

8 1222·2022
ANNI



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA E CHIRURGIA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA

Direttore: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

U.O.C. DI ANATOMIA PATOLOGICA

Direttore: Ch.mo Prof. Angelo Paolo Dei Tos

TESI DI LAUREA

ALTERAZIONI STROMALI MIDOLLARI NELLA MIELOFIBROSI

PRIMITIVA E SECONDARIA: CARATTERIZZAZIONE

CLINICOPATOLOGICA E IMPLICAZIONI PROGNOSTICHE

RELATORE: Prof. Angelo Paolo Dei Tos

CORRELATORE: Dott. Marco Pizzi

LAUREANDA: Claudia De Bona

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

RIASSUNTO – ABSTRACT	pag. 1
1. INTRODUZIONE.....	pag. 5
1.1 Le neoplasie mieloproliferative	
1.1.1 Definizione e caratteristiche generali delle Neoplasie Mieloproliferative	
1.1.2 Caratteristiche clinico-patologiche delle MPN classiche Philadelphia-negative	
1.1.3 Patogenesi e storia naturale delle MPN Philadelphia-negative	
1.2 Mielofibrosi primitiva e secondaria	
1.2.1 Definizione	
1.2.2 Epidemiologia e presentazione clinica della Mielofibrosi	
1.2.3 Alterazioni degli esami di laboratorio nella Mielofibrosi	
1.2.4 Profilo genetico della Mielofibrosi	
1.2.5 Istologia del midollo osseo nella Mielofibrosi	
1.2.6 <i>Grading</i> istologico delle alterazioni stromali nella Mielofibrosi	
1.2.7 Criteri diagnostici di PMF e SMF	
1.2.8 Stratificazione prognostica della Mielofibrosi	
1.2.9 Cenni di terapia della PMF e SMF	
1.3 Modificazioni stromali midollari nella Mielofibrosi: patogenesi e impatto clinico	
1.3.1 Patogenesi delle alterazioni stromali in corso di Mielofibrosi	
1.3.2 Impatto prognostico delle alterazioni stromali in corso di Mielofibrosi	
1.3.3 Modificazioni stromali in corso di terapia	
2. SCOPO DELLO STUDIO.....	pag. 25
3. MATERIALI E METODI.....	pag. 27
3.1 Popolazione dello studio	
3.2 Raccolta e valutazione dei dati clinico-prognostici	
3.3 Valutazione istologica dei campioni di BOM	
3.4 Analisi istochimiche e immunoistochimiche	
3.5 Elaborazione dei dati e analisi statistiche	
4. RISULTATI	pag. 29
4.1 Caratteristiche cliniche della popolazione in studio	
4.2 Caratteristiche istologiche e molecolari della popolazione in studio	
4.3 Distribuzione e caratteristiche dei casi secondo lo <i>score</i> RCO	
4.4 Valutazione prognostica dello <i>score</i> RCO e delle variabili cliniche	
5. DISCUSSIONE	pag. 41

6. CONCLUSIONI	pag. 45
Bibliografia.....	pag. 47

RIASSUNTO

Presupposti dello studio. Le neoplasie mieloproliferative (MPN) con fibrosi midollare comprendono la Mielofibrosi Primitiva (PMF) e Mielofibrosi secondarie (SMF) ad altre MPN. La stratificazione prognostica della PMF/SMF si basa sulla valutazione integrata di parametri clinico-laboratoristici. Lo *score* prognostico maggiormente utilizzato nella PMF/SMF è l'*International Prognostic Scoring System* (IPSS). Poco si sa sul valore prognostico delle alterazioni stromali midollari in corso di Mielofibrosi e su possibili correlazioni con lo *score* IPSS.

Scopo dello studio. Il presente studio ha lo scopo di: (i) descrivere le caratteristiche clinico-patologiche della PMF/SMF; (ii) valutare le alterazioni stromali midollari in corso di PMF/SMF; (iii) definire il ruolo prognostico delle alterazioni stromali midollari e di altri parametri clinico-laboratoristici in corso di PMF/SMF.

Materiali e metodi. Questo studio ha considerato una serie retrospettiva di 103 casi di Mielofibrosi (PMF/SMF), diagnosticate 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 >18 anni; (ii) diagnosi clinico-patologica di PMF o SMF; (iii) disponibilità di dati clinico/ terapeutici e dello *score* IPSS; (iv) *follow-up* clinico di almeno 3 mesi. In tutti i casi disponibili è stato valutato uno *score* integrato delle alterazioni stromali midollari (*score* RCO). Lo *score* RCO è stato correlato con i dati clinico-laboratoristici e di sopravvivenza. Le analisi statistiche sono state eseguite mediante *test* per il confronto tra variabili quantitative (*test* t di Student) e qualitative (*test* esatto di Fisher). Gli studi di sopravvivenza sono stati condotti mediante metodo di Kaplan-Meier e *test log-rank*.

Risultati. La popolazione dello studio era composta da 68/103 (66%) casi di PMF e 35/103 (34%) casi di SMF, con età media alla diagnosi di 68,4 anni. I casi di PMF comprendevano forme pre-fibrotiche (28/68 [41%] casi) e forme con fibrosi avanzata (40/68 [59%] casi). Le PMF con fibrosi di grado severo erano caratterizzate da maggior blastosi periferica e ridotti livelli di emoglobina e piastrine alla diagnosi. PMF in fase avanzata e SMF avevano caratteristiche clinico-laboratoristiche sovrapponibili.

