposta clinica.²³⁰ Inoltre, solo 16 di 35 pazienti arruolati, ha potuto completare più di due cicli di terapia a causa degli effetti collaterali, con piastrinopenia e diarrea come eventi avversi molto comuni. Questi studi suggeriscono come un dosaggio più basso, pari a 30 mg tre volte alla settimana, possa essere quello ideale.

Studi preclinici forniscono il razionale per combinare panobinostat con gli inibitori di JAK. In uno studio su linee cellulari panobinostat e fedratinib inibivano in maniera sinergica la via di segnalazione JAK/STAT, aumentando

l'effetto citotossico, rispetto all'agente singolo.²³¹ Inoltre, in modelli preclinici murini di malattia simil-MF, la combinazione di ruxolitinib e panobinostat determinava un'efficacia sinergica con ridotta crescita clonale e miglioramento della fibrosi.²³² Alla luce di questi dati, sono in corso degli studi di combinazione con ruxolitinib e panobinostat in pazienti con MF (NCT01433445 e NCT01693601). Un altro inibitore dell'istone deacetilasi, givinostat, è stato valutato in uno studio di fase 2 multicentrico in 16 pazienti affetti da mielofibrosi.²³³ Gli effetti indesiderati gastrointestinali sono risultati piuttosto comuni (62%), così come quelli ematologici (anemia grado 1-2 nel 21% e piastrinopenia grado 1-2 nel 10%). Le percentuali di risposta sono risultate piuttosto basse, con solo 3 pazienti (19%) che hanno mostrato una risposta sull'anemia (n = 1) o splenomegalia/sintomi (n = 2). In un altro studio, il vorinostat, ha consentito un tasso di risposta del 14% in 14 pazienti con MF, a fronte di una significativa tossicità.²³⁴

Tra gli agenti ipometilanti, la 5-azacitidina è stata valutata in uno studio di fase 2, in 34 pazienti affetti da MF. Il suo impiego ha determinato la completa ipometilazione, ma solo 8 pazienti hanno risposto (24%, 1 con ottenimento di remissione parziale e 7 con miglioramento clinico).²³⁵ La durata mediana della risposta è stata di soli 4 mesi e la tossicità ematologica è stata relativamente comune (neutropenia grado 3-4 nel 29%). La decitabina, altro agente ipometilante, è stata studiata in 21 pazienti con MF; 7/19 pazienti valutabili hanno risposto (1 remissione completa, 2 remissioni parziali e 4 con miglioramento ematologico), anche se non sono state riportate riduzioni delle dimensioni spleniche. A fronte di queste risposte, la tossicità ematologica è stata significativa, con neutropenia e piastrinopenia di grado 3-4 nel 95 e 52% dei pazienti, rispettivamente.²³⁶ È attualmente in corso uno studio di fase 3, di combinazione (NCT01787487) con ruxolitinib e 5-azacitidina.

1) Farmaci per superare la resistenza agli inibitori di JAK

Al fine di superare i meccanismi di resistenza agli inibitori di JAK. Sono in corso degli studi per valutare l'efficacia di farmaci inibitori della Heat Shock Protein 90 (HSP90) Le HSP sono una famiglia di chaperonine, che favoriscono il ripiegamento e la stabilità delle proteine. Più specificamente, HSP90 modula l'attività di circa 200 proteine, molte delle quali partecipano a vie di segnalazione oncogeniche, inclusa la via di JAK/STAT.²³⁷ Il razionale all'impiego di questi farmaci, è dovuto al fatto che nonostante l'inibizione di JAK, con gli inibitori attualmente disponibili, JAK2 rimane costantemente fosforilato, permettendo la eterodimerizzazione con altri membri della famiglia JAK, compresi JAK1 e TYK2,²³⁸ consentendo la prosecuzione del segnale e conferendo resistenza alla cellula neoplastica. Le cellule divenute resistenti agli inibitori di JAK2 vanno incontro a morte, se messe a contatto con un inibitore di HSP90, PU-H71. Dati preclinici recenti hanno anche dimostrato una maggiore efficacia quando PU-H71 viene combinato con un inibitore di JAK.²³⁹ L'inibizione di HSP90 (in particolare con AUY922) ha inoltre portato alla degradazione proteolitica di JAK2 sia wild-type che mutato.²⁴⁰ Attualmente è in corso uno studio di fase 2 con AUY922, nei pazienti con MF primaria o secondaria a PV e TE (NCT01668173).

Altri interessanti target di terapia sono rappresentati dalla via di segnale fosfatidil-inositolo 3-fosfatocinasi (PI3K)/mTOR/AKT, via che si colloca a valle di JAK/STAT. L'esposizione in vitro a everolimus, inibitore di mTOR, diminuisce la proliferazione delle cellule con la mutazione JAK2^{V617F}.²⁴¹ Questo agente è stato anche impiegato in 39 pazienti con MF, in uno studio multicentrico di fase 1-2. Sei pazienti hanno ottenuto un miglioramento clinico (la splenomegalia è diminuita in 5 pazienti, i livelli di emoglobina aumentati in 1 paziente) e 1 paziente ha raggiunto la remissione parziale; i rimanenti 23 pazienti hanno mantenuto la stabilizzazione della malattia. La tossicità ematologica ha rappresentato un evento molto frequente, con il 27% dei pazienti che ha mostrato

anemia di grado 2-3, mentre il 7% e il 3% ha mostrato grado 2, rispettivamente. Lieve mucosite è stata osservata nel 70% dei pazienti. È stato segnalato un effetto sinergico della inibizione della via PI3K/AKT/mTOR e di JAK,²⁴² e uno studio di fase 1b è in corso per valutare la sicurezza di ruxolitinib con buparlisib (BKM120, un inibitore di PI3K; NCT01730248).

2) Inibitori della via RAS/RAF/MEK

Il pathway di RAS/RAF/MEK è coinvolto in una vasta gamma di funzioni cellulari, tra cui la proliferazione, la migrazione, il trasporto nucleare, la processazione di mRNA.²⁴³ L'inibitore di MEK, GSK1120212 (NCT00920140) e pimasertib (AS703026; NCT00957580) sono attualmente in fase di studio in pazienti con neoplasie ematologiche. Data la stretta interazione tra il pathway JAK/STAT e il pathway RAS/RAF/MEK,^{244,245} che viene attivato dalla mutazione JAK2^{V617F},²⁴⁶ occorrono ulteriori studi in vitro preclinici, prima di poterne valutare la combinazione con ruxolitinib

3) Farmaci che interagiscono con la fibrosi

Il Transforming growth factor- β (TGF β) può avere un ruolo nel promuovere la fibrosi midollare. L'enzima lisil-ossidasi è coinvolto nella proliferazione dei megacariociti e nella generazione di fibrosi, rappresentando così un potenziale bersaglio terapeutico.²⁴⁷ Il fresolimumab (GC1008, NCT01291784), un anticorpo monoclonale diretto contro il TGF β è attualmente in fase di valutazione in uno studio di fase 1. In modelli murini il simtuzumab (GS-6624), un anticorpo monoclonale diretto contro la lisil-ossidasi, ha dimostrato di essere in grado di ridurre la fibrosi ed è attualmente in corso di valutazione nella mielofibrosi, da solo o in combinazione con ruxolitinib (NCT01369498). Inoltre, PRM-151, un agente usato nel trattamento della fibrosi polmonare idiopatica, è stato valutato in uno studio di fase 2 in pazienti con MF, da solo o con ruxolitinib.²⁴⁸

4) Inibitori delle telomerasi

Il ruolo dei telomeri e delle telomerasi come bersaglio terapeutico è un campo in continua evoluzione. La telomerasi è un enzima responsabile del mantenimento dei telomeri, che ricoprono e proteggono le estremità dei cromosomi. I telomeri sono costituiti da copie in tandem di una semplice ripetizione di DNA (TTAGGG), che viene sintetizzato dall'enzima telomerasi. Nelle cellule che mancano di telomerasi, i telomeri si accorciano ad ogni replicazione e questo impatta negativamente sulla durata della sopravvivenza cellulare.²⁴⁹ Dopo un numero finito di divisioni cellulari, le cellule senza telomerasi subiscono un arresto della crescita, chiamato senescenza replicativa. Durante lo sviluppo del cancro, questo limite pone un ostacolo alla crescita delle cellule tumorali le quali, nella grande maggioranza dei casi superano questo meccanismo, inattivando inizialmente importanti punti di controllo del ciclo cellulare e, infine, aumentando l'espressione della telomerasi, quando i telomeri diventano troppo corti.²⁵⁰ Questa riattivazione della telomerasi stabilizza i telomeri ed estende la durata della vita cellulare. Per sfuggire alla senescenza la grande maggioranza dei tumori up-regola le telomerasi, tale meccanismo viene rilevato in più del 85% di tutti i casi di cancro,^{251,252} rendendo l'enzima un valido bersaglio per la terapia antitumorale. Nelle cellule tumorali, l'inibizione della telomerasi ha dimostrato l'accorciamento dei telomeri e, dopo un numero finito di divisioni cellulari, l'induzione dell'apoptosi.^{253,254}

Imetelstat, un potente inibitore della telomerasi, che si distribuisce in modo specifico nel midollo osseo, ha dimostrato di poter ottenere remissioni complete molecolari e di normalizzare la fibrosi.²⁵⁵ La mielosoppressione e la tossicità epatica sono stati gli effetti collaterali osservati più frequentemente. Il farmaco verrà testato nel prossimo futuro in uno studio di fase II, in pazienti resistenti ad inibitori di JAK.

1.8 OBIETTIVI DELLO STUDIO

Dalla analisi della letteratura emerge chiaramente l'eterogeneità clinica di tale patologia, che esordisce spesso in età avanzata, laddove numerose possono essere le comorbidità presenti. Come dimostrato dalla molteplicità dei trattamenti possibili ad oggi non esiste una risposta terapeutica univoca per tutti i pazienti e i tassi di risposta ai vari trattamenti differiscono significativamente tra gruppi di pazienti.

Nel presente studio si è voluti andare ad analizzare l'impatto delle comorbidità e della superficie corporea sull'efficacia al trattamento con Ruxolitinib, il primo e al momento, unico inibitore di JAK1/JAK2 approvato per il trattamento dei pazienti con MF con splenomegalia e/o sintomi.

