



Università degli Studi di Padova

Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

DIPARTIMENTO DI MEDICINA DIMED

U.O.C di Anatomia Patologica

Direttore: Ch.mo Prof. Angelo Paolo Dei Tos

TESI DI LAUREA

Fenotipi mielodepletivi e mieloproliferativi di mielofibrosi primitiva e secondaria: caratteristiche clinico-patologiche e citogenetico-molecolari

RELATORE: Prof. Angelo Paolo Dei Tos

CORRELATORE: Prof. Marco Pizzi

Laureando: Vincenzo Fabiano

ANNO ACCADEMICO 2023/2024

INDICE

Sommario

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	1
1. INTRODUZIONE	5
1.1 Le neoplasie mieloproliferative	5
1.2 Definizione e classificazione della Mielofibrosi	5
1.3 Epidemiologia della Mielofibrosi	6
1.4 Presentazione clinica della Mielofibrosi	8
1.5 Alterazioni degli esami di laboratorio in corso di Mielofibrosi	9
1.6 Reperti istologici della Mielofibrosi	10
1.7 Patogenesi e profilo genetico della Mielofibrosi	10
1.8 Sistemi di stratificazione prognostica dei pazienti con Mielofibrosi	13
1.8.1 Score prognostici	13
1.8.2 Impatto prognostico dei valori emocromocitometrici	13
1.8.3 Impatto prognostico delle alterazioni genetiche e citogenetiche	14
1.9 Terapia della Mielofibrosi	15
1.9.1 Trapianto allogenico di cellule staminali	15
1.9.2 Regime terapeutico per pazienti non candidabili all'alloSCT	16
1.9.3 Farmaci a bersaglio molecolare	17
1.9.4 Nuovi agenti terapeutici	18
1.10 Fenotipi clinici di malattia	18
1.10.1 Caratteristiche clinico-prognostiche e biologiche dei fenotipi MD e MP di Mielofibrosi	19
1.10.2 Istologia nei fenotipi MD e MP di Mielofibrosi	20
2. SCOPI DELLO STUDIO	21
3. MATERIALI E METODI	23
3.1 Popolazione dello studio	23
3.2 Raccolta dei dati clinici	23
3.3 Valutazione istologica dei campioni di BOM	23

3.4 Elaborazione dei dati, analisi statistiche e notifica al Comitato Etico Territoriale..	24
4. RISULTATI	27
4.1 Caratteristiche cliniche e distribuzione dei fenotipi clinici di PMF	27
4.2 Caratteristiche istologiche dei fenotipi MD e MP di PMF	27
4.3 Caratteristiche genetiche delle PMF e correlazione con i fenotipi clinici di malattia	30
4.4 Outcome della PMF e impatto prognostico delle caratteristiche clinico-patologiche	35
4.5 Caratterizzazione clinico-patologica e prognostica della SMF	35
5. DISCUSSIONE	39
6. CONCLUSIONI	43
BIBLIOGRAFIA	45

RIASSUNTO

Presupposti dello studio. Le Mielofibrosi (MF) sono un gruppo eterogeneo di neoplasie mieloproliferative, comprendente la Mielofibrosi Primitiva (PMF) e la Mielofibrosi Secondaria (SMF) a Policitemia Vera o Trombocitemia Essenziale. Sulla base dell'emocromo, si distinguono due fenotipi clinici di MF: (i) un fenotipo mielodepletivo (MD), caratterizzato da citopenie di grado severo; e (ii) un fenotipo mieloproliferativo (MP), caratterizzato da leucocitosi e/o piastrinosi, in assenza di significative citopenie. Recenti studi hanno identificato notevoli differenze nella presentazione clinica e nella prognosi dei fenotipi MP e MD. Poco si sa, tuttavia, sulle loro caratteristiche istologiche e sull'impatto prognostico della valutazione midollare in tali patologie.

Scopo dello studio. Scopi del presente studio sono: (i) descrivere le caratteristiche istologiche dei fenotipi MD e MP di MF; (ii) identificare possibili correlazioni tra caratteristiche istologiche e parametri clinici; (iii) valutare l'impatto dei reperti istologici nella stratificazione prognostica dei pazienti affetti da MF.

Materiali e metodi. Questo studio retrospettivo ha considerato 94 casi di PMF (n=65) e SMF (n=29), diagnosticati presso l'U.O.C. di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedale Università di Padova. Ai fini dello studio, sono stati adottati i seguenti criteri di inclusione: (i) età alla diagnosi ≥ 18 anni; (ii) diagnosi di PMF/SMF sec. criteri WHO 2008 (o successivi aggiornamenti); (iii) disponibilità di dati clinici completi; (iv) follow-up ≥ 6 mesi; (v) disponibilità di preparati midollari adeguati alla rivalutazione istologica. Dopo conferma della diagnosi, sono stati considerati multipli parametri morfologici e morfometrici, con particolare riferimento alle caratteristiche dell'eritropoiesi, della megacariocitopoiesi e delle alterazioni stromali midollari (i.e. grado di fibrosi; presenza/entità di ectasia sinusoidale e di emopoiesi intravascolare). Per la stratificazione in fenotipi clinici di malattia, sono state considerate MD le PMF/SMF caratterizzate da ≥ 1 citopenia, in assenza di citosi. Le analisi statistiche sono state condotte utilizzando test non-parametrici per variabili qualitative (Fisher's exact test) e quantitative (Student's t-test). Gli studi di sopravvivenza sono stati condotti mediante curve di Kaplan Meier e test log-rank. Nel confronto tra sottogruppi, sono state considerate statisticamente significative differenze con valori di $p < 0.05$.

Risultati. La coorte delle PMF comprendeva 28/65 (43%) casi in fase precoce (ePMF) e 37/65 (57%) casi in fase fibrotica. La stratificazione per fenotipo clinico di malattia ha identificato 13/65 (20%) casi con fenotipo MD e 52/65 (80%) casi con fenotipo MP. Nessun caso di ePMF aveva fenotipo MD. La valutazione midollare ha dimostrato significative differenze tra fenotipo MD e MP di PMF. In particolare, le forme MD erano caratterizzate da più frequenti megacariociti displastici, incremento di precursori eritroidi immaturi, maggior fibrosi interstiziale e più frequente ectasia sinusoidale. La presenza di diffusa emopoiesi intra-vascolare era, invece, associata al fenotipo MP. Le analisi di sopravvivenza hanno evidenziato un'associazione statisticamente significativa tra alto score clinico IPSS e peggior outcome ($p = 0,001$). Anche la displasia megacariocitaria era associata a peggior prognosi ($p = 0,009$). La stratificazione per fenotipo clinico, ha invece documentato un trend di significatività statistica tra fenotipo MD e riduzione della sopravvivenza ($p = 0,08$). La valutazione integrata di morfologia megacariocitaria e score IPSS ha consentito una stratificazione prognostica migliore rispetto al solo score IPSS. Simili risultati sono stati ottenuti nella valutazione istologica e prognostica della coorte di SMF, per quanto la ridotta numerosità del campione abbia limitato l'applicazione delle analisi statistiche.

Conclusioni. La stratificazione delle MF in fenotipi MD e MP correla con specifiche alterazioni midollari e suggerisce l'esistenza di forme biologicamente distinte di malattia. La valutazione integrata di parametri clinici (i.e. score IPSS) e istologici (i.e. displasia megacariocitaria) potrebbe contribuire a una miglior stratificazione prognostica dei pazienti. Ulteriori studi su più ampie coorti di pazienti contribuiranno a verificare tali risultati.

ABSTRACT

Background. Myelofibroses (MF) are a heterogeneous group of myeloproliferative neoplasms, which includes Primary Myelofibrosis (PMF) and post-Polycythemia Vera/post-Essential Thrombocythemia Myelofibrosis (*i.e.* secondary MF [SMF]). Based on blood cell counts, two clinical phenotypes of MF are described: (i) myelodepletive (MD) MF, characterized by severe cytopenias; and (ii) myeloproliferative (MP) MF, characterized by leukocytosis and/or thrombocytosis without significant cytopenias. Recent studies identified significant differences in the clinical presentation and prognosis of MP and MD phenotypes. Little is known, however, on their histological features and on the prognostic impact of bone marrow (BM) evaluation in such conditions.

Study Aims. This study aimed at: (i) describing the histological features of MD and MP PMF/SMF; (ii) identifying possible correlations between the histological and clinical features of such conditions; (iii) assessing the prognostic impact of BM findings in MF patients.

Materials and methods. This retrospective study considered 94 cases of PMF (n=65) and SMF (n=29), diagnosed at the Pathology Unit of Padua University Hospital. Inclusion criteria were set as follows: (i) age at diagnosis ≥ 18 years; (ii) diagnosis of PMF/SMF, based on 2008 WHO criteria (or subsequent updates); (iii) availability of complete clinical data; (iv) follow-up ≥ 6 months; (v) availability of adequate BM biopsy samples. Following confirmation of the original diagnosis, multiple morphological/morphometric parameters were considered (*e.g.* erythroid maturation; cytological and architectural features of the megakaryocytopoiesis; stromal alterations, such as BM fibrosis, the presence/extent of sinusoidal ectasia and of intravascular hematopoiesis). For patient stratification into clinical phenotypes, MD MF was defined as ≥ 1 cytopenia without cytolysis. Statistical analyses were performed by non-parametric tests for qualitative (Fisher's exact test) and quantitative (Student's t-test) variables. Survival analyses were based on Kaplan-Meier curves and log-rank tests. Differences between subgroups were considered statistically significant for p -values < 0.05 .

Results. The PMF cohort included 28/65 (43%) early-stage (ePMF) and 37/65 (57%) fibrotic-stage cases. Stratification by clinical phenotype identified 13/65 (20%) cases with MD phenotype and 52/65 (80%) cases with MP phenotype. No ePMF had MD phenotype. BM evaluation showed significant differences between MD and MP phenotypes. In particular, dysplastic megakaryocytes, increased erythroid precursors, severe interstitial fibrosis and sinusoidal ectasia were significantly associated with the MD phenotype. Diffuse intra-vascular hematopoiesis was instead more frequent in MP cases. Survival analyses highlighted a statistically significant association between a high IPSS score, megakaryocytic dysplasia and worse prognosis ($p < 0.05$). A trend towards statistical significance was reported for the association between MD phenotype and reduced overall survival ($p = 0,08$). The integrated evaluation of megakaryocytic dysplasia and IPSS allowed a better prognostic stratification than the IPSS alone. Similar results were obtained for the histological and prognostic evaluation of SMF, although the small sample size limited the power of statistical analyses.

Conclusions. MF stratification into MD and MP phenotypes correlates with BM findings and suggests biologically distinct disease subtypes. The integrated evaluation of clinical (i.e. IPSS) and histological (i.e. megakaryocytic dysplasia) parameters may contribute to a better prognostic stratification of patients. Further studies on larger cohorts are needed to verify these preliminary findings.

1. INTRODUZIONE

1.1 Le neoplasie mieloproliferative

Le neoplasie mieloproliferative (MPN) sono malattie della cellula staminale emopoietica, caratterizzate da abnorme proliferazione della granulopoiesi, dell'eritropoiesi e/o della megacariocitopoiesi. Le MPN sono classificate in quattro sottogruppi: (i) la Leucemia Mieloide Cronica (Chronic Myeloid Leukemia, CML); (ii) le MPN classiche Philadelphia-negative, che comprendono la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Essenziale (Essential Thrombocythaemia, ET) e la Mielofibrosi Primitiva (Primary Myelofibrosis, PMF); (iii) le MPN non-classiche Philadelphia-negative, che comprendono la Leucemia Neutrofilica Cronica e la Leucemia Eosinofila Cronica; (iv) le MPN non altrimenti specificate (Myeloproliferative neoplasm, not otherwise specified, MPN-NOS)^(1,2).

1.2 Definizione e classificazione della Mielofibrosi

Classicamente, si distinguono due forme di MF: (i) la Mielofibrosi Primitiva (primary myelofibrosis, PMF) e (ii) la Mielofibrosi secondaria (SMF).

La PMF è una MPN caratterizzata da espansione della megacariocitopoiesi e della granulopoiesi, con conseguente ipercellularità midollare e tendenza alla disseminazione extra-midollare. La PMF comprende una fase pre-fibrotica (o precoce, early PMF – ePMF) caratterizzata da fibrosi minima o assente, e una fase fibrotica (o avanzata, overt o fibrotic PMF – oPMF o fPMF), caratterizzata da incremento di fibroblasti, severa fibrosi midollare e variabile rimaneggiamento delle trabecole ossee (3). Oltre alla PMF, nell'ambito delle MPN a impronta fibrotica sono incluse anche le evoluzioni mielofibrotiche di PV e ET (i.e. postPV o post-ET MF, anche note come SMF).

Per porre diagnosi di PMF/SMF è necessaria l'integrazione di dati istologici, clinico-laboratoristici, anamnestici e molecolari. Per quanto riguarda la valutazione midollare, criteri diagnostici essenziali sono l'identificazione di proliferazione e atipia dei megacariociti, associata ad aumento della cellularità midollare, con frequente aumento del rapporto mielo:eritroide. Fondamentale è inoltre la definizione del grado di fibrosi midollare. La valutazione della fibrosi si avvale di un sistema di grading semi-quantitativo che la divide in 4 gradi di progressiva severità: (i) grado 0, ovvero assenza di fibrosi; (ii) grado 1 (network lasso di reticolina con molte intersezioni, soprattutto nelle aree

perivascolari); (iii) grado 2 (diffuso e denso aumento di reticolina con estese intersezioni); (iv) grado 3 (deposizione di spessi fasci di fibre collagene). La valutazione dovrebbe essere effettuata solo sulle aree emopoietiche (evitando quelle con artefatti da prelievo). Se eterogeneo, il grado finale si stabilisce sulla base del reperto peggiore, qualora questo sia presente in almeno il 30% delle lacune midollari. I gradi MF-0 e MF-1 configurano la ePMF, mentre i gradi MF-2 e MF3 configurano la oPMF e tutte le SMF.

Per quanto riguarda la valutazione clinica, nel caso della PMF è necessario considerare reperti obiettivi (i.e. splenomegalia) e laboratoristici (i.e. emocromo, livelli sierici di LDH; stato mutazionale di geni driver). L'integrazione di tutti questi dati porta alla formulazione di una diagnosi conclusiva (Tabella 1)⁽¹²⁾. Requisiti per la diagnosi di SMF, invece, sono: (i) un'anamnesi positiva per ET/PV; e (ii) la presenza di fibrosi midollare di grado severo (MF-2/MF-3), non imputabile ad altre cause. Oltre a questi, sono richiesti almeno due criteri minori tra (i) anemia (o perdita di dipendenza da flebotomia per la post-PV MF), (ii) leucoeritroblastosi, (iii) aumento della splenomegalia, (iv) comparsa di sintomi costituzionali e (v), per la sola post-ET MF, l'aumento dei livelli di LAD ⁽¹²⁾.