La stratificazione dei pazienti in base allo *score* RCO ha documentato lievi alterazioni stromali (*score* RCO ≤ 4) in 44/101 casi (44%) e alterazioni stromali

severe (score RCO >5) in 57/101 (56%) casi. I pazienti con alto *score* RCO si presentavano più frequentemente con splenomegalia e blastosi periferica. In analisi univariata, lo *score* RCO era significativamente associato all'*outcome* dei pazienti. In analisi multi-variata, tale associazione era persa e l'unico parametro indipendentemente associato alla prognosi era lo *score* IPSS. L'applicazione dello *score* RCO a specifiche categorie IPSS (Int-2/High) contribuiva tuttavia a una miglior stratificazione prognostica dei pazienti.

Conclusioni. La PMF e la SMF sono malattie clinicamente e istologicamente eterogenee. La valutazione integrata delle alterazioni stromali midollari (*score* RCO) correla con specifiche caratteristiche clinico-laboratoristiche della malattia. Per quanto non indipendentemente correlato all'*outcome*, lo *score* RCO contribuisce alla stratificazione prognostica di pazienti con categorie di rischio IPSS intermedio/elevato. Ulteriori studi su più ampie coorti di pazienti sono necessari per confermare questi risultati preliminari.

ABSTRACT

Background. Myeloproliferative neoplasms (MPNs) with fibrosis include Primary Myelofibrosis (PMF) and the fibrotic stage of other MPNs (*i.e.* Secondary Myelofibrosis; SMF). The prognostic stratification of PMF/SMF is based on integrated clinical-laboratory scores, including the International Prognostic Scoring System (IPSS). At present, little is known on the prognostic value of BM stromal changes in PMF/SMF and on their possible relationships with IPSS.

Study aims. This study aims at: (i) describing the clinic-pathological features of PMF/SMF; (ii) evaluating BM stromal changes in PMF/SMF; (iii) defining the prognostic value of BM stromal changes and of other clinic-laboratory parameters.

Material & Methods. A retrospective series of 103 cases of PMF/SMF was retrieved from the archives of the Pathology Unit of Padova University Hospital (Padova - Italy). Inclusion criteria were set as follows: (i) age >18 years; (ii) clinic-pathological diagnosis of PMF/SMF; (iii) availability of clinical and therapeutic data (including IPSS score); (iv) clinical follow-up ≥ 3 months. In all suitable cases, BM stromal changes were assessed by an integrated histological score (RCO score), considering reticulin fibrosis, collagen deposition and osteosclerotic changes. For each patient, the RCO score was correlated with clinical and laboratory findings and with survival data. Statistical analyses were performed using the Student's *t* test and Fisher's exact test for quantitative and qualitative variables, respectively. Survival analyses were conducted using the Kaplan-Meier method and log-rank test.

Results. This study considered 68/103 (66%) cases of PMF and 35/103 (34%) cases of SMF, with mean age at diagnosis of 68,4 years. The PMF subgroup included 28/68 (41%) patients with pre-fibrotic disease and 40/68 (59%) patients with overt BM fibrosis. Compared to early PMF, fibrotic stage disease had reduced haemoglobin and platelet levels and higher circulating blasts at diagnosis. By contrast, fibrotic stage PMF and SMF had overlapping clinical and laboratory features. Histological evaluation documented mild (RCO score ≤ 4) and severe (RCO score > 5) stromal changes in 44/101 (44%) and 57/101 (56%) cases, respectively. High RCO scores were associated with higher incidence of splenomegaly and circulating blasts. By univariate analysis, the RCO score was significantly associated with outcome. By multivariate analysis, such an association

was lost and only the IPSS independently correlated with outcome. In high-risk (Int-2/High) IPSS categories, the RCO score maintained its prognostic value and allowed a better stratification of patients.

Conclusions. PMF and SMF are clinically and histologically heterogeneous diseases. The evaluation of BM stromal changes (RCO score) correlates with specific clinical-laboratory features and may contribute to the prognostic stratification of high-risk IPSS patients. Further studies on larger cohorts of patients are needed to confirm these preliminary results.

1. INTRODUZIONE

1.1 Le neoplasie mieloproliferative

1.1.1 Definizione e caratteristiche generali delle Neoplasie Mieloproliferative

Le neoplasie mieloproliferative (MPN) sono malattie della cellula staminale emopoietica, caratterizzate da abnorme proliferazione della granulopoiesi, della eritropoiesi e/o della megacariocitopoiesi. Le MPN sono classificate in quattro sottogruppi: (i) la Leucemia Mieloide Cronica *BCR::ABL1*-positiva (CML); (ii) le MPN classiche Philadelphia-negative, di cui fanno parte la Policitemia Vera (PV), la Trombocitemia Essenziale (*Essential Thrombocythaemia*, ET) e la Mielofibrosi Primitiva (*Primary Myelofibrosis*, PMF); (iii) le MPN non-classiche Philadelphia-negative, di cui fanno parte la Leucemia Neutrofilica Cronica e la Leucemia Eosinofila Cronica; e (iv) le MPN non classificabili (MPN-U) (1).

