

**ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA**

**FACOLTÀ DI MEDICINA E CHIRURGIA
DOTTORATO DI RICERCA IN EMATOLOGIA CLINICA E
SPERIMENTALE**

Coordinatore: Prof. Stefano A. Pileri

**LIVELLI SIERICI DI VEGF, IL-6, TNF-ALPHA E b-FGF IN
PAZIENTI AFFETTI DA MIELOMA MULTIPLO ALLA
DAGNOSI ARRUOLATI NEL PROTOCOLLO CLINICO
BOLOGNA 2002**

**TESI DI DOTTORATO DI RICERCA
XIX CICLO**

*Presentata da
Dott.ssa Claudia Cellini*

*Relatore
Chiar.mo Prof. Michele Cavo*

Settore Scientifico Disciplinare: MED/15 MALATTIE DEL SANGUE

*Parole chiave: mieloma multiplo, talidomide, terapia ad alte dosi,
angiogenesi, citochine angiogeniche.*

ANNO ACCADEMICO 2005-2006

INTRODUZIONE

Il mieloma multiplo (MM) è una malattia neoplastica dell'adulto anziano caratterizzata dalla proliferazione e accumulo di linfociti B e di plasmacellule e dall'aumentata produzione di immunoglobuline, complete o incomplete (componente M), rilevabili nel siero e/o nelle urine. All'aumentata produzione di immunoglobuline monoclonali, alle loro peculiari caratteristiche chimico-fisiche, alla produzione di citochine e all'espansione della massa neoplastica sono associati i caratteristici quadri clinici di presentazione della malattia tra cui si distinguono, per incidenza e severità, la patologia osteoporotica-osteolitica dell'apparato scheletrico e l'interessamento renale (Tura S., 1988). Il MM rappresenta il 10% di tutte le neoplasie ematologiche. L'incidenza è pari a circa 4 nuovi casi su 100.000 individui per anno; il sesso maschile è interessato con frequenza lievemente superiore rispetto al sesso femminile (1,3:1) e i soggetti di razza nera risultano colpiti con frequenza doppia rispetto ai soggetti di razza bianca. Alla diagnosi l'età media è di circa 70 anni e soltanto il 3% dei pazienti arruolati nei protocolli terapeutici ha meno di 40 anni.

L'eziologia del MM è sconosciuta. Probabili fattori di rischio sono rappresentati dall'esposizione a tossici ambientali e/o professionali (es. radiazioni ionizzanti, pesticidi, derivati del petrolio); inoltre sono stati descritti *clusters* familiari di malattia.

La strategia terapeutica del MM è stata finalizzata per molti anni al contenimento della taglia neoplastica attraverso l'impiego di un ristretto numero di farmaci, primi tra tutti gli agenti alchilanti in associazione ai corticosteroidi.

Circa il 50-60% dei pazienti si è dimostrato responsivo alla chemioterapia convenzionale, ma la scomparsa della componente monoclonale è stata registrata in non più del 5-10% dei pazienti e la sopravvivenza mediana dell'intera popolazione non ha superato i 3 anni dalla diagnosi. Al fine di

superare la chemioresistenza e di ottenere un prolungamento della sopravvivenza, a partire dalla seconda metà degli anni '80 è stata introdotta la chemio(radio)terapia a dosi (sub)mieloablative con successivo trapianto di progenitori emopoietici, autologhi o allogenici. Questa procedura è stata dapprima riservata a pazienti con malattia in fase avanzata e, a seguito della dimostrazione della sua fattibilità ed efficacia, è stata successivamente applicata sistematicamente come terapia di prima linea del MM. Studi controllati hanno confermato la superiorità del singolo trapianto autologo nei confronti della chemioterapia convenzionale e, più recentemente, il vantaggio offerto dal doppio trapianto autologo nei confronti del singolo. A questa era di recenti successi terapeutici ha fatto seguito, nel nuovo millennio, l'ulteriore arricchimento dell'armamentario terapeutico del MM grazie all'introduzione di nuovi farmaci attivi nei confronti del clone neoplastico e del microambiente midollare. Esempi paradigmatici di questa classe di farmaci sono la talidomide, la lenalidomide ed il bortezomib (inibitore del proteosoma).

Tali avanzamenti terapeutici hanno portato ad un significativo miglioramento nella prognosi dei pazienti con MM, tuttavia il decorso clinico può essere estremamente eterogeneo e la sopravvivenza può variare da pochi mesi a diversi anni in relazione a fattori legati alla neoplasia o a caratteristiche proprie del paziente.

Scopo della presente tesi è di rivedere succintamente i principali aspetti biologici e terapeutici del MM e di analizzare il significato prognostico di due anomalie cromosomiche ricorrenti, alterazioni del cromosoma 13 e traslocazione (4;14), nell'ambito di pazienti arruolati in un protocollo terapeutico nazionale basato sulla combinazione di talidomide e doppio trapianto autologo di progenitori emopoietici.

ASPETTI BIOLOGICI

MIELOMAGENESI

Il MM è una neoplasia clonale della B linfocitopoiesi che può procedere attraverso differenti fasi: una fase inattiva, in cui le cellule tumorali sono plasmacellule mature non proliferanti; una fase attiva, con una piccola percentuale ($\leq 1\%$) di plasmablasti proliferanti; ed una fase fulminante che si caratterizza per un incremento dei plasmablasti e per la disseminazione extramidollare della malattia (Hallek et al, 1998).

Le plasmacellule costituiscono la principale popolazione neoplastica nel MM e sono localizzate nel midollo osseo, mentre si riscontrano raramente in altre sedi. La loro bassa attività proliferativa ($\leq 1\%$) ha portato ad ipotizzare l'esistenza di B linfociti neoplastici che costituirebbero il *pool* cellulare proliferante di rifornimento del compartimento plasmacellulare maturo (Pileri et al, 1974). Questa ipotesi è stata inizialmente supportata da studi relativi alla caratterizzazione isotipica e idiotipica delle immunoglobuline di superficie dei linfociti B del sangue periferico (Van Camp et al, 1981; Bast EJEG et al, 1982). Tuttavia solo in tempi più recenti l'impiego di metodiche di studio del riarrangiamento dei geni delle immunoglobuline, come la *polymerase chain reaction* (PCR), ha consentito di dimostrare inequivocabilmente la presenza, nei pazienti con MM, di una popolazione di cellule B circolanti aventi le stesse caratteristiche delle plasmacellule mielomatose mature (Berenson et al, 1987; Billadeau et al, 1992; Corradini et al, 1993). L'evidenza, nel sangue periferico di questi pazienti, di B linfociti neoplastici caratterizzati da ipermutazioni somatiche a carico dei geni delle immunoglobuline e della stabilità delle medesime ipermutazioni durante la storia naturale della malattia ha portato a concludere che l'evento trasformante si realizza a livello di un progenitore linfoide che ha già superato la fase maturativa antigene dipendente che, fisiologicamente, ha luogo all'interno del centro germinativo

degli organi linfoidei secondari (primariamente i linfonodi) (Mac Lennan et al, 1992).

Per accordare l'origine periferica dei precursori plasmacellulari mielomatosi con la localizzazione elettivamente midollare del MM è stato ipotizzato, e successivamente dimostrato, che le cellule B circolanti nel sangue periferico migrano specificatamente al midollo osseo ove stabiliscono strette interazioni (grazie al loro ampio corredo di molecole di adesione) con le cellule stromali del microambiente, ricevendo da queste ultime i segnali appropriati per proliferare e differenziare in plasmacellule mature (Caligaris Cappio et al, 1992 e 1991). In questo processo svolgono un ruolo cruciale numerose citochine prodotte tanto dalle cellule mielomatose che dalle cellule stromali.

RUOLO DELLE CITOCHINE

L'adesione integrino mediata delle cellule mielomatose alle cellule stromali induce l'aumentata trascrizione e secrezione di numerose citochine. Tra queste IL-6 (interleuchina-6), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e TNF- α (*tumour necrosis factor α*) hanno funzione di primaria rilevanza ai fini della crescita, progressione e diffusione del MM (Klein et al, 1989).

Per quanto concerne IL-6 la trascrizione è mediata da NF- κ B (*nuclear factor κ B*) e la secrezione avviene sia ad opera delle cellule stromali del microambiente tumorale sia ad opera delle cellule mielomatose, rivestendo quindi un duplice ruolo paracrino ed autocrino. In condizioni normali IL-6 è capace di stimolare la differenziazione dei linfociti B a plasmacellule ma non la loro proliferazione. Al contrario, nelle cellule di mieloma, IL-6 innesca la proliferazione cellulare (via RAS-MAPK), promuove la sopravvivenza (sistema JAK-STAT), aumenta la resistenza all'apoptosi indotta dal desametasone (attivazione della via di segnale PI3K-AKT), stimola la secrezione di VEGF e inibisce la differenziazione dei monociti a cellule dendritiche ostacolando quindi la risposta immunitaria dell'ospite verso la

neoplasia (Donovan et al, 1998; Sengupta et al, 1998; Ogata et al, 1997; Kishimoto, 1989).

La secrezione di VEGF indotta da IL-6, oltre a stimolare a sua volta la trascrizione di IL-6 da parte delle cellule stromali, promuove la migrazione delle cellule mielomatose, inibisce la presentazione dell'antigene da parte delle cellule dendritiche e favorisce l'angiogenesi midollare che appare particolarmente elevata nelle fasi avanzate della malattia (Gabrilovich et al, 1996; Podar et al, 2001).

TNF- α , infine, anche esso prodotto sia dalle cellule mielomatose che dalle cellule stromali, svolge un ruolo di cruciale importanza nell'attivare NF- κ B e nel sovraregolare l'espressione di molecole di adesione e dei loro ligandi promuovendo, in ultimo, la sopravvivenza delle cellule neoplastiche e la protezione nei confronti dell'apoptosi (Hideshima et al, 2001).

E' così ragionevole pensare che la progressiva espansione del MM si realizzi attraverso la produzione paracrina ed autocrina di sempre maggiori quantità di citochine che stimolano la proliferazione del clone neoplastico ed inoltre reclutano ed attivano le cellule stromali, inclusi gli osteoblasti e gli osteoclasti. Questa ipotesi spiega perché l'espansione neoplastica sia consensuale con l'alterato rimodellamento osseo e l'insorgenza di lesioni osteolitiche.

IL MICROAMBIENTE MIDOLLARE

Il microambiente è caratterizzato dalla presenza di cellule accessorie (quali le cellule stromali del midollo osseo, osteoblasti ed osteoclasti), da matrice extracellulare e da cellule mielomatose.

Negli ultimi anni sta aumentando l'identificazione di *loop* autocrini e paracrini tra queste componenti. Questi *loop* sono sostenuti da numerose citochine, in particolare IL-6, IL-15, ed IGF-1 (*insulin like growth factor 1*) e portano all'attivazione di numerose vie di trasduzione, in particolare quelle attivate dal RAF-MAPK (*receptor associated factor/mitogen-activated protein kinase*), dal

PI-3K (*phosphatidylinositol 3-kinase*)/AKT, dal NF- κ B (*nuclear factor κ B*) e da STAT-3 (*signal transducer and activator of transcription 3*). Tutte queste vie contribuiscono alla proliferazione ed alla sopravvivenza del clone plasmacellulare, alla sua instabilità genomica ed alla conseguente resistenza ai farmaci ed alla distruzione ossea (Bataille et al, 1992).

Un'azione cruciale per l'interazione tra le cellule e la matrice e tra le varie cellule tra loro è svolta dai recettori espressi dalle cellule mielomatose. Tramite le integrine $\alpha 4\beta 1$ (VLA4) e $\alpha 5\beta 1$ (VLA5) le cellule di mieloma si legano alla fibronectina; questo legame, oltre ad indurre la resistenza ai farmaci, inibisce l'apoptosi FAS mediata. Quando le cellule mielomatose interagiscono con la fibronectina il cFLIP_L (*interleukine-1-converting-enzyme-like inhibitory protein long*) è rilasciato dalle membrane degli organelli intracellulari e si accumula nel citosol. cFLIP compete con la procaspasi 8 per il FADD (*FAS associated death domain protein*), inibendo in questo modo l'apoptosi. Anche la stimolazione di FAS da parte di FASL (ligando del FAS, espresso soprattutto dalle cellule T attivate) contribuisce a questo meccanismo.

Il legame delle cellule mielomatose alle cellule stromali tramite VLA4 e LFA1 assieme a VCAM1 e ad ICAM1, induce la secrezione di citochine, aumentando la produzione e la conseguente secrezione paracrina di IL-6 tramite NF- κ B (Chauhan et al, 1996).

FISIOPATOLOGIA DELL'ESALTATO RIASSORBIMENTO OSSEO

La patologia scheletrica costituisce la più frequente e severa manifestazione clinica del MM. E' presente alla diagnosi in circa il 70-80% dei pazienti ed è frequentemente causa della loro scadente qualità di vita e importante concausa di morbidità e mortalità correlate alla malattia. Si manifesta con osteoporosi di severità variabile, lesioni osteolitiche, quadri di compressione

midollare, disturbi del metabolismo del calcio e insufficienza renale. Sul piano patogenetico, la perdita di massa ossea è la conseguenza dell'esaltata attività degli osteoclasti, del loro aumentato reclutamento e della prolungata sopravvivenza, cui non corrisponde un'adeguata formazione di nuovo osso per inibizione dell'attività degli osteoblasti. L'incremento dell'attività osteoclastica si manifesta nelle fasi più precoci della storia naturale della malattia, mentre l'inibizione dell'attività osteoblastica è un evento più tardivo. L'osservazione dell'aumentato numero di osteoclasti nelle biopsie osteomidollari ottenute da pazienti con MM in fase attiva e dello stretto rapporto spaziale stabilito da queste cellule con le plasmacellule mielomatose ha portato a ipotizzare, sino dagli inizi degli anni '70, che l'esaltata attività osteoclastica fosse mediata da fattori locali (OAF) prodotti o direttamente dalle cellule mielomatose o a seguito delle interazioni esistenti tra queste e le cellule stromali midollari. Nell'arco delle ultime tre decadi, a numerose citochine, fattori di crescita od ormoni è stata attribuita un'attività di stimolazione degli osteoclasti. Tra questi fattori, i più conosciuti sono IL-6, il suo recettore solubile, IL-1 β , TNF- α , TNF- β , le metalloproteinasi MMP-1, MMP-2 e MMP-9, PTHrP (*parathormon related protein*), HGF (*hepatocyte growth factor*) e IL-11 (Bataille et al, 1992; Lacy et al, 1999; Sati et el, 1999). La base patogenetica della esaltata perdita di massa ossea in corso di MM si realizza attraverso la deregolazione di un complesso sistema di citochine (RANKL, RANK, OPG) che fisiologicamente riveste un ruolo di cruciale rilevanza nel controllo della osteoclastogenesi. RANKL (*receptor activator of nuclear factor-kB ligand*) è un membro della superfamiglia dei TNF espresso sui precursori osteoblastici e sulle cellule stromali midollari. L'avvenuto legame tra RANKL e il suo specifico recettore (RANK) espresso sugli osteoclasti e precursori osteoclastici induce l'attivazione di RANK e la sua interazione con fattori essenziali alla trasduzione di segnali che stimolano la differenziazione e la proliferazione degli osteoclasti, inibendone l'apoptosi (Lacey et al, 1998; Nakagawa et al, 1998; Yasuda et al, 1998). OPG (*osteoprotegerin*, nome derivato dal latino *os* e *protegere*) funge da recettore trappola per RANKL, di cui antagonizza le funzioni biologiche inibendo, in

ultima analisi, la differenziazione e la proliferazione degli osteoclasti e promuovendone l'apoptosi (Simonet et al, 1997; Lacey et al, 1998).

Studi condotti *in vitro* (co)coltivando cellule neoplastiche ottenute da pazienti con MM e utilizzando modelli mielomatosi murini hanno mostrato che l'esaltata osteoclastogenesi che caratterizza il MM è sostenuta dallo sbilanciamento tra RANKL, la cui espressione è esaltata, e OPG, che risulta invece depresso, verosimilmente attraverso la mediazione di fattori prodotti dalle cellule neoplastiche e dalle cellule stromali midollari, quali per esempio IL-6 e PTHrP (*parathyroid hormon related protein*) (Hofbauer et al, 2000; Roux et al, 2002). OPG è infatti efficace nel ridurre le lesioni osteolitiche e il numero degli osteoclasti, promuovendo al contempo un aumento della densità ossea (Morony et al, 2001; Croucher et al, 2001).

In considerazione del ruolo cruciale rivestito dagli osteoclasti nel sostenere la patologia scheletrica in corso di varie neoplasie, altrettanto cruciale appare il ruolo terapeutico dei bisfosfonati, in virtù della loro capacità di fissarsi alla matrice ossea, ove vengono internalizzati dagli osteoclasti. Il meccanismo molecolare di azione dei bisfosfonati può essere fondamentalmente differenziato a seconda che essi contengano, o meno, un gruppo nitrogeno. I bisfosfonati più potenti, quali il pamidronato, l'alendronato e l'acido zoledronico, sono quelli contenenti azoto (aminobisfosfonati) e agiscono inibendo la via metabolica del mevalonato. La molecola *target* è rappresentata dalla farnesil difosfato sintetasi, la cui inibizione previene la sintesi di farnesil difosfato (FPP) e geranylgeranyl difosfato (GGPP) necessari per la prenilazione di piccole *GTPbinding-proteins*, quali Ras, Rho e Rac che regolano una serie di processi cellulari importanti per la funzione degli osteoclasti quali il citoscheletro, l'orletto arruffato, il traffico di endosomi, l'ancoraggio alla membrana cellulare e l'apoptosi. Oltre ad agire sugli osteoclasti determinando perdita di funzione e apoptosi gli aminobisfosfonati agiscono poi sugli osteoblasti portando ad incremento della produzione di OPG e conseguente inibizione della osteoclastogenesi.

L'ANGIOGENESI NELLE NEOPLASIE

Durante l'embriogenesi, i vasi sanguigni si sviluppano attraverso due distinti processi: la vasculogenesi, nel corso della quale le cellule progenitrici differenziano in cellule endoteliali e l'angiogenesi propriamente detta in cui a partire da vasi già esistenti originano nuovi capillari.

A differenza di quanto avviene nell'embrione, nell'adulto il turnover delle cellule endoteliali è assai lento e ciò comporta che nuovi vasi non si sviluppino se non in risposta a stimoli appropriati quali quelli fisiologici legati al ciclo riproduttivo femminile a livello dell'ovaio, dell'endometrio e della ghiandola mammaria, o in risposta a stimoli patologici come avviene nell'artrite reumatoide, nella retinopatia proliferativa e nelle neoplasie. La formazione di nuovi vasi avviene inoltre nell'adulto unicamente col meccanismo dell'angiogenesi che si realizza attraverso diverse fasi: inizialmente viene degradata la membrana basale delle cellule endoteliali e la matrice extracellulare viene rimodellata; successivamente le cellule endoteliali migrano nello stroma circostante dove si moltiplicano e si differenziano formando nuovi capillari.

L'angiogenesi è il mezzo essenziale attraverso il quale possono realizzarsi la proliferazione, l'espansione e la metastatizzazione tumorale. Questo è vero sia per le neoplasie solide che per numerose neoplasie ematologiche.

Numerose evidenze sperimentali indicano che l'angiogenesi, come fonte di ossigeno e nutrimento, riveste un ruolo di cruciale importanza nel processo neoplastico. Lo sviluppo di nuovi vasi sanguigni è stato infatti dimostrato, sia su modelli animali sia nell'uomo, negli stadi pre-neoplastici e negli stadi precoci dello sviluppo tumorale (Hanahan et al, 1996 ; Folkman et al, 1990 ; Talks et al, 2000).

Molteplici fattori, sia pro-angiogenici che anti-angiogenici, sono implicati nel complesso controllo dell'angiogenesi, sia in condizioni fisiologiche che patologiche; nelle neoplasie in particolare, l'angiogenesi viene promossa

attraverso un cambio del bilancio tra questi fattori, direttamente liberati dalle cellule tumorali e anche dalle cellule del microambiente tumorale.

Possono essere distinte 6 diverse fasi nel processo dell'angiogenesi: il cambio del bilancio tra fattori pro-angiogenici e anti-angiogenici, l'acquisizione di una diversa morfologia delle cellule endoteliali, il rilascio di enzimi proteolitici, la migrazione di cellule endoteliali con formazione di strutture capillari, la riproduzione di cellule endoteliali e la differenziazione microvascolare.

I meccanismi coinvolti nella regolazione dell'angiogenesi tumorale sono estremamente complessi ed ancora non del tutto noti. L'angiogenesi tumorale si sviluppa attraverso le stesse fasi dell'angiogenesi fisiologica, tuttavia, si realizza mediante un più marcato incremento della attività proliferativa delle cellule endoteliali portando ad differenze funzionali e strutturali del plesso vascolare. Nei tumori solidi l'angiogenesi si esplica in particolare attraverso 3 fasi criptiche di crescita, invasione e metastasi. Lo switch angiogenetico, vale a dire il passaggio da una fase di crescita avascolare verso una vascolare è determinato dallo sbilanciamento di fattori pro- e anti-angiogenici nel microambiente tumorale, sia direttamente secreti dalle cellule tumorali sia indirettamente secrete da cellule del microambiente per effetto dell'induzione operata dalla neoplasia stessa.