1.3 Epidemiologia della Mielofibrosi

Le MPNs sono patologie rare. Si stima che l'incidenza della MF sia di circa 0,44-1,98 casi ogni 100.000 abitanti all'anno e la prevalenza sia di 1,76-4,05 ogni 100.000 abitanti. Scorporando i dati, l'incidenza della ePMF è difficile da stabilire.

Ciò dipende sia dal cambiamento nel corso del tempo dei criteri diagnostici (sebbene il tasso di diagnosi non abbia subito drammatici cambiamenti), che dai facili errori diagnostici nella fase precoce di malattia (una recente review ha attestato che il 14-18% di casi di ePMF era stato originariamente diagnosticato come ET)⁽⁴⁸⁾. La WHO 2017, che ammetteva la difficoltà nel reperire dati validi, stimava che i casi di ePMF rappresentassero circa il 30-50% di tutte le PMF, con un'incidenza di PMF che, anche in stime più recenti, si aggira attorno allo 0,5-1,5 casi per 100.000 abitanti all'anno. ^(1,48) Riguardo le SMF, il rischio cumulativo di progressione fibrotica a 10 anni dell'ET varia dallo 0,8% al 4,5%, mentre quello della PV è di circa il 2,3% ⁽⁴⁸⁾.

Tabella 1. Criteri di definizione di fase precoce e fase fibrotica di Mielofibrosi Primitiva secondo International Consensus Conference (ICC)

Mielofibrosi Primitiva Fase precoce	Mielofibrosi Primitiva Fase fibrotica
Criteri maggiori	Criteri minori
<ul style="list-style-type: none"> • Riscontro nella biopsia osteomidollare di proliferazione e atipia di megacariociti, fibrosi midollare di grado inferiore al secondo, aumento della cellularità midollare, proliferazione granulocitaria e (spesso) riduzione della eritropoiesi. 	<ul style="list-style-type: none"> • Riscontro nella biopsia osteomidollare di proliferazione e atipia di megacariociti e fibrosi midollare almeno di grado secondo.
<ul style="list-style-type: none"> • Dimostrazione di clonalità della proliferazione (anche mediante riscontro di mutazioni a carico di JAK2, CALR o MPL) o assenza di fibrosi reticolinica reattiva. 	
<ul style="list-style-type: none"> • Assenza dei criteri per la diagnosi di CML BCR:ABL1-positiva, PV, ET, sindromi mielodisplastiche o altre neoplasie mieloidi. 	
<p>Criteri minori</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • Anemia non attribuibile ad altre comorbidità. • Leucocitosi (definita come valore di globuli bianchi $\geq 11 \times 10^9/L$). • Splenomegalia palpabile. • Livello di LAD al di sopra del range di riferimento. 	
<ul style="list-style-type: none"> • Leucoeritroblastosi. 	
<p>CML, Chronic Myeloid Leukaemia, Leucemia Mieloide Cronica; JAK2, chinasi Janus 2; CALR, calreticolina; MPL, myeloproliferative leukemia virus oncogene, recettore per la trombopoietina; PV, policitemia vera; ET, trombocitemia essenziale; LAD, lattato deidrogenasi.</p> <p>Si pone diagnosi di ePMF/oPMF qualora vengano soddisfatti tutti e tre i criteri maggiori e almeno un minore confermato di due determinazioni consecutive.</p>	

La diagnosi di PMF aumenta all'aumentare dell'età (età mediana alla diagnosi: 68 e 70 anni). I pazienti affetti da ePMF sono di solito più giovani rispetto a quelli con oPMF. Il sesso maschile è lievemente più affetto di quello femminile (rapporto M:F pari a 1,2:1)^(11,48,49). Raramente la PMF colpisce pazienti di età pediatrica o giovane-adulta (solo il

10% delle oPMF vengono diagnosticate prima dei 40 anni) e in questi casi la malattia ha un decorso clinico più indolente ^(1,10,11).

1.4 Presentazione clinica della Mielofibrosi

Circa il 30-40% dei pazienti con ePMF è asintomatica alla diagnosi e giunge all'osservazione clinica soprattutto per alterazioni agli esami ematochimici (anemia, leucocitosi e/o trombocitosi; aumento dei livelli sierici LAD; leucoeritroblastosi) o per splenomegalia ^(1,10,48). I restanti pazienti manifestano sintomi costituzionali quali affaticamento, calo ponderale, sudorazioni notturne, dispnea e febbre, che si aggravano progressivamente fino a comprendere cachessia, dolori ossei e prurito con l'evoluzione a oPMF ^(1,10,48,50). L'emopoiesi inefficace e la disseminazione ematogena delle cellule neoplastiche (i.e. ematopoiesi extra-midollare [EMH] neoplastica) spiegano buona parte dei sintomi. La prima determina anzitutto l'anemia; la seconda porta alla organomegalia. L'EMH nel distretto epato/splenico determina splenomegalia (presente nell'80-90% dei pazienti) che si associa variamente a epatomegalia (circa il 50% dei pazienti) ^(1,34,48). Sia l'epatomegalia che la splenomegalia possono essere di grado molto variabile, anche in considerazione della fase di malattia (se early od overt)⁽⁴⁸⁾. Ne conseguono sintomi da ingombro addominale, quali senso di sazietà precoce, edemi degli arti inferiori e dispepsia ⁽¹⁰⁾. L'EMH non epatosplenica, colpendo molti altri distretti anatomici, determina linfadenopatie, versamenti pleurici, emotorace, ipertensione endocranica, sindromi compressive del midollo spinale o stenosi del tratto gastrointestinale ^(13,34,50).

I pazienti con PMF, specie in fase avanzata di malattia, possono inoltre sviluppare manifestazioni tromboemboliche, tra cui trombosi venose profonde agli arti inferiori, trombosi di vasi arteriosi epiaortici e trombosi splancniche (i.e. sindrome di Budd-Chiari). In circa il 7% dei casi, le trombosi splancniche e l'iperafflusso venoso portale dovuto alla splenomegalia determinano ipertensione portale, che può a sua volta determinare sanguinamenti viscerali o ascite ^(10,48,50).

Si ritiene che la produzione aberrante di citochine da parte delle cellule clonali e la risposta immunitaria dell'ospite contribuiscano ai cambiamenti stromali midollari, all'emopoiesi inefficace, all'EMH, alla cachessia e ai sintomi costituzionali ⁽⁵⁰⁾.

La SMF presenta caratteristiche cliniche sovrapponibili a quelle della PMF in fase avanzata. In pazienti con ET o PV note, questa condizione va sospettata nel caso di sintomi

sistemici (febbricola, calo ponderale, astenia), citopenie progressive o splenomegalia ingravescente ⁽¹⁴⁾.

Tanto nella PMF che nella SMF, la causa più frequente di decesso è la trasformazione a leucemia mieloide acuta (i.e. fase blastica su progressione mielofibrotica), che si riscontra in circa il 20% dei pazienti. Altre cause di morte correlate alla malattia sono l'insufficienza midollare, complicanze cardiovascolari, trombotico-emorragiche, infettive o legate all'ipertensione portale ^(15,50).

1.5 Alterazioni degli esami di laboratorio in corso di Mielofibrosi

In corso di PMF, l'alterazione laboratoristica di più frequente riscontro è l'anemia ⁽²⁵⁾. Il 35-50% dei casi è anemico alla diagnosi e quasi la totalità dei pazienti svilupperà anemia nel corso della malattia ⁽²²⁾. L'anemia ha eziologia multifattoriale ed è dovuta a fibrosi midollare, a emopoiesi inefficace, al sequestro e alla distruzione splenica dei globuli rossi, all'aumento del volume plasmatico e allo stato pro-infiammatorio generale, che intacca il metabolismo dell'epcidina ⁽⁶⁴⁾. La conta delle piastrine è assai variabile. In alcuni casi, si ha trombocitosi e questa è l'unica alterazione laboratoristica riscontrabile. Tale presentazione è tipica della ePMF e mima clinicamente una ET. In circa il 20% dei pazienti si ha invece piastrinopenia ^{(22)(22,23,42,47)} di grado variabile ⁽²⁴⁾. Alterazioni della conta leucocitaria sono meno frequenti e si presentano solitamente come incremento dei globuli bianchi ⁽²¹⁾. Nel 5-15% dei casi si riporta la presenza/comparsa di monocitosi, che si associa a prognosi severa ⁽¹⁷⁾.

Nei casi con severa fibrosi midollare, si può riscontrare leucoeritroblastosi (i.e. presenza di precursori mieloidi ed eritroidi circolanti) ^(14,16) ⁽⁴⁸⁾. In tali casi, lo striscio di sangue periferico mostra anche anisopoichilocitosi degli eritrociti con dacriociti (emazie a lacrima) ⁽¹⁾.

Per quanto riguarda gli esami ematochimici, PMF e SMF si associano tipicamente a elevati livelli sierici di LAD e di vitamina B12 ^(18,19). Tale reperto è diretta conseguenza dell'aumentato turnover delle cellule emopoietiche midollari. La analisi citofluorimetriche possono documentare precursori CD34-positivi. L'aumento di tali cellule è il risultato dell'aumentata capacità proliferativa delle cellule staminali ematopoietiche e correla con la severità dell'epato/splenomegalia, con un peggioramento della leucocitosi e della trombocitosi e (più in generale) con il rischio di progressione di malattia ⁽²⁰⁾.

1.6 Reperti istologici della Mielofibrosi

Nella fase precoce di PMF (ePMF), il midollo si presenta ipercellulato con incremento del rapporto mielo-eritroide e della megacariocitopoiesi. I precursori mieloidi immaturi (identificati mediante colorazione immunohistochimica con CD34) risultano inferiori al 10% della cellularità totale. La fibrosi midollare è minima o assente (grado MF-0 o MF-1) ^(1,2). La PMF in fase fibrotica (oPMF) e la SMF si caratterizzano per la presenza di estesi depositi di fibre reticoliniche e/o collagene (fibrosi di grado MF-2 o MF-3) con progressiva riduzione dell'emopoiesi midollare. Le trabecole ossee vanno incontro a rimaneggiamento e possono ispessirsi fino a determinare un completo sovvertimento degli spazi intertrabecolari. I sinusoidi midollari sono ectasici e tortuosi con diffusi aspetti di emopoiesi intra-vascolare. I precursori midollari CD34-positivi sono solitamente scarsi (1-2% della cellularità totale), per quanto micro-aggregati di elementi immaturi siano occasionalmente riscontrati nelle fasi avanzate di malattia ^(1,36).

I megacariociti in corso di PMF/SMF presentano tipicamente nuclei bulbosi e ipercromatici ⁽¹⁾. Le alterazioni megacariocitarie sono tuttavia molto eterogenee e spaziano da morfologie simil-PV/ET ad alterazioni simil-sindrome mielodisplastica (MDS) ^(1,36). Queste ultime comprendono megacariociti di taglia ridotta con nuclei non lobulati (forme simil-MDS con delezione del 5q [del5q]), micromegacariociti e megacariociti con nuclei separati. Caratteristica tipica dei megacariociti in corso di MF è inoltre la tendenza aggregativa in clusters. In base alla dimensione (numero di megacariociti coinvolti) e alla presenza o meno di cellule midollari interposte, si distinguono clusters larghi (formati da almeno 5) e clusters densi (gruppi di almeno 3 megacariociti in assenza di altre cellule midollari interposte).

1.7 Patogenesi e profilo genetico della Mielofibrosi

Le MPNs Philadelphia-negative sono il risultato di mutazioni somatiche acquisite nel pool delle staminali emopoietiche e delle cellule progenitrici, mutazioni che promuovono la differenziazione mieloide e la proliferazione. In particolare, la patogenesi delle MPNs, e quindi della MF, è guidata dall'attivazione costitutiva della via di JAK/STAT.

La proteina JAK2 è composta da due domini chinasi: uno con attività catalitica posto al C-terminale (JH1) e uno non catalitico pseudochinasi che previene l'auto-attivazione del dominio catalitico (JH2)^(6,67). JAK2 ha un ruolo fondamentale per l'emopoiesi, in quanto funge da mediatore tra recettori di membrana e messaggeri intracellulari. Quando fattori di crescita emopoietici come EPO (eritropoietina), G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor, fattore di crescita granulocitario), GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor, fattore di crescita granulocitario e macrofagico) e TPO (Trombopoietina) si legano al loro recettore sulla superficie cellulare, la proteina JAK2 si fosforila nella regione tirosin-chinasi (JH1), determinando l'attivazione a valle di messaggeri della famiglia STAT. Tali proteine agiscono come fattori di trascrizione, inducendo la differenziazione e la proliferazione delle cellule ematopoietiche. In condizioni normali, in assenza di fattori di crescita emopoietici, il dominio JH2 di JAK2 inibisce l'attività tirosin-chinasi di JH1, disattivando la cascata di segnali proliferativi intra-cellulari⁽⁶⁾. Nel caso di una up-regolazione della via di segnale JAK-STAT, si ha una proliferazione mieloide incontrollata e la creazione di un ambiente citochinico pro-infiammatorio alla base della patogenesi delle MPNs.

L'attivazione della via JAK/STAT dipende da vari eventi mutazionali, che possono essere classificati in "disease driver", "clonal driver" e "passenger"⁽²⁹⁾. Nell'ambito delle mutazioni "disease drivers", i geni coinvolti sono JAK2, CALR e MPL.

JAK2 codifica l'omonima proteina ed è localizzato in corrispondenza del cromosoma 9p24. In corso di MPN, la mutazione tipica di questo gene colpisce il nucleotide 1849 dell'esone 14, causando la sostituzione del residuo 617 di valina con una fenilalanina (mutazione V617F) nel dominio pseudo-chinasi (JH2)^(6,34,67). MPL (localizzato sul cromosoma 1p34) codifica il recettore della trombopoietina ed è più frequentemente mutato in corrispondenza del nucleotide 1544 (sostituzione di un triptofano con una leucina; W515L). Altre mutazioni includono la sostituzione del triptofano con altri amminoacidi [W515K/A/R] e la S505N^(29,34,66,67). Tali mutazioni determinano l'attivazione costitutiva di MPL con conseguente stimolo della via di JAK/STAT a valle⁽⁶⁷⁾. CALR (localizzato sul cromosoma 19p13.2) codifica la calreticolina, una proteina chaperonina del reticolo endoplasmatico. Le mutazioni di CALR sono generalmente frameshift e possono determinare delezioni (mutazioni di tipo 1) o inserzioni (mutazioni di tipo 2).

Altre mutazioni più rare sono del tipo type 1-like e type 2-like (30,34,67). Indipendentemente dall'evento genetico, CALR mutata lega il dominio extracellulare di MPL determinandone l'attivazione costitutiva e portando ad attivazione della via di JAK/STAT (34). La maggior parte dei pazienti con MPN presenta mutazioni a carico di JAK2 (60% dei casi di PMF; 98% dei casi di PV; 55% dei casi di ET). Mutazioni di CALR e MPL sono, invece, più rare (20-30% e 7-10% dei casi, rispettivamente) (9,29). Tali mutazioni sono solitamente mutualmente esclusive, In rari casi, tuttavia, mutazioni di JAK2 e di CALR coesistono in sub-cloni diversi (29). Circa il 10% delle MPN non presenta mutazioni in nessuno dei tre geni, configurando le così dette MPN triplo-negative (TN)(1,9,29).