1.1.2 Caratteristiche clinico-patologiche delle MPN classiche Philadelphia negative

Le MPN classiche Philadelphia-negative sono un gruppo di neoplasie con peculiare presentazione clinico-patologica e simili meccanismi patogenetici. Esse colpiscono più frequentemente la popolazione adulta con predilezione per il sesso femminile nel caso della ET e per il sesso maschile nel caso della PV e della PMF (2). La prognosi delle MPN dipende da multipli fattori clinici e biologici e dallo specifico sottotipo di malattia. Tra le MPN Philadelphia-negative, la PV è caratterizzata da prevalente espansione della serie eritroide, con incremento della massa eritrocitaria, dei valori di emoglobina (Hb) o dell'ematocrito. In corso di PV, il midollo osseo si presenta ipercellulato con pan-mielosi (*i.e.* proliferazione trilineare delle serie eritroide, della granulopoiesi e della megacariocitopoiesi). (1)

Diversamente dalla PV, la ET coinvolge principalmente la serie megacariocitaria e si caratterizza per trombocitosi isolata (piastrine [PLTS] $\geq 450 \times 10^9/L$), spesso di notevole entità. In corso di ET, il midollo osseo presenta proliferazione unilineare della megacariocitopoiesi con megacariociti giganti (1).

La PMF determina infine marcata proliferazione della megacariocitopoiesi e della granulopoiesi con tendenza allo sviluppo di fibrosi midollare. Clinicamente, la PMF si presenta con alterazioni dell'emocromo variabili. La splenomegalia è reperto

frequente e può associarsi a epatomegalia. Come nel caso della PV e dell'ET, i pazienti con PMF sono a rischio di complicanze cardiovascolari e trombotico-emorragiche (trombosi venose/arteriose dei vasi di medio e grosso calibro; emorragie mucose e del tratto gastrointestinale) (1,3). Dal punto di vista prognostico, la PMF ha un decorso clinico severo con sopravvivenza media a 10 anni del 30%. L'out-come dei pazienti con ET e PV è migliore, con sopravvivenza media a 10 anni rispettivamente dell'80% e 70% (2).

1.1.3 Patogenesi e storia naturale delle MPN Philadelphia-negative

Da un punto di vista patogenetico, le MPN Philadelphia-negative sono caratterizzate dall'attivazione costitutiva della via di JAK/STAT. Ciò è dovuto a varie alterazioni molecolari, che colpiscono mediatori di questa *pathway*. La mutazione più frequentemente riscontrata colpisce il gene *JAK2* in corrispondenza del residuo 617 dell'esone 14. Tale mutazione determina la sostituzione di una valina con una fenilalanina (mutazione V617F) a livello del dominio pseudochinasico (JH2) del gene. La proteina JAK2 funziona da intermediario tra recettori di membrana e messaggeri intracellulari. Quando fattori di crescita emopoietici come EPO, G-CSF, GM-CSF e TPO si legano al loro recettore sulla superficie cellulare, la proteina JAK2 si fosforila nella regione tirosin-chinasica (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-chinasica di JH1, disattivando la cascata di segnali proliferativi intra-cellulari. La mutazione V617F comporta l'attivazione costitutiva della proteina, con conseguente proliferazione incontrollata delle cellule staminali emopoietiche (4).

La mutazione V617F di *JAK2* è presente nella quasi totalità dei pazienti con PV (circa 95%), e nel 50-60% dei pazienti con ET e PMF (5). Nei pazienti JAK2 V617F-negativi sono state identificate altre alterazioni molecolari *driver*, tra cui: (i) mutazioni attivanti *JAK2* a livello dell'esone 12 (tale alterazione è virtualmente esclusiva di una minoranza di PV), (ii) inserzioni/delezioni nell'esone 9 del gene della calreticulina (*CALR*), e (iii) mutazioni attivanti il gene del recettore della trombopoietina (*MPL*) (4). Anche queste mutazioni determinano l'attivazione costitutiva della via di JAK/STAT e sono tra loro mutualmente esclusive. Un

sottogruppo di pazienti con PV, ET e PMF manca di tutte queste e viene definito “triplo-negativo” (TN) (6).

La storia naturale delle MPN prevede una fase pre-clinica paucisintomatica, una fase di stato sintomatica e due principali forme di progressione: (i) l’evoluzione mielofibrotica e (ii) la trasformazione in leucemia mieloide acuta (fase blastica di malattia). (1) La prima si caratterizza per lo sviluppo di severa fibrosi midollare con tendenza alla citopenia e all’insufficienza midollare. La progressione fibrotica caratterizza il 4,9-6% delle PV e lo 0,8-4,9% delle ET a 10 anni (7). Nel caso della PMF, il rischio di sviluppo di fibrosi severa è del 50% a 5 anni (8).

La progressione a fase blastica si caratterizza invece per un progressivo arresto della maturazione delle serie emopoietiche con conseguente aumento della percentuale di blasti nel midollo osseo e/o nel sangue periferico ($\geq 20\%$ delle cellule nucleate totali). La fase blastica di MPN può essere preceduta da una *fase accelerata*, con una percentuale di blasti su sangue midollare e/o periferico compresa tra il 10% e il 19% delle cellule nucleate totali (1). Il rischio di evoluzione a fase accelerata/fase blastica per la ET e per la PV è rispettivamente dello 0,7-3% e del 2,3-14,4% a 10 anni. Nel caso della PMF, sale al 10-20% a 10 anni (7). La prognosi della fase blastica di MPN è estremamente severa con una sopravvivenza mediana di circa 5,8 mesi in assenza di terapia trapiantologica (9,10).