Numerosi sono stati i report, in altre patologie oncologiche, dell'impatto delle comorbidità sulla sopravvivenza. Nella Leucemia mieloide cronica, il gruppo tedesco ha dimostrato che la presenza di comorbidità, pesate tramite il Charlson comorbidity index (CCI) correlava con una riduzione dell'aspettativa di vita indipendentemente dalla risposta ottenuta col trattamento.²⁵⁶ In aggiunta, le comorbidità predicevano una prognosi peggiore in pazienti affetti da MF.²⁵⁷ In aggiunta, il body mass index (BMI) risulta rilevante nei pazienti affetti da cancro.²⁵⁸

Ruxolitinib, il primo farmaco ad azione molecolare, approvato per il trattamento della splenomegalia e dei sintomi costituzionali è stato sperimentato in studi clinici randomizzati (i trial COMFORT e lo studio JUMP) che ne hanno documentato l'efficacia e un probabile effetto benefico sulla sopravvivenza. Tuttavia, l'impatto delle comorbidità non è stato valutato sistematicamente in questi studi che di fatto escludevano i pazienti più fragili.^{206,207,259} Per tale motivo, un panel di esperti dell'European LeukemiaNet/SIE ne sconsigliava l'utilizzo nei pazienti più defedati.²⁶⁰

Da qui, la necessità di valutare l'efficacia di ruxolitinib, nella pratica clinica quotidiana al di fuori del contesto dei trial clinici. Come già descritto, l'età mediana dei pazienti con Mielofibrosi è avanzata, per cui risulta deducibile come la popolazione degli studi non possa necessariamente rappresentare quella che quotidianamente viene vista negli ambulatori di ematologia.

L'elevata frequenza di episodi infettivi registrati nei trial clinici sottolinea l'importanza della selezione del paziente candidato a terapia con ruxolitinib e impone la ricerca di fattori predittivi di un aumentato rischio infettivo.

In risposta a queste esigenze, abbiamo raccolto i dati clinici relativi a 462 pazienti trattati con ruxolitinib presso 23 centri ematologici europei dal 2011, valutando l'impatto delle comorbidità e del BMI sulle risposte cliniche e sugli effetti collaterali ematologici ed extraematologici

CAPITOLO II

Descrizione dello studio

2.1 L'IMPATTO DELLE COMORBIDITA' E DEL BMI SULL'EFFICACIA DEL TRATTAMENTO CON RUXOLITINIB NEL TRATTAMENTO DELLA MIELOFIBROSI

2.1.1 RECLUTAMENTO DEI PAZIENTI

Dal Giugno 2011 al Novembre 2016, 462 pazienti consecutivi hanno ricevuto terapia con ruxolitinib presso 23 Centri Ematologici europei. Di questi, 234 erano stati precedentemente arruolati nell'ambito di protocollo sperimentale di fase IIIb (JUMP, NCT01493414) e 168 con richiesta compassionevole o con l'uso commerciale.

Per ogni paziente sono stati raccolti i seguenti dati alla diagnosi: età, emocromo, esami biochimici, eventi trombotici o emorragici pregressi, neoplasie pregresse, cariotipo (se disponibile), epatomegalia, splenomegalia, presenza di sintomi costituzionali, TSS, stato mutazionale del gene JAK2, CALR e MPL, eventi trombotici o emorragici pregressi. Tutti i pazienti sono stati classificati secondo l'IPSS e DIPSS,^{67,97} in base alle seguenti caratteristiche: età > di 65 anni, presenza di sintomi sistemici (sudorazioni, calo ponderale, febbre), presenza di cellule blastiche circolanti, leucocitosi >25.000/mm³ e/o anemia con concentrazione emoglobinica inferiore a 10 g/dl.

Il motivo per l'inizio della terapia, era nella totalità dei pazienti rappresentato dalla presenza di splenomegalia sintomatica e/o di sintomi sistemici, come da indicazione FDA/EMEA.

In tutto 402 (87%) pazienti erano valutabili per le comorbidità tramite il Charlson Comorbidity Index (CCI),²⁶¹ di cui 380 (82.3%) lo erano anche per il body mass index (BMI). Il BMI e CCI erano misurati all'inizio della terapia con ruxolitinib. Il BMI è calcolato come il peso corporeo in Kg diviso per il quadrato dell'altezza in m. Il CCI è una lista di 19 comorbidità, il cui peso varia da 1 a 6,

a seconda delle stime di rischio relativo calcolate col modello di regressione nello studio clinico di Charlson et al.²⁶¹

Le caratteristiche dei pazienti sono riportate nella tabella 1.

2.1.2 OBIETTIVI

In questo studio è stata eseguita un'analisi sull'impatto delle comorbidità calcolate con CCI e del BMI sull'efficacia di tale trattamento, in termini di riduzione della splenomegalia e dei sintomi sistemici e degli effetti collaterali ematologici ed extra-ematologici, in un'ampia popolazione di pazienti affetti da MF, seguiti per un lungo periodo di tempo presso 23 Centri Ematologici Europei. Lo scopo ultimo è quello di migliorare la selezione del paziente candidato al trattamento con ruxolitinib

2.1.3 DEFINIZIONI

La definizione di risposta sulla splenomegalia richiedeva un calo delle dimensioni del 50%, se la milza al momento basale superava i 10 cm dall'arco costale o una sua scomparsa nel caso fosse inferiore a tale valore, una splenomegalia inferiore a 5 cm non era valutabile per risposta. Le diagnosi di Leucemia Acuta e di Mielofibrosi, sono state poste in ottemperanza ai criteri WHO e IWG-MRT.²⁶²

Sono stati valutati sintomi quali astenia, prurito, osteoartralgie, sudorazioni, febbre, calo ponderale e sono stati "gradati" secondo la classificazione CTCAE e tramite il questionario TSS.

Gli eventi infettivi registrati, sono stati obiettivamente documentati mediante esame obiettivo, prelievo microbiologico, radiografia o tomografia assiale computerizzata e sono stati misurati secondo il CTCAE (maggiore di grado 2).

2.1.4 TERAPIA

Ruxolitinib è stato somministrato a pazienti affetti da MF a rischio IPSS intermedio-1/intermedio-2/alto con splenomegalia e/o sintomi costituzionali. La dose di inizio di ruxolitinib è stata di 20 mg due volte al giorno se la conta piastrinica superava le 200.000/mmc, di 15 mg due volte al giorno per conta tra le 100.000 e le 200.000/mmc e di 5 mg due volte al giorno in caso di piastrine tra le 50 e le 100.000/mmc. Per motivi di sicurezza, sono state fatte riduzioni della dose iniziale, in pazienti con anemia o con insufficienza renale. Nei pazienti che sviluppavano un'evoluzione di malattia veniva interrotto il trattamento.

2.1.5 ANALISI STATISTICA

Le variabili continue sono state sintetizzate come mediana e range o media e deviazione standard a seconda dell'analisi statistica effettuata; le variabili categoriche come conta e frequenza di ciascuna. Per il confronto tra gruppi di pazienti, sono stati utilizzati il Wilcoxon-Mann-Whitney rank-sum test o lo Student's t-test, quando venivano paragonati due gruppi, l'ANOVA o il Kruskal-Wallis tests, quando venivano paragonati 3 gruppi; l'associazione tra due variabili categoriche è stata testata con il test esatto di Fisher o il χ^2 . L'overall survival (OS) e il progression-free survival (PFS) sono stati calcolati secondo il metodo di Kaplan e Meier,²⁶³ dalla data della diagnosi fino a quella di morte o dell'ultimo controllo, con un intervallo di confidenza del 95% (CI 95%); nel caso del PFS anche la progressione a leucemia acuta è stata considerata come evento. Le differenze tra i gruppi sono state valutate con il Log-rank test. La sopravvivenza e la PFS sono state calcolate dall'inizio della terapia con ruxolitinib e pertanto l'analisi è stata corretta per il fenomeno del "left truncation". Inoltre, è stato utilizzato il modello di regressione multivariata a rischi proporzionali di COX per aggiustare l'outcome a seconda della categoria di rischio DIPSS di partenza. L'incidenza cumulativa di infezione è stata calcolata considerando la morte come evento competitivo, secondo il modello di

Fine e Gray. Tutti i valori di p sono “two-sided” e la significatività statistica è definita per $p < 0.05$. Tutte Le analisi statistiche sono state effettuate con il programma STATA15.

2.2 RISULTATI

2.2.1 CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI ALLA DIAGNOSI

Le caratteristiche approfondite dei pazienti alla diagnosi sono rappresentate nella tabella 1.

Characteristics	Patients (n. 402)
Male sex, n. (%)	233 (58.0%)
Primary MF, n. (%)	212 (52.7%)
Post-PV MF, n. (%)	117 (29.1%)
Post-ET MF, n. (%)	73 (18.2%)
DIPSS risk score, on 363 evaluable patients, n. (%)	
Intermediate-1	156 (43.0%)
Intermediate-2	183 (50.4%)
High	24 (6.6%)
Median hemoglobin, g/dl (range)	10.7 (4.7-16.7)
Transfusion dependence, n. (%)	102 (25.4%)
Median platelet count, $\times 10^9/l$ (range)	248.5 (32.9-1632)
Palpable spleen, n. (%)	386 (96.0%)
Spleen ≥ 10 cm, n. (%)	252 (62.7%)
Median Body Mass Index (BMI), n. (%) on 380 evaluable patients	23.9 (15.5-33.3)
BMI <21.9 (first quartile)	96 (25.2%)
BMI 21.9-24.9 (normal weight)	142 (37.4%)
BMI ≥ 25 (overweight)	142 (37.4%)
Unfavorable karyotype, n. (%) on 213 evaluable patients	16 (7.5%)
JAK2 ^{V617F} , n. (%) on 321 evaluable patients	282 (87.9%)
CALR, n. (%) on 321 evaluable patients	26 (8.1%)
MPL, n. (%) on 321 evaluable patients	1 (0.3%)
Triple negative, n. (%) on 321 evaluable patients	12 (3.7%)
Median time from MF diagnosis to ruxolitinib start, months	16.1 (0-290.5)
Ruxolitinib starting dose, n. (%)	
5 mg BID	55 (13.7%)
10 mg BID	38 (9.5%)
15 mg BID	103 (25.6%)
20 mg BID	206 (51.2%)
Median follow-up from ruxolitinib start, months (range)	23.1 (1.1-68.0)

Tabella 1. Caratteristiche dei pazienti

- DATI CLINICI

L'età mediana della coorte è di 64 anni (*range*, 39-89), il sesso più colpito è risultato essere quello maschile (233/402, 58%). 282 dei 321 pazienti valutabili (87.9%) erano portatori della mutazione V617F del gene JAK2, 26 (8.1%) della mutazione di CALR, 1 paziente era mutato per il gene di MPL (0.3%) e 12 (3.7%) erano triplo-negativi. All'esame obiettivo la splenomegalia era presente

in 386 pazienti (96%), e in 252 (62.7%) superava i 10 cm dall'arcata costale. Duecento-dodici pazienti (52.7%) erano affetti da mielofibrosi primaria, 73 avevano una forma secondaria a TE (18.2%) e 117 a PV (29.1%). I sintomi legati alla malattia e valutati con il TSS erano presenti in 379 pazienti (94%). Il rischio DIPSS era intermedio-1 in 156 (43%), intermedio-2 in 183 (50.4%) e alto in 24 (6.6%) pazienti. Il cariotipo era disponibile in 213 pazienti (52%), di questi, 16 pazienti (7.5%) avevano alterazioni citogenetiche prognosticamente sfavorevoli. La mediana delle piastrine era $249 \times 10^9/L$ g/dl (*range*, 33-1632), l'emoglobina mediana era 10.7 g/dl (*range*, 4.7-16.7). All'inizio della terapia con ruxolitinib, 102 pazienti erano trasfusione-dipendenti (25.4%).