Sono numerose le molecole identificate come regolatrici dell'angiogenesi: vi sono fattori pro-angiogenici, rappresentati in particolare dal VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) e PD-ECGF (platelet derived endothelial cell growth factor); in modo particolare, il VEGF sembra occupare un ruolo centrale nell'angiogenesi, sul quale agiscono, come induttori o promotori, numerosi fattori e condizioni: ad esempio lo stimolo ipossico, numerosi oncogeni (ras, bcl-2, VHL), fattori di crescita cellulare come TNF- α (alpha-tumor necrosis factor), HGF (hepatocyte growth factor), EGF (epidermal growth factor), G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor), citochine come IL-1 (interleukin-1) IL-6 e IL-8, l'IFN- γ (gamma-interferon), proteasi come MMP-9 (matrix metalloproteinase 9 o

gelatinase B) e la MMP-2 (matrix metalloproteinase 2 o gelatinase A). (Jacob C et al, 2006))

Di contro, sono stati identificati fattori antiangiogenetici la cui esistenza è stata inizialmente ipotizzata osservando la capacità di fattori quali IFN- α (interferone- α), fattore piastrinico 4 e trombospondina 1 (TSP-1) di inibire la chemiotassi e la proliferazione endoteliale. Alcuni di questi fattori sono rappresentati da frammenti di proteine ampiamente presenti nell'organismo quali la fibronectina, la prolattina, il collagene di tipo 1 e 8, il plasminogeno e il fattore di crescita epidermico (EGF). Il rilascio di questi frammenti polipeptidici con attività antiangiogenetica è legato all'attività di proteasi e all'espressione di geni oncosoppressori, quali p53, che in forma "*wild type*" regolano l'espressione di TSP-1 e di altri inibitori dell'angiogenesi.

Questo complesso sistema di regolazione ha contribuito a fare ipotizzare l'esistenza di un meccanismo di bilanciamento nel controllo dell'angiogenesi. La prevalenza dell'attività degli inibitori contribuisce a mantenere quiescenti le cellule endoteliali. La riduzione della concentrazione degli inibitori o l'induzione degli attivatori innescano il processo dell'angiogenesi conducendo alla proliferazione di nuovi vasi (Hanahan D. et al, 1996). Tale fenomeno si verifica in diverse situazioni quali l'ipossia delle cellule tumorali legata all'aumento della massa neoplastica non parallelo all'aumento dei vasi, l'attivazione di alcuni oncogeni come H-RAS o V-SRC e l'inattivazione di geni oncosoppressori (Talks K.L. et al, 2000).

L'ANGIOGENESI E CITOCHINE COINVOLTE NELL'ANGIOGENESI NEL MIELOMA MULTIPLO

a) FATTORI ANGIOGENICI ESPRESSI DALLE PLASMACELLULE MIELOMATOSE

Nell'ultimo decennio, sono state evidenziate numerose evidenze circa il ruolo dell'angiogenesi midollare nella patogenesi e nella progressione di alcune neoplasie ematologiche. In particolare, le nuove conoscenze relative alla biologia del mieloma multiplo (MM), hanno dimostrato come il microambiente midollare giochi un ruolo cruciale nella regolazione della crescita delle plasmacellule mielomatose, nello sviluppo della resistenza ai farmaci e patogenesi della patologia ossea associata.

Attraverso reciproche interazioni, mediate da fattori solubili pro- e anti-angiogenici, tra le plasmacellule mielomatose e il microambiente midollare (cellule stromali e cellule endoteliali), si realizza un incremento dell'angiogenesi midollare. La prima dimostrazione dell'aumentato potenziale angiogenico del mieloma multiplo attivo, è avvenuta in seguito all'osservazione che plasmacellule di pazienti affetti da MM attivo avevano un'attività angiogenica significativamente più elevata sia in studi in vitro che in vivo, rispetto a campioni provenienti da pazienti affetti da MM non attivo o da gammopatia monoclonale di significato non determinato (MGUS).

Lo switch angiogenico nel mieloma multiplo è guidato da varie citochine, che una volta secrete nel microambiente midollare possono stimolare direttamente le cellule endoteliali midollari e la formazione di nuovi vasi. Tra i fattori angiogenici, il VEGF gioca un ruolo chiave, stimolando la crescita delle cellule endoteliali, la mobilitazione dei precursori endoteliali, lo sviluppo vascolare e la proliferazione delle cellule stromali. Le plasmacellule mielomatose (MM-PC) sono in grado di produrre direttamente il VEGF; successivamente, attraverso un loop paracrino, il VEGF prodotto dalle MM-PC stimola la secrezione da parte delle cellule stromali di IL-6 e VEGF; IL-6 a sua volta promuove la proliferazione, la sopravvivenza e la produzione di VEGF delle MM-PC. L'azione del VEGF è inoltre favorita dalla perdita del potenziale inibitorio del VEGF attraverso una down-regolazione dell'antagonista solubile del VEGF sul sVEGFR-1 (soluble vascular endothelial growth factor receptor-1). Il bFGF induce la migrazione, la proliferazione e la differenziazione delle cellule endoteliali; è anch'esso

secreto direttamente dalle MM-PC e determina una stimolazione paracrina delle MM-PC mediante l'interazione con le cellule stromali e la successiva liberazione da parte di quest'ultime di IL-6 che determina a sua volta la stimolazione delle MM-PC e la secrezione di ulteriore bFGF. Inoltre, il recettore del bFGF (CD138 o syndecan-1), è altamente espresso sulle MM-PC. Un'altra citochina pro-angiogenica espressa dalla MM-PC è l'HGF, il cui recettore (c-Met) è espresso sulle MPC. Accanto al VEGF, al bFGF e all'HGF, sono implicati sicuramente molte altre molecole: il potenziale angiogenico delle MM-PC non è infatti annullato dall'utilizzo di anticorpi neutralizzanti anti-VEGF e anti-bFGF.

Più recentemente è stata identificata un'altra molecola ad azione pro-angiogenica nel MM, l'angiopoietina-1 (Ang-1); Ag-1 e i suoi recettori svolgono una funzione importante nell'angiogenesi postnatale e nell'angiogenesi tumorale. Mentre VEGF, bFGF ed HGF stimolano la proliferazione endoteliale, Ang-1 regola il rimodellamento vascolare; Ang-1 antagonizza Ang-2 legandosi al suo recettore Tie-2, determinando la destabilizzazione della vascolarizzazione quiescente e la gemmazione di nuovi vasi, un processo che sensibilizza le cellule endoteliali all'azione del VEGF.

Un'altra molecola coinvolta nell'angiogenesi è l'osteopontina (OPN), che oltre ad essere coinvolta nel riassorbimento osseo, correla con la microvessel density midollare.

La MM-PC rilasciano inoltre metalloproteasi (MMP), ed in particolare MMP-2, MMP-9 o l'attivatore del plasminogeno tipo-urokinasi (uPA), che concorrono alla degradazione della matrice, alla permeabilizzazione ed invasione delle cellule endoteliali e dei periciti per la formazione dei vasi.

Durante la sua degradazione, la matrice libera altri fattori di crescita a cui è legata, ed in particolare libera molecole come bFGF, VEGF o OPN e fattori anti-angiogenici. Nel MM attivo viene sintetizzata una maggior quantità di MMP-2 rispetto al MM non attivo o al MGUS. (Jacob C et al 2006; Rajikumar et al 2002).

In conclusione, MM-PC possono stimolare l'angiogenesi attraverso il rilascio di fattori pro-angiogenici e di enzimi degradanti la matrice o attraverso l'induzione paracrina di questi fattori da parte del microambiente midollare.

b) RUOLO DELLE CELLULE STROMALI E DELLE CELLULE ENDOTELIALI MIDOLLARI

Le cellule stromali midollari esercitano una funzione fondamentale nel sostenere la proliferazione delle plasmacellule, la loro sopravvivenza, la loro resistenza ai farmaci, nel sostenere l'attivazione degli osteoclasti e nell'inibire l'osteogenesi e nell'indurre l'angiogenesi midollare.

Le cellule stromali determinano l'incremento delle concentrazioni dei fattori angiogenici e degli enzimi degradanti la matrice nel microambiente midollare, sia attraverso la diretta secrezione che attraverso la stimolazione paracrina delle MM-PC e delle cellule endoteliali. Inoltre, la diretta interazione tra cellule stromali e MM-PC determina la stimolazione dell'espressione di VEGF e IL-6, la stimolazione della proliferazione delle MM-PC e la modulazione delle cellule endoteliali.

Le cellule endoteliali nel MM rappresentano una popolazione estremamente eterogenea di cellule formanti vasi tortuosi con rami e aperture irregolari. L'incrementata attività proliferativa delle cellule endoteliali è dimostrata sia in vivo mediante studi di immunohistochimica che in vitro; le cellule endoteliali provenienti da MM attivo hanno una maggiore attività proliferativa rispetto a MM non attivo o da MGUS o da donatori sani. Rispetto alle cellule endoteliali quiescenti del cordone ombelicale le cellule endoteliali dei pazienti affetti da MM si caratterizzano per l'esaltata espressione di specifici recettori angiogenici, come VEGFR-2, bFGFR-2, Tie-2 o CD105, per l'aumentata capacità di formare capillari in vitro e per l'espressione di fattori di crescita e di invasione come VEGF, bFGF, Ang-2 o MMP. Le cellule endoteliali midollari mielomatose producendo fattori solubili stimolanti le MM-PC, inducono pertanto la crescita plasmacellulare, l'invasione e la

disseminazione, a dimostrazione dell'ipotesi che la *microvessel density* correla direttamente con l'attività plasmacellulare mielomatosa.

Tra i fattori solubili implicati vi sono chemochine coinvolte nella chemiotassi tumorale, i cui recettori sono espressi dalla MM-PC. In ultimo, un altro possibile ruolo svolto dalle cellule endoteliali sembra derivare da aberrazione genetica analoghe a quelle osservate nelle cellule neoplastiche. (Jakob C et al 2006, Bamias A et al 2003)

RUOLO DELL'ANGIOGENESI NELLA PATOGENESI DEL MM

L'angiogenesi riveste un ruolo di primaria importanza nella patogenesi del MM.

Sono state ipotizzate due fasi di angiogenesi legate a due fasi distinte della malattia. Una prima fase pre-vascolare più lunga e corrispondente clinicamente alla MGUS (gammopatia monoclonale di significato indeterminato) e al MM *smouldering*, condizioni in cui la malattia è quiescente o in lenta crescita; ed una seconda fase vascolare più breve, in cui la crescita tumorale è rapida e la malattia più attiva.

L'angiogenesi viene stimolata da fattori di crescita liberati sia dalle cellule tumorali che dalle cellule del microambiente midollare quali HGF, b-FGF e VEGF (Di Raimondo et al., 2000) e da alcune citochine quali IL-6 e IL-8 (Vacca et al, 1994). Tali fattori sono presenti in maggiore quantità a livello del midollo osseo rispetto al sangue periferico, evidenza che sottolinea l'importanza del microambiente midollare nella loro produzione. I livelli sierici correlano con lo stadio clinico della malattia (Di Raimondo et al, 2000).

Diversi studi hanno dimostrato che l'angiogenesi nel midollo osseo di pazienti affetti da MM, misurata come numero di nuovi vasi (*microvessel density* (MVD)), è legata ad un più alto indice di proliferazione plasmacellulare (*labelling index* (LI)) e a fasi di malattia più attiva (Vacca et al, 1994; Munshi et al, 1998). A conferma dell'importanza prognostica della MVD è stata

evidenziata la persistenza di angiogenesi a livello midollare anche in pazienti che raggiungono la remissione completa dopo trapianto di cellule staminali emopoietiche: ciò è probabilmente legato al persistere di uno stimolo angiogenetico da parte della minima malattia residua non rilevabile con i metodi convenzionali il quale, a sua volta, stimola la secrezione di fattori che agiscono sulle plasmacellule maligne residue contribuendo quasi inevitabilmente alla ricaduta (Rajkumar et al, 1999).

ALTERAZIONI CITOGENETICHE E MOLECOLARI

Le alterazioni citogenetiche e molecolari alla base dello sviluppo del MM sono solo parzialmente note. Da ciò ne deriva che non è stato tuttora identificato un *pattern* citogenetico specifico per la malattia.

Il clone neoplastico è costituito da cellule B completamente differenziate e che quindi presentano una bassa attività proliferativa (Hallek et al, 1998). Quest'ultimo aspetto rappresenta un limite per l'analisi citogenetica convenzionale che mostra un cariotipo anormale soltanto nel 30-50% dei casi di nuova diagnosi, in relazione alla difficoltà di ottenere un adeguato numero di metafasi analizzabili. Con l'utilizzo della *Fluorescence In Situ Hybridization* (FISH) è possibile superare questo ostacolo e rilevare alterazioni cromosomiche sia nelle cellule in metafase sia nei nuclei in interfase (Dracopoli, 1995). Con tale metodica è possibile riscontrare anomalie citogenetiche approssimativamente nell'80-90% dei pazienti, indipendentemente dallo stadio e stato della malattia (Taberner et al, 1996). Le aberrazioni numeriche più caratteristiche sono rappresentate dalla monosomia del cromosoma 13 e dalle trisomie dei cromosomi 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e 21. Anomalie strutturali non casuali interessano più comunemente i cromosomi 13q14, 14q32 (*locus* IgH), 17p13.1 (p53), 1q21 (iperespressione del gene CKS1B) e 8q24.

Recentemente è stata proposta la suddivisione del MM in due categorie: a cariotipo iperdiploide e non iperdiploide (Smadja et al, 1998; Debes-Marun et al, 2003).

Il MM a cariotipo iperdiploide è associato a trisomie *nonrandom* dei cromosomi 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 e 21, mentre le traslocazioni del cromosoma 14 e le alterazioni del 13 sono eventi rari, non ricorrenti. Al contrario il MM non iperdiploide frequentemente si associa a traslocazioni che coinvolgono il cromosoma 14q32 e a monosomie o delezioni del cromosoma 13q14. Queste alterazioni cromosomiche non sono casualmente distribuite ma mostrano una stretta associazione tra loro e con la storia naturale, le caratteristiche immunologiche (tipo di immunoglobulina e sottotipo di catena leggera), lo stadio clinico e la prognosi della malattia (Avet-Loiseau et al, 2002).

Il cariotipo iperdiploide è rilevato nel 40-60% dei pazienti con MM, mentre riarrangiamenti a carico del 14q32 e delezioni del 13 sono riscontrati, nelle diverse casistiche, rispettivamente nel 70-80% e 40-80% dei casi. È interessante notare che queste stesse alterazioni citogenetiche sono presenti anche nella MGUS seppure con un'incidenza minore (Fonseca et al, 2001).

I riarrangiamenti del cromosoma 14q32 sono strettamente associati con la traslocazione di proto-oncogeni all'interno del gene che codifica per le catene pesanti delle immunoglobuline con conseguente sovraespressione e trasformazione in oncogeni. Le traslocazioni di più frequente riscontro sono la t(4;14), la t(11;14), la t(14;16) e la t(8;14) che coinvolgono geni fondamentali nel controllo di proliferazione, differenziazione ed apoptosi quali FGFR3 e MMSET, ciclina D1, c-maf e c-myc (Hallek et al, 1998). Per quanto riguarda le alterazioni del cromosoma 13 il meccanismo alla base sembra invece essere riconducibile alla inattivazione di un oncosoppressore come il gene del retinoblastoma (Rb) (Neri et al, 1993; Shaughnessy et al, 2000).

Nelle fasi avanzate della malattia sono riportate poi, con variabile incidenza, mutazioni a carico di altri geni come N-Ras (Neri et al, 1989) e p-53 (Neri et al, 1993).

In relazione alla stretta correlazione osservata tra tali anomalie genetiche e la storia naturale della malattia è stato proposto un possibile modello *multistep* di cancerogenesi. Secondo questa ipotesi la traslocazione a carico del 14q32 è il primo evento trasformante che, probabilmente, si realizza a monte dei progenitori plasmacellulari a livello del centro germinativo. La delezione del 13 sarebbe un evento secondario (comunque precoce) forse derivato da alcune specifiche traslocazioni del 14q32 come le t(4;14) e t(14;16) (Avet-Loiseau et al, 2002). Accanto a questo modello esiste un secondo applicabile alle neoplasie plasmacellulari con cariotipo iperdiploide. In questo gruppo il fattore principale sarebbe rappresentato dall'instabilità genomica responsabile della realizzazione di subcloni eterogenei (Fabarius et al, 2003).

Attraverso l'utilizzo della tecnica di *gene expression profiling* è stato infine riscontrato che virtualmente tutti i pazienti con MM, compresi quelli che non mostrano traslocazioni a carico del cromosoma 14, presentano over espressione dei geni della ciclina D (Bergsagel et al, 2003). Come conseguenza diretta o indiretta della traslocazione a livello del 14q32 si ha iperespressione della ciclina D1 nella t(11;14), della ciclina D3 nella t(6;14) e della ciclina D2 nella t(4;14) e t(14;16). Nella restante quota di pazienti che non presenta tali traslocazioni si ha comunque iperespressione ectopica di ciclina D1 o, meno frequentemente, di ciclina D2.

LA TERAPIA DEL MM

RUOLO DELLA CHEMIOTERAPIA CONVENZIONALE: MONO E POLICHEMIOTERAPIA

La chemioterapia convenzionale del MM si avvale, classicamente, dei glucocorticoidi, dei farmaci alchilanti (in particolare melfalan o ciclofosfamide), delle nitrosouree, degli alcaloidi della vinca (vincristina) e delle antracicline (doxorubicina) (Alexanian et al, 1994; Bergsagel et al, 1995).

Prima del 1960 la sopravvivenza media dei pazienti con MM era approssimativamente di 17 mesi. Con l'introduzione, a partire dal 1968, del melfalan associato al prednisone (MP) (Alexanian et al, 1969) la sopravvivenza media ha raggiunto valori di circa 3 anni. L'utilizzo di cicli intermittenti di MP ha rappresentato per molti decenni il "*gold standard*" nel trattamento dei i pazienti con MM. Lo schema terapeutico maggiormente utilizzato prevede l'impiego di 6 cicli mensili di terapia con melfalan al dosaggio giornaliero di 10 mg/mq di superficie corporea per via orale, per 4 giorni, in associazione al prednisone 80 mg/mq. In circa il 50-60% dei pazienti si ottiene una risposta, ma solo nel 5-10% di questi è documentata una remissione completa (RC). La durata media della risposta è di 1-2 anni e non più del 5-10% dei pazienti sopravvive a lungo termine.

Nel tentativo di migliorare i risultati terapeutici sono state sperimentate combinazioni di diversi farmaci. Il razionale di questo approccio si fonda sulla nozione che gli agenti alchilanti non sono tra di loro cross-resistenti (Bergsagel et al, 1972) e sull'ipotesi che l'utilizzo alternato di farmaci con differente meccanismo di azione apporta un chiaro beneficio (Goldie et al, 1982).

Sono stati quindi introdotti regimi di chemioterapia combinata con l'aggiunta di altri agenti alchilanti, antracicline e alcaloidi della vinca. Tale incremento dell'intensità di dose tramite l'utilizzo combinato di più agenti chemioterapici

non ha apportato tuttavia un vantaggio significativo in termini di riduzione e durata globale della sopravvivenza (Myeloma Trialists' Collaborative Group, 1998).

Uno dei regimi di polichemioterapia più utilizzati per il trattamento del MM è la combinazione di vincristina e adriamicina, somministrate in perfusione continua per quattro giorni, in associazione a desametasone ciclico (VAD). I vantaggi principali del VAD sono rappresentati dalla rapidità di risposta da esso indotta, dall'utilizzo di farmaci non escreti per via renale con conseguente impiego sicuro anche nei pazienti in insufficienza renale e dall'assenza di tossicità nei confronti delle cellule staminali emopoietiche normali. Questo ultimo importante vantaggio rende il VAD uno degli schemi terapeutici di elezione per il trattamento di pazienti candidati ad un successivo trapianto autologo.

È stato ipotizzato che la più rapida riduzione tumorale osservata con l'utilizzo del VAD rispetto a MP possa rispecchiare una differente attività dei due regimi chemioterapici nei confronti di differenti sottopopolazioni di cellule mielomatose. In particolare, il VAD avrebbe come principale bersaglio la popolazione plasmacellulare matura, mentre MP agirebbe principalmente contro i precursori plasmacellulari (Alexanian et al, 1990). Sulla base di questa ipotesi e al fine di valutare i potenziali benefici derivanti dall'associazione di due schemi comprensivi di farmaci tra loro non cross-resistenti, l'istituto "Seragnoli" ha avviato nel 1990 uno studio policentrico nazionale, denominato "Bologna 90". Scopo dello studio era di confrontare prospetticamente e con una metodologia controllata, tre differenti regimi chemioterapici: MP, lo schema alternato VAD/MP e lo schema alternato VND (analogo del VAD, ma da esso diverso per la sostituzione di doxorubicina con mitoxantrone)/MP. I risultati finali non hanno dimostrato alcuna differenza statisticamente significativa tra i 3 differenti regimi terapeutici quanto a probabilità di risposta e di durata globale della sopravvivenza (Cavo et al, 2002).