1.2 Mielofibrosi primitiva e secondaria

1.2.1 Definizione

Come precedentemente accennato, la PMF è una MPN caratterizzata da espansione della megacariocitopoiesi e della granulocitopoiesi e da tendenza allo sviluppo di fibrosi midollare. La PMF comprende una fase *pre-fibrotica* (o *precoce*), con midollo ipercellulato e fibrosi minima o assente (fibrosi di grado MF-0 o MF-1, sec. Classificazione WHO 2022), e una *fase fibrotica* (o *avanzata*), caratterizzata da una marcata deposizione di fibre reticoliniche e collagene (fibrosi di grado MF-2 o MF-3, sec. Classificazione WHO 2022). Durante la fase fibrotica di PMF è possibile avere rimaneggiamento delle trabecole ossee fino a totale obliterazione degli spazi inter-trabecolari (*i.e.* osteosclerosi midollare) (1).

Oltre alla PMF, nell'ambito delle MPN a impronta fibrotica sono incluse anche le evoluzioni mielofibrotiche di PV e ET (*i.e.* "Mielofibrosi secondarie" o "Mielofibrosi post-PV/post-ET"; SMF). Requisiti per la diagnosi di tali condizioni 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 (11,12).

1.2.2 Epidemiologia e presentazione clinica della Mielofibrosi

La PMF ha un'incidenza di circa 0,5-1,5 casi 100.000 abitanti/anno, colpisce solitamente pazienti nella la sesta/settima decade di vita e dimostra lieve prevalenza nel sesso maschile (rapporto M:F pari a 1,2:1). Raramente la PMF colpisce pazienti di età pediatrica o giovane-adulta (<40 anni) e, in questi casi, ha decorso clinico più indolente (13,14).

Clinicamente, più del 50% dei pazienti con PMF manifesta sintomi costituzionali quali affaticamento, calo ponderale, sudorazioni notturne, febbre o cachessia. La restante quota di casi è asintomatica e giunge all'osservazione clinica per splenomegalia o per alterazioni agli esami ematochimici (anemia, leucocitosi e/o trombocitosi; aumento dei livelli sierici di lattato deidrogenasi [LAD]; leucoeritroblastosi) (1,13).

Alla splenomegalia (presente nell'80-90% dei pazienti) si associa frequentemente epatomegalia (1) con sintomi da ingombro addominale, quali senso di sazietà precoce, dispepsia ed edemi degli arti inferiori (13). Splenomegalia ed epatomegalia sono dovute alla disseminazione ematogena delle cellule neoplastiche (*i.e.* ematopoiesi extra-midollare [EMH] neoplastica). L'EMH può d'altra parte colpire molti altri distretti anatomici, determinando linfadenopatie, versamenti pleurici, emotorace, ipertensione endocranica, sindromi compressive del midollo spinale o stenosi del tratto gastrointestinale (15). I pazienti con PMF possono inoltre sviluppare manifestazioni tromboemboliche, tra cui trombosi venose profonde agli arti inferiori, trombosi di vasi arteriosi epiaortici e trombosi splancniche (*e.g.* sindrome di Budd-Chiari). In circa il 7% dei casi, le trombosi splancniche e l'iperafflusso venoso portale dovuto alla splenomegalia determinano ipertensione portale (13).

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 (febricola, calo ponderale, astenia), citopenie progressive o splenomegalia ingravescente (16).

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). Altre cause di morte correlate alla malattia sono l'insufficienza midollare, complicanze cardiovascolari, trombotico-emorragiche, infettive o legate all'ipertensione portale (17).

1.2.3 Alterazioni degli esami di laboratorio nella Mielofibrosi

Tanto nella PMF che nella SMF, l'emocromo varia a seconda delle fasi di malattia. Durante la fase precoce/pre-fibrotica di PMF, si possono avere trombocitosi e leucocitosi con neutrofilia. In fase fibrotica/avanzata e nella SMF si hanno invece anemia (con o senza trombocitopenia/leucopenia) e leucoeritroblastosi (*i.e.* presenza di precursori mieloidi ed eritroidi circolanti) (16,18). La presenza/comparsa di monocitosi è riportata nel 5-15% dei casi e si associa a prognosi severa (8). Lo striscio di sangue periferico mostra anisopoichilocitosi degli eritrociti con dacriociti (emazie a lacrima) e, in fase fibrotica di malattia, mielociti/metamielociti ed eritroblasti in circolo (1). La PMF e la SMF si associano tipicamente ad elevati livelli sierici di lattato deidrogenasi (LAD) e di vitamina B12 (19,20). Tale reperto è diretta conseguenza dell'aumentato *turnover* delle cellule emopoietiche midollari.

Precursori ematopoietici circolanti (cellule CD34-positive) possono essere presenti a vari livelli nel sangue periferico dei pazienti con PMF e Mielofibrosi secondaria. L'aumento di cellule CD34-positive circolanti 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 (21).