Cento-novantotto pazienti (49.2%) non presentavano comorbidità, 128 (31.8%) avevano un CCI pari a 1-2 e 76 (40.7%) uguale o maggiore a 3, con una mediana di CCI di 1 (*range*, 0-8). Le più frequenti comorbidità erano la malattia vascolare periferica (14%), il precedente tumore (13.5%), diabete (10%) e le patologie epatiche (9.6%). I pazienti con $CCI \geq 3$ appartenevano più frequentemente alla categoria DIPSS intermedio-2 ($p=0.03$), erano più frequentemente anemici (Hb inferiore a 10 g/dl in 33.8% in $CCI=0$, 43.7% in $CCI=1-2$ e 56.6% in $CCI>3$, $p=0.005$) e trasfusione dipendenti (20% vs 28.1% and 34.2%, $p=0.04$).

In tutto 12 pazienti (3.2%) erano sottopeso (BMI <18.5), 225 (59.2%) erano normopeso, 123 (32.4%) erano sovrappeso (BMI 25-30), mentre 20 pazienti (5.2%) erano obesi (BMI >25). Il BMI mediano era di 23.9 (*range*, 15.5-33.3). I pazienti sovrappeso erano più frequentemente maschi ($p=0.001$), avevano meno anemia ($p=0.03$) e appartenevano più frequentemente alla categoria DIPSS intermedio-1 ($p=0.03$).

Il follow-up medio dall'inizio del trattamento era di 23.1 mesi (*range*, 1.1-68).

2.2.2 IMPATTO DELLE COMORBIDITA' E DEL BMI SULLA RISPOSTA

In tutto, 354 pazienti (88%) erano valutabili per risposta sulla milza e 379 (94%) per risposta sui sintomi secondo i criteri dell'IEG-MRT. Cento-trentotto pazienti

(39%) hanno ottenuto una risposta sulla milza e 309 (81.5%) una risposta sui sintomi durante la terapia. In particolare, 100/354 (28.2%) e 122/322 (37.9%) pazienti avevano ottenuto una risposta sulla milza e 277/379 (73%) e 263/320 (82.1%) pazienti sui sintomi a 3 e 6 mesi, rispettivamente.

Suddividendo la coorte in 3 categorie con differenti CCI (CCI=0, CCI 1-2 e CCI \geq 3), un CCI più elevato non correlava con una minore risposta sulla milza durante il trattamento, che risultava ottenuta dal 37.6%, 38.5% e 43.7% dei pazienti con CCI=0, 1-2 e \geq 3, rispettivamente (p=0.68). Anche la risposta sui sintomi non pareva essere influenzata dalla presenza di comorbidità (77.3%, 85.9% e 84.9% nei pazienti con CCI=0, 1-2 e \geq 3, rispettivamente, p=0.11). La percentuale di risposte su milza e sintomi a 3 e 6 mesi era sovrapponibile nei tre gruppi di CCI.

Per gli scopi di questo studio, i pazienti sono stati suddivisi anche in 3 categorie considerando il peso al disotto del primo percentile (<21.9, n. 96), i pazienti normopeso (21.9-24.9, n. 142) e i pazienti sovrappeso (>24.9, n. 142). Le tre categorie di BMI non erano associate a differenze in termini di risposta sulla milza che era raggiunta nel 40.7%, 35.2% e 41.3% dei pazienti con un BMI <21.9, 21-24.9 e \geq 25, rispettivamente (p=0.57), o in termini di risposta sui sintomi, ottenuta dal 79.3%, 79.7% e 84.6% dei pazienti (p=0.49) durante la terapia. Inoltre, la percentuale di pazienti responsivi era sovrapponibile nei tre gruppi sia a 3 (p=0.85 and p=0.32) che a 6 mesi (p=0.73 and p=0.63).

È interessante notare che le dosi medie di partenza sia quella cumulativa non differivano a seconda del CCI (p=0.78) né del BMI (p=0.37).

2.2.3 IMPATTO DELLE COMORBIDITA' E DEL BMI SULLA TOSSICITA' DI RUXOLITINIB

In tutto, 253 dei 293 pazienti valutabili, aveva sviluppato una anemia relata al farmaco (nel 37.9% di grado 3-4); l'85% e il 73.5% dei pazienti aveva sviluppato anemia a 3 e 6 mesi, rispettivamente. Piastrinopenia di qualunque

grado era stata osservata durante il trattamento in 204 dei 394 pazienti valutabili (nel 10.8% di grado 3-4), mentre infezioni di grado ≥ 2 sono occorse in 120 (29.9%) pazienti, dopo un tempo mediano dall'inizio di ruxolitinib di 5.9 mesi (range, 1-60.9). In particolare, le infezioni erano rappresentate da: polmonite nel 25.8% dei casi (grado 2 in 11 pazienti, grado 3 in 14 e grado 4-5 in 6), bronchiti nel 15% dei casi (di grado 2 in 16 pazienti e di grado 3 in 2), infezioni gastrointestinali nell' 8.3% dei casi (di grado 2 in 4 pazienti, di grado 3 in 5 e di grado 4 in 1), infezioni del tratto urinario nell' 8.3% dei casi (di grado 2 in 9 pazienti e di grado 3 in 1 paziente), infezioni da virus erpetici si sono verificate nel 10% dei casi (infezioni da Herpes Simplex di grado 2 in 6 pazienti e infezioni di grado 2 e 3 da Herpes zoster in 5 e 1 paziente, rispettivamente), infezioni cutanee nel 5.8% dei casi (di grado 2 in 6 pazienti e di grado 3 in 1), infezioni delle vie aeree superiori nel 7.7% dei casi (di grado 2 in 8 pazienti e di grado 3 in 1), febbre di origine sconosciuta si è registrata nel 15% dei casi (di grado 2 in 13 pazienti e di grado 3-4 in 5), sepsi nel 1.7% dei casi (1 di grado 3 e 1 di grado 4). In aggiunta, una tubercolosi di grado 2, una infezione dell'occhio di grado 2 e una infezione renale di grado 2 sono stati registrati in un paziente ciascuno.

La presenza di comorbidità influenzava la comparsa di anemia (di qualunque grado) occorsa durante il trattamento e nei primi 3 mesi, mentre il BMI non si associava mai a tossicità farmaco-indotta (tabella 2). È interessante notare che lo sviluppo di anemia e piastrinopenia severe (grado 3/4) sia in qualunque momento dall'inizio della terapia sia a 3 che 6 mesi non era influenzata dal CCI né dal BMI. In più, l'incidenza cumulative di infezioni, aggiustata per il rischio di morte, non appariva condizionata dal CCI e dal BMI ($p=0.27$ and $p=0.95$, rispettivamente).

	Anemia						Thrombocytopenia					
	CCI<3	CCI≥3	<i>p</i>	BMI<21,9	BMI≥21,9	<i>p</i>	CCI=0	CCI≥1	<i>p</i>	BMI<21,9	BMI≥21,9	<i>p</i>
Any time	206/244 (84.4%)	47/49 (95.9%)	0.03	60/65 (92.3%)	187/218 (85.8%)	0.17	103/195 (52.8%)	101/199 (50.7%)	0.68	48/94 (51.1%)	145/282 (51.4%)	0.95
At 3 months	202/244 (82.8%)	47/49 (95.9%)	0.02	60/65 (92.3%)	183/218 (83.9%)	0.09	84/194 (43.3%)	86/199 (43.2%)	0.99	43/94 (45.7%)	117/281 (41.6%)	0.49
At 6 months	162/224 (72.3%)	32/40 (80.0%)	0.31	46/60 (76,7%)	144/197 (73.1%)	0.58	73/171 (42.7%)	76/168 (45.2%)	0.64	32/80 (40%)	112/250 (44.8%)	0.45

Tabella 2: Incidenza di anemia e piastrinopenia di qualunque grado a seconda del CCI e del BMI

2.2.4 IMPATTO DELLE COMORBIDITA' E DEL BMI ULL'OUTCOME

L'overall survival e il progression-free survival erano significativamente differenti tra le diverse categorie di CCI ($p=0.01$ e $p=0.04$, rispettivamente) (Figura 1). Il CCI manteneva il suo significato prognostico anche dopo aggiustamento per categorie di rischio DIPSS ($p<0.001$ e 0.001 , rispettivamente) (Figura 1a e 1b). Così come il CCI anche il BMI correlava con la sopravvivenza ($p=0.003$) e il PFS ($p=0.003$) anche dopo aggiustamento per categoria di rischio DIPSS (Figure 1c and 1d).

Una landmark analysis che considerava i pazienti responsivi a 6 mesi (Figura 2) evidenziava come i pazienti che mostravano una risposta sulla milza secondo i criteri IWG-MRT e avevano un CCI inferiore a 3 al baseline presentavano la migliore sopravvivenza rispetto alle altre categorie (Figura 2a). È importante sottolineare che a parità di CCI, il raggiungimento di una risposta sulla splenomegalia migliorava significativamente l'OS.

La stessa landmark analysis che considerava la risposta a 6 mesi a seconda della categoria di BMI, mostrava che i pazienti che non raggiungevano una risposta splenica e avevano un BMI <21.9 presentavano l'outcome peggiore (Figure 2b). Nel gruppo di pazienti sottopeso, l'ottenimento di una risposta sulla milza potrebbe pertanto migliorare significativamente l'aspettativa di vita.

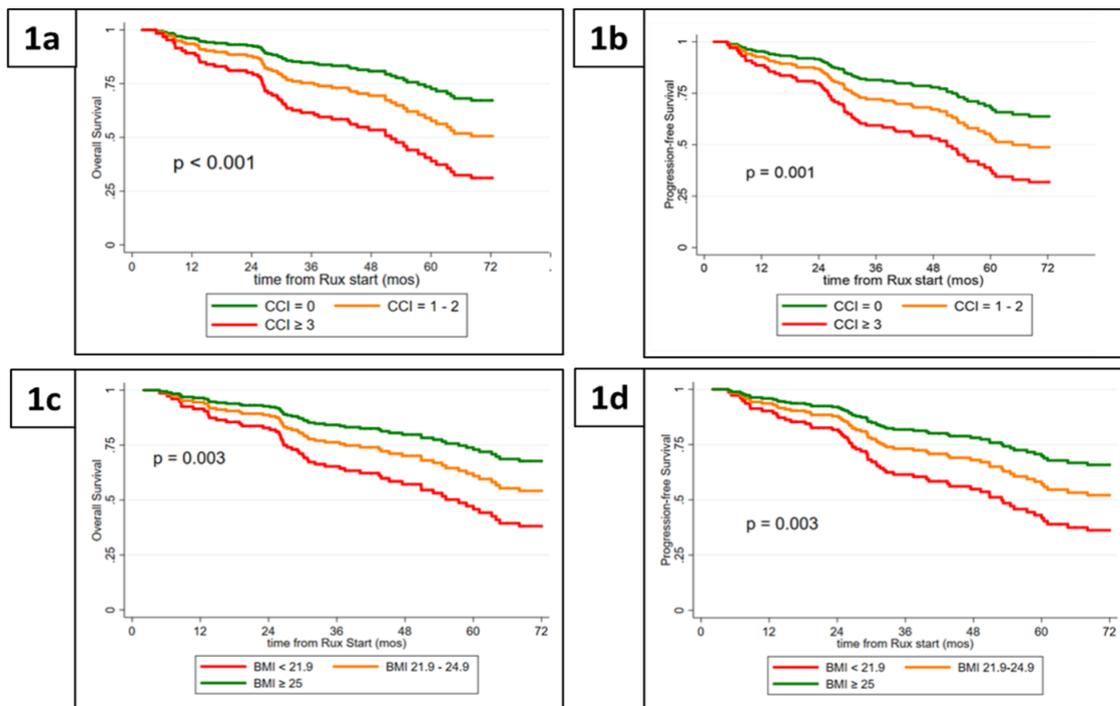


Figura 1. Overall survival (OS) e progression-free survival (PFS) a seconda del Charlson comorbidity index (CCI) e del BMI all'inizio della terapia con ruxolitinib. L'OS (figura 1a e 1c) e la PFS (figura 1b e 1d) sono state calcolate usando il modello di regressione multivariata per rischi proporzionali di Cox, dopo aggiustamento per categoria di rischio DIPSS e per corrette per "left truncation".