Oltre alle mutazioni disease driver, in corso di MPN sono state identificate mutazioni clonal driver, ovvero alterazioni genetiche che correlano con il fenotipo clinico e il rischio di progressione della malattia (29). Tali mutazioni sono presenti in più dell'80% dei casi e colpiscono geni coinvolti nella regolazione della metilazione del DNA (TET2, DNMT3A, IDH1/2), nel rimodellamento della cromatina (ASXL1, EZH2), nei processi di splicing (U2AF1, SF3B1, SRSF2) e di riparazione del DNA (TP53, PPMID) (27). I geni coinvolti in questo tipo di mutazioni non sono MPN-specifici e possono essere coinvolti in altri processi di tumorigenesi mieloide. Alcune di queste mutazioni hanno un impatto prognostico, ma la loro importanza risiede anche nel poter essere utilizzate come marker di clonalità per la diagnosi di casi TN (1,29). L'esistenza di mutazioni clonal driver comuni ad altre neoplasie mieloidi rende ragione di recenti osservazioni secondo cui il confine biologico tra MPN, MDS e MDS/MPN è spesso sfumato. Ci sembra valere in particolare per la PMF, in cui la presenza di mutazioni in geni non MPN-ristrette potrebbe aumentare gli aspetti mielodisplastici (i.e citopenia; dismaturazione midollare) e la gravità della malattia.

Le MPN possono infine essere caratterizzate da mutazioni passenger, ovvero mutazioni che non comportano conseguenze funzionali. Tali mutazioni possono essere utili per tracciare l'evoluzione clonale delle MPNs. A oggi, tenuto conto anche della difficoltà di predire se una mutazione avrà o meno conseguenze funzionali, sono considerate varianti di significato sconosciuto (29).

Oltre a queste alterazioni geniche, le MPN (e in particolare la PMF/SMF) sono associate ad anomalie del cariotipo quali del(20q), del(13q), +8, +9, del(12p). Altri cromosomi

coinvolti sono il 5, il 7, l'11, il 14 e il 17 ^(29,49,50). Alterazioni citogenetiche sono riportate nel 18% delle ePMF e nel 30-40% delle oPMF ⁽⁴⁹⁾.

1.8 Sistemi di stratificazione prognostica dei pazienti con Mielofibrosi

1.8.1 Score prognostici

Alla luce dell'eterogeneità dell'evoluzione biologica e del decorso clinico, sono stati sviluppati vari score per stratificare i pazienti in classi di rischio clinico. Questi includono il *Lille Scoring System*, l'*International Prognostic Scoring System* (IPSS), il *Dynamic IPSS* (DIPSS), il *DIPSS plus*, il *Mutation Enhanced IPSS* (MIPSS70, MIPSS70 plus, MIPSS70-plus versione 2.0), il *Genetically Inspired PSS* (GIPSS) e il *Myelofibrosis Secondary to PV and ET-Prognostic Model* (MYSEC-PM).

Tra questi il più utilizzato è l'IPSS che considera cinque parametri, valutati al momento della diagnosi e associati a prognosi sfavorevole: (i) età > 65 anni, (ii) Hb < 10 g/dL, (iii) WBC > 25 x10⁹/L, (iv) presenza di sintomi costituzionali (febbre, sudorazioni notturne della durata superiore a un mese, calo ponderale > 10% nell'anno precedente alla diagnosi di PMF) e (v) presenza di blasti circolanti su sangue periferico ≥ 1% delle cellule nucleate totali. Sulla base di tali variabili, vengono individuate quattro classi di rischio, a prognosi progressivamente peggiore se presenti da nessuno a tre o più fattori di rischio (Low Risk, OS di 11,3 anni; Intermediate Risk-1 [IR-1], (OS 7,9 anni); IR-2, OS di 4 anni; High Risk, OS di 2.3 anni ^(21,54)).

Col tempo sono stati elaborati altri score che analizzano parametri diversi (i.e. trombocitopenia, dipendenza dalle trasfusioni ematiche, cariotipo avverso, fibrosi midollare, specifiche mutazioni di CALR, presenza di mutazioni HMR ad alto rischio molecolare). L'uso di questi score è funzionale o all'arruolamento in trials clinici o a meglio guidare le decisioni terapeutiche, con particolare riferimento al trapianto allogenico di midollo ⁽⁵⁰⁾.

1.8.2 Impatto prognostico dei valori emocromocitometrici

I sistemi di score che comprendono l'anemia considerano come prognosticamente sfavorevoli valori di emoglobina inferiori a 10 g/dL (o 9 g/dL e 8 g/dL, aggiustando il valore per sesso maschile e femminile, rispettivamente).

Per quanto riguarda la piastrinopenia, il cutoff generalmente utilizzato considera valori inferiori a $100 \times 10^9/L$. Conte piastriniche inferiori a $50 \times 10^9/L$ configurano, invece quadri di piastrinopenia severa. In letteratura sono vari i lavori che mostrano come nella PMF la trombocitopenia sia associata a una ridotta overall survival (OS), agendo da fattore di rischio indipendente (9,23,24,53). Sembra che il significato prognostico negativo si mantenga anche nel contesto della SMF (9,23,24). Bassi livelli di piastrine si assocerebbero anche a un minor tasso di risposta al trattamento con ruxolitinib (9,68).

La leucopenia compare solo in uno score prognostico (score Lille) ed è definita come una conta leucocitaria inferiore $4 \times 10^9/L$. A differenza delle altre citopenie, i dati sul ruolo prognostico della leucopenia non sono univoci (25). La leucocitosi sembra invece correlare più significativamente con la prognosi ed è inclusa in più di uno score. Essa viene definita da conte leucocitarie superiori a 25 o a $30 \times 10^9/L$.

1.8.3 Impatto prognostico delle alterazioni genetiche e citogenetiche

Le mutazioni di JAK2, CALR e MPL sembra abbiano un ruolo nella stratificazione prognostica dei pazienti con PMF. In particolare, le mutazioni di CALR correlano con una prognosi migliore in termini di rischio di eventi tromboembolici e di OS rispetto alle mutazioni di JAK2 o MPL. I casi triplo-negativi sono invece ad alto rischio di trasformazione leucemica e hanno prognosi generalmente negativa (9,30,48).

Anche il burden allelico delle mutazioni driver sembra avere un ruolo prognostico. In particolare, vari studi dimostrano un'associazione tra basso burden della mutazione V617F di JAK2 (<25%), fenotipo citopenico e prognosi più severa di malattia (5,9,30,35). Viceversa, un burden allelico >50% è stato associato a una migliore risposta alla terapia con ruxolitinib in termini di riduzione della splenomegalia (6).

Oltre alle mutazioni in geni driver, varie alterazioni in geni non-driver sono state associate alla prognosi della PMF. In particolare, mutazioni di ASXL1, EZH2, IDH1, IDH2 e SFSR2 correlano con una ridotta OS e una ridotta sopravvivenza libera da progressione (PFS) (9,28). In considerazione del loro impatto prognostico, sono state riconosciute come mutazioni ad alto rischio molecolare (high molecular risk, HMR) e sono state incluse in alcuni score per la stratificazione prognostica (2830). Mutazioni il cui ruolo prognostico è

ancora incerto comprendono invece quelle di TET2, DNMT3A, RUNX1, NOTCH1, NRAS, KRAS e TP53 ⁽⁹⁾.

Per quanto riguarda le alterazioni citogenetiche, il 4-8% dei pazienti presenta aberrazioni cromosomiche ad alto rischio, quali un cariotipo complesso (i.e. più di tre anomalie) e alterazioni del tipo +8, -7/del(7q), i(17q), -5/del(5q), del(12p), riarrangiamento di 11q23 o inv(3) ⁽⁴⁸⁾. Una prognosi favorevole è invece associata ad alterazioni isolate del tipo +9, del(13q), del(20q), anomalie dell'1q e perdita della Y, ⁽⁵⁰⁾.

1.9 Terapia della Mielofibrosi

Le opzioni terapeutiche per la MF comprendono (i) le terapie con intento curativo e (ii) quelle volte a ridurre gli effetti collaterali della malattia e a migliorare la qualità di vita dei pazienti. Vi sono poi i pazienti con MF asintomatica o con stratificazione prognostica nelle categorie di rischio più basse. In questi casi è possibile ricorrere a un approccio “wait and see” con stretto follow-up clinico-laboratoristico. Il razionale di questo approccio risiede nella mancanza ad oggi di agenti che possano modificare il corso di malattia ^(12,50).

1.9.1 Trapianto allogenico di cellule staminali

Il trapianto allogenico di cellule staminali (alloSCT) è l'unico trattamento potenzialmente curativo, nonché quello in grado di prolungare significativamente la sopravvivenza dei pazienti. È però gravato da elevati tassi di morbidità (i.e. graft versus host disease) e mortalità (almeno il 30% dei casi) indipendentemente dal regime di condizionamento utilizzato ^(34,50,64), i quali sono differenziati sulla base di fattori clinico-epidemiologici. Nella maggior parte dei pazienti con MF si preferiscono regimi mieloablativi non-standard a intensità ridotta che riducono la mortalità peri-trapiantologica e consentono di trattare un maggior numero di pazienti ⁽³⁸⁾. La scelta terapeutica è resa complessa dalle restrizioni che definiscono chi è candidabile a trapianto (età < 70 anni; buone condizioni generali; malattia caratterizzata da rischio alto/intermedio-2, sec. IPSS/DIPSS/DIPSS plus), che risultano in ultima analisi una minoranza di pazienti ^(12,34,37). All'atto pratico, si tratta di pazienti in condizioni generali tali da permettere loro di tollerare il trapianto e il condizionamento, ma al tempo stesso con una malattia in fase tale da avere una sopravvivenza stimata a 10 anni del 10-30% ⁽⁵⁰⁾. Il valore terapeutico dell'alloSCT in corso di fase blastica di malattia è

stato recentemente confermato dalla *European Society of Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) ⁽⁵⁰⁾.

1.9.2 Regime terapeutico per pazienti non candidabili all'alloSCT

Per i pazienti non candidabili a trapianto (pazienti ad elevato rischio o pazienti sintomatici a rischio intermedio/basso) l'arruolamento in trials clinici appare la scelta più appropriata, data l'assenza di farmaci che modifichino il corso di malattia ⁽³⁴⁾. Le opzioni terapeutiche mirano al trattamento dei sintomi correlati a MF, con particolare riferimento a sintomi costituzionali, splenomegalia e anemia.

Nei pazienti con anemia trovano applicazione androgeni (testosterone enantato 400-600 mg/settimana o fluossimesterone 10 mg TID), corticosteroidi (prednisone 0,5-1 mg/kg/d), danazolo e agenti immunomodulatori (talidomide a basse dosi [50 mg/d] e lenalidomide)^(35,39). L'utilizzo di agenti stimolanti l'eritropoiesi è efficace in pazienti trasfusione-indipendenti e con bassi livelli sierici di EPO (<2,5 U/L). In questi, è possibile ricorrere a iniezioni di EPO (40.000 unità sottocute/settimana). I tassi di risposta di queste terapie vanno dal 15% fino al 50% e hanno una durata di uno o due anni ^(40,50). Ad oggi per i pazienti con anemia (in assenza di splenomegalia o sintomi costituzionali) i farmaci non-JAK1/JAK2inibitori (JAKi) sono preferibili, ma sono sempre più i dati sul possibile utilizzo di alcuni JAKi in seconda linea ⁽⁵⁰⁾.

In caso di splenomegalia, di trombocitosi o di leucocitosi, e in assenza di anemia o sintomi costituzionali, il farmaco di scelta è l'idrossiurea, che porta a una riduzione del volume splenico in circa il 40% dei casi, con una durata di efficacia di circa un anno. Riducendo l'ematopoiesi midollare, si rende ragione dell'utilizzo in corso di trombocitosi e leucocitosi periferiche e della difficoltà di utilizzo in caso di pazienti con severa depressione della funzione midollare ^(21,24,50). In caso di refrattarietà, possono essere utilizzati altri farmaci citotossici quali la Cladribina o agenti alchilanti (Melphalan e Busulfano) nonché alcuni JAKi ^(34,39,50).

In caso di splenomegalia refrattaria alle terapie farmacologiche, di dolore o malessere addominale, di ipertensione portale sintomatica e/o di trombocitopenia severa, è possibile ricorrere alla splenectomia. I benefici della chirurgia sono principalmente legati alla riduzione del fabbisogno trasfusionale e a un significativo miglioramento della trombocitopenia. Tali effetti hanno durata media di circa un anno. Nei pazienti in cui non

sia possibile procedere alla splenectomia si può considerare l'irradiazione splenica, che determina tuttavia un miglioramento solo transitorio della sintomatologia addominale ^(39,40).

1.9.3 Farmaci a bersaglio molecolare

Negli ultimi anni, il trattamento sintomatico della MF ha visto importanti avanzamenti grazie all'introduzione di farmaci a bersaglio molecolare noti come JAK1/JAK2-inibitori (JAKi), farmaci che agiscono attraverso la riduzione dell'ambiente citochinico pro-infiammatorio. Sono trattamenti che hanno migliorato significativamente la qualità di vita dei pazienti, soprattutto attraverso la gestione dei sintomi e il controllo della splenomegalia. Tuttavia, non hanno dimostrato di poter modificare la storia naturale della malattia in termini di riduzione della fibrosi midollare, né completa, né parziale, né come inversione del processo ^(34,50).

Il primo e più utilizzato di questi farmaci è il ruxolitinib (inibitore di JAK1/2). È indicato per il trattamento della splenomegalia nei pazienti refrattari all'idrossiurea, ma solo in assenza di anemia ^(34,39,50). Questo farmaco ha dimostrato di ridurre rapidamente e in modo duraturo la splenomegalia e i sintomi costituzionali, migliorando notevolmente la qualità di vita dei pazienti ^(12,40,41), nonché di incidere positivamente sull'OS ⁽⁶⁹⁾. I trials COMFORT-1 e COMFORT2 hanno stabilito l'efficacia del ruxolitinib anche in corso di splenomegalia sintomatica e con sintomi costituzionali. Il suo uso come trattamento pre-trapianto è ancora dibattuto ⁽⁵⁰⁾. Altro farmaco approvato dall'FDA utilizzabile similmente al ruxolitinib in caso di splenomegalia e sintomi costituzionali nei pazienti refrattari all'idrossiurea è il fedratinib (inibitore di JAK2), utilizzabile anche in caso di resistenza o intolleranza al ruxolitinib ^(34,50). Il tasso di risposta a questi trattamenti varia dal 30% al 50%. L'uso del ruxolitinib e del fedratinib è però limitato dalle citopenie (anemia, trombocitopenia) che possono indurre ^(21,34,50), sebbene non abbiano lo stesso valore prognostico negativo di quelle legate alla malattia ^(46,72).