In conclusione, la chemioterapia convenzionale del MM non risulta efficace nel modificare la storia naturale della malattia ed il suo decorso fatale. I limiti

dei farmaci tradizionali sono rappresentati dalla loro incapacità di eradicare il clone mielomatoso, dall'inevitabile sviluppo di resistenza ad essi, dalla refrattarietà primaria di circa un terzo dei pazienti non precedentemente trattati e dalla sostanziale inefficacia delle terapie di salvataggio nei pazienti resistenti/progressivi.

STUDI CLINICI DI CHEMIO(RADIO)TERAPIA A DOSI (SUB)MIELOABLATIVE CON SUPPORTO DI PROGENITORI EMOPOIETICI AUTOLOGHI

Un significativo miglioramento della terapia del MM è stato realizzato in seguito alla dimostrazione, *in vitro*, dell'esistenza di una correlazione lineare tra le dosi di melphalan utilizzate e la citotossicità da esso indotta. Sulla base di questa evidenza, a partire dagli anni '80, si è definita la sempre più sistematica applicazione della terapia (sub)mieloablativa nel trattamento del MM. Queste esperienze hanno fornito la dimostrazione che elevate dosi di melphalan (HDM), in un *range* compreso tra 100 e 140 mg/mq, consentono di superare la resistenza alla chemioterapia convenzionale e di ottenere un aumento della percentuale di RC (pari a circa il 20%) (Mc Elwain et al, 1983; Barlogie et al, 1986; Selby et al, 1987), anche se al prezzo di una elevata incidenza di complicanze fatali sia di tipo infettivo che emorragico, registrate durante la prolungata fase di aplasia midollare indotta dalla chemioterapia.

Al fine di ridurre il rischio di tali complicanze, a partire dalla seconda metà degli anni '80, è stato introdotto il trapianto di cellule staminali autologhe, dapprima del midollo osseo e, in tempi più recenti, del sangue periferico (PBSC). Questo approccio ha assicurato una rapida ricostituzione emopoietica dopo la chemioterapia ad alte dosi ed ha ridotto il rischio di mortalità correlato alla procedura al di sotto del 5-10%. Ha contribuito a questi favorevoli risultati l'impiego crescente, dagli inizi degli anni '90 in poi, del sangue periferico quale sorgente di cellule staminali. L'interesse che si è sviluppato negli ultimi anni nei riguardi delle PBSC può essere spiegato dalla

possibilità di mobilizzare e raccogliere, agevolmente in regime ambulatoriale, una grande quantità di progenitori emopoietici e, soprattutto, dal più rapido recupero della emopoiesi osservato dopo il trapianto (Tarella et al, 1991).

L'approccio migliore per la mobilizzazione di progenitori emopoietici è attualmente rappresentato dalla combinazione di chemioterapia e fattori di crescita granulocitari (G-CSF o GM-CSF). Il G-CSF e il GM-CSF sono in grado di determinare un incremento importante dei progenitori circolanti e consentono anche una rapida ricostituzione dell'emopoiesi dopo chemioterapia (Majolino et al, 1995; Duhrsen et al, 1988). Tra i chemioterapici, l'esperienza maggiore è stata sviluppata con la ciclofosfamide, alla dose di 4-7 g/mq, della quale viene anche sfruttata l'attività plasmacitolitica.

Alcuni studi hanno preso in considerazione l'analisi dei fattori che influenzano negativamente la mobilizzazione di PBSC, mostrando l'importanza della durata della precedente chemioterapia (superiore o inferiore ad un anno) e soprattutto della pregressa esposizione al melfalan e alle radiazioni ionizzanti (Ferland et al, 1993; Jagannath et al, 1992; Tricot et al, 1995). Il valore minimo di PBSC, necessario per una rapida ricostituzione emopoietica, è stato identificato in 2×10^6 /kg di peso corporeo. Una precedente e prolungata esposizione a chemioterapia è in grado di influenzare negativamente soprattutto il recupero piastrinico, per cui i pazienti sottoposti a chemioterapia per più di 24 mesi necessitano di una dose di PBSC, pari a 5×10^6 /kg cellule CD34+ (Tricot et al, 1995).

I promettenti risultati ottenuti con il trapianto autologo nei pazienti con MM ad alto rischio, con percentuali di RC del 10-20% (Barlogie et al, 1986 e 1987; Jagannath et al, 1990; Vesole et al, 1999) hanno successivamente posto le basi per l'introduzione di questa procedura nel trattamento dei pazienti di nuova diagnosi. Uno studio prospettico randomizzato, realizzato dall'*Intergroupe Francophone du Myélome* (IFM-90) su 204 pazienti con MM non precedentemente trattati, ha dimostrato la superiorità della terapia sovramassimale con supporto di progenitori emopoietici midollari nei confronti della chemioterapia convenzionale, sia in termini di raggiungimento della RC

(22% e 5% rispettivamente), sia in termini di prolungamento statisticamente significativo della sopravvivenza libera da eventi (EFS) (probabilità a 5 anni del 28% e 10% rispettivamente) e sopravvivenza globale (OS) (probabilità a 5 anni del 52% e 12% rispettivamente) (Attal et al, 1996). Il vantaggio derivante dall'applicazione del trapianto autologo come terapia di prima linea del MM nei confronti della chemioterapia convenzionale è stato inoltre confermato da uno studio prospettico randomizzato condotto dal Medical Research Council (Child et al, 2003).

Al contrario sono stati recentemente pubblicati i risultati di uno studio multicentrico di fase III che non hanno mostrato un vantaggio significativo della terapia ad alte dosi nei confronti della chemioterapia convenzionale (Barlogie et al, 2006). Tuttavia esistono alcune differenze in questo studio che possono spiegare almeno in parte la discordanza dei risultati: innanzitutto va sottolineato come i pazienti venissero randomizzati soltanto dopo avere eseguito una iniziale induzione con VAD e alte dosi di ciclofosfamide seguita da raccolta dei progenitori emopoietici autologhi.

Nei maggiori studi sino a questo momento pubblicati i regimi di condizionamento al trapianto sono stati differenti. Essi possono essere fondamentalmente suddivisi in due gruppi a seconda dell'utilizzo o meno della TBI e comprendono melfalan, alla dose di 140 mg/mq, associato o meno alla TBI (Barlogie et al, 1996 e 1998; Harousseau et al, 1995; Attal et al, 1992), melfalan 200 mg/mq (Jagannath et al, 1992) e busulfano più melfalan (BUMEL) (Alegre et al, 1995). Il regime mieloablativo più frequentemente utilizzato è l'HDM, somministrato alle dosi di 140-200 mg/mq (Bjorkstrand et al, 1994; Vesole et al, 1996; Femand et al, 1993; Alegre et al, 1995). Uno studio randomizzato dell'*Intergroupe Francophone du Myélome (IFM 95 trial)* ha mostrato che l'utilizzo del melfalan, 200 mg/mq, riduce in modo statisticamente significativo la tossicità legata alla procedura trapiantologica se confrontato al regime di condizionamento con melfalan 140 mg/mq più TBI (Attal et al, 2001). Al di fuori del differente profilo di tossicità, non vi è alcuna evidenza che ciascuno di questi regimi di condizionamento sia inequivocabilmente superiore agli altri per efficacia.

Nonostante il miglioramento nella prognosi del MM ottenuto attraverso l'introduzione della terapia mieloablativa e supporto di progenitori emopoietici autologhi, la ricaduta della malattia è evento comune alla maggior parte dei pazienti (Attal et al, 1996; Lenhoff et al, 2000). Nel tentativo di migliorare i risultati terapeutici alcuni gruppi hanno sviluppato procedure di *purging* delle cellule tumorali contaminanti la sorgente di progenitori emopoietici con metodiche di selezione positiva o negativa (Gazzit et al, 1995; Schiller et al, 1995; Lemoli et al, 1996). I risultati di studi pilota hanno dimostrato la possibilità di ridurre significativamente la contaminazione tumorale (Schiller et al, 1995; Lemoli et al, 1996), anche se l'unico studio controllato sino a questo momento pubblicato non ha evidenziato alcun beneficio clinico dei pazienti così trattati, in termini di OS e EFS (Vescio et al, 1999; Steward et al, 2001). In alternativa, numerosi *trials* clinici (Attal et al, 1992 e 1995; Cunningham et al, 1998) hanno investigato la possibilità di prolungare la durata della remissione post-trapianto con l'impiego dell'Interferone α (IFN- α) che, in studi precedenti, si era dimostrato in grado di prolungare la durata della remissione e la sopravvivenza dopo una risposta favorevole alla chemioterapia convenzionale (Mandelli et al, 1990; Westin et al, 1995). I primi risultati dello studio randomizzato inglese effettuato su 85 pazienti valutati con 52 mesi di *follow-up*, hanno dimostrato un significativo prolungamento della OS e EFS dei pazienti in terapia di mantenimento con IFN- α rispetto al gruppo di controllo; la differenza ha cessato però di essere significativa a 5.8 anni di distanza. In realtà sembra che soltanto un sottogruppo di pazienti con MM tragga realmente beneficio dal trattamento con IFN- α (Bladè & Esteve, 2000). Più precisamente l'IFN- α è capace di determinare una *up-regulation* di Mcl-1, un gene appartenente alla famiglia Bcl-2 con effetto antiapoptotico e stimolato anche dall'IL-6 nelle cellule mielomatose; questo potrebbe risultare in un effetto negativo per alcuni pazienti (Puthier et al, 2001). In particolare la terapia di mantenimento con IFN- α sembra non essere efficace nei pazienti con MM che sovraesprimono bcl-2, un evento molto frequente in questo tipo di neoplasia (Sangfelt et al, 1995).

STUDI CLINICI SUL DOPPIO TRAPIANTO DI PROGENITORI EMOPOIETICI AUTOLOGHI COME SUPPORTO A REGIMI DI CHEMIO(RADIO)TERAPIA (SUB)MIELOABLATIVA

Come precedentemente riportato la chemioterapia ad alte dosi con singolo autotrapianto di progenitori emopoietici ha consentito di aumentare la percentuale di RC, la OS e EFS dei pazienti con MM di nuova diagnosi se confrontata con la chemioterapia convenzionale (Attal et al, 1996). Tuttavia, nonostante il significativo miglioramento prognostico offerto da questa procedura, non si è osservato alcun *plateau* nelle curve di EFS dei pazienti così trattati (Attal et al, 1996; Lenhoff et al, 2000), a dimostrazione dell'incapacità di una singola linea di terapia (sub)mieloablativa di eradicare il clone mielomatoso.

Sulla base di queste osservazioni e della dimostrata esistenza *in vitro* ed *in vivo* di una correlazione dose-risposta per il melfalan, alcuni gruppi hanno investigato la possibilità di incrementare ulteriormente l'intensità di dose citotossica somministrata. Questo obiettivo può essere raggiunto attraverso la somministrazione di due linee sequenziali di chemioterapia ad alte dosi ed è stato reso possibile dalla rapida e completa ricostituzione emopoietica assicurata dal trapianto di PBSC autologhe. L'obiettivo primario dell'intensificazione di dose citotossica con doppio autotrapianto è di superare i meccanismi di farmacoresistenza dei quali le cellule mielomatose sono abbondantemente fornite e di massimizzare il grado di citoriduzione tumorale, migliorando i risultati terapeutici.

Studi pilota in cui è stato utilizzato il doppio trapianto di cellule emopoietiche midollari (Harousseau et al, 1992) o di PBSC (Cavo et al, 1996; Vesole et al 1996; Bjorkstrand et al, 1995; Weaver et al, 1998), hanno evidenziato che questa procedura è fattibile con una mortalità correlata al trapianto dell'1-7%. Questi studi hanno anche suggerito che l'ulteriore intensificazione di dose

citotossica con doppio autotrapianto può incrementare la probabilità di ottenimento della RC ed estendere la OS e EFS se comparata retrospettivamente con la chemioterapia convenzionale (Barlogie et al, 1997). La prima ampia esperienza di doppio autotrapianto di PBSC in pazienti affetti da MM di nuova diagnosi è stata riportata nel 1999 in una serie di 231 pazienti di età inferiore a 70 anni. In questo studio la prima linea di terapia ad alte dosi è stata effettuata con melfalan, 200 mg/mq, ed è stata poi ripetuta nei pazienti che avevano raggiunto e mantenuto una remissione completa o parziale; negli altri pazienti il secondo ciclo di terapia (sub)mieloablativa è consistito nell'associazione di melfalan, 140 mg/mq, e TBI. È stato evidenziato un progressivo incremento della percentuale di RC dal 26% dopo il primo trapianto al 41% dopo il secondo. Il tempo mediano alla ricaduta è risultato di 52 mesi, mentre la durata mediana di OS e EFS è risultata rispettivamente pari a 68 e 43 mesi (Barlogie et al, 1999). Più recentemente lo stesso gruppo ha riportato i risultati ottenuti su 515 pazienti con MM di nuova diagnosi o precedentemente trattati, arruolati in un programma terapeutico che prevedeva l'utilizzo di due linee sequenziali di melfalan, 200 mg/mq, e con un *follow-up* superiore ai 5 anni. Il 77% dei pazienti ha effettivamente eseguito i due trapianti. È stata riscontrata una EFS ≥ 5 anni nel 25% dei pazienti. È interessante notare poi che una EFS ≥ 7 anni è stata osservata anche in assenza di una RC; questo dato può essere spiegato con il fatto che i pazienti in RC da oltre 7 anni sono probabilmente guariti, mentre quelli senza RC ma con una EFS superiore ai 7 anni possono aver ristabilito una condizione di MGUS con bassa probabilità di evoluzione (Tricot et al, 2002).

Gli unici due studi controllati volti a valutare i vantaggi del doppio autotrapianto rispetto al singolo autotrapianto sono comunque rappresentati dallo studio dell'*Intergroupe Francophone du Myélome (IFM-94 02 Trial)*, e dallo studio "Bologna 96".

Nello studio IFM-94 02 *Trial* 403 pazienti di età inferiore a 60 anni con MM di nuova diagnosi, sono stati randomizzati a ricevere una singola linea o due linee di chemio(radio)terapia mieloablativa con supporto di progenitori

emopoietici midollari o PBSC. In entrambi i gruppi la terapia mieloablativa è stata effettuata con melfalan 140 mg/mq più TBI e preceduta da melfalan 140 mg/mq nei pazienti candidati a ricevere due trapianti. I dati di questo studio hanno mostrato una probabilità di eseguire il secondo autotrapianto del 75%. Non è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa nella percentuale di raggiungimento della RC, mentre è risultato significativo l'incremento della OS e EFS a favore del gruppo randomizzato a ricevere due autotrapianti di PBSC nei confronti del gruppo randomizzato a ricevere un singolo autotrapianto. In particolare l'analisi statistica ha mostrato una OS a 7 anni dalla diagnosi del 21% nel gruppo randomizzato a ricevere un solo autotrapianto e del 42% nel gruppo randomizzato a ricevere due autotrapianti. L'EFS dei pazienti che non avevano ottenuto una "very good partial response" (VGPR) a tre mesi dal primo trapianto era dell'11% dopo singolo autotrapianto rispetto ad un 43% dopo due autotrapianti. Sono altresì risultati correlati alla sopravvivenza in analisi multivariata anche i livelli sierici di β 2-microglobulina, latticodeidrogenasi, età e gruppo di trattamento. Da ciò risulta quindi che il doppio trapianto autologo migliora la OS e la EFS nei pazienti con mieloma, specialmente in quelli che non ottengono una VGPR (Attal et al, 2003)

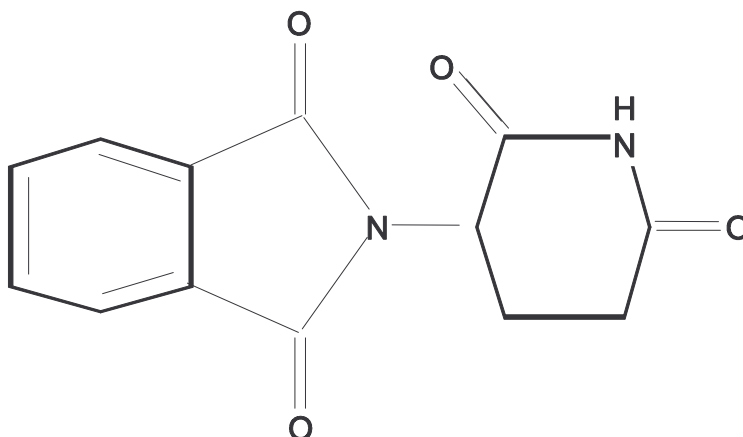
Nel Protocollo "Bologna 96" sono stati arruolati 358 pazienti, 220 dei quali sono stati attualmente analizzati: 110 erano randomizzati a ricevere un singolo autotrapianto, i restanti 110 avevano ricevuto due autotrapianti. Come primo obiettivo di studio è stata analizzata la risposta ai due differenti programmi terapeutici, senza osservare differenze statisticamente significative tra i due gruppi di randomizzazione. I risultati, analizzati per intenzione di trattamento, hanno mostrato che la probabilità di ottenimento di una RC o nRC (così definita dalla scomparsa della proteina monoclonale all'elettroforesi, ma positività all'immunofissazione) era del 31% nel braccio randomizzato a singolo autotrapianto e del 43% nel braccio randomizzato a doppio autotrapianto. Come era accaduto anche nello studio francese, non si sono verificate differenze statisticamente significative in termini di OS nei due gruppi di randomizzazione con un follow-up mediano di meno di 4 anni

dall'inizio della terapia. All'opposto nel braccio randomizzato al doppio autotrapianto, in confronto al singolo autotrapianto, è stata registrata una EFS significativamente più lunga (31 mesi rispetto a 21.5) e una durata di remissione più lunga (39.5 mesi rispetto a 23.5 mesi). In conclusione, in confronto con il singolo autotrapianto, il doppio autotrapianto come terapia di prima linea per il MM è in grado di prolungare significativamente la durata della remissione e della EFS. I maggiori benefici clinici del doppio autotrapianto sono stati conseguiti in quei pazienti che non avevano ottenuto una risposta con la chemioterapia convenzionale di prima linea e/o che non avevano raggiunto la remissione completa dopo trapianto autologo.

NUOVI FARMACI

Il riconoscimento del ruolo cruciale esercitato dal microambiente midollare nel promuovere la crescita e la sopravvivenza delle cellule di mieloma nonché la resistenza ai chemioterapici convenzionali ha portato, negli ultimi cinque anni, all'introduzione di una nuova classe di farmaci nella terapia del MM, attiva, in primo luogo, a livello del microambiente. Tali agenti comprendono la talidomide, i suoi analoghi ed il bortezomib.

Talidomide



α -(N-phthalilamido)glutarimide

La talidomide (α -ptalimido-glutaramide) è un derivato dell'acido glutammico ad attività sedativa la cui utilizzazione negli anni '50, per la terapia dell'insonnia e della nausea in gravidanza, fu responsabile di più di 10.000 casi certi di malformazioni neonatali quali amelia, focomelia, ipoplasia ossea, paralisi facciale, difetti del midollo spinale e malformazioni di orecchio interno, occhio, rene, genitali, cuore e apparato gastro-intestinale.

A seguito di questi avvenimenti il farmaco è stato ritirato dal mercato e successivamente è stato impiegato in modo sporadico in svariate patologie quali l'eritema nodoso lepromatoso, le lesioni cutanee da lupus eritematoso, la stomatite aftosa AIDS-correlata e la malattia da trapianto contro l'ospite (graft versus host disease (GVHD)). L'efficacia della talidomide in queste condizioni cliniche, peraltro piuttosto differenti, ha condotto ad uno studio più approfondito dei suoi effetti.

Di primaria importanza tra i meccanismi di azione della talidomide è la provata attività antiangiogenetica: talidomide è in grado infatti di inibire l'angiogenesi indotta dal bFGF e VEGF (D'Amato et al, 1994).

Proprio su tale azione antiangiogenetica, considerando l'importanza che la crescita di nuovi vasi svolge nello sviluppo del MM, si fondano le basi empiriche del primo impiego clinico della talidomide nel trattamento del MM avanzato. Successivamente l'evidenza che la densità microvascolare del midollo osseo e la concentrazione plasmatica di VEGF e FGF non differiscono in modo significativo tra i pazienti responsivi e quelli refrattari (Singhal et al, 1999; Neben et al, 2001) ha portato ad indagare altri meccanismi di azione.

Studi *in vitro* e *trials* clinici hanno quindi dimostrato che, oltre ad una attività antiangiogenetica, talidomide possiede una vasta gamma di effetti.

In primo luogo talidomide è in grado di inibire la crescita e la sopravvivenza delle cellule mielomatose sia tramite un danno ossidativo al DNA (Parman et al, 1999), sia mediante induzione diretta dell'apoptosi (attivazione delle caspasi 8 e aumento della sensibilità all'apoptosi indotta da FAS) anche in cellule mielomatose con caratteristiche di farmacoresistenza (Hideshima et al, 2000). Inoltre talidomide è capace di modulare l'espressione di molecole di adesione cellulare (Geitz et al, 1996), di interferire con la sintesi di citochine quali TNF e IL-6 (Payvandi et al, 2000), di esplicare una attività immunomodulatrice attraverso la stimolazione dei linfociti T e cellule NK (Dimopoulos et al, 2003) e di downregolare NF-kB (Mitsiades et al, 2002).