1.2.4 Profilo genetico della Mielofibrosi

Come precedentemente discusso, mutazioni *driver* coinvolgenti la via di JAK/STAT sono presenti in circa l'80-90% dei casi di PMF. La mutazione V617F di *JAK2* è presente in circa il 50-60% dei pazienti, mentre mutazioni di *CALR* e

MPL sono presenti nel 30% e nell'8% dei casi. Il 12% dei pazienti non presenta alcuna di queste mutazioni (PMF TN) (1).

Oltre alle mutazioni di *JAK2*, *CALR* e *MPL*, nella PMF sono state identificate numerose mutazioni in geni “non-*driver*” che correlano con il fenotipo e il rischio di progressione della malattia (22). Tali alterazioni 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*, *PPM1D*) (23). Alcune di queste mutazioni (*ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2* e *IDH1/2*) sono associate a una ridotta sopravvivenza globale (OS) e libera da progressione di malattia (PFS) (24). Oltre al loro impatto prognostico, le mutazioni non-*driver* possono essere utilizzate come *marker* di clonalità per la diagnosi di casi triplo-negativi (1).

1.2.5 Istologia del midollo osseo nella Mielofibrosi

La valutazione istologica del midollo osseo riveste un ruolo fondamentale nella diagnosi della PMF e della SMF.

Nella *fase precoce* di PMF, il midollo si presenta ipercellulato con incremento del rapporto mielo-eritroide e della megacariocitopoiesi. Quest'ultima si caratterizza per la presenza di megacariociti con nuclei bulbosi e ipercromatici (aspetto “*cloud-like*”) con evidente tendenza aggregativa in *clusters* densi (*i.e.* gruppi di ≥ 3 megacariociti senza elementi emopoietici interposti). I precursori mieloidi immaturi (identificati mediante colorazione immunoistochimica con CD34) risultano <10% della cellularità totale. La fibrosi midollare è minima o assente (grado MF-0 o MF-1, secondo Classificazione WHO 2022).

La PMF in *fase fibrotica* 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. I megacariociti sono aumentati e si organizzano in *clusters* densi. Nelle fasi più avanzate di fibrosi, la megacariocitopoiesi può apparire displastica con elementi di piccola taglia e micromegacariociti. 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 (1,25).

1.2.6 Grading istologico delle alterazioni stromali nella Mielofibrosi

La determinazione della fibrosi e delle alterazioni stromali midollari riveste un ruolo fondamentale nella diagnosi istologica della Mielofibrosi. Al fine di standardizzare tale valutazione, nel 2005 è stato proposto l'*European consensus on grading bone marrow fibrosis* (ECGMF), una scala semi-quantitativa in quattro gradi progressivi (MF-0, MF-1, MF-2, MF-3) che classifica i depositi reticolinici, come di seguito riportato:

- **MF-0** → Fibre reticoliniche sparse, senza intersezioni;
- **MF-1** → Intreccio lasso di fibre reticoliniche con numerose intersezioni, specialmente in aree peri-vascolari;
- **MF-2** → Marcato e diffuso infittimento delle fibre reticoliniche, con estese intersezioni e focali fasci di fibre collagene e/o osteosclerosi;
- **MF-3** → Marcato e diffuso infittimento delle fibre reticoliniche, con estese intersezioni e fasci di fibre collagene, solitamente associate a osteosclerosi (26).

Questo *grading* è stato validato a livello internazionale ed è adottato dalla Classificazione WHO dei Tumori Ematopoietici e dei Tessuti (27).

Più recentemente, è stato proposto un simile sistema di gradazione anche per i depositi delle sole fibre collagene e per le alterazioni delle trabecole ossee. Tale valutazione è stata inizialmente proposta nell'ambito di *trial* clinici dedicati alla terapia della Mielofibrosi ed è stata successivamente adottata dalla Classificazione WHO 2017. La valutazione istologica dei depositi di collagene è possibile mediante colorazione istochimica con impregnazione argentea o tricromica di Masson e prevede il seguente sistema di *grading*:

- **Co-0** → Collagene presente solo a livello peri-vascolare (normale);
- **Co-1** → Focali depositi di collagene in zona paratrabecolare o centro-lacunare;

-
- **Co-2** → Depositi di collagene in zona paratrabecolare o centro-lacunare con focali interconnessioni, oppure diffusi depositi paratrabecolari di collagene;
 - **Co-3** → Intersezioni diffuse in > 30% delle lacune midollari (28).

Le alterazioni dell'osso trabecolare sono normalmente valutate su sezioni colorate con ematossilina/eosina, usando il seguente *grading*:

- **Ost-0** → Trabecole ossee regolari;
- **Ost-1** → Focali spicole, *budding* o apposizione di osso neoformato;
- **Ost-2** → Diffusa apposizione paratrabecolare di osso neoformato con ispessimento trabecolare e con focali ponti inter-trabecolari;
- **Ost-3** → Estesi ponti inter-trabecolari costituiti da tessuto osseo neoformato, con obliterazione delle lacune midollari (28).

Nel caso di distribuzione eterogenea della fibrosi reticolinica, dei depositi di collagene o delle alterazioni ossee, il grado finale è attribuito sulla base delle alterazioni con punteggio più alto, purché queste siano presenti in almeno il 30% della superficie bioptica totale (28).