In alternativa a questi farmaci, vi sono altri JAKi come il momelotinib (inibitore di JAK1/2, non ancora approvato dall'FDA) e il pacritinib (inibitore di JAK2, non ancora approvato in Italia). Questi farmaci sembrano avere un effetto benefico sull'eritropoiesi [forse per un'alterazione farmaco-indotta della produzione di epcidina ^(34,50)], tanto che stanno emergendo come possibili opzioni terapeutiche di seconda linea (a bassi dosaggi) in pazienti anemici. Generalmente si parla di pazienti in assenza di splenomegalia e sintomi

costituzionali, ma alcuni dati indicano il possibile uso del momelotinib anche in presenza di splenomegalia e sintomi costituzionali (studio MOMENTUM). Tuttavia, l'efficacia del momelotinib nella riduzione della splenomegalia non è stata confermata in modo definitivo (studio SIMPLIFY-2). Viene considerato il farmaco di prima scelta in specifici scenari (i.e. refrattarietà al ruxolitinib), ma il suo utilizzo deve essere ampiamente discusso con il paziente poiché una minoranza consistente di pazienti sviluppa una neuropatia periferica sensitiva potenzialmente irreversibile ^(34,50,64). Il pacritinib (negli Stati Uniti) si usa in caso di trombocitopenia grave (con addizionale azione sull'anemia, come citato) anche in presenza di splenomegalia (studi PERSIST-1 e PERSIST-2)^(50,64).

È importante notare che l'uso dei JAKi può essere limitato da effetti collaterali, tra cui anemia, trombocitopenia, neuropatia periferica, eventi cardiaci, diarrea, nausea, edema e infezioni opportunistiche, a seconda del farmaco utilizzato ^(50,64). L'eterogeneità della MF e le difficoltà legate all'aderenza al regime farmacologico complicano la definitiva valutazione dei benefici in termini di sopravvivenza derivanti dall'uso di questi farmaci. Fino ad ora, non ci sono evidenze chiare di un effetto positivo sui tassi di sopravvivenza con l'uso dei JAKi nella MF ⁽⁵⁰⁾.

1.9.4 Nuovi agenti terapeutici

Sono molti gli agenti a bersaglio molecolare attualmente in studio. Questi comprendono il navitoclax (inibitore delle proteine anti-apoptotiche della famiglia di Bcl-2) ^(34,64), il pelabresib (CPI-0610, un inibitore delle proteine BET che determina una riduzione di citochine e che induce la differenziazione megacariocitica ed eritroide) ⁽³⁴⁾, anticorpi monoclonali specifici per CALRmutata (INCA033989)⁽⁵⁰⁾, il piasclisib, (inibitore di PI3Kδ) ^(34,64), l'imetelstat (inibitore delle telomerasi) ^(34,64) e il KRT-232 (un inibitore di MDM2) ⁽⁶⁴⁾.

1.10 Fenotipi clinici di malattia

Recentemente sono stati descritti due fenotipi clinici di MF, sulla base dei valori emocromocitometrici alla diagnosi: un fenotipo mielodepletivo (MD) e un fenotipo mieloproliferativo (MP). Il fenotipo MD è caratterizzato da severa citopenia in assenza di

citosi, mentre il fenotipo MP presenta marcata leucocitosi e piastrinosi. Tali fenotipi sono stati riportati in tutte le forme di MF (i.e. ePMF, oPMF e SMF) ^(9,23,25,42-47).

Le definizioni di fenotipo MD e MP e i cutoff per i vari valori emocromocitometrici adottati in letteratura sono piuttosto eterogenei. In generale, si considerano citopenici pazienti con valori di WBC $<4 \times 10^9/L$, Hb $<10 \text{ g/dL}$ (nelle donne) e $<11 \text{ g/dL}$ (negli uomini) o PLTs $<100 \times 10^9/L$ (o, in alcuni studi, $<50 \times 10^9/L$). La definizione di citosi è invece meno riproducibile, in particolare per quanto riguarda i livelli di WBC. Alcuni studi propongono un cutoff di $13 \times 10^9/L$, altri invece adottano cutoff più elevati (e.g. $15 \times 10^9/L$). Di fronte a tale eterogenità, un recente studio di Coltro et al ha esaminato varie definizioni di fenotipo MD, identificando come consistenti i seguenti criteri diagnostici: (i) almeno una citopenia (WBC $<4 \times 10^9/L$; Hb $<10 \text{ g/dL}$ [nelle donne] e $<11 \text{ g/dL}$ [negli uomini]; PLTs $<100 \times 10^9/L$) e (ii) assenza di qualsiasi citosi (WBC $>15 \times 10^9/L$; Hb $>16 \text{ g/dL}$ [nelle donne] e $>16,5 \text{ g/dL}$ [negli uomini]; PLTs $>450 \times 10^9/L$).

1.10.1 Caratteristiche clinico-prognostiche e biologiche dei fenotipi MD e MP di Mielofibrosi

I fenotipi MD e MP dimostrano notevoli differenze in termini di presentazione clinica, risorse terapeutiche e caratteristiche genetiche. In particolare, i pazienti con fenotipo MD sono più frequentemente di sesso maschile ⁽³⁵⁾, hanno età più avanzata ^(25,42), presentano più frequentemente malattia in fase fibrotica avanzata ⁽²⁵⁾ e hanno livelli più elevati di blasti CD34-positivi nel sangue periferico. Di contro, i pazienti con fenotipo MP presentano più spesso splenomegalia massiva e sintomi costituzionali quali dolore addominale e sudorazioni notturne ^(25,42,46).

Per quanto riguarda la prognosi, il fenotipo MD è stato ripetutamente associato a peggior outcome in termini di OS e di evoluzione leucemica. Questi dati sono in linea con precedenti studi che hanno documentato un valore prognostico negativo per piastrinopenia e/o anemia nei pazienti con PMF/SMF ^(42,46) ⁽²⁵⁾. Al di là di possibili differenze biologiche, le discrepanze prognostiche tra fenotipo MD e MP sono verosimilmente imputabili anche alle diverse opzioni terapeutiche, che caratterizzano tali pazienti. Le uniche terapie possibili per i pazienti con PMF/SMF MD sono infatti l'alloSCT (disponibile solo in una minoranza di casi) o la terapia di supporto trasfusionale. I pazienti con PMF/SMF MP sono

invece candidabili a terapie citoriduttive (e.g. idorssiurea) o farmaci quali JAKi, potenzialmente in grado di migliorare la qualità di vita e l'outcome.

Per quanto riguarda l'assetto genetico delle forme MD e MP, notevoli differenze esistono in termini di mutazioni driver e non-driver. In particolare, le forme MD sono associate a basso burden allelico della mutazione di JAK2 e tale caratteristica correla con una prognosi più severa (^{30,35,46}). Non è ben chiaro perché un basso burden della mutazione V617F di JAK2 si associ a un fenotipo clinico più aggressivo. Si è ipotizzato che in tali casi co-esistano cloni JAK2-wild type biologicamente più aggressivi e responsabili del processo patogenetico (⁴²). Oltre a tale caratteristica, le PMF/SMF con fenotipo MD sono più frequentemente triplonegative rispetto alle forme MP (^{25,46}) e sono associate a mutazioni in geni non-driver ad alto rischio (^{9,25,42,67})(^{9,46,67}). Tali caratteristiche contribuiscono a spiegare la maggiore aggressività biologica delle MF con fenotipo MD (⁴²).

1.10.2 Istologia nei fenotipi MD e MP di Mielofibrosi

Ad oggi pochissimi studi hanno considerato le caratteristiche istologiche dei fenotipi MD e MP di PMF/SMF. Come precedentemente accennato, il fenotipo MD sembra essere più frequentemente associato a severe fibrosi interstiziale (^{25,42}). Oltre a ciò, alcune evidenze cliniche suggeriscono la presenza di PMF/SMF citopeniche, caratterizzate da aspetti di displasia delle serie emopoietiche (⁹). Il significato di tali dati alla luce della stratificazione delle MF in fenotipi MD e MP è, tuttavia, poco chiaro e nessuno studio ha a oggi condotto una precisa descrizione istologica di queste forme cliniche di malattia. Una più precisa caratterizzazione delle serie emopoietiche potrebbe tuttavia contribuire a chiarire la biologia dei fenotipi MD e MP, anche correlandoli con altre neoplasie mieloidi caratterizzate da gradi variabili di citopenia (e.g. MDS). La descrizione dell'istologia midollare delle forme MD/MP potrebbe infine identificare parametri morfologici/morfometrici utili a una miglior stratificazione prognostica dei pazienti.

2. SCOPI DELLO STUDIO

Scopi del presente studio sono:

- (i) descrivere le caratteristiche istologiche dei fenotipi MD e MP di Mielofibrosi;
- (ii) identificare possibili correlazioni tra reperti istologici e quadri clinici;
- (iii) valutare l'impatto dei reperti istologici nella stratificazione prognostica di malattia.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Popolazione dello studio

Questo studio retrospettivo monocentrico ha considerato una coorte di pazienti con diagnosi di PMF/SMF, trattati presso l'U.O.C. di Ematologia e Immunologia Clinica dell'Azienda Ospedale Università di Padova. Ai fini dello studio, sono stati adottati i seguenti criteri di inclusione: (i) età ≥ 18 anni; (ii) diagnosi clinico-patologica di PMF o SMF (sec. criteri WHO 2008 e successivi aggiornamenti); (iii) disponibilità di dati clinici, laboratoristici e terapeutici completi; (iv) follow-up clinico ≥ 6 mesi; (v) disponibilità di campioni istologici di biopsia osteomidollare adeguati alla valutazione morfologica/fenotipica. In base a tali criteri, sono stati identificati un totale di 94 pazienti.

3.2 Raccolta dei dati clinici

Per ciascun paziente, sono stati considerati i seguenti dati clinico-laboratoristici: (i) età e sesso; (ii) sintomi e reperti obiettivi alla diagnosi; (iii) esami laboratoristici alla diagnosi (conta di globuli bianchi [WBC]; livelli di emoglobina [Hb]; conta delle piastrine [PLTS]; presenza e conteggio di precursori emopoietici e mieloblasti su sangue periferico; livelli sierici di lattico deidrogenasi [LAD]); (iv) esami citogenetico-molecolari alla diagnosi; (v) terapia e outcome.

Per la stratificazione dei casi in base al fenotipo clinico di malattia, sono state considerate MD le PMF/SMF caratterizzate da: (i) ≥ 1 citopenia (WBC $< 4 \times 10^9/L$; Hb < 10 g/dL nelle femmine e < 11 g/dL nei maschi; PLTS $< 100 \times 10^9/L$); (ii) assenza di citosi (WBC $> 15 \times 10^9/L$; PLTS $> 450 \times 10^9/L$). I restanti casi sono stati identificati come MP (definizione di Coltro et al.) [4]. Data l'eterogeneità delle definizioni di fenotipo MD/MP presenti in letteratura, sono state condotte ulteriori analisi considerando criteri diagnostici più o meno stringenti di MD (i.e. definizione meno stringente: ≥ 1 citopenia senza specifiche relative a eventuali citosi; definizione più stringente: ≥ 2 citopenie in assenza di citosi).

3.3 Valutazione istologica dei campioni di BOM

Di ciascun paziente sono stati rivalutati i campioni istologici di biopsia osteomidollare (BOM) alla diagnosi, archiviati presso l'U.O.C. di Anatomia Patologica dell'Azienda

Ospedale Università di Padova. Dopo conferma della diagnosi di PMF/SMF, sono stati raccolti i seguenti dati istologici: (i) cellularità; (ii) rapporto mielo-eritroide; (iii) distribuzione e maturazione dei precursori eritroidi; (iv) numero, distribuzione e caratteristiche citologiche dei megacariociti (i.e. presenza e percentuale di megacariociti morfologicamente normali, con nuclei bulbosi, simil-ET, displastici per separazione nucleare, nuclei simil-del(5q) o aspetti del tipo micromegacariocita); (v) presenza e tipo di clusters di megacariociti; (vi) percentuale di precursori CD34-positivi; (viii) presenza ed entità della fibrosi interstiziale (MF 0-1 vs MF 2-3, sec. criteri WHO 2008); (ix) presenza ed entità dell'ectasia di sinusoidi; (x) presenza ed entità di ematopoiesi intra-sinusoidale.

Tutti i campioni sono stati rivalutati da due patologi non a conoscenza dei dati clinici, in sessioni congiunte al microscopio. La valutazione istologica è stata condotta sui preparati istologici originari, anche grazie all'utilizzo di colorazioni istochimiche (acido periodico di Shiff [PAS]; Giemsa per linfomi; impregnazione argentea per la valutazione della fibrosi midollare) e immunoistochimiche. Queste ultime hanno incluso immunoreazioni per CD34 (BIOCARE, clone QBEnd/10), CD61 (Leica, clone 2f2), E-caderina (Leica, clone 36B5) e mieloperossidasi (MPO, DAKO) (Bond Ready-to-Use III Leica). Le reazioni immunoistochimiche sono state condotte utilizzando il coloratore automatizzato BOND-MAX (Leica). Le immagini istologiche e i dati morfometrici sono stati acquisiti mediante programma *Leica Application Suite X* (versione 5.1.0).

3.4 Elaborazione dei dati, analisi statistiche e notifica al Comitato Etico Territoriale

I dati clinico-patologici sono stati raccolti in un unico database (file Excel) e sono stati analizzati mediante test non parametrici per variabili qualitative (Fisher's exact test) e quantitative (Student's t-test). Le indagini di sopravvivenza con metodica univariata sono state effettuate mediante curve di Kaplan-Meier e test log-rank. A tal fine, la sopravvivenza globale (Overall survival, OS) è stata calcolata come il periodo intercorrente tra la data della diagnosi e la data del decesso/ultimo follow-up. I pazienti persi al follow-up sono stati censiti al momento dell'ultimo contatto. La sopravvivenza libera da progressione (Progression free survival, PFS) è stata calcolata come il periodo intercorrente tra la data della diagnosi e la data di progressione/recidiva di malattia o la data dell'ultimo follow-up. Al fine di evitare potenziali bias legati all'effetto di terapie, sono state condotte analisi separate per i pazienti affetti da PMF (casi therapy-naive) e per quelli affetti da SMF (casi

potenzialmente trattati con terapie citoriduttive, antiaggreganti e/o salassi). I dati sono stati analizzati usando il software Jamovi (versione 2.3.28), considerando statisticamente significativi valori di $p < 0,05$.

Il presente studio è stato condotto in accordo con la dichiarazione di Helsinki, previa notifica al Comitato Etico Territoriale (CET) competente (CET Area Centro-Est Veneto; codice di notifica: 429n/AO/23).

4. RISULTATI

4.1 Caratteristiche cliniche e distribuzione dei fenotipi clinici di PMF

La coorte di pazienti affetti da PMF comprendeva 65/94 (69%) casi (ePMF: 28/65 [43%]; oPMF: 37/65 [57%]) con età media alla diagnosi di 70,2 anni (range: 25,0 - 87,3 anni) e rapporto tra pazienti di sesso maschile e di sesso femminile pari a 1,5:1 (pazienti di sesso femminile: 26/65 [40%]; pazienti di sesso maschile: 39/65 [60%]) (Tabella 2).