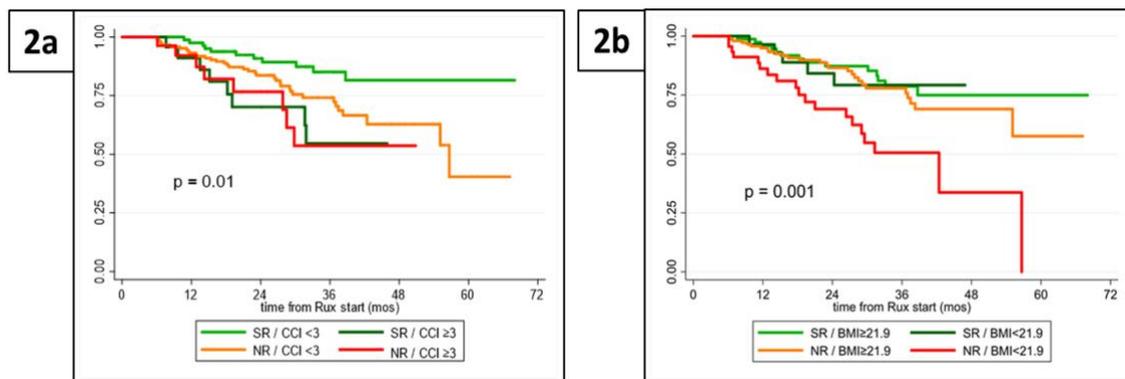


Figura 2. Landmark analysis della sopravvivenza (OS) a seconda della risposta sulla milza a 6 mesi e del Charlson comorbidity index (figura 2a) e del BMI (figura 2b) all'inizio della terapia con ruxolitinib.

CAPITOLO III

Discussione

3.1 L'IMPATTO DELLE COMORBIDITA' E DEL BMI SUL TRATTAMENTO CON RUXOLITINIB

È noto come le comorbidità possano influenzare la prognosi dei pazienti affetti da cancro e come impattino sull'algoritmo terapeutico di tali patologie.^{257,264-266} Mentre tali acquisizioni hanno portato all'integrazione della valutazione della comorbidità e dello stato nutrizionale come pratica comune di routine nella valutazione iniziale dei pazienti affetti da Leucemia Mieloide Cronica Philadelphia positiva, lo studio degli stessi parametri non è mai stato approfondito nei pazienti affetti da Mielofibrosi trattati con ruxolitinib.

La nostra analisi condotta su una vasta coorte di pazienti affetti da MF trattati omogeneamente con ruxolitinib nella pratica clinica quotidiana ha evidenziato come le comorbidità, così come dimostrato in altre patologie, hanno un ruolo importante nel predire la sopravvivenza, ma non condizionano la probabilità di ottenere una risposta sulla splenomegalia né sul controllo dei sintomi legati all'infiammazione, caratteristica della malattia. Inoltre, i pazienti con un carico inferiore di comorbidità all'inizio del trattamento, che riuscivano ad ottenere una risposta sulla milza sembravano avere una prognosi migliore rispetto ai pazienti non responsivi con simile CCI. La soglia di CCI <3 potrebbe così aiutare a identificare i pazienti che possono meritare una terapia con ruxolitinib, considerando che i pazienti responsivi e con un minore carico di comorbidità possono presentare l'outcome migliore.

Abbiamo trovato che i pazienti che hanno un maggior numero di comorbidità, presentano più frequentemente anemia prima e durante la terapia. Da ciò deriva che i clinici che hanno in cura tali pazienti devono effettuare un controllo ematologico serrato, settimanale, al fine di identificare la comparsa di anemizzazione se il CCI è superiore a 3 al baseline.

Diversamente dalla Leucemia Mieloide Cronica, il BMI non influenzava significativamente la percentuale di risposte né la comparsa di tossicità nei

pazienti affetti da MF e trattati con ruxolitinib. Al contrario, sembra che il farmaco possa migliorare la cachessia relata alla patologia con conseguente miglioramento della sopravvivenza tramite una riduzione delle citochine pro-infiammatorie. L'ottenimento di una risposta sulla milza in pazienti sottopeso a causa della malattia correlava con un miglioramento della sopravvivenza rispetto ai pazienti che non avevano ottenuto una risposta sulla milza e con simile BMI. Per tale motivo, la cachessia relata alla MF non è di per sé una controindicazione all'inizio del trattamento con ruxolitinib.

Il nostro gruppo ha recentemente proposto una valutazione multidimensionale per i pazienti fragili con Neoplasie mieloproliferative croniche Philadelphia-positiva e -negativa che debbano iniziare terapia con inibitori delle tirosin-chinasi: la valutazione del BMI è stata inclusa nella valutazione iniziale insieme alla valutazione del performance status, delle attività giornaliere strumentali (IADL), del CCI e del "short physical performance battery" (SPPB).²⁶⁷ Più recentemente, un nuovo strumento, il "cachexia index" è stato proposto al fine di consentire una quantificazione più oggettiva dei sintomi costituzionali nella mielofibrosi primaria.²⁶⁸ Questo score prende in considerazione due test di laboratorio molto semplici: l'albumina sierica e i livelli di colesterolo, che hanno dimostrato un ruolo prognostico indipendentemente dalla categoria di rischio IPSS/DIPSS. Tali parametri possono riflettere infatti lo stato ipercatabolico/cachettico della malattia e confermano ulteriormente il ruolo dello stato nutrizionale sull'outcome.²⁶⁸

In conclusione, la presenza di comorbidità il BMI non sembrano essere una controindicazione al trattamento con ruxolitinib nei pazienti affetti da MF; tuttavia tali informazioni possono contribuire a definire con maggiore precisione i pazienti che necessitano un controllo più attento durante il trattamento.

BIBLIOGRAFIA

1. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* 2009;114:937-51.
2. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia* 2008;22:437-8.
3. Heuck G. Two cases of leukemia with peculiar blood and bone marrow findings, respectively. *Arch Pathol Anat* 1879;78:475-96.
4. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood* 1951;6:372-5.
5. Di Guglielmo G. Myelosi eritemica cronica. *Haematologica* 1942;24:1-58.
6. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* 2002;100:2292-302.
7. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391-405.
8. Tefferi A, Thiele J, Vannucchi AM, Barbui T. An overview on CALR and CSF3R mutations and a proposal for revision of WHO diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2014;28:1407-13.
9. Broccia G, Deplano W, Dessalvi P, et al. Hematological malignancies in the island of Sardinia, 1974-1993: age and sex distributions and temporal changes in incidence. *Hematol Oncol* 2004;22:91-109.
10. Girodon F, Bonicelli G, Schaeffer C, et al. Significant increase in the apparent incidence of essential thrombocythemia related to new WHO diagnostic criteria: a population-based study. *Haematologica* 2009;94:865-9.
11. Chaiter Y, Brenner B, Aghai E, Tatarsky I. High incidence of myeloproliferative disorders in Ashkenazi Jews in northern Israel. *Leuk Lymphoma* 1992;7:251-5.
12. Johansson P, Kutti J, Andreasson B, et al. Trends in the incidence of chronic Philadelphia chromosome negative (Ph-) myeloproliferative disorders in the city of Goteborg, Sweden, during 1983-99. *J Intern Med* 2004;256:161-5.
13. Troussard X, Duchenet V, Cornet E, Mouchel D, Malet M, Collignon A. [Haematological malignancies: incidence in Basse-Normandie, France, for 1997-2004]. *Rev Epidemiol Sante Publique* 2009;57:151-8.
14. Rohrbacher M, Berger U, Hochhaus A, et al. Clinical trials underestimate the age of chronic myeloid leukemia (CML) patients. Incidence and median age of Ph/BCR-ABL-positive CML and other chronic myeloproliferative disorders in a representative area in Germany. *Leukemia* 2009;23:602-4.
15. Phekoo KJ, Richards MA, Moller H, Schey SA, South Thames Haematology Specialist C. The incidence and outcome of myeloid malignancies in 2,112 adult patients in southeast England. *Haematologica* 2006;91:1400-4.
16. Smith A, Howell D, Patmore R, Jack A, Roman E. Incidence of haematological malignancy by sub-type: a report from the Haematological Malignancy Research Network. *Br J Cancer* 2011;105:1684-92.

17. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, Wollan PC, Tefferi A. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol* 1999;61:10-5.
18. Rollison DE, Howlader N, Smith MT, 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;112:45-52.
19. Woodliff HJ, Dougan L. Myelofibrosis in Western Australia: an epidemiological study of 29 cases. *Med J Aust* 1976;1:523-5.
20. Lickiss JN, Giles GG, Baikie MJ, Lowenthal RM, Challis D, Panton J. Myeloproliferative and lymphoproliferative disorders in Tasmania, 1972-80: patterns in space and time. *J Natl Cancer Inst* 1984;72:1223-31.
21. Titmarsh GJ, Duncombe AS, McMullin MF, et al. How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. *Am J Hematol* 2014;89:581-7.
22. foundation Mr. MPN prevalence by the numbers2013.
23. Tefferi A, Lasho TL, Jimma T, et al. One thousand patients with primary myelofibrosis: the mayo clinic experience. *Mayo Clinic proceedings* 2012;87:25-33.
24. Sekhar M, Prentice HG, Popat U, et al. Idiopathic myelofibrosis in children. *British journal of haematology* 1996;93:394-7.
25. Altura RA, Head DR, Wang WC. Long-term survival of infants with idiopathic myelofibrosis. *British journal of haematology* 2000;109:459-62.
26. DeLario MR, Sheehan AM, Ataya R, et al. Clinical, histopathologic, and genetic features of pediatric primary myelofibrosis--an entity different from adults. *Am J Hematol* 2012;87:461-4.
27. Bonduel M, Sciuccati G, Torres AF, Pierini A, Gallo G. Familial idiopathic myelofibrosis and multiple hemangiomas. *Am J Hematol* 1998;59:175-7.
28. Jones AV, Chase A, Silver RT, et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nature genetics* 2009;41:446-9.
29. Smith RE, Chelmowski MK, Szabo EJ. Myelofibrosis: a review of clinical and pathologic features and treatment. *Critical reviews in oncology/hematology* 1990;10:305-14.
30. Bosch X, Campistol JM, Montoliu J, Cervantes F, Revert L. Toluene-associated myelofibrosis. *Blut* 1989;58:219-20.
31. Bosch X, Campistol JM, Montoliu J, Revert L. Myelofibrosis and focal segmental glomerulosclerosis associated with toluene poisoning. *Human toxicology* 1988;7:357-61.
32. Jacobson RJ, Salo A, Fialkow PJ. Agnogenic myeloid metaplasia: a clonal proliferation of hematopoietic stem cells with secondary myelofibrosis. *Blood* 1978;51:189-94.
33. Reeder TL, Bailey RJ, Dewald GW, Tefferi A. Both B and T lymphocytes may be clonally involved in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2003;101:1981-3.
34. Skov V, Riley CH, Thomassen M, et al. Whole blood transcriptional profiling reveals significant down-regulation of human leukocyte antigen class I and II genes in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. *Leuk Lymphoma* 2013;54:2269-73.