Per poter comprendere il possibile meccanismo d'azione di talidomide nel MM è necessario tenere presente il ruolo che il microambiente midollare

riveste nella crescita e nella progressione della malattia. Nella “fase attiva” del MM, è aumentata la produzione di IL-6 da parte della cellule stromali e, quindi, la proliferazione e l’attività angiogenetica della plasmacellule mielomatose. Conseguentemente, si determina un aumento della neovascolarizzazione midollare e della secrezione dei fattori angiogenetici, quali FGF e VEGF, ed un aumento della secrezione di induttori della proteolisi, quali le metallo-matrix proteasi (MMPs), con il ruolo di agire sulla matrice per aprire la strada ai nuovi vasi che si sviluppano. Talidomide potrebbe pertanto essere utile nella terapia del MM, grazie alla sua azione su vari livelli: sulle cellule stromali inibendo la produzione di IL-6, TNF- α e IL-1 β , sui linfociti T, determinando l’aumento della produzione di IL-2 e IFN- γ , sulle cellule endoteliali modulando l’espressione di molecole di adesione e inibendo la produzione di VEGF e FGF e, conseguentemente, l’angiogenesi (Figura-1).

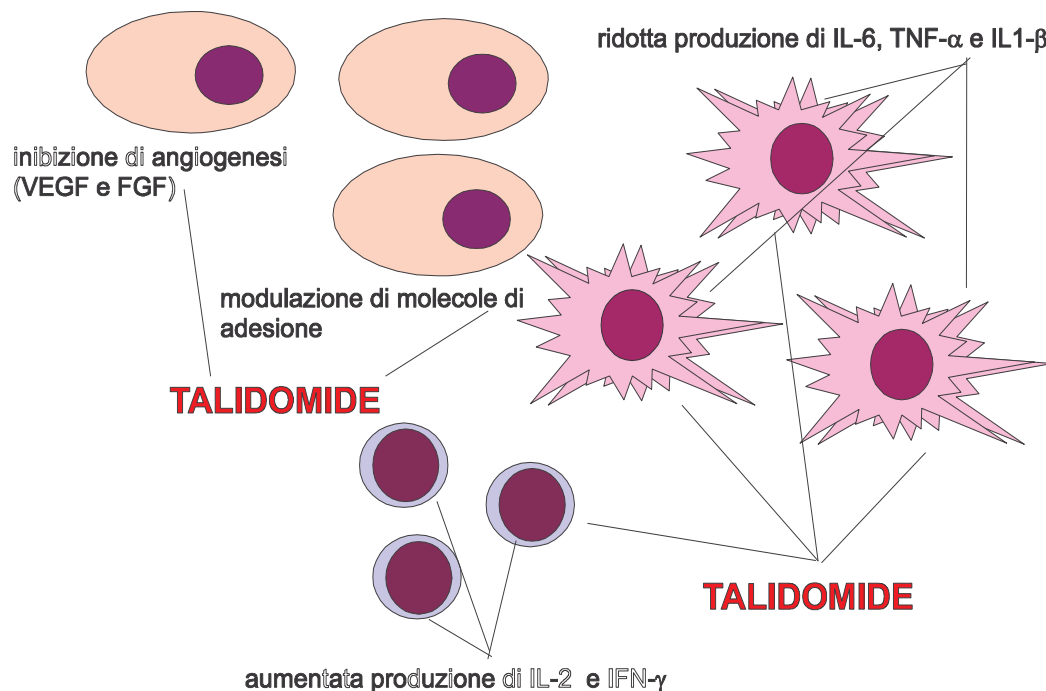


Figura-1: meccanismo di azione di talidomide nel MM

La prima evidenza della efficacia della talidomide nella terapia del MM è stata riportata da uno studio clinico di fase II condotto su pazienti con malattia

ricaduta-refrattaria (Singhal et al, 1999). In questo studio 84 pazienti sono stati trattati con dosi crescenti di talidomide da 200 mg/die a 800 mg/die. E' stata riportata una percentuale di risposta del 32% e, dopo 12 mesi di *follow-up*, la sopravvivenza libera da eventi e globale è risultata pari al 22% e 58% rispettivamente. E' stata osservata una tossicità per lo più di grado lieve-moderato rappresentata principalmente da stipsi, sonnolenza e astenia. Il 75% dei pazienti ha tollerato la dose di 600 mg/die, ma solo la metà di questi è stata in grado di raggiungere il massimo stabilito di 800 mg/die.

Successivamente sono stati condotti numerosi altri studi basati sull'impiego della talidomide nei pazienti con malattia ricaduta-refrattaria. Tutti hanno riportato una percentuale di risposta del 20-45%, confermando l'efficacia di talidomide come agente singolo nel trattamento del MM avanzato, anche se la dose ottimale di farmaco risulta ancora in corso di definizione (Juliussen et al, 2000; Grosbois et al, 2001; Oakervee et al, 2001; Rajkumar et al, 2001; Tosi et al, 2001).

Con l'obiettivo di migliorare i già promettenti risultati ottenuti con talidomide come agente singolo è stato indagato l'impiego di talidomide in associazione a desametasone e/o chemioterapici. Tale utilizzo combinato si basa sul provato sinergismo *in vitro* con il desametasone e sulla assenza di tossicità midollare propri di talidomide.

Diversi studi hanno evidenziato che l'utilizzo di uno schema combinato con talidomide e desametasone permette di incrementare il *response rate* del 20% e di recuperare parte dei pazienti refrattari alla sola talidomide (Weber et al, 1999; Palumbo et al 2001; Tosi et al, 2001). Anche studi condotti sulla valutazione della associazione fra talidomide, desametasone e chemioterapia hanno mostrato risultati incoraggianti. Gli schemi principalmente utilizzati comprendono talidomide, desametasone e ciclofosfamide; talidomide, ciclofosfamide, etoposide e desametasone (T-CED); desametasone e talidomide con infusione di cisplatino, doxorubicina, ciclofosfamide ed etoposide (DT-PACE); talidomide, desametasone e melphalan. Le percentuali di risposta variano tra il 30 e 70% (Moehler et al, 2000; Dimopoulos et al, 2001; Barlogie et al, 2001; Tricot et al, 2001 ; Srkalovic et al, 2002).

Questi incoraggianti risultati ottenuti nell'ambito del MM avanzato hanno portato alcuni gruppi, tra i quali il nostro, ad avviare studi clinici investigazionali volti a testare il ruolo della talidomide nella terapia di prima linea del MM sintomatico.

L'associazione di talidomide e desametasone è stata quindi utilizzata in pazienti candidati a ricevere un successivo programma di chemioterapia ad alte dosi con trapianto di progenitori emopoietici autologhi riportando promettenti risultati sia in termini di risposta alla terapia sia in termini di adeguata raccolta di cellule staminali (Rajkumar et al, 2003; Weber et al, 2003, Cavo et al, 2004). Lo studio "Bologna 2002", condotto dal nostro centro, prevedeva, per pazienti affetti da mieloma multiplo di nuova diagnosi, una terapia di induzione con talidomide e desametasone seguita da un doppio trapianto autologo. Allo scopo di confrontare i risultati ottenuti con talidomide-desametasone nei confronti del classico schema di induzione VAD, è stata condotta analisi retrospettiva caso-controllo su 100 pazienti arruolati nel protocollo "Bologna 2002" e 100 pazienti analoghi per età, stadio e β 2microglobulina (*case-matching*) arruolati nel precedente protocollo "Bologna 96" in cui, come terapia di induzione, veniva utilizzato il VAD. Tale analisi ha mostrato la superiorità di talidomide e desametasone nei confronti di VAD in termini di risposta alla terapia (risposta \geq risposta parziale (RP): 76% *versus* 53%) (Cavo et al, 2005).

Un ampio studio randomizzato condotto dal gruppo di *Little Rock* ha indagato in modo prospettico il vantaggio apportato dall'aggiunta della talidomide nell'ambito del programma trapiantologico. In questo studio i pazienti venivano randomizzati a ricevere chemioterapia sequenziale e doppio autotrapianto (*Total Therapy II*) con o senza associazione di talidomide sia nella terapia di induzione sia nel consolidamento e mantenimento post-trapianto (Barlogie et al, 2001). Rispetto al gruppo di controllo i pazienti che hanno ricevuto talidomide hanno mostrato una superiorità significativa in termini di raggiungimento di una RC (62% *versus* 43%) e in termini EFS a cinque anni (56% *versus* 44%). Non è stata invece osservata una differenza significativa in termini di OS; limite che può essere spiegato da un minore

response rate osservato nel gruppo randomizzato a talidomide dopo la ricaduta di malattia (Barlogie et al, 2006).

L'efficacia di talidomide nella terapia di prima linea del MM è stata confermata anche nell'ambito di pazienti non candidati a terapia ad alte dosi. Uno studio comparativo di MP e MPT (melfalan, prednisone e talidomide) ha dimostrato infatti la superiorità di MPT nei confronti della chemioterapia convenzionale sia in termini di raggiungimento della RC che in termini di EFS e OS (Palumbo et al, 2006).

Per quanto riguarda la tossicità correlata alla terapia con talidomide la più seria complicanza è rappresentata dal tromboembolismo venoso (TEV). L'incidenza nel trattamento del MM avanzato con talidomide come agente singolo è inferiore al 5%. Tale incidenza aumenta drammaticamente in caso di mieloma di nuova diagnosi e in caso di associazione di talidomide con desametasone e/o chemioterapia, variando dal 10 al 28% a seconda delle diverse casistiche e degli schemi terapeutici utilizzati (Rajkumar et al, 2002; Osman et al, 2001; Zangari et al, 2001). Il meccanismo patogenetico sottostante all'aumentata incidenza di TEV nei pazienti affetti da MM di nuova diagnosi trattati con talidomide e desametasone non è ancora stato chiarito. Non pare esserci una correlazione con una preesistente trombofilia documentata dal riscontro di anomalie laboratoristiche, come livelli di proteina C, proteina S ed antitrombina III, anticorpi antifosfolipidi, fattore V Leiden (mutazione nel gene che codifica per il fattore V della cascata coagulativa) e II Leiden (mutazione nel promotore del gene della protrombina) (Zangari et al., 2000 e 2001). Parimenti non è stata trovata una correlazione con il "bulky" della malattia o lo stato di responsività-refrattarietà dei pazienti alla terapia, nonostante le VTE si verificano preferenzialmente nei primi mesi di terapia. Alla luce di ciò, nei pazienti con MM di nuova diagnosi sottoposti a terapia con talidomide-desametasone \pm chemioterapia deve essere considerata l'introduzione di un'appropriata profilassi antitromboembolica. Anche a tale proposito, in assenza di studi prospettici, non vi è consenso su quale sia il miglior regime profilattico, se il warfarin a basso dosaggio fisso, il warfarin a dosi terapeutiche, l'eparina a basso peso molecolare (Weber et al,

2003; Barlogie et al, 2004; Cavo et al, 2004), o la terapia antiaggregante con aspirina (Baz et al, 2005).

Le altre complicanze del trattamento con talidomide sono correlate alla dose ed alla durata del trattamento. Tra queste un ruolo di primaria importanza lo assume la neuropatia periferica, trattandosi di una complicanza reversibile solo se il trattamento viene prontamente sospeso. Si tratta di una neuropatia prevalentemente sensoriale, bilaterale e simmetrica; è assonale distale con un andamento di tipo ascendente (piedi→ginocchia; mani→gomiti) tipo “*dying back*” (Chaudri et al, 2003) e meno frequentemente ha i caratteri di una gangliopatia sensitiva (Isoardo et al, 2004). Si manifesta con parestesie, disestesie, ipopallestesia ed alterazioni della marcia. La genesi della neuropatia risulta complessa e solo in parte nota. Un possibile ruolo aggiuntivo può essere attribuito alla terapia con vincristina, alla paraproteina, all'amiloide, alla compressione radicolare o spinale. La sua solo parziale reversibilità rende indispensabile uno stretto monitoraggio dei pazienti dal momento che nella terapia a lungo termine (>1 anno) la neuropatia rappresenta la complicanza più frequente e che più influenza la qualità di vita dei pazienti.

Altri effetti collaterali sono la sedazione, che può essere minimizzata se il farmaco è assunto di sera, la stipsi (soprattutto per dosi >400 mg), che si giova dell'assunzione di fibre e lassativi, e la tossicità cutanea, soprattutto in forma di rash (Rajkumar et al, 2000). Quest'ultima può in rari casi presentarsi sottoforma di epidermolisi tossica.

Più raramente sono stati riportati neutropenia, alterazioni della funzionalità epatica, bradicardia (Fahadi et al, 2004) ed ipotiroidismo sia clinico che a livello laboratoristico (Badros et al, 2000).

Va infine ricordato che in virtù dei ben noti effetti teratogeni è fondamentale che i soggetti in età fertile assumano talidomide in associazione con un adeguato metodo anticoncezionale (ormonale e meccanico per le donne, solo meccanico per gli uomini).

PAZIENTI E METODI

DISEGNO DEL PROTOCOLLO

Il protocollo prevedeva l'arruolamento di pazienti affetti da mieloma multiplo sintomatico alla diagnosi, non precedentemente trattati, di età inferiore ai 65 anni, con malattia misurabile a livello sierico e/o urinario, in stadio superiore al I o in I stadio in progressione, in presenza di una normale funzionalità cardiorespiratoria.

Il protocollo terapeutico era articolato in varie fasi: inizialmente era prevista una terapia di induzione di 4 mesi con talidomide alla dose di 100 mg al giorno per le 2 settimane iniziali, poi aumentata alla dose di 200 mg a cui era associata terapia con desametasone alla dose di 40 mg al giorno per 4 giorni consecutivi per 3 cicli nei mesi dispari (primo e terzo mese di trattamento) e per 1 ciclo nei mesi pari (secondo e quarto mese di trattamento). Successivamente era prevista una terapia mobilizzante con ciclofosfamide alla dose di 7 g/mq e fattore di crescita granulocitario.

A distanza di circa un mese era prevista la prima linea ad alte dosi con melphalan 200 mg/mq e reinfusione dei progenitori emopoietici autologhi del sangue periferico (I trapianto autologo) precedentemente raccolti, ripetuta dopo 3 mesi (II trapianto autologo).

Tra la terapia con ciclofosfamide e la prima linea di melphalan ad alte dosi e tra le due linee di melphalan ad alte dosi veniva ripresa la terapia con talidomide alla dose di 200 mg al giorno e veniva ripetuto il desametasone 40 mg al giorno per 4 giorni al mese.

Durante tutto il periodo di trattamento, i pazienti ricevevano mensilmente terapia con acido zoledronico alla dose di 4 mg. **(FIGURA 1)**

DOSAGGI CITOCHINICI

I campioni di sangue venoso erano prelevati ai pazienti alla diagnosi, al termine della terapia di induzione con talidomide e desametasone (dopo 4 mesi di trattamento), a 3 mesi dal primo trapianto autologo e a 3 mesi dal secondo trapianto autologo.

Una volta prelevati i campioni venosi venivano centrifugati a 3000 giri al minuto per 10 minuti; il siero così ottenuto veniva criopreservato ad una temperatura minima di -20°C fino al momento dell'analisi.

I livelli sierici delle singole citochine venivano poi determinati utilizzando la metodica sandwich ELISA (enzyme linked immunoadsorbent assay), impiegando specifici anticorpi monoclonali umani anti-TNF-alpha, anti-VEGF, anti-bFGF e anti-IL6 mediante kits commerciali di rilevazione (Pierce Endogen). I campioni e la standardizzazione sono stati misurati in doppio; la sensibilità della metodica è stata calibrata secondo le indicazioni del prodotto.

ANALISI STATISTICA

L'analisi statistica è stata realizzata utilizzando il programma MedCalc Software for Windows. I risultati erano considerati statisticamente significativi quando $p < 0.05$. Per il confronto tra il gruppo dei pazienti e il gruppo dei soggetti sani si è utilizzato il Man Whitney U-test, mentre per valutare le differenze all'interno dello stesso gruppo si è utilizzato il Wilcoxon test. Le correlazioni tra i vari parametri è stata realizzata utilizzando la Spearman rank correlation. La probabilità di sopravvivenza è stata condotta utilizzando il metodo descritto da Kaplan and Meier. I valori mediani sono stati utilizzati come valori cut-off. Le differenze tra 2 curve di sopravvivenza sono state testate sotto il profilo statistico mediante il log-rank test. La correlazione con l'ottenimento della risposta è stata condotta utilizzando la logistic regression

analysis, mediante l'ingresso successivo di una variabile era permesso per un valore massimo di $p = 0.05$.

Si è invece utilizzato il modello di rischio proporzionale di Cox nel quale per l'entrata di una variabile era permesso un valore massimo di $p = 0.05$, per valutare i fattori predittivi della sopravvivenza globale e della sopravvivenza libera da progressione.

RISULTATI

CARATTERISTICHE DEI PAZIENTI

La popolazione oggetto dello studio è composta da 96 pazienti, arruolati nel periodo compreso fra il Gennaio 2002 e l'Ottobre 2004; tutti i pazienti hanno dato il consenso informato allo studio; l'età mediana era pari a 57 anni; il 48% era di sesso femminile; il 58% dei pazienti era in III stadio. La concentrazione mediana di emoglobina era pari a 10.7 g/dl, la conta piastrinica mediana pari a 212.000/mcl; il 59% dei pazienti presentava una componente monoclonale di tipo IgG, il 29% di tipo IgA ed il restante 12% di tipo Bence Jones. La concentrazione mediana di beta-2 microglobulina era pari a 2.86 mg/dl, mentre la concentrazione mediana di lattico deidrogenasi (LDH) era pari a 281 U/L. La metà dei pazienti presentava un'estesa malattia ossea, con oltre 2 lesioni osteolitiche. Il 10% dei pazienti presentava una creatininemia superiore a 2 mg/dl; l'infiltrazione plasmacellulare midollare mediana era pari al 50%.

Sono stati valutati mediante metodica FISH per la ricerca di delezione del cromosoma 13, 70 pazienti sui 96 totali: tra questi, la metà erano positivi per la delezione del cromosoma 13. **(FIGURA 2)**

Per poter confrontare le concentrazioni citochiniche sieriche con un gruppo di controllo, sono stati prelevati campioni di sangue venoso da 32 volontari sani che hanno dato il loro consenso allo studio.

RISPOSTA CLINICA

La risposta al trattamento è stata valutata dopo la terapia di induzione e dopo il I e/o il II trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche del sangue periferico. I criteri per valutare la risposta al trattamento sono stati adottati seguendo i criteri riportati da SWOG and Blade, nel 1998, dove per remissione completa (CR) si intende la scomparsa della componente monoclonale sia all'immunodiffusione che all'immuno-elettroforesi sierica e/o urinaria in almeno 2 determinazioni, per very good partial remission (VGPR) si intende una riduzione della componente monoclonale sierica > al 90%, per risposta parziale (PR) una riduzione della componente monoclonale sierica > 50% o una riduzione della componente monoclonale urinaria > 90%, e per non risposta (NR) una riduzione della componente monoclonale sierica o urinaria inferiore alla PR o una stazionarietà o progressione della componente monoclonale.

Dopo la terapia di induzione tutti i pazienti erano valutabili per la risposta al trattamento: il 22% era in CR, il 63% era in PR (di cui il 10% era in VGPR) e il restante 15% era NR.

Di 40 pazienti abbiamo la valutazione della risposta a 3 mesi dal primo trapianto (I Tx): il 48% era in CR, il 49% era in PR (di cui il 27% in VGPR) e il 3% era NR. Di 39 pazienti (29 dei quali valutati anche dopo il I Tx) abbiamo la valutazione della risposta a 3 mesi dal II trapianto: il 65% era in CR, il 32% era in PR (di cui il 22% in VGPR) e il 3% era NR. **(FIGURA 3)**

ANALISI DELLA SOPRAVVIVENZA

La sopravvivenza globale (OS) mediana e la sopravvivenza libera da progressione (PFS) mediana non sono ancora state raggiunte al momento

dell'analisi: con un follow-up mediano è di 40,5 mesi, la probabilità di sopravvivenza a 40 mesi è del 77%; mentre la probabilità di PFS è del 66%. **(FIGURE 15 e16)**

LIVELLI SIERICI DELLE CITOCHINE

Le concentrazioni sieriche di bFGF e di IL-6 sono significativamente più elevate nei pazienti affetti da MM rispetto al gruppo di controllo: concentrazione media di bFGF pari a 48.74 vs 21.41 pg/ml, ($p < 0.0001$), e di IL-6 pari a 372.20 vs 5.09 pg/ml, ($p = 0.04$); non abbiamo osservato differenze relativamente ai livelli sierici di VEGF (concentrazione mediana dei pazienti pari a 247.66 vs 243.84 pg/ml del gruppo di controllo); mentre, esaminando solo coloro con valori di TNF-alpha > 10 pg/ml, il valore soglia di sensibilità della metodica, vi era una differenza significativa tra i pazienti e il gruppo di controllo, con una concentrazione mediana di TNF-alpha pari a 52.8 vs 17 pg/ml, ($p = 0.0019$) **(FIGURA 4 e 5)**

Successivamente, abbiamo indagato l'eventuale correlazione tra le concentrazioni sieriche delle citochine ed altre caratteristiche clinico-laboratoristiche alla diagnosi (età, stadio, concentrazione di emoglobina, conta piastrinica, concentrazione di beta 2 microglobulina, concentrazione di LDH, .FISH, lesioni osteolitiche) e le correlazioni tra le varie concentrazioni citochiniche tra loro.