Sintomi sistemici (febbre, calo ponderale o sudorazioni notturne) erano presenti in 17/65 (26%) pazienti e splenomegalia è stata documentata in 35/65 (54%) casi. Gli esami emocromocitometrici hanno evidenziato anemia (Hb <11 g/dL in maschi; <10 g/dL in femmine) in 23/65 (35%), leucopenia (WBC <4 x 10⁹/L) in 4/65 (6%) e piastrinopenia (PLTS <100 x 10⁹/L) in 6/65 (9%) casi. Due o più citopenie erano presenti in 8/65 (12%) pazienti.

In totale, 13/65 (20%) casi avevano fenotipo MD e 52/65 (80%) casi avevano fenotipo MP. Nessun paziente affetto da ePMF presentava fenotipo MD. Nei casi di oPMF, il confronto tra fenotipo MD e MP non ha dimostrato differenze statisticamente significative in alcun parametro relativo alla presentazione clinica di malattia (i.e. sesso, età alla diagnosi, presenza/assenza di splenomegalia, presenza/assenza di sintomi costituzionali) (Tabella 3).

4.2 Caratteristiche istologiche dei fenotipi MD e MP di PMF

In tutti i casi di PMF, sono stati documentati reperti istologici diagnostici di malattia. In particolare, la cellularità midollare era normale/aumentata in 60/65 (92%) casi e ridotta in 5/65 (8%). La serie mieloide prevaleva sulla serie eritroide (rapporto mielo-eritroide medio: 4,3:1) con normale maturazione o lieve incremento di precursori della granulopoiesi, eritropoiesi maturante e megacariocitopoiesi aumentata (numero medio di megacariociti: 22,8/HPF). La distribuzione per fibrosi midollare ha documentato 24/65 (37%) casi con fibrosi MF-1, 17/65 (26%) con MF-2 e 20/65 (31%) con MF-3. Una normale trama reticolinica è stata documentata in 4/65 (6%) casi.

Tabella 2. Caratteristiche clinico-laboratoristiche dei pazienti con Mielofibrosi					
	Popolazione totale (n=94)	ePMF (n=28)	oPMF(n=37)	PMF(n=65)	SMF(n=29)
Sesso (%)					
Maschi	58 (62)	15 (54)	24 (65)	39 (60)	19 (66)
Femmine	36 (38)	13 (46)	13 (35)	26 (40)	10 (34)
Età media (range)	68,4 (25-87,3)	69,2 (25 - 87,3)	71 (41,1 - 86,3)	70,2 (25 - 87,3)	64,5 (44,2 - 79,9)
Sintomi costituzionali (%)	21 (22)	4 (14)	13 (35)	17 (26)	4 (14)
Splenomegalia (%)	52 (55)	14 (50)	21 (57)	35 (54)	17 (59)
Valore medio Hb (range)					
Maschi	114,2 (65 - 171)	133,5 (94 - 164)	102,8 (77 - 139)	114,6 (77 - 164)	113,5 (65 - 171)
Femmine	112,5 (82 - 153)	127 (87 - 153)	108,9 (87 - 141)	116,5 (87 - 153)	113,5 (82 - 121)
Valore medio GB (range)	13 (2,4 - 75,12)	11,8 (3,1 - 42,2)	13,4 (2,42 - 75,12)	12,7 (2,42 - 75,12)	13,7 (3,34 - 56,33)
Valore medio PLT (range)	423 (19 - 1342)	667,3 (105 - 1342)	306,6 (30 - 789)	462 (30 - 1342)	335,6 (19 - 799)

Il confronto tra fenotipo MD e MP ha dimostrato significative differenze nelle caratteristiche della megacariocitopoiesi e dell'eritropoiesi, nel grado di fibrosi midollare e in altri parametri morfologici e morfometrici. In particolare, i fenotipi MD erano caratterizzati da più alta frequenza di micromegacariociti (11/13 [85%] vs 16/52 [31%]; $p < 0,001$), megacariociti con nuclei separati (8/13 [62%] MD vs 15/52 [29%] MP; $p = 0,05$) e simil-del(5q) (i.e. megacariociti di taglia ridotta con nuclei ipolobati; 8/13 [62%] MD vs 15/52 [29%] MP; $p = 0,05$). Il fenotipo MD presentava inoltre più alta frequenza di megacariociti simil-MDS di qualsiasi tipo (i.e. >10% di micromegacariociti, megacariociti con nuclei separati e/o simil del(5q) rispetto al totale della megacariocitopoiesi; 13/13 [100%] vs 23/52 [52%]; $p < 0,001$). La morfologia megacariocitaria simil-MDS correlava significativamente con il grado di fibrosi midollare (casi con megacariociti displastici: 20/37 [54%] in fibrosi MF-2/MF-3 vs 5/28 [18%] in fibrosi MF-0/MF1; $p = 0,01$).

Oltre a differenze nella megacariocitopoiesi, il fenotipo MD era più frequentemente associato a incremento di precursori eritroidi immaturi (i.e. aggregati di ≥ 5 proeritroblasti/eritroblasti basofili; 7/13 [54%] MD vs 8/52 [15%] MP; $p = 0,01$), a diffusa ectasia sinusoidale (i.e. $\geq 50\%$ di sinusoidi con lume ectasico; 11/13 [85%] MD vs 22/52 [42%] MP; $p = 0,01$), a minor emopoiesi intrasinusoidale (i.e. emopoiesi in $>66.7\%$ dei sinusoidi: 2/13 [15%] in MD vs 30/52 [58%] in MP; $p = 0,01$), a una minor percentuale di blasti midollari (blasti CD34-positivi: 1,3% in MD vs 2,2% in MP; $p = 0,03$), e a un maggior grado di fibrosi midollare (fibrosi MF-2/MF-3: 13/13 [100%] MD vs 24/52 [46%] MP; $p < 0,001$) (Figure 1 e 2)(Tabella 4). Simili differenze istologiche tra fenotipi clinici di PMF sono state osservate, adottando definizioni alternative di fenotipo MD (cfr. paragrafo 3.2 dei Materiali e Metodi).

Tabella 3. Caratteristiche clinico-laboratoristiche dei pazienti a fenotipo MD e MP						
	Popolazione totale		oPM (n=37)		SMF (n=29)	
	MD (n=25)	MP (n=69)	MD (13)	MP (n=24)	MD (n=12)	MP (n=17)
Sesso (%)						
Maschi	19(76)	39 (57)	10 (77)	14 (56)	9 (75)	10 (59)
Femmine	6 (24)	30 (43)	3 (23)	11 (44)	3 (25)	7 (41)
Età media	68,1	68,5	72,8	70,1	63,4	65,2
(range)	(44,2 - 86,3)	(25 - 87,3)	(53,1 - 86,3)	(41,1 - 85,5)	(44,2 - 79,9)	(51,8 - 78,9)
Sintomi costituzionali (%)						
Sintomi costituzionali (%)	8 (32)	13 (19)	6 (46)	7 (29)	2 (17)	2 (12)
Splenomegalia (%)						
Splenomegalia (%)	16 (64)	36 (52)	8 (62)	13 (54)	8 (67)	9 (53)
Valore medio Hb						
Maschi	93,5	124,3	86	114,8	101,9	124
(range)	(65 - 137)	(79 - 171)	(77 - 107)	(87 - 139)	(65 - 137)	(79 - 171)
Femmine	90,2	117	89,3	114,8	91	107,1
(range)	(82 - 98)	(87 - 153)	(87 - 94)	(93 - 141)	(82 - 98)	(98 - 121)
Valore medio GB						
Valore medio GB	7	15,2	5,7	17,6	8,4	14,6
(range)	(2,42 - 13,9)	(3,1 - 75,12)	(2,42 - 8,68)	(5,67-75,12)	(3,34 - 13,9)	(3,1 - 75,12)
Valore medio PLT						
Valore medio PLT	166	516,1	151,6	390,6	181,6	531,4
(range)	(19 - 385)	(77 - 1342)	(30 - 371)	(113 - 789)	(19 - 385)	(103 - 1342)

4.3 Caratteristiche genetiche delle PMF e correlazione con i fenotipi clinici di malattia

Dati relativi al cariotipo midollare erano disponibili in 37/65 (57%) casi. Alterazioni citogenetiche sono state documentate in 5/37 (14%) casi. Tali alterazioni comprendevano la del(13q) (2/37 [5,4%]), la +1 (1/37 [2,7%]), la del(1q) (1/37 [2,7%]), la ring 7q- (1/37 [2,7%]), la +8 (1/37 [2,7%]), la +9 (2/37 [5,4%]), la t(1;9) (1/37 [2,7%]) e la -Y (1/37 [2,7%]). Cariotipo complesso è stato documentato in 1/37 (2,7%) caso. Per quanto tutti i casi con alterazioni citogenetiche avessero fenotipo MP, il confronto tra casi MD e MP non ha documentato differenze statisticamente significative (possibile effetto della ridotta numerosità del campione).

Dati su geni driver di MPN (i.e. JAK2, CALR, MPL) erano disponibili in 61/65 (95%) casi. Di questi, 47/61 (77%) casi presentavano la mutazione V617F di JAK2 (38/47 [81%] casi con fenotipo MP e 9/47 [19%] casi con fenotipo MD), 7/61 (11,5%) presentavano mutazioni di CALR (casi con fenotipo MP) e 7/61 (11,5%) presentavano mutazioni di MPL (di cui 5/7 [71%] MP e 2/7 [29%] MD). La distribuzione di tali mutazioni non differiva significativamente tra fenotipo MD e MP ($p > 0,05$). Una profilazione estesa per mutazioni non-driver di MPN era disponibile in 4/65 (6%) casi, tutti caratterizzati da fenotipo MP. In 3 di questi, sono state documentate mutazioni dei geni ASXL1 (2/3 [67%] casi) e U2AF1 (1/3 [33%] casi).

Tabella 4. Caratteristiche istologiche nei pazienti a fenotipo MD e MP in PMF e SMF

	PMF(n =65)			SMF (n=29)		
	MD (n=13)	MP (n=52)	p value	MD (n=12)	MP (n=17)	p value2
Cellularità %	59	66,7	n.s.	80,6	83,1	n.s.
(range)	(7,5 – 90)	(5 – 95)	n.s.	(40 – 95)	(50 – 95)	
Fibrosi (%)						
0-1	0 (0)	28 (54)	< 0,001	0(0)	0(0)	n.s.
2-3	13 (100)	24 (46)		12 (100)	17 (100)	n.s.
Blasti CD34	1,3	2,2	0,03	1,6	2,2	n.s.
(range)	(0,5 – 4)	(0,5 - 6,5)		(0,5 – 4)	(0 – 9)	n.s.
M:E ratio >2	0 (0)	1 (2)	n.s.	1 (8)	0 (0)	n.s.
MK simil-ET (%)						
Presenti	2 (15)	28 (54)	0,02	2 (17)	7 (41)	n.s.
Assenti	11 (85)	24 (46)		10 (83)	10 (59)	n.s.
MK simil-5q (%)						
Presenti	8 (62)	15 (29)	0,05	8 (67)	7 (41)	n.s.
Assenti	5 (38)	37 (72)		4 (33)	10 (59)	n.s.
MK con nuclei separati (%)						
Presenti	8 (62)	15 (29)	0,05	5 (42)	4 (24)	n.s.
Assenti	5 (38)	37 (71)		7 (58)	13 (76)	n.s.
Micromegacariociti (%)						
Presenti	11 (85)	16 (31)	< 0,001	7 (58)	4 (24)	n.s.
Assenti	2 (15)	36 (69)		5 (42)	13 (76)	n.s.
Megacariociti simil-MDS (%)						
Presenti	11 (85)	14 (27)	< 0,001	8 (67)	5 (29)	0,07
Assenti	2 (15)	38 (73)		4 (33)	12 (71)	
Cluster densi (%)						
Presenti	8 (62)	36 (69)	n.s.	8 (67)	15 (88)	n.s.
Assenti	5 (38)	16 (31)		4 (33)	2 (12)	n.s.
Cluster larghi (%)						
Presenti	6 (46)	35 (67)	n.s.	11 (92)	16 (94)	n.s.
Assenti	7 (54)	17 (33)		1 (8)	1 (6)	n.s.
Espansione di precursori eritroidi (%)						
Presente	7 (54)	8 (15)	0,01	10 (83)	6 (35)	0,02
Assente	6 (46)	44 (85)		2 (17)	11 (65)	
Displasia eritroide topografica (%)						
Presente	0 (0)	2 (4)	n.s.	1 (8)	0 (0)	n.s.
Assente	13 (100)	50 (96)		11 (92)	17 (100)	n.s.
Ectasia dei sinusoidi (%)						
Presente	11(85)	22 (42)	0,01	9 (75)	11 (65)	n.s.
Assente	2 (15)	30 (58)		3 (25)	6 (35)	n.s.
Emopoiesi intrasinusoidale (%)						
Presente	2 (15)	29 (56)	0,01	7 (58)	10 (59)	n.s.

PMF, mielofibrosi primitiva; MD, fenotipo mielodepletivo; MP, fenotipo mieloproliferativo; M:E, rapporto mielo:eritroide;

MK, megacariociti; ET, trombocitemia essenziale; MDS, sindrome mielodisplastica; n.s., non significativa.

Megacariociti con morfologia simil-MDS con delezione del 5q.

Presenti se complessivamente la percentuale dei megacariociti con morfologia simil-MDS (micromegacariociti, megacariociti con nuclei separati e megacariociti di taglia ridotta con nuclei ipolobati [i.e. simil-5q]) era maggiore o uguale al 10%.