35. Tefferi A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2005;23:8520-30.
36. Dupriez B, Morel P, Demory JL, et al. Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood* 1996;88:1013-8.
37. Reilly JT, Snowden JA, Spearing RL, et al. Cytogenetic abnormalities and their prognostic significance in idiopathic myelofibrosis: a study of 106 cases. *British journal of haematology* 1997;98:96-102.
38. Wassie E, Finke C, Gangat N, et al. A compendium of cytogenetic abnormalities in myelofibrosis: molecular and phenotypic correlates in 826 patients. *British journal of haematology* 2014.
39. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer cell* 2005;7:387-97.
40. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054-61.
41. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *The New England journal of medicine* 2005;352:1779-90.
42. James C, Ugo V, Casadevall N, Constantinescu SN, Vainchenker W. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends in molecular medicine* 2005;11:546-54.
43. Staerk J, Constantinescu SN. The JAK-STAT pathway and hematopoietic stem cells from the JAK2 V617F perspective. *Jak-Stat* 2012;1:184-90.
44. Oh ST, Gotlib J. JAK2 V617F and beyond: role of genetics and aberrant signaling in the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Expert review of hematology* 2010;3:323-37.
45. Ungureanu D, Wu J, Pekkala T, et al. The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nature structural & molecular biology* 2011;18:971-6.
46. Silvennoinen O, Ungureanu D, Niranjani Y, Hammaren H, Bandaranayake R, Hubbard SR. New insights into the structure and function of the pseudokinase domain in JAK2. *Biochemical Society transactions* 2013;41:1002-7.
47. Lasho TL, Pardanani A, McClure RF, et al. Concurrent MPL515 and JAK2V617F mutations in myelofibrosis: chronology of clonal emergence and changes in mutant allele burden over time. *British journal of haematology* 2006;135:683-7.
48. Pardanani A, Lasho T, Finke C, Oh ST, Gotlib J, Tefferi A. LNK mutation studies in blast-phase myeloproliferative neoplasms, and in chronic-phase disease with TET2, IDH, JAK2 or MPL mutations. *Leukemia* 2010;24:1713-8.
49. Grand FH, Hidalgo-Curtis CE, Ernst T, et al. Frequent CBL mutations associated with 11q acquired uniparental disomy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2009;113:6182-92.
50. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *The New England journal of medicine* 2013;369:2391-405.

51. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *The New England journal of medicine* 2013;369:2379-90.
52. Pasquier F, Cabagnols X, Secardin L, Plo I, Vainchenker W. Myeloproliferative neoplasms: JAK2 signaling pathway as a central target for therapy. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia* 2014;14 Suppl:S23-35.
53. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood* 2014;124:2507-13; quiz 615.
54. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* 2013;27:1861-9.
55. Tefferi A, Pardanani A, Lim KH, et al. TET2 mutations and their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia and myelofibrosis. *Leukemia* 2009;23:905-11.
56. Chen E, Schneider RK, Breyfogle LJ, et al. Distinct effects of concomitant Jak2V617F expression and Tet2 loss in mice promote disease progression in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2015;125:327-35.
57. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, et al. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2001;98:3249-55.
58. Zhou A, Oh ST. Prognostication in MF: from CBC to cytogenetics to molecular markers. *Best practice & research Clinical haematology* 2014;27:155-64.
59. Visani G, Finelli C, Castelli U, et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: clinical and haematological parameters predicting survival in a series of 133 patients. *British journal of haematology* 1990;75:4-9.
60. Cervantes F, Pereira A, Esteve J, et al. Identification of 'short-lived' and 'long-lived' patients at presentation of idiopathic myelofibrosis. *British journal of haematology* 1997;97:635-40.
61. Varki A, Lottenberg R, Griffith R, Reinhard E. The syndrome of idiopathic myelofibrosis. A clinicopathologic review with emphasis on the prognostic variables predicting survival. *Medicine* 1983;62:353-71.
62. Silverstein MN, Gomes MR, ReMine WH, Elveback LR. Agnogenic myeloid metaplasia. Natural history and treatment. *Archives of internal medicine* 1967;120:546-50.
63. Garcia-Manero G, Schuster SJ, Patrick H, Martinez J. Pulmonary hypertension in patients with myelofibrosis secondary to myeloproliferative diseases. *Am J Hematol* 1999;60:130-5.
64. Dingli D, Utz JP, Krowka MJ, Oberg AL, Tefferi A. Unexplained pulmonary hypertension in chronic myeloproliferative disorders. *Chest* 2001;120:801-8.
65. Cortelezzi A, Gritti G, Del Papa N, et al. Pulmonary arterial hypertension in primary myelofibrosis is common and associated with an altered angiogenic status. *Leukemia* 2008;22:646-9.
66. Vaa BE, Wolanskyj AP, Roeker L, et al. Pruritus in primary myelofibrosis: clinical and laboratory correlates. *Am J Hematol* 2012;87:136-8.
67. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International

Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood* 2010;115:1703-8.

68. Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. *Blood* 2010;115:778-82.

69. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, et al. Dynamic International Prognostic Scoring System (DIPSS) predicts progression to acute myeloid leukemia in primary myelofibrosis. *Blood* 2010;116:2857-8.

70. Scherber R, Dueck AC, Johansson P, et al. The Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF): international prospective validation and reliability trial in 402 patients. *Blood* 2011;118:401-8.

71. Emanuel RM, Dueck AC, Geyer HL, 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012;30:4098-103.

72. Elliott MA, Pardanani A, Lasho TL, Schwager SM, Tefferi A. Thrombosis in myelofibrosis: prior thrombosis is the only predictive factor and most venous events are provoked. *Haematologica* 2010;95:1788-91.

73. O'Reilly RA. Splenomegaly in 2,505 patients in a large university medical center from 1913 to 1995. 1913 to 1962: 2,056 patients. *The Western journal of medicine* 1998;169:78-87.

74. Wanless IR, Peterson P, Das A, Boitnott JK, Moore GW, Bernier V. Hepatic vascular disease and portal hypertension in polycythemia vera and agnogenic myeloid metaplasia: a clinicopathological study of 145 patients examined at autopsy. *Hepatology* 1990;12:1166-74.

75. Valla D, Casadevall N, Huisse MG, et al. Etiology of portal vein thrombosis in adults. A prospective evaluation of primary myeloproliferative disorders. *Gastroenterology* 1988;94:1063-9.

76. Georgiades CS, Neyman EG, Francis IR, Sneider MB, Fishman EK. Typical and atypical presentations of extramedullary hemopoiesis. *AJR American journal of roentgenology* 2002;179:1239-43.

77. Koch CA, Li CY, Mesa RA, Tefferi A. Nonhepatosplenic extramedullary hematopoiesis: associated diseases, pathology, clinical course, and treatment. *Mayo Clinic proceedings* 2003;78:1223-33.

78. Bartlett RP, Greipp PR, Tefferi A, Cupps RE, Mullan BP, Trastek VF. Extramedullary hematopoiesis manifesting as a symptomatic pleural effusion. *Mayo Clinic proceedings* 1995;70:1161-4.

79. Knobel B, Melamud E, Virag I, Meytes D. Ectopic medullary hematopoiesis as a cause of ascites in agnogenic myeloid metaplasia. Case report and review of the literature. *Acta haematologica* 1993;89:104-7.

80. Liote F, Yeni P, Teillet-Thiebaud F, et al. Ascites revealing peritoneal and hepatic extramedullary hematopoiesis with peliosis in agnogenic myeloid metaplasia: case report and review of the literature. *The American journal of medicine* 1991;90:111-7.

81. Yusen RD, Kollef MH. Acute respiratory failure due to extramedullary hematopoiesis. *Chest* 1995;108:1170-2.

82. Richters ML. Myelofibrosis, diffuse alveolar hemorrhage and radiation treatment. *Am J Hematol* 2013;88:922.
83. Lundh B, Brandt L, Cronqvist S, Eyrich R. Intracranial myeloid metaplasia in myelofibrosis. *Scandinavian journal of haematology* 1982;28:91-4.
84. Koch BL, Bisset GS, 3rd, Bisset RR, Zimmer MB. Intracranial extramedullary hematopoiesis: MR findings with pathologic correlation. *AJR American journal of roentgenology* 1994;162:1419-20.
85. Loewy G, Mathew A, Distenfeld A. Skin manifestation of agnogenic myeloid metaplasia. *Am J Hematol* 1994;45:167-70.
86. Pecci A, Croci G, Balduini CL, Boveri E. Cutaneous involvement by post-polycythemia vera myelofibrosis. *Am J Hematol* 2014;89:448.
87. Mizoguchi M, Kawa Y, Minami T, Nakayama H, Mizoguchi H. Cutaneous extramedullary hematopoiesis in myelofibrosis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1990;22:351-5.
88. Fedeli G, Certo M, Cannizzaro O, et al. Extramedullary hematopoiesis involving the esophagus in myelofibrosis. *The American journal of gastroenterology* 1990;85:1512-4.
89. Schreiber D, Brenner B, Jacobs R, Ben-Arieh Y, Tatarsky I, Alroy G. Small intestinal myeloid metaplasia. *Jama* 1988;259:2580-2.
90. Lopez-Guillermo A, Cervantes F, Bruguera M, Pereira A, Feliu E, Rozman C. Liver dysfunction following splenectomy in idiopathic myelofibrosis: a study of 10 patients. *Acta haematologica* 1991;85:184-8.
91. Mesa RA, Li CY, Ketterling RP, Schroeder GS, Knudson RA, Tefferi A. Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. *Blood* 2005;105:973-7.
92. Cervantes F, Tassies D, Salgado C, Rovira M, Pereira A, Rozman C. Acute transformation in nonleukemic chronic myeloproliferative disorders: actuarial probability and main characteristics in a series of 218 patients. *Acta haematologica* 1991;85:124-7.
93. Ragni MV, Shreiner DP. Spontaneous 'remission' of agnogenic myeloid metaplasia and termination in acute myeloid leukemia. *Archives of internal medicine* 1981;141:1481-4.
94. Hernandez JM, San Miguel JF, Gonzalez M, et al. Development of acute leukaemia after idiopathic myelofibrosis. *Journal of clinical pathology* 1992;45:427-30.
95. Passamonti F, Rumi E, Elena C, et al. Incidence of leukaemia in patients with primary myelofibrosis and RBC-transfusion-dependence. *British journal of haematology* 2010;150:719-21.
96. Huang J, Li CY, Mesa RA, et al. Risk factors for leukemic transformation in patients with primary myelofibrosis. *Cancer* 2008;112:2726-32.
97. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 2009;113:2895-901.
98. Cervantes F, Barosi G, Demory JL, et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups. *British journal of haematology* 1998;102:684-90.