Le concentrazioni sieriche di IL-6 correlavano significativamente con le concentrazioni di TNF-alpha e di VEGF (rispettivamente $p < 0.0001$ e $p = 0.0142$); inoltre VEGF correlava con la conta piastrinica ($p = 0.0015$). **(FIGURA 6)**

Abbiamo quindi verificato se le concentrazioni sieriche basali correlassero con la risposta alla terapia di induzione (TALI-DEX), mediante una logistic regression analysis. Le concentrazioni sieriche basali delle citochine non correlavano con la risposta al trattamento. Le uniche variabili indipendenti

per la risposta al trattamento erano la concentrazione di LDH e il numero di lesioni osteolitiche. **(FIGURA 7)**

Abbiamo verificato le modificazioni prima e dopo la terapia di induzione: si è evidenziato un incremento significativo delle concentrazioni sieriche di VEGF dopo il trattamento con una concentrazione mediana da 247.66 a 403.1 pg/ml, ($p < 0.0001$), in assenza di modificazioni significative delle altre citochine. Poiché molti pazienti presentavano valori basali al di sotto del valore soglia di sensibilità della metodica, abbiamo esaminato unicamente i pazienti che presentavano dei valori basali superiori al valore soglia (IL-6 > 4 pg/ml, TNF-alpha > 10 pg/ml): si è documentato una riduzione significativa dei valori di IL-6 (da 17.8 a 4 pg/ml, $p = 0.0006$) e di TNF-alpha (da 54.2 a 10 pg/ml, $p = 0.0007$). In ultimo abbiamo studiato le modificazioni delle concentrazioni sieriche dopo il I Tx e dopo il II Tx, rispettivamente in 40 e 39 pazienti, dei quali erano disponibili i campioni al termine del trattamento: i livelli sierici di bFGF si riducono significativamente dopo il I e dopo il II Tx ($p = 0.0001$ e $p = 0.0003$); permane il trend di significativo incremento del VEGF, sia dopo il I che dopo il II Tx ($p < 0.0001$ e $p = 0.001$). Globalmente non abbiamo osservato modificazioni significative di TNF-alpha e di IL-6; invece, esaminando coloro che avevano una concentrazione basale superiore al valore soglia, abbiamo trovato un decremento significativo dei livelli di IL-6 dopo il I e il II Tx ($p = 0.0008$ e $p = 0.0032$) e dei livelli di TNF-alpha dopo il I Tx ($p = 0.002$). **(FIGURE 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14)**

Non abbiamo osservato differenze significative del decremento dei valori sierici delle varie citochine tra pazienti responsivi e non responsivi in ogni fase terapeutica esaminata.

I livelli sierici basali di bFGF ($p = 0.0285$) e la concentrazione emoglobinica alla diagnosi ($p = 0.0165$) sono risultati essere gli unici fattori predittivi indipendenti per la OS utilizzando il modello di rischio proporzionale di Cox, in cui erano inclusi anche VEGF, TNF-alpha, IL-6 e la conta piastrinica. In particolare, elevati livelli basali di bFGF correlavano con una miglior probabilità di OS: esaminando l'OS dei pazienti suddivisi sulla base di un cut-off di bFGF pari a 33 pg/ml, i pazienti con valori più elevati di bFGF si

associavano ad una significativa maggior probabilità di OS ($p = 0.04$).
(FIGURA 17)

I livelli citochinici basale non correlavano invece con la probabilità di PFS.

DISCUSSIONE

Nei pazienti affetti da MM avanzato è stato dimostrato un incremento dell'angiogenesi midollare, documentata in termini di microvessel density (MVD), rispetto a pazienti con MM asintomatico o con MGUS.

Ancora resta da chiarire se l'aumentata angiogenesi riscontrata nei pazienti con MM svolga un ruolo nella patogenesi della malattia e sia il risultato delle citochine angiogeniche espresse nel microambiente tumorale o se invece sia un epifenomeno.

L'osservazione che esiste una correlazione tra l'aumentata angiogenesi (espressa come MVD) ed una prognosi sfavorevole (Rajkumar), supporta l'ipotesi del ruolo dell'angiogenesi nella patogenesi e nella progressione del MM.

Inoltre, in recenti studi sulle cellule endoteliali midollari in pazienti con MM (Vacca A et al.2003), è stato dimostrato come le cellule endoteliali stesse abbiano caratteristiche citogenetiche riconducibili alla cellula neoplastica, portando all'ipotesi di una genesi comune con le cellule tumorali; è stato inoltre dimostrato che attraverso reciproche interazioni con le MMPC e con le cellule stromali midollari, siano in grado di supportare la crescita e la progressione del MM, sia in virtù della neo-angiogenesi sia attraverso la stimolazione della proliferazione e della sopravvivenza delle MMPC.

Questi recenti avanzamenti nella conoscenza dell'angiogenesi, hanno fornito il razionale per ricercare la specifica inibizione dei segnali angiogenici con la finalità di interrompere la rete di segnale che intercorre tra le MMPC e le cellule endoteliali. Lo sviluppo e la disponibilità di nuovi farmaci nella terapia del mieloma multiplo, (la talidomide e i suoi derivati, gli inibitori del proteasoma, gli antagonisti del recettore tirosin-kinasico del VEGF, gli anticorpi monoclonali anti-VEGF, anticorpi monoclonali anti-IL-6, anticorpi anti-FGFR3,) che hanno una documentata azione anti-angiogenica, rende necessario identificare e misurare specifiche molecole coinvolte nell'angiogenesi e le loro modificazioni durante il trattamento.

La scelta di utilizzare come targets le citochine coinvolte nell'angiogenesi piuttosto che la MVD, nasce dal tentativo di identificare dei marcatori facilmente reperibili e dosabili in maniera oggettiva. Nella letteratura medica fino ad ora disponibile relativa alle citochine angiogeniche, sono stati riportati dei risultati spesso contrastanti tra uno studio e l'altro: questi aspetti contraddittori possono essere ricondotti in parte al fatto che le casistiche pubblicate sull'argomento sono spesso numericamente limitate, raramente descrivono una popolazione omogenea di pazienti (spesso comprendono pazienti ricaduti/refrattari, già sottoposti a varie linee terapeutiche) ed ancora più raramente descrivono pazienti sottoposti allo stesso regime terapeutico. (Jakob C et al 2006)

Per cercare di ovviare ai limiti dei lavori precedentemente pubblicati, abbiamo condotto uno studio su una casistica relativamente ampia (96 pazienti) di pazienti affetti da MM alla diagnosi, sottoposti al medesimo regime terapeutico, comprendente nella prima fase terapeutica l'utilizzo di talidomide, uno dei primi farmaci noti per la sua attività anti-angiogenica.

La scelta di utilizzare le concentrazioni sieriche come surrogato della produzione citochinica nel microambiente midollare è stata giustificata dalla maggiore accessibilità nel reperire campioni valutabili rispetto al midollo osseo e dalle segnalazioni di una correlazione positiva tra valori riscontrati nel sangue periferico e nel sangue midollare (Di Raimondo, 2000 e Andersen, 2005). In ultimo, abbiamo utilizzato le concentrazioni sieriche anziché quelle plasmatiche per poter confrontare i risultati con gli studi a tutt'oggi pubblicati in cui si sono dosati più frequentemente le concentrazioni sieriche, anche se è verosimile che le concentrazioni plasmatiche possano essere più accurate per lo meno per quanto riguarda il dosaggio di VEGF che può essere rilasciato dalle piastrine durante la coagulazione inficiando la stima delle concentrazioni sieriche.

Abbiamo evidenziato che le concentrazioni sieriche di bFGF e di IL-6 nei pazienti affetti da MM sintomatico alla diagnosi sono significativamente più elevate rispetto ad un gruppo di controllo rappresentato da donatori sani e concentrazioni significativamente più elevate di TNF-alpha esaminando

unicamente coloro con valori superiore al valore minimo di detactabilità della metodica. In letteratura, risultati analoghi sui pazienti con MM alla diagnosi sono stati riportati da Sezer O et al nel 2001, evidenziando livelli sierici di bFGF più elevati nei pazienti rispetto al gruppo di controllo, in assenza di significatività per quanto riguarda i livelli di VEGF, IL-6 e HGF, da Weber D et al nel 2002, che ha segnalato concentrazioni sieriche significativamente più elevate nei pazienti rispetto al gruppo di controllo per quanto riguarda bFGF e TNF-alpha; nello stesso lavoro sono segnalati livelli sierici significativamente più elevati anche di VEGF e di HGF; analogamente, anche Iwasaki et al nel 2002, ha evidenziato livelli sierici di VEGF e di HGF più elevati nei pazienti con MM alla diagnosi rispetto al gruppo di controllo. Il secondo obiettivo dello studio era quello di verificare se le concentrazioni citochiniche sieriche correlassero con le altre caratteristiche clinico-laboratoristiche alla diagnosi.

Abbiamo osservato una correlazione significative tra i livelli di IL-6 e i livelli di TNF-alpha e di VEGF, mentre i livelli di VEGF correlavano con la conta piastrinica. Non abbiamo osservato correlazioni fra i livelli citochinici ed altre caratteristiche alla diagnosi, compreso lo stadio di malattia.

In altri lavori sempre eseguiti su pazienti con MM alla diagnosi, viene invece segnalata una correlazione tra bFGF e concentrazione di emoglobina, creatininemia sierica, calcemia, stadio, concentrazione di beta 2 microglobulina e proteina C reattiva sierica (Iwasaki) e una correlazione tra VEGF e stadio e creatininemia (Usnarska Zubkiewicz).

Il terzo obiettivo era quello di verificare se i livelli sierici citochinici si modificassero dopo le diverse fasi terapeutiche e se correlassero con la risposta al trattamento. Dopo la terapia di induzione con talidomide e desametasone abbiamo osservato un incremento significativo dei livelli di VEGF (concentrazione mediana da 247.66 a 403.1 pg/ml) ed una riduzione significativa dei livelli di IL-6 e di TNF-alpha esaminando coloro con un valore basale superiore al valore soglia della metodica. Il trend riscontrato dopo la terapia di induzione è stato confermato proseguendo nel programma terapeutico (dopo il I Tx e dopo il II Tx). I valori di bFGF si riducono più

tardivamente rispetto a IL-6 e TNF-alpha, ed in particolare si riducono significativamente dopo la terapia ad alte dosi.

Relativamente all'incremento dei livelli sierici del VEGF risulta difficile delineare una spiegazione; è verosimile che i livelli sierici possano non correlare con i livelli della citochina nel microambiente midollare o che rispetto a questi ultimi possano essere significativamente più elevati. Inoltre, non correlando con i markers di attività della malattia, come ad esempio la beta 2 microglobulina, il VEGF sierico può non essere un valido marcatore dell'angiogenesi; in ultimo, sappiamo che i livelli sierici di VEGF sono teoricamente inficiati dal rilascio di VEGF da parte delle piastrine durante la coagulazione, che, con il proseguire del trattamento si osserva un incremento della conta piastrinica, e che i livelli sierici di VEGF alla diagnosi correlano con la conta piastrinica, ma tutto ciò non giustifica chiaramente la causa dell'incremento osservato di VEGF. La medesima osservazione dell'incremento dei livelli di VEGF è stata segnalata da Hatjiharissi E et al nel 2004.

Non è stata evidenziata alcuna differenza tra pazienti responsivi e non responsivi al trattamento, verosimilmente a causa dell'elevata percentuale di pazienti responsivi al trattamento (85% dopo la terapia di induzione e 97% dopo la terapia ad alte dosi). Negli unici lavori pubblicati su pazienti con MM alla diagnosi trattati con talidomide, Weber nel 2002 ha evidenziato come (casistica di 28 pazienti) i livelli citochinici di VEGF, bFGF, HGF, TNF-alpha e Ang non si modificassero dopo terapia con talidomide associata o meno a desametasone; analogamente, anche Thompson nel 2003 non ha evidenziato modificazioni dei dosaggi, in questo caso plasmatici, di VEGF, bFGF, TNF-alpha e IL-6 in 38 pazienti con MM alla diagnosi trattati con talidomide associata o meno a desametasone. I differenti risultati tra i vari studi possono essere legati al diverso schema di trattamento e all'utilizzo di dosaggi differenti nei vari lavori.

I livelli sierici basali non correlavano con la probabilità di risposta al trattamento, che risultava predetta unicamente dal numero di lesioni

osteolitiche e dal LDH. Questo può essere spiegato dall'alta responsività alla terapia osservata nello studio.

Elevati livelli sierici basali di bFGF correlavano significativamente con una migliore probabilità di sopravvivenza globale.

In conclusione, l'esatto ruolo di queste citochine e le loro modificazione durante il trattamento con farmaci che agiscono direttamente inibendo l'angiogenesi restano da chiarire. Tuttavia, la nostra osservazione relativa alla riduzione significativa dei livelli di bFGF, TNF-alpha e IL-6 al termine del trattamento e al ruolo prognostico positivo sulla OS di elevati livelli sierici basali di bFGF, induce alla necessità di ulteriori studi sull'argomento che possano confermare i nostri risultati.

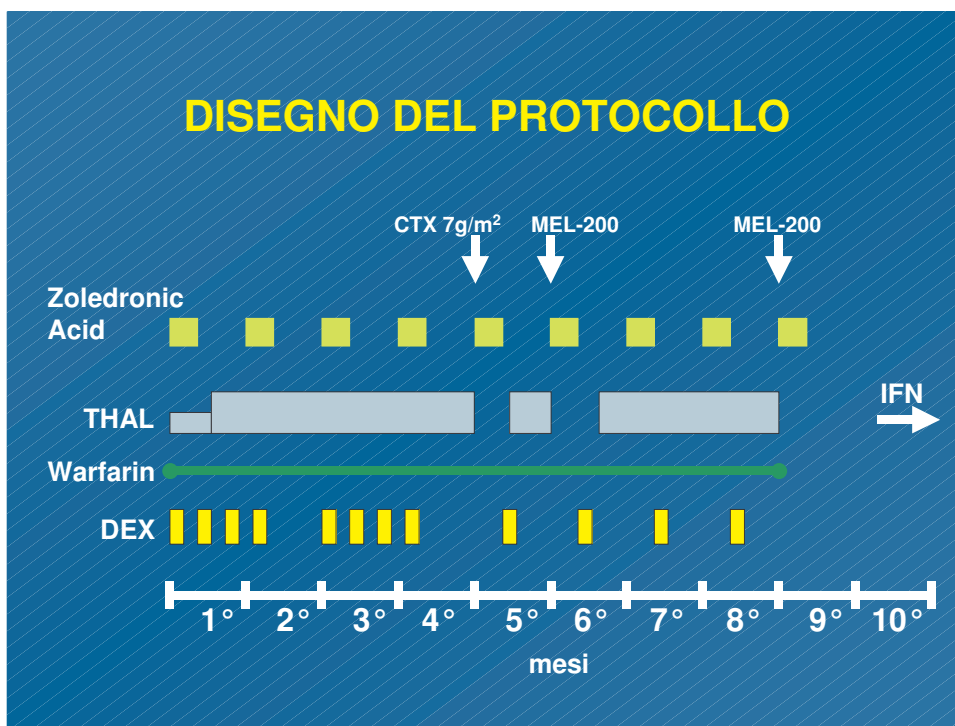
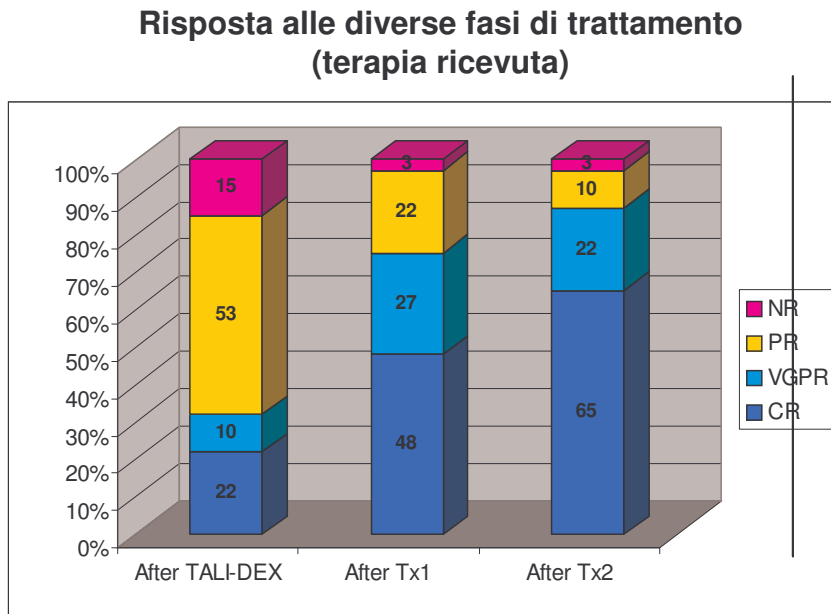


FIGURA 1

CARATTERISTICHE ALLA DIAGNOSI

Totale pazienti (numero)	96
Età alla diagnosi (anni)	57
Stadio > II	58
Hb mediana (g/dl)	10.7
Plts mediana (/mcl)	212.000
IgG (%)	59
IgA (%)	29
Bence Jones (%)	12
PCR mediana	0.34
Beta 2 M mediana	2.86
LDH mediana	281
Osteolisi > 2 (%)	50
Creatininemia > 2 g/dl (%)	10
PC midollari mediana (%)	50
Pazienti valutati in FISH	70/96
FISH + (Δ 13)	35/70

FIGURA 2



Il 93% dei pts ha ricevuto Tx1 (89/96) e il 61% ha ricevuto Tx2 (59/96)

FIGURA 3

Concentrazioni sieriche di b-FGF, IL-6, TNF- α e VEGF in controlli sani e in pazienti con mieloma multiplo alla diagnosi

Mean +/- SEM	Controls (32)	Patients (96)	<i>p</i>
b-FGF (pg/ml)	21.41 +/- 5.15	48.74 +/- 3.79	< 0.0001
IL-6 (pg/ml)	5.09 +/- 0.58	372.20 +/- 131.36	0.04
TNF-a (pg/ml)	12.75 +/- 0.80	22.94 +/- 4.47	n.s.
VEGF (pg/ml)	243.84 +/- 29.69	247.66 +/- 24.56	n.s.