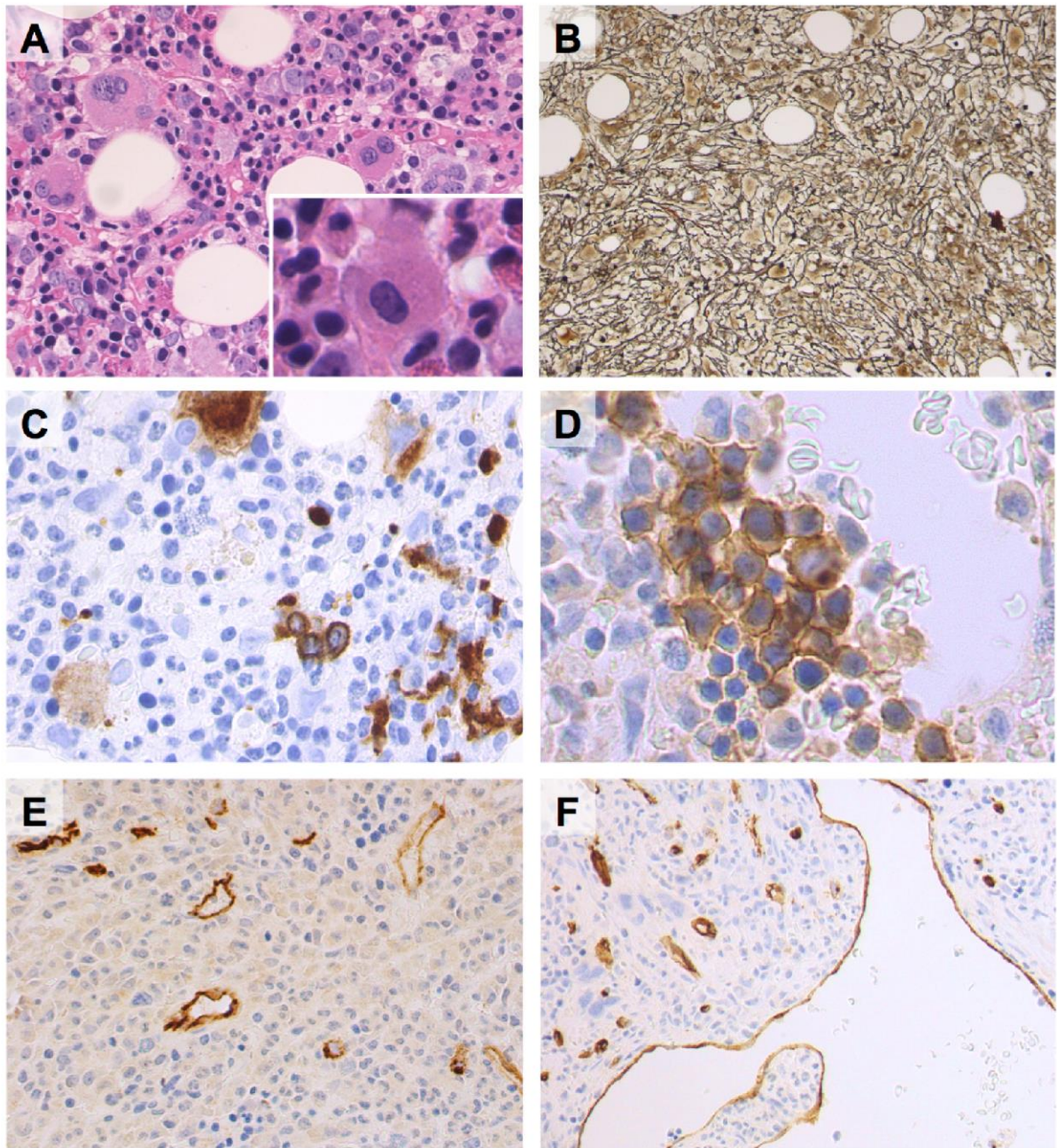


Figura 1. Caratteristiche istologiche del fenotipo Mielodepletivo della Mielofibrosi. Il fenotipo MD di MF è più frequentemente associato alla presenza di megacariociti con nuclei separati (A), simil-5q (insetto) e micromegacariociti (C) e si associa a una fibrosi di grado più severo (B). Si riscontra inoltre più frequentemente un aumento dei precursori eritroidi immaturi (D) e una percentuale più bassa di blasti midollari CD34-positivi (E). I sinusoidi sono più frequentemente ectasici e con una minor quantità di emopoiesi intrasinusoidale (F).

(Colorazione con ematossilina/eosina, impregnazione argentea, immunoperossidasi).

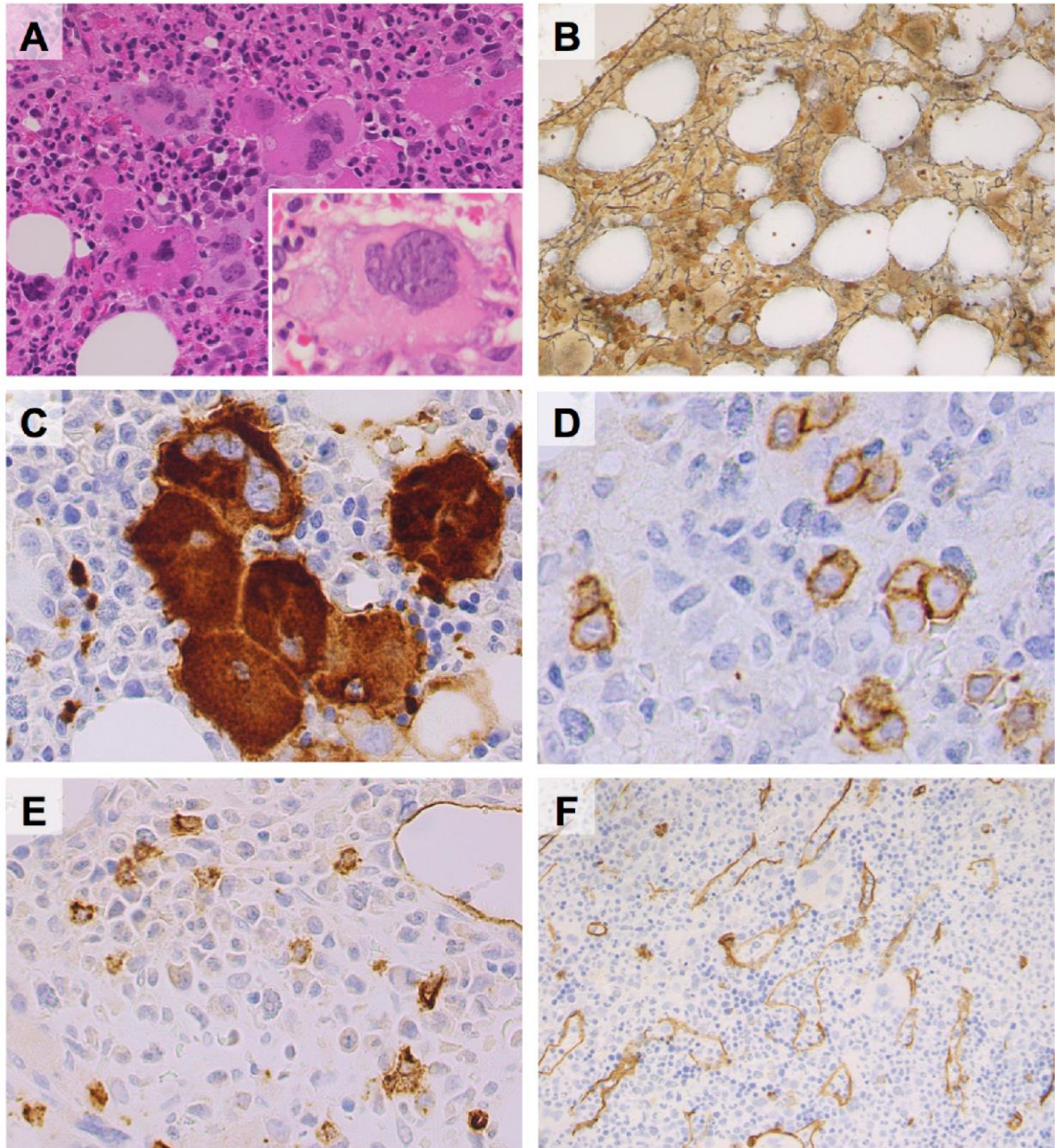


Figura 2. Caratteristiche istologiche del fenotipo Mieloproliferativo della Mielofibrosi. Il fenotipo MP di MF è caratterizzato dalla presenza di megacariociti bulbosi (inserto) e organizzati in clusters (A,C) e si associa a una fibrosi di grado più lieve (B). Si riscontra meno frequentemente un aumento dei precursori eritroidi immaturi (D), mentre è associato ad una percentuale più elevata di blasti midollari CD34positivi (E). I sinusoidi sono più frequentemente non ectasici e con una maggior quantità di emopoiesi intrasinusoidale (F).

(Colorazione con ematossilina/eosina, impregnazione argentea, immunoperoxidasi).

4.4 Outcome della PMF e impatto prognostico delle caratteristiche clinico-patologiche

Durante il periodo censito dallo studio, sono stati registrati 15/65 (23%) decessi tra i pazienti con PMF, di cui 5/15 (33%) casi con fenotipo MP e 10/15 (67%) con fenotipo MD (durata media del follow-up: 46 mesi, range: 19 – 80 mesi).

Per valutare l'impatto prognostico delle caratteristiche cliniche e istologiche della PMF, sono state condotte analisi di sopravvivenza con metodica univariata, che hanno documentato un'associazione statisticamente significativa tra riduzione dell'overall survival (OS) e displasia di megacariociti (Hazard ratio [HR] 3,78; $p = 0,01$), età >65 anni (HR = 7,69; $p = 0,02$), livelli di Hb <10 g/dL (HR = 4,22; $p = 0,01$), WBC >25 x10⁹/L (HR = 3,84; $p = 0,01$) e alto score IPSS (i.e. IPSS Int2/High; $p = 0,001$). La stratificazione per fenotipo clinico di malattia ha inoltre documentato un trend di significatività statistica tra riduzione dell'OS e fenotipo MD (HR 2,57; $p = 0,08$; Figura 3).

La limitata numerosità della popolazione di studio non ha consentito analisi multivariate per stabilire il valore prognostico indipendente di tali parametri clinico-patologici.

Alla luce di questi risultati, sono state condotte analisi di sopravvivenza che considerassero la valutazione integrata di displasia megacariocitaria e score IPSS. Tali analisi hanno identificato sottogruppi di pazienti prognosticamente rilevanti, anche a parità di score IPSS ($p = 0,01$; Figura 4).

4.5 Caratterizzazione clinico-patologica e prognostica della SMF

La popolazione affetta da SMF era composta da 29/94 (31%) pazienti (post-PV MF: 10/29 [24%]; post-ET MF: 19/29 [66%]), con età media alla diagnosi di 64,5 anni e rapporto maschi:femmine pari a 1,9:1 (pazienti di sesso femminile: 10 [34%]; pazienti di sesso maschile: 19 [66%]). L'età media alla diagnosi era significativamente maggiore rispetto a quella dei pazienti con PMF ($p = 0,03$)

Tra i pazienti con SMF, 12/29 (41%) presentavano fenotipo MD e 17/29 (59%) fenotipo MP. Il confronto tra SMF con fenotipo MD e fenotipo MP non ha dimostrato differenze statisticamente significative in alcuno dei parametri clinici considerati (Tabella 3).

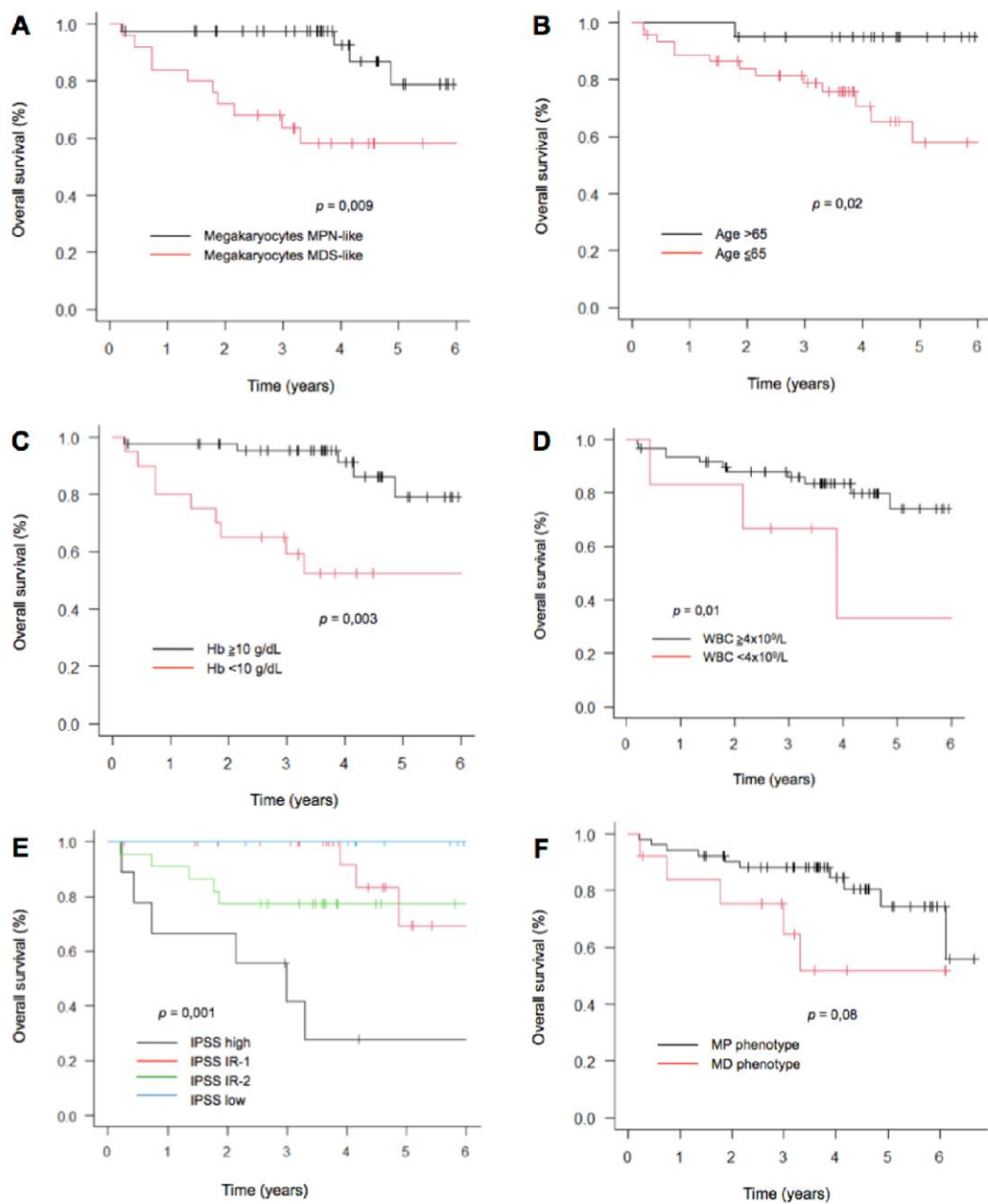


Figura 3. Curve di sopravvivenza in Mielofibrosi Primitiva in analisi univariata. Le analisi di sopravvivenza hanno mostrato un'associazione statisticamente significativa tra riduzione dell'overall survival (OS) e displasia di megacariociti (A), età superiore a 65 anni (B), livelli di Hb inferiori a 10 g/dL (C), conta dei globuli bianchi superiore a $25 \times 10^9/L$ (D) e alto score IPSS (i.e. IPSS Int-2/High) (E). La stratificazione per fenotipo clinico di malattia ha documentato un trend di significatività statistica tra riduzione dell'OS e fenotipo MD (F).

La valutazione midollare ha documentato caratteristiche simili a quelle dell'oPMF con cellularità normale/aumentata in tutti i casi (cellularità media: 82%), prevalenza della serie mieloide e incremento della megacariocitopoiesi con tendenza aggregativa in clusters lassi e/o densi. Sinusoidi ectasici ed emopoiesi intravascolare sono stati documentati in 20/29 (69%) e 17/29 (59%) casi. Il confronto tra caratteristiche istologiche dei fenotipi MD e MP ha documentato una maggior frequenza di megacariociti simil-MDS e una più frequente espansione di precursori eritroidi nel fenotipo MD (megacariociti displastici: 8/12 [67%] in MD vs 5/17 [29%] in MP, trend di significatività statistica, $p = 0,07$; aggregati di ≥ 5 proeritroblasti/eritoblasti basofili: 10/12 [83%] MD vs 6/17 [35%] MP; $p = 0,02$; Tabella4).