99. Dingli D, Schwager SM, Mesa RA, Li CY, Tefferi A. Prognosis in transplant-eligible patients with agnogenic myeloid metaplasia: a simple CBC-based scoring system. *Cancer* 2006;106:623-30.
100. Elliott MA, Verstovsek S, Dingli D, et al. Monocytosis is an adverse prognostic factor for survival in younger patients with primary myelofibrosis. *Leukemia research* 2007;31:1503-9.
101. Tefferi A, Huang J, Schwager S, et al. Validation and comparison of contemporary prognostic models in primary myelofibrosis: analysis based on 334 patients from a single institution. *Cancer* 2007;109:2083-8.
102. Vener C, Fracchiolla NS, Gianelli U, et al. Prognostic implications of the European consensus for grading of bone marrow fibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2008;111:1862-5.
103. Tam CS, Kantarjian H, Cortes J, et al. Dynamic model for predicting death within 12 months in patients with primary or post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009;27:5587-93.
104. Morel P, Duhamel A, Hivert B, Stalniekiewicz L, Demory JL, Dupriez B. Identification during the follow-up of time-dependent prognostic factors for the competing risks of death and blast phase in primary myelofibrosis: a study of 172 patients. *Blood* 2010;115:4350-5.
105. Hussein K, Huang J, Lasho T, et al. Karyotype complements the International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis. *European journal of haematology* 2009;82:255-9.
106. Tefferi A, Meyer RG, Wyatt WA, Dewald GW. Comparison of peripheral blood interphase cytogenetics with bone marrow karyotype analysis in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *British journal of haematology* 2001;115:316-9.
107. Tam CS, Abruzzo LV, Lin KI, et al. The role of cytogenetic abnormalities as a prognostic marker in primary myelofibrosis: applicability at the time of diagnosis and later during disease course. *Blood* 2009;113:4171-8.
108. Hussein K, Pardanani AD, Van Dyke DL, Hanson CA, Tefferi A. International Prognostic Scoring System-independent cytogenetic risk categorization in primary myelofibrosis. *Blood* 2010;115:496-9.
109. Caramazza D, Begna KH, Gangat N, et al. Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients. *Leukemia* 2011;25:82-8.
110. Tefferi A, Siragusa S, Hussein K, et al. Transfusion-dependency at presentation and its acquisition in the first year of diagnosis are both equally detrimental for survival in primary myelofibrosis--prognostic relevance is independent of IPSS or karyotype. *Am J Hematol* 2010;85:14-7.
111. Patnaik MM, Caramazza D, Gangat N, Hanson CA, Pardanani A, Tefferi A. Age and platelet count are IPSS-independent prognostic factors in young patients with primary myelofibrosis and complement IPSS in predicting very long or very short survival. *European journal of haematology* 2010;84:105-8.
112. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, et al. DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *Journal of*

clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 2011;29:392-7.

113. Masarova L, Bose P, Daver N, et al. Patients with post-essential thrombocythemia and post-polycythemia vera differ from patients with primary myelofibrosis. *Leukemia research* 2017;59:110-6.

114. Passamonti F, Giorgino T, Mora B, et al. A clinical-molecular prognostic model to predict survival in patients with post polycythemia vera and post essential thrombocythemia myelofibrosis. *Leukemia* 2017.

115. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:1356-63.

116. Barbui T, Carobbio A, Finazzi G, et al. Elevated C-reactive protein is associated with shortened leukemia-free survival in patients with myelofibrosis. *Leukemia* 2013;27:2084-6.

117. Tefferi A, Lasho TL, Huang J, et al. Low JAK2V617F allele burden in primary myelofibrosis, compared to either a higher allele burden or unmutated status, is associated with inferior overall and leukemia-free survival. *Leukemia* 2008;22:756-61.

118. Guglielmelli P, Barosi G, Specchia G, et al. Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele. *Blood* 2009;114:1477-83.

119. Rumi E, Harutyunyan AS, Pietra D, et al. CALR exon 9 mutations are somatically acquired events in familial cases of essential thrombocythemia or primary myelofibrosis. *Blood* 2014;123:2416-9.

120. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia* 2014;28:1804-10.

121. Lundberg P, Karow A, Nienhold R, et al. Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014;123:2220-8.

122. Tefferi A, Finke CM, Lasho TL, et al. U2AF1 mutation types in primary myelofibrosis: phenotypic and prognostic distinctions. *Leukemia* 2018;32:2274-8.

123. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, et al. MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2018;36:310-8.

124. Lofvenberg E, Wahlin A. Management of polycythaemia vera, essential thrombocythaemia and myelofibrosis with hydroxyurea. *European journal of haematology* 1988;41:375-81.

125. Lofvenberg E, Wahlin A, Roos G, Ost A. Reversal of myelofibrosis by hydroxyurea. *European journal of haematology* 1990;44:33-8.

126. Manoharan A. Management of myelofibrosis with intermittent hydroxyurea. *British journal of haematology* 1991;77:252-4.

127. Wagner H, Jr., McKeough PG, Desforjes J, Madoc-Jones H. Splenic irradiation in the treatment of patients with chronic myelogenous leukemia or myelofibrosis with

myeloid metaplasia. Results of daily and intermittent fractionation with and without concomitant hydroxyurea. *Cancer* 1986;58:1204-7.

128. Martinez-Trillos A, Gaya A, Maffioli M, et al. Efficacy and tolerability of hydroxyurea in the treatment of the hyperproliferative manifestations of myelofibrosis: results in 40 patients. *Annals of hematology* 2010;89:1233-7.

129. Sirhan S, Lasho TL, Hanson CA, Mesa RA, Pardanani A, Tefferi A. The presence of JAK2V617F in primary myelofibrosis or its allele burden in polycythemia vera predicts chemosensitivity to hydroxyurea. *Am J Hematol* 2008;83:363-5.

130. Petti MC, Latagliata R, Spadea T, et al. Melphalan treatment in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *British journal of haematology* 2002;116:576-81.

131. Gilbert HS. Long term treatment of myeloproliferative disease with interferon-alpha-2b: feasibility and efficacy. *Cancer* 1998;83:1205-13.

132. Radin AI, Kim HT, Grant BW, et al. Phase II study of alpha2 interferon in the treatment of the chronic myeloproliferative disorders (E5487): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Cancer* 2003;98:100-9.

133. Kiladjian JJ, Chomienne C, Fenaux P. Interferon-alpha therapy in bcr-abl-negative myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2008;22:1990-8.

134. Tefferi A, Elliot MA, Yoon SY, et al. Clinical and bone marrow effects of interferon alfa therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2001;97:1896.

135. Ianotto JC, Kiladjian JJ, Demory JL, et al. PEG-IFN-alpha-2a therapy in patients with myelofibrosis: a study of the French Groupe d'Etudes des Myelofibroses (GEM) and France Intergroupe des syndromes Myeloproliferatifs (FIM). *British journal of haematology* 2009;146:223-5.

136. Kiladjian JJ, Mesa RA, Hoffman R. The renaissance of interferon therapy for the treatment of myeloid malignancies. *Blood* 2011;117:4706-15.

137. Silver RT, Vandris K, Goldman JJ. Recombinant interferon-alpha may retard progression of early primary myelofibrosis: a preliminary report. *Blood* 2011;117:6669-72.

138. Ianotto JC, Boyer-Perrard F, Gyan E, et al. Efficacy and safety of pegylated-interferon alpha-2a in myelofibrosis: a study by the FIM and GEM French cooperative groups. *British journal of haematology* 2013;162:783-91.

139. Barosi G, Elliott M, Canepa L, et al. Thalidomide in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a pooled-analysis of individual patient data from five studies. *Leuk Lymphoma* 2002;43:2301-7.

140. Canepa L, Ballerini F, Varaldo R, et al. Thalidomide in agnogenic and secondary myelofibrosis. *British journal of haematology* 2001;115:313-5.

141. Marchetti M, Barosi G, Balestri F, et al. Low-dose thalidomide ameliorates cytopenias and splenomegaly in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a phase II trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2004;22:424-31.

142. Elliott MA, Mesa RA, Li CY, et al. Thalidomide treatment in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *British journal of haematology* 2002;117:288-96.

143. Thomas DA, Giles FJ, Albitar M, et al. Thalidomide therapy for myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Cancer* 2006;106:1974-84.

144. Merup M, Kutti J, Birgergard G, et al. Negligible clinical effects of thalidomide in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Medical oncology* 2002;19:79-86.
145. Mesa RA, Elliott MA, Schroeder G, Tefferi A. Durable responses to thalidomide-based drug therapy for myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Mayo Clinic proceedings* 2004;79:883-9.
146. Berrebi A, Feldberg E, Spivak I, Shvidel L. Mini-dose of thalidomide for treatment of primary myelofibrosis. Report of a case with complete reversal of bone marrow fibrosis and splenomegaly. *Haematologica* 2007;92:e15-6.
147. Mesa RA, Steensma DP, Pardanani A, et al. A phase 2 trial of combination low-dose thalidomide and prednisone for the treatment of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2003;101:2534-41.
148. Tefferi A, Cortes J, Verstovsek S, et al. Lenalidomide therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2006;108:1158-64.
149. Quintas-Cardama A, Kantarjian HM, Manshouri T, et al. Lenalidomide plus prednisone results in durable clinical, histopathologic, and molecular responses in patients with myelofibrosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009;27:4760-6.
150. Mesa RA, Yao X, Cripe LD, et al. Lenalidomide and prednisone for myelofibrosis: Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) phase 2 trial E4903. *Blood* 2010;116:4436-8.
151. Tefferi A, Lasho TL, Mesa RA, Pardanani A, Ketterling RP, Hanson CA. Lenalidomide therapy in del(5)(q31)-associated myelofibrosis: cytogenetic and JAK2V617F molecular remissions. *Leukemia* 2007;21:1827-8.
152. Tefferi A, Verstovsek S, Barosi G, et al. Pomalidomide is active in the treatment of anemia associated with myelofibrosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009;27:4563-9.
153. Lacy MQ, Tefferi A. Pomalidomide therapy for multiple myeloma and myelofibrosis: an update. *Leuk Lymphoma* 2011;52:560-6.
154. Begna KH, Pardanani A, Mesa R, et al. Long-term outcome of pomalidomide therapy in myelofibrosis. *Am J Hematol* 2012;87:66-8.
155. Brubaker LH, Briere J, Laszlo J, et al. Treatment of anemia in myeloproliferative disorders: a randomized study of fluoxymesterone v transfusions only. *Archives of internal medicine* 1982;142:1533-7.
156. Besa EC, Nowell PC, Geller NL, Gardner FH. Analysis of the androgen response of 23 patients with agnogenic myeloid metaplasia: the value of chromosomal studies in predicting response and survival. *Cancer* 1982;49:308-13.
157. Levy V, Bourgarit A, Delmer A, et al. Treatment of agnogenic myeloid metaplasia with danazol: a report of four cases. *Am J Hematol* 1996;53:239-41.
158. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Domingo A, Arellano-Rodrigo E, Montserrat E. Efficacy and tolerability of danazol as a treatment for the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: long-term results in 30 patients. *British journal of haematology* 2005;129:771-5.
159. Tefferi A, Silverstein MN. Recombinant human erythropoietin therapy in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *British journal of haematology* 1994;86:893.