1.2.7 Criteri diagnostici di PMF e SMF

Da quanto in precedenza discusso, risulta evidente che la diagnosi di PMF e di SMF si basa sull'integrazione di dati clinico-anamnestici, laboratoristici e istologici. Al fine di standardizzare e rendere riproducibile la diagnosi di tali malattie, la Classificazione WHO dei Tessuti Ematopoietici e dei Tessuti Linfoidi ha formulato criteri diagnostici distinti per la PMF in fase pre-fibrotica/precoce, per la PMF in fase fibrotica/avanzata e per la SMF. In tutti i casi, sono previsti criteri diagnostici maggiori e minori, la cui combinazione determina la diagnosi di malattia (1,29).

Nel caso della PMF in fase pre-fibrotica/precoce, i criteri diagnostici maggiori comprendono: (i) reperti istologici midollari coerenti (proliferazione megacariocitaria atipica con fibrosi reticolinica di grado \leq MF-1, associata a incremento della cellularità con espansione della granulopoiesi e frequente diminuzione dell'eritropoiesi); (ii) esclusione di CML *BCR::ABL1*-positiva, PV, ET, MDS o altre neoplasie mieloidi; (iii) presenza di mutazione di *JAK2*, *CALR*, *MPL* o, in loro assenza, documentazione di altri *marker* di clonalità (*e.g.* mutazioni

di *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/2*, *SRSF2*, *SR3B1*) o esclusione di cause secondarie di fibrosi midollare. Criteri diagnostici minori (da confermarsi in almeno 2 occasioni consecutive) sono invece: (i) anemia non attribuibile ad altre condizioni; (ii) leucocitosi $\geq 11 \times 10^9/L$; (iii) splenomegalia palpabile; (iv) aumento dei livelli sierici di LAD. La diagnosi di PMF in fase precoce è posta in presenza di tutti i criteri maggiori e di almeno un criterio minore.

Nel caso della PMF in fase fibrotica/avanzata, i criteri diagnostici maggiori comprendono: (i) reperti istologici midollari coerenti (proliferazione megacariocitaria atipica con fibrosi reticolinica e/o collagene di grado MF-2 o MF-3); (ii) esclusione di CML *BCR::ABL1*-positiva, PV, ET, MDS o altre neoplasie mieloidi; (iii) presenza di mutazione di *JAK2*, *CALR*, *MPL* o, in loro assenza, documentazione di altri *marker* di clonalità (e.g. mutazioni di *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/2*, *SRSF2*, *SR3B1*) o esclusione di cause secondarie di fibrosi midollare severa. Criteri diagnostici minori (da confermarsi in almeno 2 occasioni consecutive) sono invece: (i) anemia non attribuibile ad altre condizioni; (ii) leucocitosi $\geq 11 \times 10^9/L$; (iii) splenomegalia palpabile; (iv) aumento dei livelli sierici di LAD; (v) leucoeritroblastosi. Come per la PMF in fase precoce, la diagnosi è posta in presenza di tutti i criteri maggiori e di almeno un criterio minore (1).

Per la diagnosi di SMF sono attualmente utilizzati i criteri proposti dall'*International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment* (IWG-MRT) e successivamente adottati dalla Classificazione WHO. Questi comprendono requisiti diagnostici essenziali e criteri addizionali. I primi includono: (i) una precedente diagnosi di ET/PV; (ii) fibrosi midollare di grado superiore a MF-1. Criteri addizionali comprendono: (i) progressiva anemia o riduzione della necessità di salassi/terapia citoriduttiva per l'eritrocitosi (nel caso di Mielofibrosi post-PV) o riduzione ≥ 2 mg/mL dal valore medio di Hb (nel caso di Mielofibrosi post-ET); (ii) leucoeritroblastosi su sangue periferico; (iii) aumento del volume della milza (definito come incremento ≥ 5 cm del diametro splenico o insorgenza di splenomegalia prima non evidente); (iv) sviluppo di ≥ 1 sintomo costituzionale (calo ponderale $>10\%$ in 6 mesi; sudorazioni notturne; febbre non attribuibile ad altre cause); (v) aumento dei livelli sierici di LAD (criterio valido solo per la diagnosi di Mielofibrosi post-ET). Per la diagnosi di SMF è richiesto che siano soddisfatti entrambi i requisiti diagnostici essenziali e almeno due criteri addizionali (1,11).

1.2.8 Stratificazione prognostica della Mielofibrosi

La Mielofibrosi è una patologia con evoluzione biologica e decorso clinico molto variabili. Alcuni casi rimangono asintomatici per lungo tempo, altri progrediscono rapidamente verso forme letali (30). Alla luce di tale eterogeneità, sono stati sviluppati vari *score* per stratificare i pazienti con Mielofibrosi in classi di rischio clinico. Tali *score* 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) e il *Genetically Inspired PSS* (GIPSS).

1.2.8.1 *Lille Scoring System*

Questo *score* si basa sulla valutazione dei livelli di Hb e sulla conta dei globuli bianchi (WBC) alla diagnosi. In particolare, viene assegnato 1 punto nel caso di Hb <10g/dL, di WBC <4 x10⁹/L o di WBC >30 x10⁹/L. Lo *score* ottenuto dalla somma di questi punteggi viene utilizzato per stratificare i pazienti nelle seguenti 3 classi di rischio:

- Rischio *basso* → *score* 0 - nessun fattore di rischio (Hb >10g/dL; WBC compresi tra 4 e 30 x10⁹/L). In questa classe, l'OS è di 7.7 anni;
- Rischio *intermedio* → *score* 1 - presenza di un fattore di rischio (OS pari a 2.2 anni);
- Rischio *alto* → *score* 2 - presenza di due fattori di rischio (OS pari a 1.1 anni) (31).