Dati relativi al cariotipo midollare erano disponibili in 20/29 (69%) casi. Alterazioni citogenetiche sono state documentate in 9/20 (45%) casi (3/9 [33%] casi con fenotipo MP e 6/9 [67%] con fenotipo MD). Tali alterazioni comprendevano la del(20q) (5/9 [56%]), la +8 (2/9 [22%]) la +9 (1/9 [11%]), le del(17p) e del(5q-) (1/9 [11%]) e la -Y (1/9 [11%]). La del(20q) è risultata significativamente più frequente nelle SMF con fenotipo MD rispetto a quelle con fenotipo MP (4/5 [80%] in MD vs 1/5 [20%] in MP; $p = 0,03$). Nessun'altra alterazione citogenetica è risultata significativamente associata al fenotipo clinico di malattia.

Per quanto riguarda le analisi mutazionali associate a neoplasie mieloidi, dati su geni driver di MPN (i.e. JAK2, CALR, MPL) erano disponibili in 28/29 (97%) casi. Di questi, 19/28 (68%) casi presentavano la mutazione V617F di JAK2 (12/19 [63%] casi con fenotipo MP e 7/19 [37%] casi con fenotipo MD), 7/28 (25%) presentavano mutazioni di CALR (4/7 [57%] casi con fenotipo MP e 3/7 [43%] casi con fenotipo MD), 1/28 (4%) caso (a fenotipo MP) presentava mutazioni di MPL e 1/28 (4%) caso (a fenotipo MD) è risultato triplo-negativo. La distribuzione di tali mutazioni non differiva significativamente tra fenotipo MD e MP ($p > 0,05$).

Una profilazione estesa per mutazioni non-driver di MPN era disponibile in 7/29 (24%) casi. Le mutazioni (presenti in 6/7 [86%] casi, 2/6 (33%) a fenotipo MD e 4/6 (67%) a fenotipo MP) documentate erano a carico dei geni ASXL1 (2/6 [33%] casi, entrambi a fenotipo MP), DNMT3A (1/6 [17%] caso a fenotipo MD), EZH2 (1/6 [17%] caso a fenotipo MD), NRAS (2/6 [33%] casi, uno a fenotipo MP e uno a fenotipo MD), TET2 (1/6 [17%] caso a fenotipo MP), SF3B1 (2/6 [33%] casi, uno a fenotipo MP e uno a fenotipo MD) e CBL (1/6 [17%] caso a fenotipo MD).

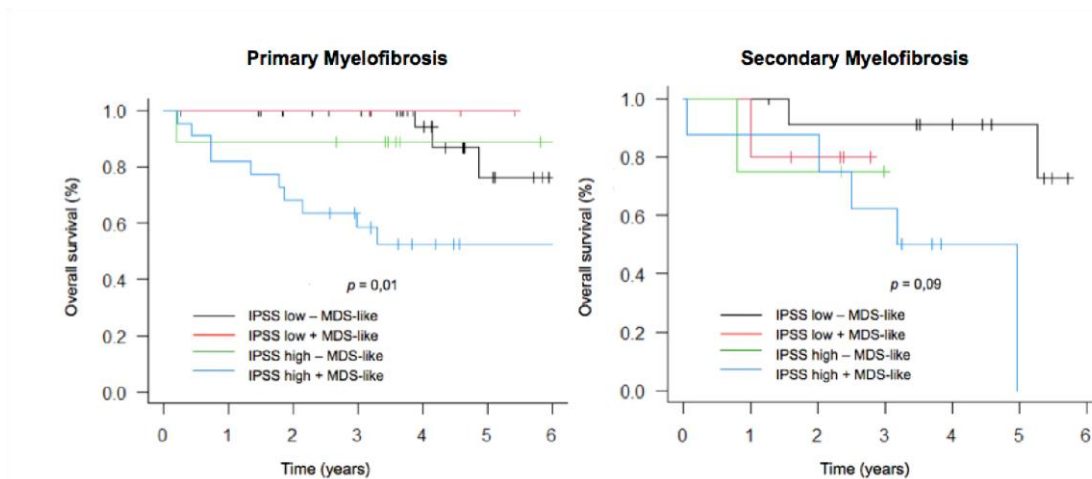


Figura 4. Valutazione integrata di IPSS e displasia megacariocitaria in Mielofibrosi Primitiva e Mielofibrosi Secondaria. La valutazione integrata di score IPSS e displasia megacariocitaria identifica sottogruppi di pazienti prognosticamente rilevanti, anche a parità di score IPSS sia in PMF (statisticamente significativo) che in SMF (trend di significatività statistica).

Per quanto riguarda la prognosi, 9/29 (32%) pazienti con SMF sono deceduti durante il follow-up (durata media del follow-up: 39 mesi, range: 1 – 74). Analogamente a quanto osservato per la PMF, la presenza di megacariociti displastici correlava con una peggior OS (HR = 5,15; $p = 0,03$) e la valutazione integrata di score IPSS e displasia megacariocitaria consentiva una miglior stratificazione dei pazienti rispetto al solo IPSS (trend di significatività statistica, $p = 0,09$) (Figura 4).

5. DISCUSSIONE

Le neoplasie mieloproliferative (MPN) Philadelphia-negative a impronta mielofibrotica sono un eterogeneo gruppo di patologie ematologiche, delle quali sono riconosciuti due fenotipi clinici (i.e. fenotipo MD e MP). Tali fenotipi sono considerati estremi di uno stesso spettro biologico e si distinguono per caratteristiche cliniche (sintomatologia ed entità della splenomegalia), laboratoristiche (presenza e grado di citopenie e/o citosi), genetiche (burden di mutazioni driver e presenza di mutazioni non-driver ad alto rischio) e prognostiche.

Di notevole interesse è, in particolare, il fenotipo MD, che risulta associato a una prognosi particolarmente severa, spesso senza concrete possibilità di trattamento. Nel dettaglio, il fenotipo MD è caratterizzato da citopenie severe, da un profilo genetico ricco in mutazioni non MPN-ristrette, da un maggior grado di fibrosi midollare e da atipie megacariocitarie ancora poco caratterizzate (⁶⁷). Questi aspetti rendono il fenotipo MD di MF affine ad alcune forme di MDS e propongono l'esistenza di un nesso biologico tra tali neoplasie.

Per valutare questa possibilità e accrescere le conoscenze sui fenotipi MD e MP di MF, il presente studio ha considerato le caratteristiche istologiche di un'ampia serie di PMF e SMF. Ci ha consentito di identificare correlazioni tra reperti morfologici e quadri clinici, valutando anche l'impatto prognostico di specifici reperti istologici.

Per quanto riguarda le caratteristiche morfologiche del midollo osseo, il fenotipo MD ha dimostrato una maggior frequenza di displasia megacariocitaria ed eritroide, più severa fibrosi interstiziale e maggior ectasia sinusoidale rispetto ai fenotipi MP. A differenza di precedenti studi (^{30,42}), il confronto tra variabili cliniche (i.e. sesso, età alla diagnosi, sintomi costituzionali, splenomegalia) non ha invece documentato differenze significative tra i due fenotipi clinici. Le ragioni di questa differenza non sono al momento note, ma potrebbero dipendere dalla ridotta numerosità delle casistiche analizzate, dall'eterogeneità dei criteri adottati per definire i fenotipi MD o da differenze intrinseche alle popolazioni oggetto dei vari studi.

I nostri risultati sono stati ottenuti considerando una rigorosa definizione di fenotipo MD, secondo quanto recentemente proposto da Coltro et al (i.e. assenza di citosi e citopenie severe, quali WBC <4 x10⁹/L, Hb <10 g/dL nelle donne o <11 g/dL negli uomini e PLTs <100 x10⁹/L) (⁴⁴). Data l'eterogeneità di definizioni pubblicate in letteratura, sono stati considerati anche criteri alternativi per la stratificazione in fenotipo MD e MP, che hanno

condotto a risultati largamente sovrapponibili a quelli ottenuti con la definizione di Coltro et al. La riproducibilità di tali risultati e la loro conferma nelle varie forme di MF (i.e. ePMF, oPMF e SMF) dimostra la consistenza dei reperti istologici e il limitato impatto di pregresse terapie o della fibrosi midollare sugli aspetti mielodisplastici della megacariocitopoiesi e dell'eritropoiesi.

La valutazione morfologica del midollo osseo è stata integrata, ove possibile, con i dati citogenetico-molecolari. Tali analisi, pur se limitate dalla bassa numerosità di casi disponibili, hanno dimostrato un'associazione statisticamente significativa tra fenotipo MD e del(20q) nelle SMF (l'assenza di alterazioni del 20q non ha consentito tale valutazione nei casi di PMF). Questo dato è di particolare interesse, in quanto la del(20q) è un'alterazione citogenetica tipica anche delle MDS (3). La globalità dei reperti clinici, morfologici e citogenetici suggerisce pertanto l'esistenza di un nesso biologico tra MF con fenotipo MD e MDS, confermando la plasticità delle neoplasie mieloidi e le tradizionali difficoltà riguardanti la loro classificazione.

Gli aspetti simil-MDS dei casi con fenotipo MD del nostro studio potrebbero suggerire errori nel loro inquadramento diagnostico. Questa possibilità è tuttavia esclusa dalle procedure adottate per il reclutamento dei casi. Ogni PMF/SMF, infatti, è stata criticamente rivalutata, considerando la globalità dei dati clinici, istologici e citogenetico-molecolari. Nei casi di MF con fenotipo MD, la diagnosi di MDS con fibrosi è stata così esclusa dalla combinazione di dati clinici (i.e. presenza di splenomegalia), laboratoristici (i.e. documentazione di anemia non macrocitica), istologici (i.e. presenza di cluster di megacariociti con nuclei bulbosi, oltre a megacariociti simil-MDS) e molecolari (i.e. presenza di mutazioni driver di MPN; elevato burden allelico di tali mutazioni). Questo approccio integrato ha così consentito la diagnosi di PMF/SMF secondo i criteri in vigore (Classificazione WHO 2008 e successivi aggiornamenti), escludendo ogni altra alternativa diagnostica.

Oltre a considerare gli aspetti istologici e biologici dei fenotipi clinici di MF, il presente studio ha valutato anche l'impatto prognostico del fenotipo MD e di alterazioni morfologiche simil-MDS. La limitata numerosità del campione ha consentito soltanto analisi con metodica univariata. Come tali, i nostri risultati necessitano di conferme su più ampie coorti di pazienti anche con analisi di tipo multivariato. Nonostante questi limiti, le analisi di sopravvivenza nel sottogruppo delle PMF hanno dimostrato un trend di

significatività statistica tra riduzione dell'OS e fenotipo MD. Tale risultato è in linea con quanto riportato in precedenti studi [4,33,42] e conferma la maggiore aggressività biologica delle PMF con fenotipo citopenico. Oltre a questo, un elevato score IPSS (IPSS Int-2 e High) e la presenza di displasia megacariocitaria (i.e. megacariociti simil-MDS >10% della megacariocitopoiesi totale) correlavano significativamente con una riduzione dell'OS. Inoltre, la valutazione integrata di displasia megariocitaria e IPSS ha identificato sottogruppi di pazienti con prognosi diversificata, anche a parità di score IPSS. Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti nella coorte delle SMF, seppur solo con trend di significatività statistica (analisi limitate dalla bassa numerosità di casi). Di interesse, infine, è notare come la displasia megacariocitaria abbia consentito una stratificazione prognostica migliore rispetto a quella basata su fenotipi clinici di malattia. Ci suggerisce come vero determinante prognostico delle forme MD la presenza di alterazioni midollari simil-MDS, che sono più frequenti in questo gruppo di pazienti. Tale ipotesi deve essere confermata da future analisi su più ampie popolazioni con analisi multivariate.

Nel complesso, i nostri risultati suggeriscono un rilevante ruolo prognostico per specifici parametri istologici (i.e. displasia megacariocitaria), che potrebbero essere integrati con gli score clinici per una miglior stratificazione prognostica dei pazienti. Un limite all'applicazione dei parametri istologici è, tuttavia, rappresentato dalla difficoltà della diagnosi di displasia megacariocitaria in corso di PMF/SMF. I megacariociti di tali condizioni hanno, infatti, morfologia spesso ambigua e la distinzione tra megacariociti con nuclei bulbosi e megacariociti simil-MDS in alcuni casi è molto complessa. Per ovviare a tali limiti, il presente studio ha considerato criteri stringenti di displasia dei megacariociti, limitandosi a considerare solo micromegacariociti (i.e. megacariociti di taglia uguale a precursori mieloidi, identificati grazie a colorazione immunostochimica con CD61), megacariociti con nuclei separati (non bulbosi) e megacariociti di taglia ridotta con nuclei ipolobulati simil-MDS con del(5q). Per considerare un caso simil-MDS, tali megacariociti dovevano costituire >10% della megacariocitopoiesi totale. Tali criteri risultano di semplice applicazione e potrebbero limitare la variabilità interosservatore. In proposito, è di interesse notare che anche la sola presenza di micromegacariociti correlava significativamente con la prognosi. Nell'ambito della displasia megacariocitaria, tali cellule sono le più facilmente definibili e il loro riconoscimento è soggetto a una minima variabilità inter-osservatore. Futuri studi su score integrati clinico-patologici potrebbero

quindi considerare la sola presenza di micromegacariociti unitamente alle categorie di rischio clinico identificate con l'IPSS.

6. CONCLUSIONI

La MF è una malattia biologicamente, clinicamente e istologicamente eterogena. I fenotipi clinici di malattia correlano significativamente con la morfologia midollare e suggeriscono l'esistenza di un nesso biologico tra PMF/SMF con fenotipo MD e alcune forme di MDS. La presenza di displasia della megacariocitopoiesi potrebbe rappresentare un nuovo fattore prognosticamente rilevante nei pazienti con PMF/SMF, indipendentemente dal fenotipo clinico di malattia. Una valutazione integrata di score IPSS e displasia megacariocitaria potrebbe, in particolare, contribuire a una miglior stratificazione dei pazienti in classi di rischio. Ulteriori studi su più ampie coorti di pazienti sono necessari per confermare questi risultati preliminari e per condurre analisi di sopravvivenza integrate.