160. Rodriguez JN, Martino ML, Dieguez JC, Prados D. rHuEpo for the treatment of anemia in myelofibrosis with myeloid metaplasia. Experience in 6 patients and meta-analytical approach. *Haematologica* 1998;83:616-21.
161. Aloe Spiriti M, Latagliata R, Avvisati G, et al. Erythropoietin treatment of idiopathic myelofibrosis. *Haematologica* 1993;78:371-3.
162. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Hernandez-Boluda JC, Sureda A, Torrebadell M, Montserrat E. Erythropoietin treatment of the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: results in 20 patients and review of the literature. *British journal of haematology* 2004;127:399-403.
163. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Hernandez-Boluda JC, et al. Darbepoetin-alpha for the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *British journal of haematology* 2006;134:184-6.
164. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:761-70.
165. Benbassat J, Penchas S, Ligumski M. Splenectomy in patients with agnogenic myeloid metaplasia: an analysis of 321 published cases. *British journal of haematology* 1979;42:207-14.
166. Mesa RA, Nagorney DS, Schwager S, Allred J, Tefferi A. Palliative goals, patient selection, and perioperative platelet management: outcomes and lessons from 3 decades of splenectomy for myelofibrosis with myeloid metaplasia at the Mayo Clinic. *Cancer* 2006;107:361-70.
167. Barosi G, Ambrosetti A, Buratti A, et al. Splenectomy for patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia: pretreatment variables and outcome prediction. *Leukemia* 1993;7:200-6.
168. Lafaye F, Rain JD, Clot P, Najean Y. Risks and benefits of splenectomy in myelofibrosis: an analysis of 39 cases. *Nouvelle revue francaise d'hematologie* 1994;36:359-62.
169. Barosi G, Ambrosetti A, Centra A, et al. Splenectomy and risk of blast transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. Italian Cooperative Study Group on Myeloid with Myeloid Metaplasia. *Blood* 1998;91:3630-6.
170. Arana-Yi C, Quintas-Cardama A, Giles F, et al. Advances in the therapy of chronic idiopathic myelofibrosis. *The oncologist* 2006;11:929-43.
171. Merup M, Lazarevic V, Nahi H, et al. Different outcome of allogeneic transplantation in myelofibrosis using conventional or reduced-intensity conditioning regimens. *British journal of haematology* 2006;135:367-73.
172. Kroger N, Alchalby H, Klyuchnikov E, et al. JAK2-V617F-triggered preemptive and salvage adoptive immunotherapy with donor-lymphocyte infusion in patients with myelofibrosis after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2009;113:1866-8.
173. Klyuchnikov E, Holler E, Bornhauser M, et al. Donor lymphocyte infusions and second transplantation as salvage treatment for relapsed myelofibrosis after reduced-intensity allografting. *British journal of haematology* 2012;159:172-81.
174. Jovanovic JV, Ivey A, Vannucchi AM, et al. Establishing optimal quantitative-polymerase chain reaction assays for routine diagnosis and tracking of minimal residual disease in JAK2-V617F-associated myeloproliferative neoplasms: a joint European

LeukemiaNet/MPN&MPNr-EuroNet (COST action BM0902) study. *Leukemia* 2013;27:2032-9.

175. Guardiola P, Anderson JE, Bandini G, et al. Allogeneic stem cell transplantation for agnogenic myeloid metaplasia: a European Group for Blood and Marrow Transplantation, Societe Francaise de Greffe de Moelle, Gruppo Italiano per il Trapianto del Midollo Osseo, and Fred Hutchinson Cancer Research Center Collaborative Study. *Blood* 1999;93:2831-8.

176. Gupta V, Hari P, Hoffman R. Allogeneic hematopoietic cell transplantation for myelofibrosis in the era of JAK inhibitors. *Blood* 2012;120:1367-79.

177. Maziarz RT, Mesa RA, Tefferi A. Allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes: the question is "when?". *Mayo Clinic proceedings* 2003;78:941-3.

178. Babushok D, Hexner E. Allogeneic transplantation for myelofibrosis: for whom, when, and what are the true benefits? *Current opinion in hematology* 2014;21:114-22.

179. Guardiola P, Anderson JE, Gluckman E. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *The New England journal of medicine* 2000;343:659; author reply -60.

180. Deeg HJ, Appelbaum FR. Stem-cell transplantation for myelofibrosis. *The New England journal of medicine* 2001;344:775-6.

181. Lussana F, Rambaldi A, Finazzi MC, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia transformed to myelofibrosis or acute myeloid leukemia: a report from the MPN Subcommittee of the Chronic Malignancies Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica* 2014;99:916-21.

182. Soll E, Massumoto C, Clift RA, et al. Relevance of marrow fibrosis in bone marrow transplantation: a retrospective analysis of engraftment. *Blood* 1995;86:4667-73.

183. Li Z, Gooley T, Applebaum FR, Deeg HJ. Splenectomy and hemopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood* 2001;97:2180-1.

184. Ciurea SO, Sadegi B, Wilbur A, et al. Effects of extensive splenomegaly in patients with myelofibrosis undergoing a reduced intensity allogeneic stem cell transplantation. *British journal of haematology* 2008;141:80-3.

185. Devine SM, Hoffman R, Verma A, et al. Allogeneic blood cell transplantation following reduced-intensity conditioning is effective therapy for older patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2002;99:2255-8.

186. Hessling J, Kroger N, Werner M, et al. Dose-reduced conditioning regimen followed by allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *British journal of haematology* 2002;119:769-72.

187. Kroger N, Zabelina T, Schieder H, et al. Pilot study of reduced-intensity conditioning followed by allogeneic stem cell transplantation from related and unrelated donors in patients with myelofibrosis. *British journal of haematology* 2005;128:690-7.

188. Rondelli D, Barosi G, Bacigalupo A, et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation with reduced-intensity conditioning in intermediate- or high-risk patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2005;105:4115-9.

189. Kroger N, Holler E, Kobbe G, et al. Allogeneic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning in patients with myelofibrosis: a prospective,

multicenter study of the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 2009;114:5264-70.

190. Bacigalupo A, Soraru M, Dominietto A, et al. Allogeneic hemopoietic SCT for patients with primary myelofibrosis: a predictive transplant score based on transfusion requirement, spleen size and donor type. *Bone marrow transplantation* 2010;45:458-63.

191. Alchalby H, Badbaran A, Zabelina T, et al. Impact of JAK2V617F mutation status, allele burden, and clearance after allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood* 2010;116:3572-81.

192. Abellsson J, Merup M, Birgegard G, et al. The outcome of allo-HSCT for 92 patients with myelofibrosis in the Nordic countries. *Bone marrow transplantation* 2012;47:380-6.

193. Alchalby H, Yunus DR, Zabelina T, et al. Risk models predicting survival after reduced-intensity transplantation for myelofibrosis. *British journal of haematology* 2012;157:75-85.

194. Rondelli D, Goldberg JD, Isola L, et al. MPD-RC 101 prospective study of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood* 2014;124:1183-91.

195. Samuelson S, Sandmaier BM, Heslop HE, et al. Allogeneic haematopoietic cell transplantation for myelofibrosis in 30 patients 60-78 years of age. *British journal of haematology* 2011;153:76-82.

196. Ruiz-Arguelles GJ, Garces-Eisele J, Reyes-Nunez V, Ruiz-Delgado GJ, Rosillo C, Camoriano JK. Clearance of the Janus kinase 2 (JAK2) V617F mutation after allogeneic stem cell transplantation in a patient with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Am J Hematol* 2007;82:400-2.

197. Benjamini O, Koren-Michowitz M, Amariglio N, Kroger N, Nagler A, Shimoni A. Relapse of postpolycythemia myelofibrosis after allogeneic stem cell transplantation in a polycythemic phase: successful treatment with donor lymphocyte infusion directed by quantitative PCR test for V617F-JAK2 mutation. *Leukemia* 2008;22:1961-3.

198. Verstovsek S. Therapeutic potential of Janus-activated kinase-2 inhibitors for the management of myelofibrosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010;16:1988-96.

199. Pardani A, Gotlib JR, Jamieson C, et al. Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:789-96.

200. Verstovsek S. Janus-activated kinase 2 inhibitors: a new era of targeted therapies providing significant clinical benefit for Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:781-3.

201. Pardani A, Tefferi A. Targeting myeloproliferative neoplasms with JAK inhibitors. *Current opinion in hematology* 2011;18:105-10.

202. Quintas-Cardama A, Verstovsek S. Spleen deflation and beyond: the pros and cons of Janus kinase 2 inhibitor therapy for patients with myeloproliferative neoplasms. *Cancer* 2012;118:870-7.

203. Cervantes F, Mesa R, Harrison C. JAK inhibitors: beyond spleen and symptoms? *Haematologica* 2013;98:160-2.

204. Pardani A, Laborde RR, Lasho TL, et al. Safety and efficacy of CYT387, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *Leukemia* 2013;27:1322-7.