FIGURA 4

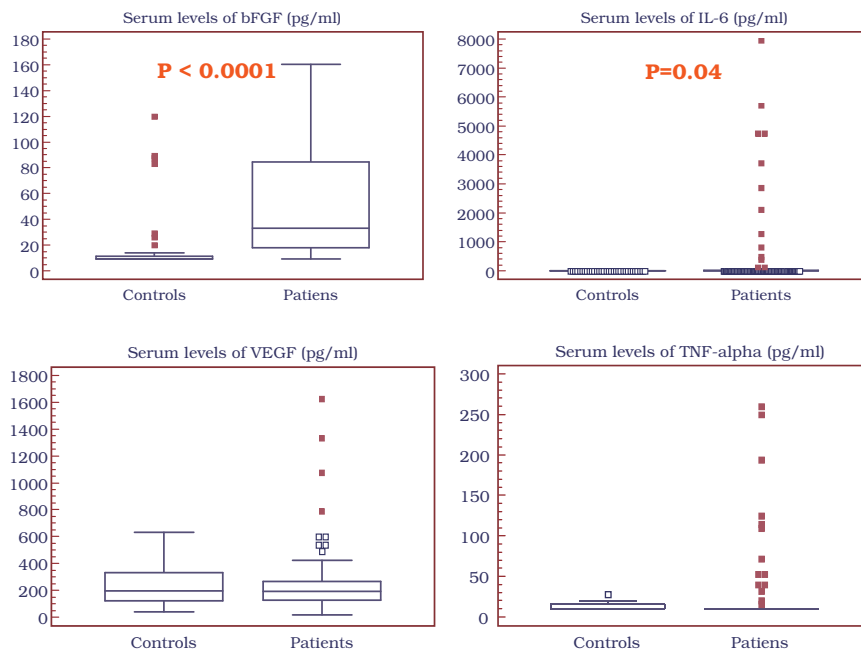


FIGURA 5

Correlazione tra le concentrazioni di citochine pre-trattamento e le altre caratteristiche alla diagnosi (Spearman rank)

	IL-6	TNF- α	bFGF	VEGF	PLTS	β -2 M	LDH
IL-6		< 0.0001	NS	0.0142	NS	NS	NS
TNF- α	< 0.0001		NS	NS	NS	NS	NS
bFGF	NS	NS		NS	NS	NS	NS
VEGF	0.0142	NS	NS		0.0015	NS	NS

FIGURA 6

Variabili con valore prognostico indipendente per la risposta a tali-dex (logistic regression analysis)

	<i>p</i>
b-FGF	0,3288
IL-6	0,7850
TNF-α	0,4103
VEGF	0,8613
LDH	0,0084
BONE LESIONS	0,0458

FIGURA 7

Concentrazioni sieriche di b-FGF, IL-6, TNF- α e VEGF prima e dopo talidomide e desametasone

	Prior tali-dex	After tali-dex	<i>p</i> *
b-FGF (pg/ml)	Mean	48.74	46.57
	DS	37.19	32.22
	Median	33.05	36.15
IL-6 (pg/ml)	Mean	372.20	214.96
	DS	1287.14	948.11
	Median	4	4
TNF-α (pg/ml)	Mean	22.94	24.25
	DS	43.80	75.13
	Median	10	10
VEGF (pg/ml)	Mean	247.66	403.10
	DS	240.64	330.43
	Median	190.00	271.47

* Using non-parametric Wilcoxon-signed test for paired samples

FIGURA 8

Livelli sierici di b-FGF alla diagnosi, dopo tali-dex, dopo Tx_1 e dopo Tx_2

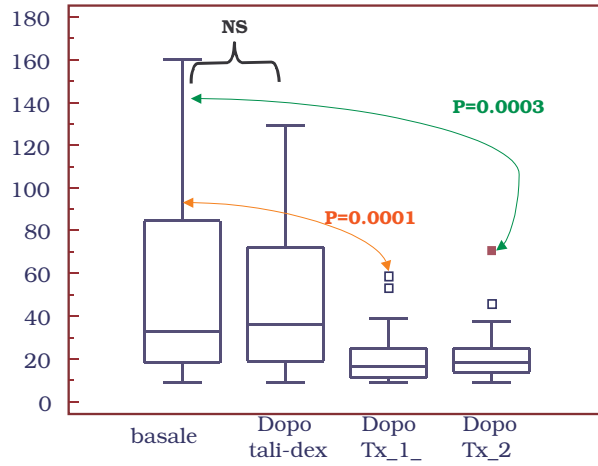


FIGURA 9

Livelli sierici di IL-6 alla diagnosi, dopo tali-dex, dopo Tx_1 e dopo Tx_2

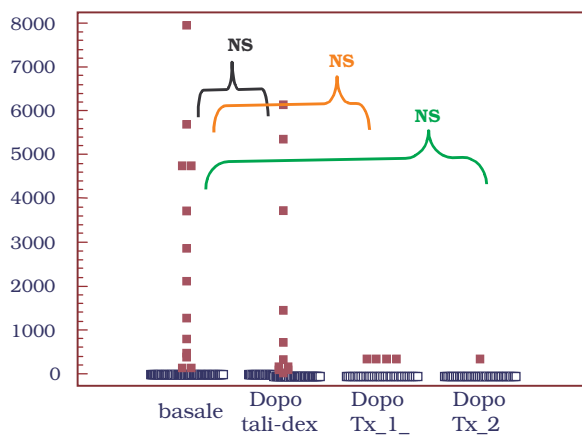


FIGURA 10

Livelli sierici di IL-6 alla diagnosi, dopo tali-dex, dopo Tx_1 e dopo Tx_2 in coloro con valori basali > valore soglia (4 pg/ml)

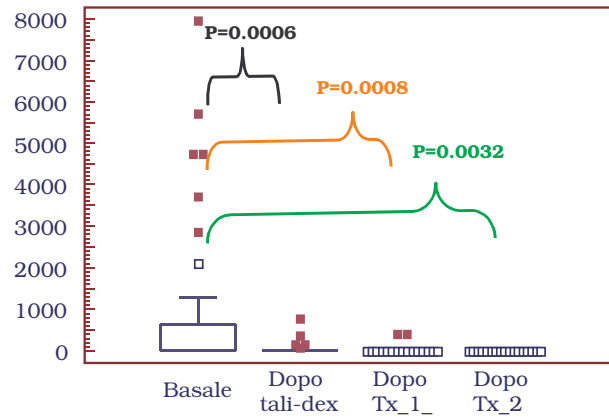


FIGURA 11

Livelli sierici di TNF-a alla diagnosi, dopo tali-dex, dopo Tx_1 e dopo Tx_2

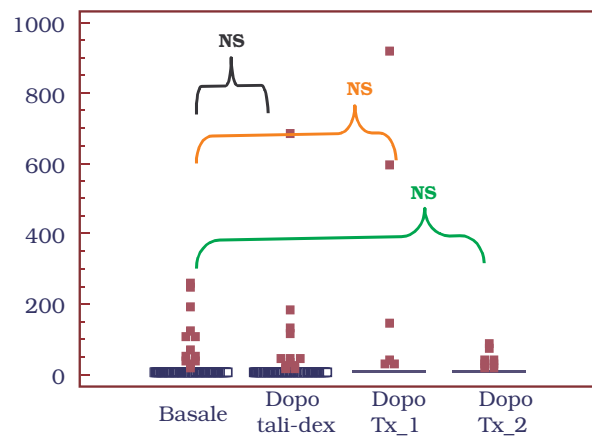


FIGURA 12

Livelli sierici di TNF-a alla diagnosi, dopo tali-dex, dopo Tx_1 e dopo Tx_2 in coloro con valori basali > valore soglia (10 pg/ml)

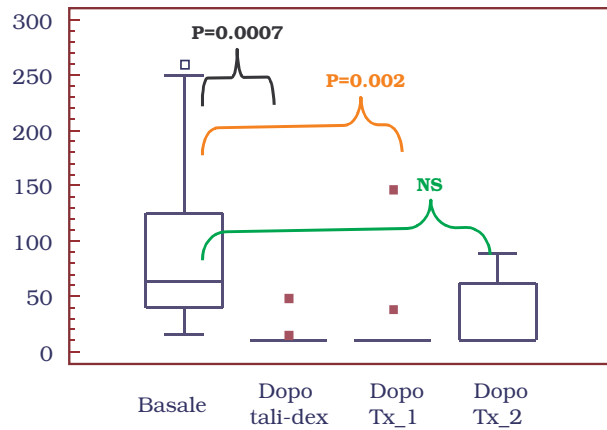


FIGURA 13

Livelli sierici di VEGF alla diagnosi, dopo tali-dex, dopo Tx_1 e dopo Tx_2

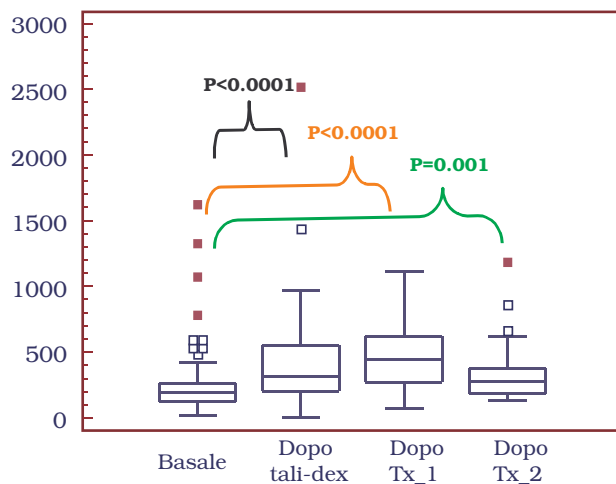


FIGURA 14

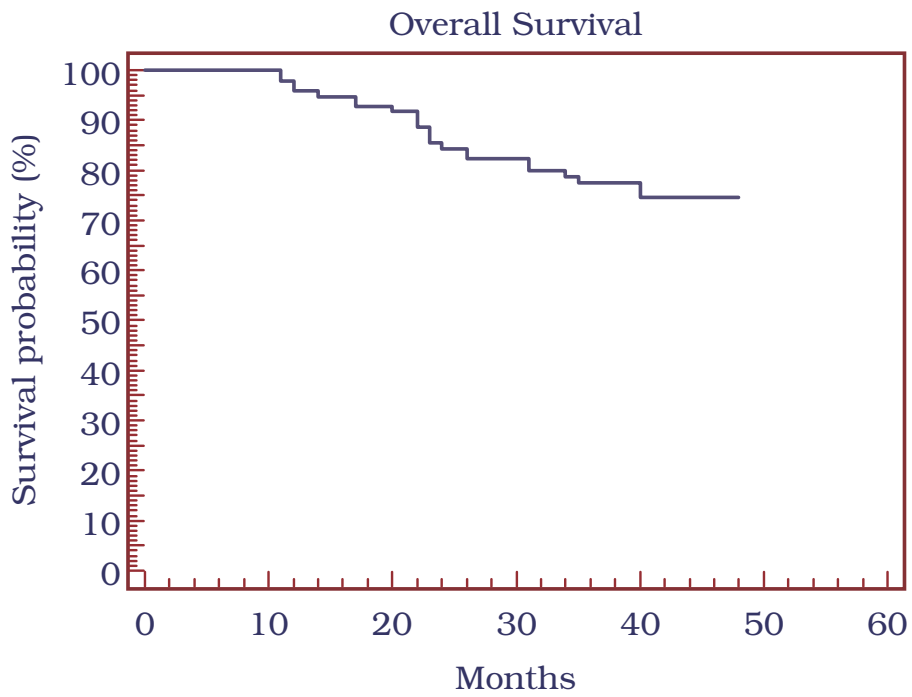


FIGURA 15

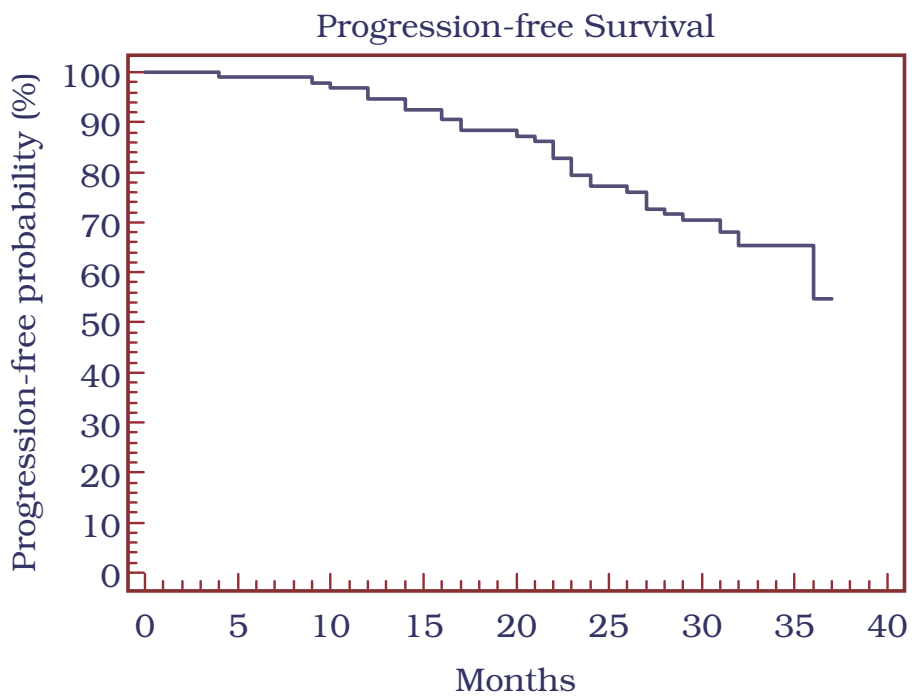
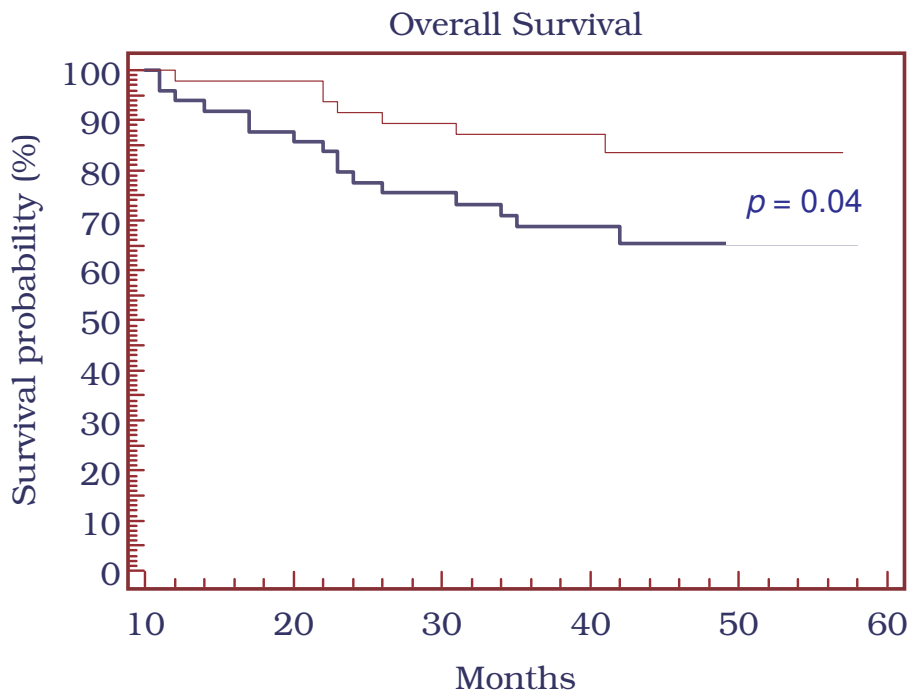


FIGURA 16



La linea rossa indica pazienti con bFGF basali > 33 pg/ml e la linea blu i pazienti con bFGF basali < o = a 33 pg/ml. ($p = 0.04$)

FIGURA 17

BIBLIOGRAFIA

- Adams J., The proteasome: structure, function and role in the cell. *Cancer Treat. Rev.*, 2003; 29 (suppl.1): 3-9
- Alegre A., Lamana M., Arranz R. et al., Busulphan and melphalan as conditioning regimen for autologous peripheral blood stem cell transplantation in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 1995, 91: 380-386.
- Alexanian R., Haut A., Khan AU. et al., Treatment for multiple myeloma: combination chemotherapy with different melphalan dose regimens. *JAMA* 1969, 208: 1680-1685.
- Alexanian R., Dimopoulos MA. et al., The treatment of multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*, 1994, 330: 484-489.
- Alexandrakis MG, Sfiridaki A, Miyakis S et al, Relationship between serum levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor and metalloproteinase-9 with biochemical markers of bone disease in multiple myeloma. *Clin Chim Acta*, Dec 2006 (Epub ahead of print)
- Alexandrakis MG, Passam FH, BoulaA, et al. Relationship between circulating serum soluble interleukin-6 receptor and the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in multiple myeloma. *Ann Hematol*, 2003, 82: 19-23.
- Alexanian R., Dimopoulos MA., Smith T. et al., Early myeloablative therapy for multiple myeloma. *Blood*, 1994, 84: 4278-4282.
- Alexanian R., Dimopoulos MA., Smith T. et al., Limited value of myeloablative therapy for late multiple myeloma. *Blood*, 1994, 83: 512-516.
- Anagnostopoulous A, Weber D., Rankin K., et al, Thalidomide and Dexamethasone for resistant multiple myeloma, *Br J Haematology*, 2003, 121: 768-771.

- Attal M., Huguet F., Schlaifer D. et al., Intensive combined therapy for previously untreated aggressive myeloma. *Blood*, 1992, 79: 1130-1136.
- Attal M., Harousseau JL., Stopa AM. et al., High dose therapy in multiple myeloma: final analysis of a prospective randomized study of the Intergroupe Francophone du Myélome (IFM 90). *Blood*, 1995, 86 (suppl 1): 485a.
- Attal M., Harousseau JL., Autologous transplantation in multiple myeloma. In Gahrton G., Durie BGM (eds): *Multiple myeloma*, London, UK, Arnold, 1996, p182.
- Attal M., Harousseau JL., Stopa AM. et al., A prospective randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.*, 1996, 335: 91.
- Attal M., Harousseau JL., Fancon T., Single versus double transplantation in myeloma: a prospective randomized trial of the Intergroupe Francophone du Myélome (IFM). *Blood*, 2000, 96: 557a.
- Attal M., Harousseau JL., Randomized Trial Experience of the Intergroupe Francophone du Myélome. *Semin. Hematol.*, 2001, 38: 226-230.
- Attal M., Harousseau JL., Fancon T. et al., Single versus double autologous stem cell transplantation for Multiple Myeloma, *New England Journal of Medicine*, 2003; 349; 26:2495-2502.
- Avet-Loiseau H., Li JY., Fancon T. et al., High incidence of translocation t(11 ;14) (q13 ;q32) and t(4 ;14) (p16 ;q32) in patients with plasma cells malignancies. *Cancer Res.*, 1998, 58: 5640-5645.
- Avet-Loiseau H., Fancon T., Daviet A. et al., 14q32 translocations and monosomy 13 observed in monoclonal gammopathy of undetermined significance delineate a multistep process for the oncogenesis of multiple myeloma. Intergroupe Francophone du Myelome, *Cancer Res*, 1999, 59:4546-50.

- Avet-Loiseau H., Fancon T., Grosbois B. et al., Oncogenesis of multiple myeloma: 14q32 and 13q chromosomal abnormalities are not randomly distributed, but correlate with natural history, immunological features, and clinical presentation. *Blood*, 2002, 99: 2185-2191.
- Avet-Loiseau., Moreau F., Charbonnel C. et al, A comprehensive analysis of cytogenetic abnormalities in myeloma: results of the FISH analysis of 1000 patients enrolled in the IFM99 trials, *Blood*, 2005, 106(11): 185a.
- Badros A., Zangari M., Bodenner D., Hypothyroidism in patients with multiple myeloma receiving thalidomide, *Blood*, 2000, 96: 285b.
- Baidas S.M., Winer E.P.; Fleming G.M., Phase II evaluation of Thalidomide in patients with metastatic breast cancer, *Journal of clinical oncology*, 2000; 18:2710-2717.
- Bamias A, Dimopoulos MA. Angiogenesis in human cancer: implications in cancer therapy. *Eur J Int Med*, 2003; 14: 459-469
- Barlogie B., Hall R., Zander A., Dicke K. & Alexanian R., High-dose melphalan with autologous bone marrow transplantation for multiple myeloma. *Blood*, 1986, 67: 1298-1301.
- Barlogie B., Alexanian R., Dicke KA. et al., High dose chemoradiotherapy and autologous bone marrow transplantation for resistant multiple myeloma. *Blood*, 1987, 70: 869-872.
- Barlogie B., Jagannath S., Vesole DH. et al., Superiority of tandem autologous transplantation over standard therapy for previously untreated multiple myeloma. *Blood*, 1997, 89: 789-793.
- Barlogie B., Jagannath S., Naucke S., Mattox S. et al., Long-term follow-up after high-dose therapy for high-risk multiple myeloma. *Bone Marrow Transplantation*, 1998, 21: 1101-1107.
- Barlogie B., Jagannath S., Desikan KR. et al., Total therapy with tandem transplant for newly diagnosed multiple myeloma. *Blood*, 1999, 93: 55-65.

- Barlogie B., Zangari M., Spencer T. et al., Thalidomide in the management of multiple myeloma, *Seminars in Haematology*, 2001, 38 : 250-259.
- Barlogie B., Desikan R., Eddleman P. et al., Extended survival in advanced and refractory multiple myeloma after single-agent thalidomide : identification of prognostic factors in a phase II study of 169 patients, *Blood*, 2001, 98: 492-494.
- Barlogie B., Shaughnessy J., Tricot G., et al, Treatment of multiple myeloma, *Blood*, 2004, 1: 20-32.
- Barlogie B., Kyle A., Anderson KC. et al, Standard chemotherapy compared with high-dose chemoradiotherapy for multiple myeloma: final results of phase III US Intergroup trial S9321, *Journal of Clinical Oncology*, 2006, 24: 1-9.
- Barlogie B., Tricot G., Van Rhee F. et al, Long-term outcome results of the first tandem autotransplant trial for multiple myeloma, *British Journal of Haematology*, 2006, 135: 158-64.
- Barlogie B., Tricot G., Anaissie E. et al, Thalidomide and hematopoietic-cell transplantation for multiple myeloma, *N Engl J Med*, 2006, 354: 1021-30.
- Bast EJE, Van Camp B., Reinaert P. et al., Idiotypic peripheral blood lymphocytes in monoclonal gammopathy. *Clinical and Experimental Immunology*, 1982, 47: 677-682.
- Bataille R., Chappard D. & Klein B., Mechanisms of bone lesions in multiple myeloma. *Haematology-Oncology Clinics of North America*, 1992, 6: 285-295.
- Bataille R., Boccadoro M., Klein B. et al., C-reactive protein and beta-2 microglobulin produce a simple and powerful myeloma staging system, *Blood*, 1992, 80: 733-37.
- Baz R., Li L., Kottle-Marchant k. et al, The role of aspirin in the prevention of thrombotic complications of thalidomide and anthracycline-based chemotherapy for multiple myeloma, *Mayo Clinic Proceedings*, 2005, 80(12). 1549-51.