BIBLIOGRAFIA

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. "WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer"; 2010. 417 p.
2. Arber, Daniel A et al. "International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data." *Blood* vol. 140,11 (2022): 1200-1228. doi:10.1182/blood.2022015850.
3. Tefferi, Ayalew. "Primary myelofibrosis: 2023 update on diagnosis, riskstratification, and management." *American journal of hematology* vol. 98,5 (2023): 801-821. doi:10.1002/ajh.26857.
4. Mascarenhas, John et al. "Biological drivers of clinical phenotype in myelofibrosis." *Leukemia* vol. 37,2 (2023): 255-264. doi:10.1038/s41375022-01767-y.
5. Vannucchi, Alessandro M et al. "JAK2 Allele Burden in the Myeloproliferative Neoplasms: Effects on Phenotype, Prognosis and Change with Treatment." *Therapeutic advances in hematology* vol. 2,1 (2011): 21-32. doi:10.1177/2040620710394474.
6. Spivak, Jerry L. "Myeloproliferative Neoplasms." *The New England journal of medicine* vol. 376,22 (2017): 2168-2181. doi:10.1056/NEJMra1406186.
7. Kuykendall, Andrew T et al. "Disease-related thrombocytopenia in myelofibrosis is defined by distinct genetic etiologies and is associated with unique prognostic correlates." *Cancer* vol. 128,19 (2022): 3495-3501. doi:10.1002/cncr.34414.
8. Tefferi, Ayalew et al. "Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis." *Blood* vol. 124,16 (2014): 2507-13; quiz 2615. doi:10.1182/blood-2014-05-579136.
9. Garmezy, Benjamin et al. "A provider's guide to primary myelofibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management." *Blood reviews* vol. 45 (2021): 100691. doi:10.1016/j.blre.2020.100691.
10. Tefferi, Ayalew "Myelofibrosis with myeloid metaplasia." *The New England journal of medicine* vol. 342,17 (2000): 1255-65. doi:10.1056/NEJM200004273421706.
11. Altura, R A et al. "Long-term survival of infants with idiopathic myelofibrosis." *British journal of haematology* vol. 109,2 (2000): 459-62. doi:10.1046/j.1365-2141.2000.01977.x

12. Tefferi Ayalew, “Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, riskstratification and management. *Am J Hematol*. 2021 Jan 1;96(1):145–62.
13. Bose, Prithviraj, and Srdan Verstovsek. “Management of Myelofibrosis-Related Cytopenias.” *Current hematologic malignancy reports* vol. 13,3 (2018): 164-172. doi:10.1007/s11899-018-0447-9.
14. Passamonti, Francesco et al. “Post-ET and Post-PV Myelofibrosis: Updates on a Distinct Prognosis from Primary Myelofibrosis.” *Current hematologic malignancy reports* vol. 13,3 (2018): 173-182. doi:10.1007/s11899-018-0453-y.
15. Cervantes, Francisco et al. “Improving survival trends in primary myelofibrosis: an international study.” *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 30,24 (2012): 2981-7. doi:10.1200/JCO.2012.42.0240
16. Guglielmelli, Paola et al. “Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis.” *Blood* vol. 129,24 (2017): 3227-3236. doi:10.1182/blood-2017-01-761999.
17. Sabattini, Elena et al. “Progression in Ph-Chromosome-Negative Myeloproliferative Neoplasms: An Overview on Pathologic Issues and Molecular Determinants.” *Cancers* vol. 13,21 5531. 4 Nov. 2021, doi:10.3390/cancers13215531.
18. Nicolosi, Maura et al. “Sex and degree of severity influence the prognostic impact of anemia in primary myelofibrosis: analysis based on 1109 consecutive patients.” *Leukemia* vol. 32,5 (2018): 1254-1258. doi:10.1038/s41375-018-0028-x
19. Vener, Claudia et al. “Oxidative stress is increased in primary and postpolycythemia vera myelofibrosis.” *Experimental hematology* vol. 38,11 (2010): 1058-65. doi:10.1016/j.exphem.2010.07.005.
20. Barosi, G et al. “Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia.” *Blood* vol. 98,12 (2001): 3249-55. doi:10.1182/blood.v98.12.3249.
21. Al-Ali, Haifa Kathrin, and Alessandro M Vannucchi. “Managing patients with myelofibrosis and low platelet counts.” *Annals of hematology* vol. 96,4 (2017): 537-548. doi:10.1007/s00277-016-2697-8.
22. Cervantes, Francisco et al. “New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment.” *Blood* vol. 113,13 (2009): 2895901. doi:10.1182/blood-2008-07-170449 .

23. Al-Ali, Haifa Kathrin et al. "Safety and efficacy of ruxolitinib in an openlabel, multicenter, single-arm phase 3b expanded-access study in patients with myelofibrosis: a snapshot of 1144 patients in the JUMP trial." *Haematologica* vol. 101,9 (2016): 106573. doi:10.3324/haematol.2016.143677.
24. Reynolds, Samuel B, and Kristen Pettit. "New approaches to tackle cytopenic myelofibrosis." *Hematology. American Society of Hematology. Education Program* vol. 2022,1 (2022): 235-244. doi:10.1182/hematology.2022000340.
25. Thiele, Juergen, and Hans M Kvasnicka. "Hematopathologic findings in chronic idiopathic myelofibrosis." *Seminars in oncology* vol. 32,4 (2005): 380-94. doi:10.1053/j.seminoncol.2005.04.010.
26. Thiele, Jürgen et al. "European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity." *Haematologica* vol. 90,8 (2005): 1128-32.
27. Tefferi, Ayalew et al. "Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis." *Blood advances* vol. 1,2 105-111. 30 Nov. 2016, doi:10.1182/bloodadvances.2016000208
28. Vannucchi, Alessandro M et al. "Mutations and prognosis in primary myelofibrosis". *Leukemia* 27, 1861–1869 (2013). doi.org/10.1038/leu.2013.119.
29. Luque Paz, Damien et al. "Genetic basis and molecular profiling in myeloproliferative neoplasms." *Blood* vol. 141,16 (2023): 1909-1921. doi:10.1182/blood.2022017578.
30. Chifotides, Helen T et al. "Association of Myelofibrosis Phenotypes with Clinical Manifestations, Molecular Profiles, and Treatments." *Cancers* vol. 15,13 3331. 24 Jun. 2023, doi:10.3390/cancers15133331.
31. Masarova, Lucia et al. "Significance of thrombocytopenia in patients with primary and postessential thrombocythemia/polycythemia vera myelofibrosis." *European journal of haematology* vol. 100,3 (2018): 257263. doi:10.1111/ejh.13005.
32. Palmer, Jeanne "EXABS-163-MPN Myelofibrosis with Cytopenia". *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia* vol. 22, October 2022, Pages S70-S71. 10.1016/S2152-2650(22)00667-X.
33. Coltro, Giacomo et al. "Differential prognostic impact of cytopenic phenotype in prefibrotic vs overt primary myelofibrosis." *Blood cancer journal* vol. 12,8 116. 12 Aug. 2022, doi:10.1038/s41408-022-00713-6.

34. Kröger, Nicolaus M et al. "Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: a consensus process by an EBMT/ELN international working group." *Leukemia* vol. 29,11 (2015): 2126-33. doi:10.1038/leu.2015.233.
35. Guglielmelli, Paola et al. "Identification of patients with poorer survival in primary myelofibrosis based on the burden of JAK2V617F mutated allele." *Blood* vol. 114,8 (2009): 1477-83. doi:10.1182/blood-2009-04216044
36. Passamonti, F et al. "A clinical-molecular prognostic model to predict survival in patients with post polycythemia vera and post essential thrombocythemia myelofibrosis." *Leukemia* vol. 31,12 (2017): 2726-2731. doi:10.1038/leu.2017.169.
37. Tefferi, Ayalew et al. "Myelofibrosis: Genetic Characteristics and the Emerging Therapeutic Landscape." *Cancer research* vol. 82,5 (2022): 749-763. doi:10.1158/0008-5472.CAN-21-2930.
38. Kröger, Nicolaus M et al. "Rapid regression of bone marrow fibrosis after dose-reduced allogeneic stem cell transplantation in patients with primary myelofibrosis." *Experimental hematology* vol. 35,11 (2007): 1719-22. doi:10.1016/j.exphem.2007.08.022.
39. Barbui, Tiziano et al. "Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol. 29,6 (2011): 761-70. doi:10.1200/JCO.2010.31.8436.
40. Tefferi, Ayalew. "New insights into the pathogenesis and drug treatment of myelofibrosis." *Current opinion in hematology* vol. 13,2 (2006): 87-92. doi:10.1097/01.moh.0000208469.48614.2e.
41. Harrison, C N et al. "Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis." *Leukemia* vol. 30,8 (2016): 1701-7. doi:10.1038/leu.2016.148.
42. Marcellino, Bridget K et al. "The Myelodepletive Phenotype in Myelofibrosis: Clinical Relevance and Therapeutic Implication." *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia* vol. 20,7 (2020): 415-421. doi:10.1016/j.clml.2020.01.008.
43. Hernández-Boluda, Juan-Carlos et al. "Predictive factors for anemia response to erythropoiesis-stimulating agents in myelofibrosis." *European journal of haematology* vol. 98,4 (2017): 407-414. doi:10.1111/ejh.12846.

44. Coltro G, Guglielmelli P *et al.* “A Myelodepletive Phenotype Is Associated with Distinctive Molecular Features and Adverse Outcomes in Patients with Myelofibrosis”. *Blood* vol. 138, supplement 1 (November 23, 2021). 1498. doi.org/10.1182/blood-2021-146600.
45. Hernández-Boluda, Juan-Carlos *et al.* “Clinical characteristics, prognosis and treatment of myelofibrosis patients with severe thrombocytopenia.” *British journal of haematology* vol. 181,3 (2018): 397-400. doi:10.1111/bjh.14601.
46. Gangat, Naseema *et al.* “DIPSS plus: a refined Dynamic International Prognostic Scoring System for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status.” *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* vol.29,4 (2011): 392-7. doi:10.1200/JCO.2010.32.2446
47. Cerquozzi, S, and A Tefferi. “Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: a literature review of incidence and risk factors.” *Blood cancer journal* vol. 5,11 e366. 13 Nov 2015, doi:10.1038/bcj.2015.95.
48. Gianelli, Umberto *et al.* “International Consensus Classification of myeloid and lymphoid neoplasms: myeloproliferative neoplasms.” *Virchows Archiv : an international journal of pathology* vol. 482,1 (2023): 53-68. doi:10.1007/s00428-022-03480-8.
49. Barosi, G *et al.* “JAK2(V617F) allele burden $\geq 50\%$ is associated with response to ruxolitinib in persons with MPN-associated myelofibrosis and splenomegaly requiring therapy.” *Leukemia* vol. 30,8 (2016): 1772-5. doi:10.1038/leu.2016.45.
50. Mughal, Tariq I *et al.* “Myelofibrosis-associated complications: pathogenesis, clinical manifestations, and effects on outcomes.” *International journal of general medicine* vol. 7 89-101. 29 Jan. 2014, doi:10.2147/IJGM.S51800.
51. Patnaik, Mrinal M *et al.* “Age and platelet count are IPSS-independent prognostic factors in young patients with primary myelofibrosis and complement IPSS in predicting very long or very short survival.” *European journal of haematology* vol. 84,2 (2010): 105-8. doi:10.1111/j.1600-0609.2009.01373.x
52. Verstovsek, Srdan *et al.* “Role of neoplastic monocyte-derived fibrocytes in primary myelofibrosis.” *The Journal of experimental medicine* vol. 213,9 (2016): 1723-40. doi:10.1084/jem.20160283.

53. Thiele, J, and H M Kvasnicka. "Grade of bone marrow fibrosis is associated with relevant hematological findings-a clinicopathological study on 865 patients with chronic idiopathic myelofibrosis." *Annals of hematology* vol. 85,4 (2006): 226-32. doi:10.1007/s00277-005-0042-8.
54. Vener, Claudia et al. "Prognostic implications of the European consensus for grading of bone marrow fibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis." *Blood* vol. 111,4 (2008): 1862-5. doi:10.1182/blood-2007-09-112953.
55. Guglielmelli, Paola et al. "Prognostic impact of bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis. A study of the AGIMM group on 490 patients." *American journal of hematology* vol. 91,9 (2016): 918-22. doi:10.1002/ajh.24442.
56. Gianelli, Umberto et al. "The European Consensus on grading of bone marrow fibrosis allows a better prognostication of patients with primary myelofibrosis." *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* vol. 25,9 (2012): 1193-202. doi:10.1038/modpathol.2012.87.
57. Gianelli, Umberto et al. "Prognostic significance of a comprehensive histological evaluation of reticulin fibrosis, collagen deposition and osteosclerosis in primary myelofibrosis patients." *Histopathology* vol. 71,6 (2017): 897-908. doi:10.1111/his.13309.
58. Passamonti, Francesco, and Barbara Mora. "Myelofibrosis." *Blood* vol. 141,16 (2023): 1954-1970. doi:10.1182/blood.2022017423.
59. Chagraoui, Hédia et al. "Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice." *Blood* vol. 100,10 (2002): 3495-503. doi:10.1182/blood-2002-04-1133.
60. Lee, Sung-Eun. "Novel therapeutics for myelofibrosis." *Blood research* vol. 58,S1 (2023): S13-S19. doi:10.5045/br.2023.2023012.
61. Gagelmann, Nico et al. "Comprehensive clinical-molecular transplant scoring system for myelofibrosis undergoing stem cell transplantation." *Blood* vol. 133,20 (2019): 2233-2242. doi:10.1182/blood-2018-12-890889.
62. Lancman, Guido et al. "Outcomes and predictors of survival in blast phase myeloproliferative neoplasms." *Leukemia research* vol. 70 (2018): 49-55. doi:10.1016/j.leukres.2018.05.004.
63. Czader, Magdalena, and Attilio Orazi. "Acute Myeloid Leukemia and Other Types of Disease Progression in Myeloproliferative Neoplasms." *American journal of clinical pathology* vol. 144,2 (2015): 188-206. doi:10.1309/AJCPZQK40JOZZZCC.

- 64.** Bose, Prithviraj, and Srdan Verstovsek. “Mutational profiling in myelofibrosis: implications for management.” *International journal of hematology* vol. 111,2 (2020): 192-199. doi:10.1007/s12185-019-02758-z.
- 65.** Devos, Timothy et al. “Updated recommendations on the use of ruxolitinib for the treatment of myelofibrosis.” *Hematology (Amsterdam, Netherlands)* vol. 27,1 (2022): 23-31. doi:10.1080/16078454.2021.2009645.
- 66.** Harrison, Claire N et al. “Management of myelofibrosis after ruxolitinib failure.” *Annals of hematology* vol. 99,6 (2020): 1177-1191. doi:10.1007/s00277-020-04002-9.
- 67.** Vainchenker, William, and Robert Kralovics. “Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms.” *Blood* vol. 129,6 (2017): 667-679. doi:10.1182/blood-2016-10-695940.
- 68.** Tremblay, Douglas, and Ruben Mesa. “Novel treatments for myelofibrosis: beyond JAK inhibitors.” *International journal of hematology* vol. 115,5 (2022): 645-658. doi:10.1007/s12185-022-03299-8 Prithviraj Prithviraj Prithviraj.
- 69.** Verstovsek, Srdan et al. “Long-term survival in patients treated with ruxolitinib for myelofibrosis: COMFORT-I and -II pooled analyses.” *Journal of hematology & oncology* vol. 10,1 156. 29 Sep. 2017, doi:10.1186/s13045-017-0527-7.