205. Vainchenker W, Favale F. Myelofibrosis, JAK2 inhibitors and erythropoiesis. *Leukemia* 2013;27:1219-23.
206. Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *The New England journal of medicine* 2012;366:787-98.
207. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *The New England journal of medicine* 2012;366:799-807.
208. Passamonti F, Caramazza D, Maffioli M. JAK inhibitor in CALR-mutant myelofibrosis. *The New England journal of medicine* 2014;370:1168-9.
209. Guglielmelli P, Biamonte F, Rotunno G, et al. Impact of mutational status on outcomes in myelofibrosis patients treated with ruxolitinib in the COMFORT-II study. *Blood* 2014;123:2157-60.
210. Mesa RA, Gotlib J, Gupta V, et al. Effect of ruxolitinib therapy on myelofibrosis-related symptoms and other patient-reported outcomes in COMFORT-I: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013;31:1285-92.
211. Cervantes F, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, et al. Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis. *Blood* 2013;122:4047-53.
212. Wilkins BS, Radia D, Woodley C, Farhi SE, Keohane C, Harrison CN. Resolution of bone marrow fibrosis in a patient receiving JAK1/JAK2 inhibitor treatment with ruxolitinib. *Haematologica* 2013;98:1872-6.
213. Mascarenhas J, Hoffman R. A comprehensive review and analysis of the effect of ruxolitinib therapy on the survival of patients with myelofibrosis. *Blood* 2013;121:4832-7.
214. Heine A, Brossart P, Wolf D. Ruxolitinib is a potent immunosuppressive compound: is it time for anti-infective prophylaxis? *Blood* 2013;122:3843-4.
215. Heine A, Held SA, Daecke SN, et al. The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. *Blood* 2013;122:1192-202.
216. Wysham NG, Sullivan DR, Allada G. An opportunistic infection associated with ruxolitinib, a novel janus kinase 1,2 inhibitor. *Chest* 2013;143:1478-9.
217. Lee SC, Feenstra J, Georghiou PR. *Pneumocystis jiroveci* pneumonitis complicating ruxolitinib therapy. *BMJ case reports* 2014;2014.
218. Caocci G, Murgia F, Podda L, Solinas A, Atzeni S, La Nasa G. Reactivation of hepatitis B virus infection following ruxolitinib treatment in a patient with myelofibrosis. *Leukemia* 2014;28:225-7.
219. Colomba C, Rubino R, Siracusa L, et al. Disseminated tuberculosis in a patient treated with a JAK2 selective inhibitor: a case report. *BMC research notes* 2012;5:552.
220. Goldberg RA, Reichel E, Oshry LJ. Bilateral toxoplasmosis retinitis associated with ruxolitinib. *The New England journal of medicine* 2013;369:681-3.
221. Wathes R, Moule S, Milojkovic D. Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with ruxolitinib. *The New England journal of medicine* 2013;369:197-8.
222. Palandri F, Polverelli N, Catani L, Vianelli N. Ruxolitinib-associated tuberculosis: a case of successful ruxolitinib rechallenge. *Annals of hematology* 2015;94:519-20.

223. Tefferi A, Litzow MR, Pardanani A. Long-term outcome of treatment with ruxolitinib in myelofibrosis. *The New England journal of medicine* 2011;365:1455-7.
224. Verstovsek S, Kantarjian HM, Estrov Z, et al. Long-term outcomes of 107 patients with myelofibrosis receiving JAK1/JAK2 inhibitor ruxolitinib: survival advantage in comparison to matched historical controls. *Blood* 2012;120:1202-9.
225. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, 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;98:1865-71.
226. Passamonti F, Maffioli M, Cervantes F, et al. Impact of ruxolitinib on the natural history of primary myelofibrosis: a comparison of the DIPSS and the COMFORT-2 cohorts. *Blood* 2014;123:1833-5.
227. Verstovsek S, Dean, J.P., Cernohous, P. Pacritinib, a dual JAK2/FLT3 inhibitor: an integrated efficacy and safety analysis of phase II trial data in patients with primary and secondary myelofibrosis (MF) and platelet counts <100,000/ml. *Blood* 2013;122:395.
228. Pardanani A, Harrison, C.N., Cortes, J.E. . Results of a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study (JAKARTA) of the JAK2-selective inhibitor fedratinib (SAR302503) in patients with myelofibrosis (MF). *Blood* 2013;122:393.
229. Mascarenhas J, Lu M, Li T, et al. A phase I study of panobinostat (LBH589) in patients with primary myelofibrosis (PMF) and post-polycythaemia vera/essential thrombocythaemia myelofibrosis (post-PV/ET MF). *British journal of haematology* 2013;161:68-75.
230. DeAngelo DJ, Mesa RA, Fiskus W, et al. Phase II trial of panobinostat, an oral pan-deacetylase inhibitor in patients with primary myelofibrosis, post-essential thrombocythaemia, and post-polycythaemia vera myelofibrosis. *British journal of haematology* 2013;162:326-35.
231. Wang Y, Fiskus W, Chong DG, et al. Cotreatment with panobinostat and JAK2 inhibitor TG101209 attenuates JAK2V617F levels and signaling and exerts synergistic cytotoxic effects against human myeloproliferative neoplastic cells. *Blood* 2009;114:5024-33.
232. Evrot E, Ebel N, Romanet V, et al. JAK1/2 and Pan-deacetylase inhibitor combination therapy yields improved efficacy in preclinical mouse models of JAK2V617F-driven disease. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2013;19:6230-41.
233. Rambaldi A, Dellacasa CM, Finazzi G, et al. A pilot study of the Histone-Deacetylase inhibitor Givinostat in patients with JAK2V617F positive chronic myeloproliferative neoplasms. *British journal of haematology* 2010;150:446-55.
234. Andersen CL, Mortensen NB, Klausen TW, Vestergaard H, Bjerrum OW, Hasselbalch HC. A phase II study of vorinostat (MK-0683) in patients with primary myelofibrosis and post-polycythemia vera myelofibrosis. *Haematologica* 2014;99:e5-7.
235. Quintas-Cardama A, Tong W, Kantarjian H, et al. A phase II study of 5-azacitidine for patients with primary and post-essential thrombocythemia/polycythemia vera myelofibrosis. *Leukemia* 2008;22:965-70.
236. Odenike O, Godwin, J., van Besien, K., Huo, D., Sher, D., Burke, P. Phase II trial of low dose, subcutaneous decitabine in myelofibrosis. *Blood* 2008;2809.
237. Jhaveri K, Modi S. HSP90 inhibitors for cancer therapy and overcoming drug resistance. *Advances in pharmacology* 2012;65:471-517.

238. Koppikar P, Bhagwat N, Kilpivaara O, et al. Heterodimeric JAK-STAT activation as a mechanism of persistence to JAK2 inhibitor therapy. *Nature* 2012;489:155-9.
239. Bhagwat N, Koppikar P, Keller M, et al. Improved targeting of JAK2 leads to increased therapeutic efficacy in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2014;123:2075-83.
240. Weigert O, Lane AA, Bird L, et al. Genetic resistance to JAK2 enzymatic inhibitors is overcome by HSP90 inhibition. *The Journal of experimental medicine* 2012;209:259-73.
241. Guglielmelli P, Barosi G, Rambaldi A, et al. Safety and efficacy of everolimus, a mTOR inhibitor, as single agent in a phase 1/2 study in patients with myelofibrosis. *Blood* 2011;118:2069-76.
242. Bogani C, Bartalucci N, Martinelli S, et al. mTOR inhibitors alone and in combination with JAK2 inhibitors effectively inhibit cells of myeloproliferative neoplasms. *PloS one* 2013;8:e54826.
243. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert opinion on therapeutic targets* 2012;16:103-19.
244. Steelman LS, Abrams SL, Whelan J, et al. Contributions of the Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways to leukemia. *Leukemia* 2008;22:686-707.
245. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, et al. Targeting survival cascades induced by activation of Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways for effective leukemia therapy. *Leukemia* 2008;22:708-22.
246. Oku S, Takenaka K, Kuriyama T, et al. JAK2 V617F uses distinct signalling pathways to induce cell proliferation and neutrophil activation. *British journal of haematology* 2010;150:334-44.
247. Papadantonakis N, Matsuura S, Ravid K. Megakaryocyte pathology and bone marrow fibrosis: the lysyl oxidase connection. *Blood* 2012;120:1774-81.
248. Dillingh MR, van den Blink B, Moerland M, et al. Recombinant human serum amyloid P in healthy volunteers and patients with pulmonary fibrosis. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 2013;26:672-6.
249. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutation research* 1991;256:271-82.
250. Shay JW, Wright WE. Telomerase activity in human cancer. *Current opinion in oncology* 1996;8:66-71.
251. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011-5.
252. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *European journal of cancer* 1997;33:787-91.
253. Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, et al. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nature medicine* 1999;5:1164-70.
254. Zhang X, Mar V, Zhou W, Harrington L, Robinson MO. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes & development* 1999;13:2388-99.

255. Tefferi A, Begna, K., Laborde, R. Imetelstat, a telomerase inhibitor, induces morphologica and molecular remissions in myelofibrosis and recersal of bone marrow fibrosis. *Blood* 2012;120:662.
256. Saussele S, Krauss MP, Hehlmann R, et al. Impact of comorbidities on overall survival in patients with chronic myeloid leukemia: results of the randomized CML study IV. *Blood* 2015;126:42-9.
257. Newberry KJ, Naqvi K, Nguyen KT, et al. Comorbidities predict worse prognosis in patients with primary myelofibrosis. *Cancer* 2014;120:2996-3002.
258. Caan BJ, Cespedes Feliciano EM, Kroenke CH. The Importance of Body Composition in Explaining the Overweight Paradox in Cancer-Counterpoint. *Cancer research* 2018;78:1906-12.
259. Al-Ali HK, Griesshammer M, le Coutre P, et al. Safety and efficacy of ruxolitinib in an open-label, multicenter, single-arm phase 3b expanded-access study in patients with myelofibrosis: a snapshot of 1144 patients in the JUMP trial. *Haematologica* 2016;101:1065-73.
260. Marchetti M, Barosi G, Cervantes F, et al. Which patients with myelofibrosis should receive ruxolitinib therapy? ELN-SIE evidence-based recommendations. *Leukemia* 2017;31:882-8.
261. Charlson ME, Sax FL. The therapeutic efficacy of critical care units from two perspectives: a traditional cohort approach vs a new case-control methodology. *Journal of chronic diseases* 1987;40:31-9.
262. Vardiman JW. The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chemico-biological interactions* 2010;184:16-20.
263. Kaplan ELM, P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association* 1958;53:457-81.
264. Ording AG, Garne JP, Nystrom PM, Froslev T, Sorensen HT, Lash TL. Comorbid diseases interact with breast cancer to affect mortality in the first year after diagnosis--a Danish nationwide matched cohort study. *PloS one* 2013;8:e76013.
265. Goede V, Cramer P, Busch R, et al. Interactions between comorbidity and treatment of chronic lymphocytic leukemia: results of German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group trials. *Haematologica* 2014;99:1095-100.
266. Breccia M, Federico V, Loglisci G, Salaroli A, Serrao A, Alimena G. Evaluation of overall survival according to myelodysplastic syndrome-specific comorbidity index in a large series of myelodysplastic syndromes. *Haematologica* 2011;96:e41-2.
267. Breccia M, Palandri F, Luciano L, et al. Identification and assessment of frailty in older patients with chronic myeloid leukemia and myelofibrosis, and indications for tyrosine kinase inhibitor treatment. *Annals of hematology* 2018;97:745-54.
268. Nicolosi M ea. Development of a prognostically relevant "Cachexia Index" in Primary Myelofibrosis using serum albumin and cholesterol levels. EHA 2018, Abstract: PF614.