- Bennet CL., Schumok GT., Kwaan HC. et al., High incidence of thalidomide-associated deep vein thrombosis and pulmonary emboli when chemotherapy is also administered, *Blood*, 2001, 98: 161a.
- Berenson J., Wong R., Kim K. et al, Evidence for peripheral blood B lymphocytes but not T lymphocytes involvement in multiple myeloma. *Blood*, 1987, 70: 1550-1553.
- Berenson J.R., Yang H.H., Sadler K. et al., Phase I/II trial assessing bortezomib and melphalan combination therapy for the treatment of patients with relapsed or refractory multiple myeloma. *Journal of Clinical Oncology*, 2006; 24: 1-8.
- Bergsagel DE., Chemotherapy of myeloma, in Malpas JS., Bergsagel DE., Kyle RA. (a cura di), *Myeloma. Biology and Management*, Oxford Medical Publications, 1995: 273-306.
- Bergsagel DE., Cowan DH., Hasselback R. et al., Plasma cell myeloma: response of melphalan resistant patients to high dose intermittent Cyclophosphamide. *Canadian Medical Association Journal*, 1972, 107: 851.
- Bergsagel PL., Kuehl W., Critical roles for immunoglobulin translocations and cyclin D dysregulation in multiple myeloma, *Immunol Rev*, 2003, 194:96-104.
- Besinger W.I., Buckner C.D., Anasetti C. et al., Allogeneic marrow transplantation for multiple myeloma: an analysis of risk factors on outcome. *Blood*, 1996; 88: 2787-2793
- Billadeau D., Quam L., Thomas W. et al., Detection and quantification of malignant cells in the peripheral blood of multiple myeloma patients. *Blood*, 1992, 80 : 1818-1824.
- Björkstrand B., Ljungman P., Bird JM., Samson D., Gahrton G. et al., Double high dose chemoradiotherapy with autologous stem cell transplantation can induce molecular remissions in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplantation*, 1995, 15: 367-371.

- Bjorkstrand B.B., Ljungman P., Svensson H. et al., Allogeneic bone marrow transplantation vs. autologous stem cell transplantation on multiple myeloma: a retrospective case-matched study from the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*, 1996; 88: 4711-4718
- Bladè J., Samson D., Reece D., et al, Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated with high-dose therapy and haematopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematology*, 1998, 102: 1115-1123.
- Bladé J. & Esteve J., Viewpoint on the impact of interferon in the treatment of multiple myeloma: benefit for a small proportion of patients. *Medical Oncology*, 2000, 17: 77-84.
- Caligaris Cappio F., Bergui L., Gregoretti MG. et al., Role of bone marrow stromal cells in the growth of human multiple myeloma. *Blood*, 1991, 77: 2688-2693.
- Caligaris Cappio F., Gregoretti MG., Ghia P. et al., In vitro growth of human multiple myeloma: implications for biology and therapy. *Hematology-Oncology Clinics of North America*, 1992, 6: 257-271.
- Cavo M., Gozzetti A., Lemoli RM. et al., High response rate to sequential courses of myeloablative therapy with double autotransplants for primary refractory multiple myeloma. *Haematologica*, 1996, 81: 98.
- Cavo M., Benni M., Ronconi S. et al, Melphalan-prednisone versus alternating combination VAD/MP or VND/MP as primary therapy for multiple myeloma: final analysis of a randomized clinical study. *Haematologica*, 2002, 87: 934-942.
- Cavo M., Zamagni E., Cellini C., et al, Deep vein thrombosis in patients with multiple myeloma receiving first-line thalidomide-dexamethasone therapy, *Blood*, 2002, 100: 2273.
- Cavo M., Zamagni E. , Tosi P. et al, First-line therapy with thalidomide and dexamethasone in preparation for autologous stem

cell transplantation for multiple myeloma, *Haematologica*, 2004, 89: 826-31.

- Cavo M., Zamagni E., Tosi P. et al., Superiority of thalidomide and dexamethasone over vincristine-doxorubicin-dexamethasone (VAD) as primary therapy in preparation for autologous transplantation for multiple myeloma, *Blood*, 2005, 106(1): 35-39.
- Cavo M., Terragna C., Renzulli M et al, Poor outcome with front-line autologous transplantation in t(4;14) multiple myeloma: low complete remission rate and short duration of remission, *Journal of Clinical Oncology*, 2006, 24: e4-5
- Chang H., Qi C., Qi Yi et al., P53 gene deletion detected by fluorescence in situ hybridization is an adverse prognostic factor for patients with multiple myeloma following autologous stem cell transplantation, *Blood*, 2005, 105(1): 358-60.
- Chauhan D., Uchiyama H., Akbarali Y. et al., Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B, *Blood*, 1996, 87: 1104-12.
- Chaundry V., Cornblath DR., Corse A. et al., Thalidomide induced neuropathy, *Neurology*, 2002, 59: 1872-1875.
- Chesi M., Bergsagel PL., Brents LA. et al., Dysregulation of Cyclin D1 by translocation into an IgH gamma switch region in two multiple myeloma cell lines, *Blood*, 1996, 88: 674-81.
- Chiarle R. et al., Increased proteasome degradation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27 is associated with a decreased overall survival in mantle cell lymphoma. *Blood*, 2000; 95: 619-626.
- Child JA., Gareth JM., Davies FE. et al, High-dose chemotherapy with haematopoietic stem-cell rescue for multiple myeloma, *N Engl J Medicine*, 348: 1875-1883.
- Chng WJ., Ketterling RP., Fonseca R, Analysis of genetic abnormalities provides insights into genetic evolution of hyperdiploid myeloma, *Genes, Chromosomes & Cancer*, 2006, 45: 1111-20.

- Clark P. & Walker ID., The phenomenon known as acquired activated protein C resistance, *British Journal of Haematology*, 2001, 115: 767-773.
- Corradini P., Boccadoro M., Voena C. et al., Evidence for a bone marrow B cell transcribing malignant plasma cell VDJ joined to Cm sequence in immunoglobulin IgG and IgA secreting multiple myelomas. *Journal of Experimental Medicine*, 1993, 178: 1091-1096.
- Croucher PI., Shipman CM., Lippitt J. et al, Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood*, 2001, 98(13): 3534-3540.
- Cunningham D., Powles R., Malpas J. et al., A randomized trial of maintenance interferon following high-dose chemotherapy in multiple myeloma: long term follow-up results. *British Journal of Haematology*, 1998, 102: 495-502.
- Cuzick J., Cooper EH., Mac Lennan IC., The prognostic value of serum beta-2 microglobulin compared with other presentation features in myelomatosis. *Br. J. Cancer*, 1985, 52: 1-6.
- Debes-Marun C., Dewald G., Bryant S. et al., Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma, *Leukemia*, 2003, 17: 427-36.
- Desikan R., Barlogie B., Sawyer J. et al., Results of high-dose therapy for 1000 patients with multiple myeloma : durable complete remission and superior survival in the absence of chromosome 13 abnormalities, *Blood*, 2000, 95: 4008-10.
- Desikan RK., Jagannath S., Therapeutic dilemmas with thalidomide in multiple myeloma: case discussions, *Seminars in Oncology*, 2001, 28: 593-596.
- Dewald GW., Kyle RA., Hicks GA. et al., The clinical significance of cytogenetic studies in 100 patients with multiple myeloma, plasma cell leukaemia, or amyloidosis, *Blood*, 1985, 66: 380-90.

- Dimopoulos MA., Barlogie B., Smith TL et al., High serum lactate dehydrogenase level as a marker for drug resistance and short survival in multiple myeloma. *Ann. Intern. Med.*, 1991, 115: 931-035.
- Dimopoulos MA., Mouloupoulos A., Smith T. et al., Risk of disease progression in asymptomatic multiple myeloma. *Am. J. Med.*, 1993, 94: 57.
- Dimopoulos MA., Panayiotidis P., Grigoraki V. et al., Oral hyperfractionated cyclophosphamide and intermittent thalidomide-dexamethasone for previously treated patients with multiple Myeloma, *Blood*, 2001, 98: 164a.
- Dimopoulos MA., Zervas K., Kouvatseas G. et al, Thalidomide and dexamethasone combination for refractory multiple myeloma, *Ann Oncology*, 2001, 12: 991-995
- Dimopoulos MA., Anagnostopoulos A., Weber D., Treatment of plasma cells dyscrasias with Thalidomide and its derivatives, *Journal of Clinical Oncology*, 2003, 23:4444-54.
- Dimopoulos MA., Spencer A., Attal M. et al, Study of lenalidomide plus dexamethasone versus dexamethasone alone in relapsed or refractory multiple myeloma (MM): results of a phase 3 study (MM-010), *Blood*, 2005, 106: 6a.
- Di Raimondo F., Azzaro M.P., Palumbo G.A. et al., Angiogenic factors in multiple myeloma: higher levels in bone marrow than in peripheral blood, *Haematologica*, 2000; 85:800-805.
- Donovan KA., Lacy MQ., Kline MP. et al., Contrast in cytokine expression between patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance or multiple myeloma. *Leukemia*, 1998, 12: 593.
- Dracopoli NC., *Current Protocols in Human Genetics*. John Wiley: New York, 1995.
- Duhrsen V., Villeval JL., Boyd J., Kannourakis G., Moerstyn G., Metcalf D., Effects of recombinant human granulocyte colony-

stimulating factor on hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Blood*, 1993, 81: 3158-3163.

- Durie BGM., Salmon SE., A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment and survival. *Cancer*, 1975, 36: 842-854.
- Einsele H., Schafer H.J., Hebart H. et al., Follow-up on patients with progressive multiple myeloma undergoing allograft after reduced-intensity conditioning. *British Journal of Haematology*, 2003; 121:411-418
- Fabarius A., Helmann R., Duesberg PH. et al., Instability of chromosome structure in cancer cells increases exponentially with degrees of aneuploidy, *Cancer Genet Cytogenet*, 2003, 143: 59-72.
- Fahadi IE., Gaddam V., Saucedo JF. et al, Bradycardia during therapy for multiple myeloma with thalidomide, *American Journal of Cardiology*, 2004, 93: 1052-55.
- Fancon T., Avet-Loiseau H., Guillerme G. et al., Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum β 2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood*, 2001, 95: 1566-1571.
- Femand JP., Chevret S., Ravaud P. et al., High-dose chemoradiotherapy and autologous blood stem cell transplantation in multiple myeloma: results of a phase 2 trial involving 63 patients. *Blood*, 1993, 82: 2005-2009.
- Fine H.A., Figg W.D., Jaeckle K. et al., Phase II trial of the antiangiogenic agent Thalidomide in patients with recurrent high-grade gliomas, *Journal of Clinical Oncology*, 2000; 18:708-715.
- Folkman J., What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?, *Journal of National Cancer Institute*, 1990; 82:4-6.
- Fonseca R., Hrrington D., Oken M. et al., Myeloma and the t(11;14)(q13;q32) rapresents a uniquely defined biological subset of patients, *Blood*, 2002, 99: 3735-41.

- Fonseca R., Oken M., Harrington D. et al., Deletions of chromosome 13 in multiple myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q-arm or monosomy, *Leukemia*, 2001, 15:981-86.
- Fonseca R., Oken MM., Greipp PR., The t(4;14) (p16.3;q32) is strongly associated with chromosome 13 abnormalities in both multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood*, 2001, 98: 1271-1272.
- Fonseca R., Harrington D., Oken M. et al., Biologic and prognostic significance of interphase FISH detection of chromosome 13 abnormalities ($\Delta 13$) in multiple myeloma: an Eastern Cooperative Group (ECOG) Study, *Cancer Res*, 2002, 62: 715-20.
- Fonseca R., Blood E., Rue M. et al., Clinical and biologic implications of recurrent genomic aberrations in myeloma, *Blood*, 2003; 101: 4569-75.
- Fonseca R., Debes-Marun CS., Picken EB. et al., The recurrent IgH translocations are highly associated with nonhyperdiploid variant multiple myeloma. *Blood*, 2003, 102: 2562-67.
- Fonseca R., van Wier SA., Chng WJ. et al., Prognostic value of chromosome 1q21 gain by fluorescent in situ hybridization and increase CKS1B expression in myeloma, *Leukemia*, 2006, Oct 5, Epub ahead of print.
- Fritz E., Ludwig H., Kundi M., Prognostic relevance of cellular morphology in multiple myeloma. *Blood*, 1984, 63: 1072-1079.
- Gabilovich DI., Chen HL., Girgis KR. et al., Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med*, 1996, 2: 5991-6000.
- Gahrton G., Svensson H., Cavo M. et al., Progress in allogeneic bone marrow and peripheral blood stem cell transplantation for multiple myeloma: a comparison between transplant performed 1983-93 and 1994-98 at European Group for Blood and Marrow

Transplantation centres. *British Journal of Haematology*, 2001; 113: 209-216

- Garban F., Attal M., Michallet M. et al., Prospective comparison of autologous stem cell transplantation followed by a dose-reduced allograft (IFM99-03 trial) with tandem autologous stem cell transplantation (IFM99-04 trial) in high risk de novo multiple myeloma. *Blood*, 2006, 107(9): 3474-80.
- Gazzit Y., Reading C., Hoffman R. et al., Purified CD34 + Lin⁻ Thy⁺ stem cells do not contain clonal myeloma cells. *Blood*, 1995, 86: 381-389.
- Gertz MA., Lacy MQ., Dispenzieri A. et al, Clinical implications of t(11;14)(q13;32), t(4;14)(p16.3;q32), and -17p13 in myeloma patients treated with high-dose therapy, *Blood*, 106: 2837-40.
- Ghobrial Im., Dispenzieri A., Bundha KL. et al, Effect of thalidomide on stem cell collection and engraftment in patients with multiple myeloma, *BM Transplantation*, 2003, 32: 587-592.
- Giannini F., Volpi N., Rossi S. et al., Thalidomide neuropathy: a Ganglionopathy?, *Neurology*, 2002, 60: 877-878.
- Goldie JH., Coldman AJ., Gudauskas GA. et al., Rationale for the use of alternating non cross-resistance chemotherapy. *Cancer Treatment Reports*, 1982, 66: 439.
- Gould J., Alexanian R., Goodacre A. et al., Plasma cell karyotype in multiple myeloma, *Blood*, 1988, 71: 453-56.
- Greipp PR., Lust JA., O'Fallon WM. et al., Plasma cell labelling index and beta-2 microglobulin predict survival independent of thymidine kinase and C-reactive protein in multiple myeloma, *Blood*, 1993, 81: 3382-87.
- Greipp PR., Prognosis in myeloma, *Mayo Clin Proc*, 1994, 69:895.
- Greipp PR., San Miguel J., Durie BGM. et al., International Staging System for multiple myeloma, *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 15: 3412-20.

- Grosbois B., Bellissant E. Moreau P. et al., Thalidomide in the treatment of advanced multiple myeloma. A prospective study of 120 patients, *Blood*, 2001, 98 : 163a.
- Gutierrez N.C., Castellanos M., Hernandez J.M., Biological and prognostic implications of IgH, Rb and p53 abnormalities in multiple myeloma: a study of the myeloma spanish group (GEM-2000). *The Haematology Journal*, 2005; 90(1): 71 abstract
- Hallek M., Bergsagel PL., Anderson KC., Multiple myeloma increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood*, 1998, 91: 3-21.
- Hanahan D., Folkman J. et al., Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis, *Cell*, 1996; 86:353.364.
- Harousseau JL., Milpied M., La Porte JP. et al., Double-intensive therapy in high-risk multiple myeloma. *Blood*, 1992, 79: 2827-2833.
- Harousseau JL, Attal M., Divine M. et al., Autologous stem cell transplantation after first remission induction treatment in multiple myeloma: a report of the French registry on autologous transplantation in multiple myeloma. *Blood*, 1995, 85: 3077-3085.
- Harousseau JL., Attal M., Divine M. et al., Comparison of autologous bone marrow transplantation and peripheral blood stem cell transplantation after first remission induction treatment in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplant*, 1995, 15: 963.
- Harousseau JL. et al, Bortezomib (Velcade) plus dexamethasone as induction treatment prior to autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: results of an IFM phase II. Proceedings ASCO, 2005.
- Hatjiharissi E, Terpos E, Papaioannou M et al. The combination of intermediate doses of thalidomide and dexamethasone reduced bone marrow micro-vessel density but not serum levels of angiogenic cytokines in patients with refractory/relapsed multiple myeloma. *Hematol Oncol*. 2004, 22(4): 159-68.

- Hideshima T., Chauhan D., Shima Y. et al, Thalidomide and its analogues overcome drug resistance of human multiple myeloma cells to conventional therapy. *Blood*, 2000, 96: 2943-2950.
- Hideshima T., Chauhan D., Schlossman R. et al., The role of tumor necrosis factor alpha in the pathophysiology of human multiple myeloma: therapeutic applications. *Oncogene*, 2001, 20: 4519-27.
- Hideshima T. et al., NF-kB as a therapeutic target in multiple myeloma. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 16639-16647
- Hideshima T., Richardson P.G., Chauhan D. et al., The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Research*, 2001; 61: 3071-3076.
- Hideshima T. et al., Molecular mechanism of novel therapeutic approaches for multiple myeloma. *Nature Review Cancer*, 2002; 2: 927-937
- Hofbauer LC., Khosla S., Dunstan CR. et al, The roles of osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *Journal of Bone and Mineral Research*, 2000, 15:2-12.
- Isoardo G., Bergui M., Durelli L. et al., Thalidomide neuropathy: clinical, electrophysiological and neuroradiological features, *Acta Neurologica Scandinavica*, 2004, 109: 188-193.
- Iwasaki T, Hamano T, Ogata A, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor in multiple myeloma. *Br. J Haemat.* 2002, 116: 796-802
- Jacob C, Serz J, Zavrski I, et al. Angiogenesis in multiple myeloma. *Eur J of Cancer*, 2006, 42: 1581-1590
- Jagannath S., Vesole DH., Glenn L., Crowley J., Barlogie B. et al., Low-risk intensive therapy for multiple myeloma with combined autologous bone marrow and blood stem cell support. *Blood* ,1992, 80: 1666-1672.

- Jagannath S.V., Barlogie B., Berenson J. et al., A phase II study of two doses of bortezomib in relapsed or refractory myeloma. *British Journal of Haematology*, 2004; 127: 165-172-
- Jaccic W., Trudel S., Chang H. et al., Clinical outcomes in t(4;14) multiple myeloma: a chemotherapy-sensitive disease characterized by rapid relapse and alkylating resistance, *Journal of Clinical Oncology*, 2005, 23: 7069-73.
- Juliusson G., Celsing F., Turesson I: et al., Frequent good partial remissions from Thalidomide including best response ever in patients with advanced refractory and relapsed myeloma, *British Journal of Haematology*, 2000; 109: 89-96.
- Keats JJ., Reiman T., Maxwell CA. et al, in multiple myeloma, t(4;14)(p16;q32) is an adverse prognostic factor irrespective of FGFR3 expression, *Blood*, 2003, 101:1520-29.
- Kishimoto T, The biology of interleukin-6. *Blood*, 1989, 74:1.
- Klein B., Zhang XG., Jourdan M. et al., Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*, 1989, 73: 17-26.
- Kropff M. et al., Bortezomib in combination with dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *Leukemia Research*, 2005; 29: 587-90.
- Kyle RA., Prognostic factors in multiple myeloma. *Stem Cell*, 1995, 2: 56.
- Lacey DL., Timms E., Tan HL. et al, Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998, 93: 165-176.
- Lacy MQ., Donovan KA., Heimbach JK. et al, Comparison of interleukin-1beta expression by in situ hybridization in monoclonal gammopathy of undetermined significance and multiple myeloma. *Blood*, 1999, 93: 300-305.
- Le Blanc R., Catley L.P., Hideshima T. et al., Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in murine model. *Cancer Research*, 2002; 62: 4996-5000

- Lemoli RM., Fortuna A., Motta MR. et al., Concomitant mobilization of plasma cells and hemopoietic progenitors into peripheral blood of multiple myeloma patients: positive selection and transplantation of enriched CD34+ cells to remove circulating tumour cells. *Blood*, 1996, 87: 1625-1634.
- Mac Lennan ICM., In which cells does neoplastic transformation occur in myelomatosis? *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1992, 182: 209-213.
- Majolino I., Marcenò R., Buscemi F. et al., Mobilization of circulating progenitor cells in multiple myeloma during VCAD therapy with or without rhG-CSF. *Haematologica*, 1995, 80: 108-114.
- Mandelli F., Avvisati G., Amadori S. et al., Maintenance treatment with recombinant interferon alpha-2b in patients with multiple myeloma responding to conventional induction chemotherapy. *N. Engl. Med.*, 1990, 322: 1430-1434.
- Margrangeas F., Lodè L., Wuilleme S. et al., Genetic heterogeneity in multiple myeloma. *Leukemia*, 2005; 19: 191-194
- Mateos MV., Hernández JM., Hernández MT. et al., Bortezomib plus melphalan and prednisone in elderly untreated patients with multiple myeloma: results of multicenter phase I/II study, *Blood*, 2006, 108(7): 2165-72.
- Mc Elwin TJ., Powles RL. et al., High dose intravenous melphalan for plasma cell leukemia and myeloma. *Lancet*, 1983, 1: 822-824.
- Minnema MC., Fijnheer R., De Groot PG. Et al, Extremely high levels of Von Willebrand factor antigen and of procoagulant factor VIII found in multiple myeloma patients are associated with activity status but not with thalidomide treatment, *J Thrombosis Haemostasy*, 2003, 1: 445-449.
- Mitsiades N., Mitsiades CS., Poulaki V. et al, Apoptotic signaling induced by immunomodulatory thalidomide analogs in human multiple myeloma cells : therapeutic implications, *Blood*, 2002, 99: 4525-30.