1.2.8.2 *Score IPSS e DIPSS*

Lo *score* IPSS 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:

- *Low Risk*: nessuno fattore di rischio (OS di 11.3 anni);

-
- *Intermediate Risk-1 (IR-1)*: presenza di un fattore di rischio (OS 7.9 anni);
 - *Intermediate Risk-2 (IR-2)*: presenza di due fattori (OS di 4 anni);
 - *High Risk*: presenza di tre o più fattori di rischio (OS di 2.3 anni) (32).

L'IPSS è stato successivamente modificato per considerare l'impatto prognostico di fattori di rischio acquisiti durante il corso di malattia (*score* IPSS dinamico o DIPSS). Il DIPSS consente la stratificazione dei pazienti in qualsiasi fase di malattia e viene calcolato assegnando 2 punti a valori di Hb <10g/dL e 1 punto a: (i) età >65 anni, (ii) WBC >25 x10⁹/L, (iii) presenza di sintomi costituzionali (febbre, sudorazioni notturne o calo ponderale) e (iv) blasti circolanti su sangue periferico ≥ 1% degli elementi nucleati totali. Il DIPSS raggruppa i pazienti nelle seguenti categorie di rischio:

- *Low Risk*: 0 punti;
- *IR-1*: 1-2 punti (OS di 14.2 anni);
- *IR-2*: 3-4 punti (OS di 4 anni);
- *High Risk*: 5-6 punti (OS di 1.5 anni) (33).

1.2.8.3 Score DIPSS plus

Il DIPSS *plus* è uno *score* prognostico che integra l'IPSS/DIPSS, aggiungendo i tre seguenti fattori di rischio: (i) condizione di trasfusione-dipendenza, (ii) presenza di cariotipo sfavorevole (cariotipo complesso o ≥1 delle seguenti anomalie cromosomiche: +8, -7/7q, i(17q), -5/5q, 12p-, inv(3), riarrangiamenti di 11q23), e (iii) PLTS <100 x10⁹/L. Tali fattori consentono una migliore stratificazione dei pazienti con PMF, modificando le curve di sopravvivenza di ciascuna delle classi di rischio identificate dall'IPSS/DIPSS (34).

1.2.8.4 Score MIPSS70 e MIPSS70-plus

L'IPSS, il DIPSS e il DIPSS *plus* non considerano lo stato mutazionale della PMF nella stratificazione prognostica dei pazienti. Questo limite è stato recentemente preso in considerazione da due *score* dedicati a pazienti di età inferiore ai 70 anni eleggibili a trapianto di midollo, il *Mutation-Enhanced IPSS for Transplantation-Age Patients with Primary Myelofibrosis* (MIPSS70) e il *Karyotype-Enhanced MIPSS70* (MIPSS70-*plus*).

Il MIPSS70 include sei variabili cliniche e tre genetiche, tra cui: (i) Hb <10 mg/dL (1 punto), (ii) blasti circolanti $\geq 2\%$ delle cellule nucleate totali (1 punto), (iii) presenza di sintomi costituzionali (1 punto), (iv) PLTS <100 $\times 10^9/L$ (2 punti), (v) WBC >25 $\times 10^9/L$ (2 punti), (vi) presenza di fibrosi midollare di grado \geq MF-2 (1 punto), (vii) assenza di mutazioni di tipo 1 di *CALR* (1 punto), (viii) presenza di mutazioni ad alto rischio (HMR; *i.e.* mutazioni di *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2* e *IDH1/2*) (1 punto), (ix) presenza di ≥ 2 mutazioni HMR (2 punti). Sulla base del MIPSS70, i pazienti sono raggruppati nelle seguenti classi di rischio:

- *Low risk*: 0-1 punti (OS di 27.7 anni);
- *Intermediate risk*: 2-4 punti (OS di 7.1 anni);
- *High risk*: ≥ 5 punti (OS di 3.1 anni).

Il MIPSS70 *plus* considera invece: (i) Hb <10 g/dL (1 punto), (ii) blasti circolanti $\geq 2\%$ delle cellule nucleate totali (1 punto), (iii) presenza di sintomi costituzionali (1 punto), (iv) assenza di mutazioni di tipo 1 di *CALR* (2 punti), (v) presenza di mutazioni HMR (*i.e.* mutazioni di *ASXL1*, *SRSF2*, *EZH2* e *IDH1/2*) (1 punto), (vi) presenza di ≥ 2 HMR (2 punti) e (vii) presenza di cariotipo sfavorevole (ogni anomalia cariotipica diversa da cariotipo normale o alterazione isolata di 20q-, 13q, +9, traslocazione/duplicazione del cromosoma 1, -Y, o alterazioni dei cromosomi sessuali diversi da -Y) (3 punti). Il punteggio ottenuto dalla somma di questi parametri individua le seguenti classi di rischio:

- *Low Risk*: 0-2 punti (OS a 10 anni del 100%);
- *Intermediate Risk*: 3 punti (OS a 10 anni del 90%);
- *High Risk*: 4-6 punti (OS a 10 anni del 76%);
- *Very High Risk*: ≥ 7 punti (OS a 10 anni del 46.5%) (18,35).