- Mitsiades N. et al., Molecular sequelae of the proteasome inhibition in human multiple myeloma cells. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 2002; 99: 14374-14379
- Moheler TM., Neben K., Hawighorst H. et al., Thalidomide plus CED as salvage therapy in poor prognosis multiple myeloma, *Blood*, 2000, 96: 290b.
- Morony S., Capparelli C., Sarosi I. et al, Osteoprotegerin inhibits osteolysis and decreases skeletal tumour burden in syngenic and nude mouse models of experimental bone metastasis. *Cancer Research*, 2001, 61: 4432-4436.
- Myeloma Trialists' Collaborative Group, Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6.633 patients from 27 randomized trials. *Journal of Clinical Oncology*, 1998, 16: 3832-3842.
- Munshi N., Wilson C.S., Penn J. et al., Angiogenesis in newly diagnosed multiple myeloma : poor prognosis with increased microvessel density (MVD) in bone marrow biopsies, *Blood*, 1998,92:400a
- Nakagawa N., Kinosaki M., Yamaguchi K. et al, RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1998, 253: 395-400.
- Neri A., Murphy JP., Cro L. et al., Ras oncogene mutation in multiple myeloma. *Journal of Experimental Medicine*, 1989, 170: 1715-1725.
- Neri A., Baldini L., Tracca D. et al., p53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancies. *Blood*, 1993, 81: 128-135.
- Nishida K., Tamura A., Nakazawa N. et al., The Ig heavy chain gene is frequently involved in chromosomal translocations in

multiple myeloma and plasma cell leukaemia as detected by in situ hybridization, *Blood*, 1997, 90: 526-34.

- Oakerwee H., Gupta V., Smith ML. et al., Response to thalidomide can be predicted by paraprotein quantitation 14 days after initiating therapy, , *B. Journ. of Haematol*, 2001, 113 (Suppl.1): 40.
- Oakerwee H., Brownell A., Cervi P. et al., A study of the safety and efficacy of Thalidomide combined with vincristine, adriamycin, and dexamethasone in the treatment of younger patients with multiple myeloma: a UK Myeloma Forum pilot study, *B. Journ. of Haematol*, 2002, 117(suppl1): 65.
- Oakerwee H., Baugh H., Boots M. et al., A study of the safety and efficacy of oral melphalan, prednisolone and thalidomide in the treatment of multiple myeloma: a UK Myeloma Forum pilot study, *B. Journ. of Haematol*, 2002, 117(suppl1): 66.
- Oakerwee HE., Popat R., Curry N. et al., PAD combination therapy (PS-341/bortezomib, doxorubicin and dexamethasone) for previously untreated patients with multiple myeloma, *British Journal of Haematology*, 2005, 129: 755-62.
- Ogata A., Chauhan D, Teoh G. et al., IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade, *J Immunol*, 1997, 159: 2212-21.
- Olson K.B., Hall T.C., Horton J. et al., Thalidomide (N-phthaloylglutamimide) in the treatment of advanced cancer, *Clinical Pharmacology and Therapy*, 1965; 6:292-7.
- Orłowski M. et al., Catalytic activities of the 20S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 383: 1-16.
- Orłowski R.Z. et al., Phase I trial of the proteasome inhibitor Bortezomib and pegylated liposomal doxorubicin in patients with advanced hematologic malignancies. *Blood*, 2005; 105: 3058-65.

- Osman K., Comenzo R. & Rajkumar SV., Deep venous thrombosis and thalidomide therapy for multiple myeloma, *The New England Journal of Medicine*, 2001, 344: 1951-1952.
- Palumbo A., Giaccone L., Bertola A. et al, Low-dose thalidomide plus dexamethasone is an effective salvage therapy for advanced multiple myeloma, *Haematologica*, 2001, 86: 399-403.
- Palumbo A., Bringhen S., Caravita T. et al, Oral melphalan and prednisone chemotherapy plus thalidomide compared with melphalan and prednisone alone in elderly patients with multiple myeloma: randomized control trial, *The Lancet*, 2006, 367(9513): 825-831.
- Pey X.Y. et al., Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors, *Clinical Cancer Research*, 2004, 10: 3839-52.
- Pileri A., Tarocco RP., In vivo Kinetic studies in human myeloma. *Haematologica*, 1974, 59:10.
- Podar k., Tay YT., Davies FE. et al., Vascular endothelial growth factor triggers signaling cascades mediating multiple myeloma cell growth and migration, *Blood*, 2001, 98: 428-35.
- Podar K. et al., Caveolin-1 is required for vascular endothelial growth factor-triggered multiple myeloma cell migration and is targeted by bortezomib. *Cancer Research*, 2004; 64: 7500-7506
- Puthier D., Thabard W., Rapp MJ. et al., Interferon α extends the survival of human myeloma cells through an upregulation of the Mcl-1 antiapoptotic molecule. *British Journal of Haematology*, 2001, 112: 358-363.
- Qin J.Z. et al., Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells. *Cancer Research*, 2005; 65: 6282-6293
- Rajkumar SV., Fonseca R., Lacy MQ. et al., Beta-2 microglobulin and bone marrow plasma cell involvement predict complete

responders among patients undergoing blood cell transplantation for myeloma. *Bone Marrow Transplant*, 1999, 23: 1261.

- Rajkumar SV., Fonseca R., Lacy MQ. et al., Plasmablastic morphology is an independent predictor of poor survival after autologous stem-cell transplantation for multiple myeloma. *J. Clin. Oncol.*, 1999, 17: 2551.
- Rajkumar SV., Fonseca R., Lacy MQ. et al., Abnormal cytogenetics predict poor survival after high dose therapy and autologous blood cell transplantation in multiple myeloma. *Bone Marrow Transplantation*, 1999, 24: 497-503.
- Rajkumar S.V., Fonseca R., Witzig T.E. et al., Bone marrow angiogenesis in patients achieving complete response after stem cell transplantation for multiple myeloma, *Leukemia*, 1999;13:469-472.
- Rajkumar SV., Gertz MA. & Witzig TE., Life-threatening toxic epidermal necrolysis with thalidomide therapy for myeloma, *The New England Journal of Medicine*, 2000, 343: 972-973.
- Rajkumar SV., Hayman SR., Gertz MA. Et al., Combination therapy with thalidomide plus dexamethasone for newly diagnosed myeloma, *Blood*, 2001, 98:849a.
- Rajkumar SV., Dispenzieri A., Lacy M. et al., Response rate and durability of response with thalidomide therapy for relapsed multiple myeloma, *Blood*, 2001, 98: 162a
- Rajkumar SV., Leonard JP., Pekle K. Et al., Thalidomide for previously untreated indolent or smouldering multiple myeloma, *Leukemia*, 2001, 15: 1274-1276.
- Rajkumar SV., Hayman S., Gertz M. et al, Combination therapy with thalidomide plus dexamethasone for newly diagnosed myeloma, *J Clin Oncol*, 2002, 20: 4319-23.
- Rajikumar SV, Mesa RA, Fonseca A et a. Bone marrow angiogenesis in 400 patients with monoclonal gammopathy of

undetermined significance, multiple myeloma and primary amyloidosis. *Clin Cancer Res.* 2002; 8: 2210-2216

- Richardson PG., Schlossman RL., Weller E. et al, Immunomodulatory drug CC-5013 overcomes drug resistance and is well tolerated in patients with relapsed multiple myeloma, *Blood*, 2002, 100:3063-67.
- Richardson P.G. et al., A phase II study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *New England Journal of Medicine*, 2003; 348: 2609-17.
- Richardson P.G., Sonneveld P., Schuster M.W. et al., Bortezomib or high-dose dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *New England Journal of Medicine*, 2005; 352: 2487-2498
- Richardson P.G., Barlogie B., Berenson J. et al., Extended follow-up of a phase II trial in relapsed, refractory multiple myeloma: final time-to-event results from the SUMMIT trial. *Cancer*, 2006; 106(6): 1316-1319
- Richardson P.G. et al., Proteasome inhibition in the treatment of cancer. *Cell Cycle*, 2005; 4: 290-296.
- Roux S., Meignin V., Quillard J. et al, RANK (receptor activator of nuclear factor- κ B) and RANKL expression in multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 2002, 117: 86-92.
- San Miguel JF., Garcia-Sanz R., Gonzalez M. et al., A new staging system for multiple myeloma based on the number of S-phase plasma cell, *Blood*, 1995, 85: 448-55.
- Sangfelt O., Osterborg A., Grandt D. et al., Response to interferon therapy in patients with multiple myeloma correlates with expression of bcl-2 oncoprotein. *Int. J. Cancer*, 1995, 63: 190.
- Sati H., Greaves M., Apperley JF. et al, Expression of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in plasma cells from patients with multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 1999, 104: 350-357.

- Sawyer JR., Tricot G., Mattox S. et al., Jumping translocations of chromosome 1q in multiple myeloma: evidence for a mechanism involving decondensation pericentromeric heterochromatin, *Blood*, 1998, 91: 1732-41.
- Schiller G., Vescio R., Freytes C. et al., Transplantation of CD34+ peripheral blood progenitors cells after high-dose chemotherapy for patients with multiple myeloma. *Blood*, 1995, 86: 390-397.
- Schreiber S., Ackermann J., Obermair A. et al, Multiple myeloma with deletion of chromosome 13q is characterized by increased bone marrow neovascularization, *British Journal of Haematology*, 2000, 110: 605-09.
- Selby PJ., Mc Elwin TJ., Nandi AC. et al., Multiple myeloma treated with high dose intravenous melphalan. *British Journal of Haematology*, 1987, 66: 55-62.
- Sengupta TK., Talbot ES., Scherle PA., Ivashkiv LB., Rapid inhibition of interleukin-6 signaling and Stat3 activation mediated by mitogen-activated protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 11107-12.
- Sezer O, Jacob C, Eucker J et al. Serum levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in multiple myeloma. *Eur J Haematol* 2001, 66: 83-88
- Shaughnessy J., Tian E., Sawyer J. et al., Prognostic impact of cytogenetic and interphase fluorescence in situ hybridization-defined chromosome 13 deletion in multiple myeloma: early results of total therapy II, *Br J Haematol*, 2003, 120: 44-52.
- Shaughnessy J., Jacobson J., Sawyer J. et al, Continuous absence of metaphase-defined cytogenetic abnormalities, especially of chromosome 13 and hypodiploidy, ensures long-term survival in multiple myeloma treated with Total Therapy I: interpretation in context of global gene expression, *Blood*, 2003, 101:3849-56.

- Simonet WS., Lacey DL., Dunstan CR. et al, Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 1997, 89: 309-319.
- Singhal S., Mehta M.D.J., Desikan M.D.R. et al, Antitumor activity of Thalidomide in refractory multiple myeloma, *The New England Journal of Medicine*, 1999; 341:1565-1571.
- Smadja NV., Fruchart C., Isnard F. et al., Chromosomal analysis in multiple myeloma: cytogenetic evidence of two different diseases, *Leukemia*, 1998, 12: 960-69.
- Soverini S., Cavo M., Cellini C. et al., Cyclin D1 overexpression is a favorable prognostic variable for newly diagnosed multiple myeloma patients treated with high-dose chemotherapy and single or double autologous transplantation, *Blood*, 2003, 102: 1070-71.
- Srkalovic G., Elson P., Trebisky B. et al, Use of melphalan, thalidomide and dexamethasone in treatment of refractory multiple myeloma, *Med Oncol*, 2002, 19: 219-26.
- Stewart AK., Vescio RA. et al., Purging of autologous peripheral blood stem cells using CD34 selection does not improve overall or progression-free survival after high-dose chemotherapy for multiple myeloma: results of a multicenter randomized controlled trial. *Journal of Clinical Oncology*, 2001, 19: 3771-3779.
- Streetly M., Jones RW., Knight R. et al., An update of the use and outcomes of the new immunomodulatory agent CC-4047 (actimid) in patients with relapsed/refractory myeloma. *Blood*, 2003, 102: 263a
- Taberero D., San Miguel J., Garcia-Sanz R et al., Incidence of chromosome numerical changes in multiple myeloma: Fluorescence in situ hybridization analysis using 15 chromosome-specific probes. *Am. J. Pathol.*, 1996, 149: 153-161.
- Tarella C., Ferrero D., Bregni M. et al., Peripheral blood expansion of early progenitor cells after high dose Cyclophosphamide and rhGM-CSF. *Eur. J. Cancer*, 1991, 27: 227.

- The UK Myeloma Forum Guidelines Working Group, Diagnosis and management of multiple myeloma, *Br J haematology*, 2001; 115: 522-540
- Thompson MA, Witzing TE, Kumar S et al. Plasma levels of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 predict progression-free survival following thalidomide therapy in patient with previously untreated multiple myeloma. *Br J Haematol*, 2003; 123: 305-308
- Tosi P, Zamagni E, Cellini C et al., Salvage therapy with thalidomide in patients with advanced relapsed/refractory multiple myeloma, *Haematologica*, 2002,; 87: 408-414.
- Tosi P, Zamagni E, Cellini C et al., Neurological toxicity of long-term (> 1 yr) thalidomide therapy in patients with multiple myeloma, *Eur J Haematology*, 2005; 74 (3): 212-216.
- Tricot G., Barlogie B., Jagannath S. et al., Poor prognosis in multiple myeloma is associated only with partial or complete deletions of chromosome 13 or abnormalities involving 11q and not with other karyotype abnormalities. *Blood*, 1995, 86: 4250-4256.
- Tricot G., Jagannath S., Vesole D. et al., Peripheral blood stem cell transplants for multiple myeloma: identification of favourable variables for rapid engraftment in 225 patients. *Blood*, 1995, 85: 588-593.
- Tricot G., Vesole D.H., Jagannath S. et al., Graft versus myeloma effect: proof of principle. *Blood*, 1996; 87: 1196-1198
- Tricot G., Sawyer JR., Jagannath S. et al., Unique role of cytogenetics in the prognosis of patients with myeloma receiving high-dose therapy and autotransplants. *J. Clin. Oncol.*, 1997, 15: 2659-2666.
- Tricot G., Siegel E., Langmaid C. et al., Angiochemotherapy (ACT) for multiple myeloma with DT-PACE results in a high response rate, but in contrast to tandem transplants with melphalan does not affect durable disease control, *Blood*, 2001, 98: 850a.

- Tricot G., Spencer T., Sawyer J. et al., Predicting long-term (>5 years) event-free survival in multiple myeloma patients following planned tandem autotransplants. *British Journal of Haematology*, 2002, 116:211-217.
- Tura S., Cavo M., Il Mieloma Multiplo, in *Ematologia*, UTET, 1988; 453.
- Urbaska-Rys H, Wierzbowska A, Robak T. Circulating angiogenic cytokines in multiple myeloma and related disorders. *Eur Cytokine Netw*, 2003; 14(1): 40-51
- Vacca A., Ribatti D., Roncali L. et al., Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma, *British Journal of Haematology*, 1994;87:503-8.
- Vacca A, Ria R, Semeraro F et al. Endothelial cells in the bone marrow of patients with multiple myeloma. *Blood*, 2003; 102(9): 3340-3348
- Van Camp B., Reinaert P., Broodtaerts L., Studies on the origin of the precursor cell in multiple myeloma, Waldenström macroglobulinemia and benign monoclonal gammopathy. *Clinical and Experimental Immunology*, 1981, 44: 82-89.
- Vescio RA., Schiller G., Stewart AK. et al., Multicenter phase III trial to evaluate CD34+ selected versus unselected autologous peripheral blood progenitor cell transplantation in multiple myeloma. *Blood*, 1999, 93: 1858-1868.
- Vesole DH., Tricot G., Jagannath S. et al., Autotransplants in multiple myeloma: what have we learned? *Blood*, 1996, 88: 838-847.
- Vesole DH., Crowley JJ., Stiff PJ. et al., High-dose melphalan with autotransplantation for refractory multiple myeloma: results of a Southwest Oncology Group phase III trial. *J. Clin. Oncol.*, 1999, 17: 2173.
- Ward C.M., Yen T., Harvie R. et al, Elevated levels of factor VIII and Von Willebrand factor after thalidomide treatment for malignancy:

relationship to thromboembolic events, *Haematology J*, 2003; 4 (suppl 1): S251.

- Weaver CH., Zhen B. et al., Phase I-II evaluation of rapid sequence tandem high-dose melphalan with peripheral blood stem cell support in patients with multiple myeloma. *Bone Marrow Transplantation*, 1998, 22: 245-251.
- Weber DM., Gavino, Delasalle K., Thalidomide alone or with dexamethasone for multiple myeloma, *Blood*, 1999, 94:604a.
- Weber DM., Ranking K, Gavino M., Thalidomide alone or with dexamethasone for previously untreated multiple myeloma, *J.Clin Oncol*, 2003, 21:16-19.
- Weber D, Albitar M, Delasalle K, et al. Correlation of peripheral blood plasma levels of angiogenesis factors with treatment of thalidomide (T) or thalidomide-dexamethasone (TD) in previously untreated patients with multiple myeloma (MM); *Blood*, Nov 2002: abs 3193
- Westin J., Rodjer S., Turesson I. et al., Interferon alpha-2b versus no maintenance therapy during the plateau phase in multiple myeloma: a randomized study. *Br. J. Haematol.*, 1995, 89: 561-568.
- Yacoub-Agha I., Attal M. et al: Thalidomide in patients with advanced multiple myeloma: a study of 83 patients-report of the Intergroupe Francophone du Myélome, *Haematology J*, 2002, 3: 185-192.
- Yasuda H., Shima N., Nakagawa N. et al, Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 1998, 95: 3597-3602.
- Zangari M., Anaissie E., Barlogie B. et al., Increased risk of deep vein thrombosis in patients with multiple myeloma receiving thalidomide and chemotherapy, *Blood*, 2001, 98: 1614-1615.

- Zangari M., Siegel E., Anaissie E. et al., Risk factors for deep vein thrombosis in large group of myeloma patients treated with thalidomide: the Arkansas experience, *Blood*, 2001, 98: 161a.
- Zangari M., Saghafifar F., Anaissie F. et al, Activated protein C resistance in the absence of factor V Leiden mutation is a common finding in multiple myeloma and is associated with an increased risk of thrombotic complications, *Blood Coagulation Fibrinolysis*, 2002, 13: 187-192.
- Zangari M., Esseltine D., Lee C.K. et al., Response to bortezomib is associated to osteoblastic activation in patients with multiple myeloma. *British Journal of Haematology*, 2005; 131: 71-73.
- Zangari M. et al., Marked activity of VTD regimen comprising Velcade (V) plus Thalidomide (T) and added Dexamethasone for non-responders in advanced and refractory multiple myeloma (MM). *Haematologica/European Journal of Haematology* 2005; 90 (S2): 255 (abs 637).
- Zojer N., Konigsberg R., Ackermann J. et al., Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization, *Blood*, 2000, 95: 1925-30.
- Zomas A., Anagnostopoulos N., Dimopoulos M.A., Successful treatment of multiple myeloma relapsing after high-dose therapy and autologous transplantation with Thalidomide as a single agent, *Bone Marrow Transplantation*, 2000; 25:1319-1320.

Indice:

Introduzione	pag.1
Aspetti biologici	pag.3
- Mielomagenesi	pag.3
- Ruolo delle citochine	pag.4
- Il microambiente midollare	pag.5
- Fisiopatologia dell'esalto riassorbimento osseo	pag.6
- L'Angiogenesi nelle neoplasie	pag.9
- L'Angiogenesi e le citochine coinvolte nell'angiogenesi nel mieloma multiplo:	
- a) Fattori angiogenici espressi dalle plasmacellule mielomatose	pag.12
- b) Ruolo delle cellule stromali e delle cellule endoteliali midollari	pag.14
- Ruolo dell'angiogenesi nella patogenesi del MM	pag.15
- Alterazioni citogenetiche e molecolari.	pag.16
La terapia del Mieloma multiplo:	
- Ruolo della chemioterapia convenzionale mono- e poli-chemioterapia	pag.19
- Studi clinici di chemio(radio)terapia a dosi (sub)mieloablativa con supporto di progenitori emopoietici autologhi	pag.21
- Studi clinici sul doppio trapianto di progenitori emopoietici autologhi come supporto a regimi di chio(radio)terapia (sub)mieloablativa	pag.27
- Nuovi farmaci	pag.29
Pazienti e metodi:	
- Disegno del protocollo	pag.37
- Dosaggi citochinici	pag.38
- Analisi statistica	pag.38
Risultati:	
- Caratteristiche dei pazienti	pag.39

- Risposta clinica	pag.40
- Analisi delle sopravvivenza	pag.40
- Livelli sierici delle citochine	pag.41
Discussione	pag.44
Figure	pag.49
Bibliografia	pag.58