1.2.8.5 Score MIPSS70-plus 2.0

Lo score MIPSS70-*plus* versione 2.0 integra e aggiorna il MIPSS70-*plus*, in quanto: (i) distingue cariotipi *very high risk* (VHR; *i.e.* anomalie singole/multiple coinvolgenti -7, i(17q), inv(3)/3q21, 12p-/12p11.2, 11q-/11q23, o altre trisomie autosomiche escluse + 8/ + 9) da cariotipi *sfavorevoli* (*i.e.* tutte le altre anomalie citogenetiche); (ii) considera l'impatto prognostico di mutazioni HMR non incluse nel MIPSS70-*plus* (mutazione U2AF1Q57); e (iii) differenzia l'impatto

prognostico dei livelli di Hb, anche a seconda del sesso dei pazienti. Sulla base di queste modifiche, il MIPSS70-*plus* 2.0 attribuisce: 4 punti a cariotipi VHR; 3 punti a cariotipi sfavorevoli o ≥ 2 mutazioni HMR; 2 punti a 1 mutazione HMR, sintomi costituzionali o anemia severa aggiustata per sesso del paziente (< 80 g/L nelle donne e < 90 g/L negli uomini); 1 punto ad anemia moderata aggiustata per sesso del paziente (80-99 g/L nelle donne e 90-109 g/L negli uomini) o a blasti circolanti $\geq 2\%$ delle cellule nucleate totali. Il punteggio ottenuto dalla somma di questi parametri individua i seguenti gruppi di rischio:

- *Very-high risk*: ≥ 9 punti (OS a 10 anni inferiore al 5%);
- *High risk*: 5-8 punti (OS a 10 anni del 13%);
- *Intermediate risk*: 3-4 punti (OS a 10 anni del 37%);
- *Low risk*: 1-2 punti (OS a 10 anni del 56%);
- *Very-low risk*: 0 punti (OS a 10 anni del 92%) (36,37).

1.2.8.6 Score GIPSS

Il GIPSS è un recente *score* prognostico, che si basa unicamente su fattori di rischio citogenetico-molecolari. Questi comprendono: (i) presenza di cariotipo VHR (2 punti); (ii) presenza di cariotipo sfavorevole (1 punto); (iii) assenza di mutazioni di tipo 1 di *CALR* (1 punto); e (iv) presenza di mutazioni di *ASXL1*, *SRSF2* o *U2AF1Q157* (1 punto). La combinazione di tali parametri individua le seguenti classi di rischio:

- *Low risk*: 0 punti (OS di 26.4 anni);
- *IR-1*: 1 punto (OS di 8 anni);
- *IR-2*: 2 punti (OS di 4.2 anni);
- *High risk*: ≥ 3 punti (OS di 2 anni) (38).

1.2.9 Cenni di terapia della PMF e SMF

Le opzioni terapeutiche per la PMF/SMF comprendono: (i) terapie con intento curativo; e (ii) terapie volte a ridurre gli effetti collaterali della malattia e a migliorare la qualità di vita dei pazienti.

L'unico trattamento potenzialmente curativo per la Mielofibrosi è il trapianto allogenico di cellule staminali (alloSCT). Sfortunatamente, questa terapia è gravata

da elevati tassi di mortalità e morbilità ed è attuabile solo in una minoranza di pazienti (età <70 anni; buone condizioni generali; malattia caratterizzata da rischio alto/intermedio-2, sec. IPSS/DIPSS/DIPSS *plus*) (22,39). I regimi di condizionamento in vista dell'alloSCT sono differenziati sulla base di fattori clinico-epidemiologici. Nella maggior parte dei pazienti con PMF/SMF, si preferiscono regimi mieloablativi non-*standard* a intensità ridotta, che riducono la mortalità peri-trapiantologica e consentono di trattare un maggior numero di pazienti (40).

Per i casi non candidabili a trapianto, sono disponibili opzioni terapeutiche che mirano al trattamento dei sintomi correlati a PMF. Nei pazienti con anemia è indicato l'utilizzo di androgeni (testosterone enantato 400-600 mg/settimana o fluossimesterone 10 mg TID), corticosteroidi (prednisone 0,5-1 mg/kg/d), danazolo, talidomide a basse dosi (50 mg/d) e lenalidomide (41). 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), ottenendo tassi di riposta della durata di un anno in circa il 50% dei casi (42).

Per la splenomegalia il farmaco di scelta è l'idrossiurea. Quest'ultima riduce anche l'ematopoiesi midollare, migliorando la trombocitosi e la leucocitosi periferiche. Il trattamento con idrossiurea si associa a una riduzione del volume splenico in circa il 40% dei casi. In caso di refrattarietà a questa terapia possono essere utilizzati altri farmaci citotossici, quali la Cladribina o agenti alchilanti (Melphalan e Busulfano) (41).

In anni recenti, il trattamento sintomatologico della Mielofibrosi si è giovato di farmaci a bersaglio molecolare, appartenenti alla categoria dei *JAK1/JAK2*-inibitori. Il primo e più utilizzato di questi farmaci è il Ruxolitinib, che permette una rapida e durevole riduzione della splenomegalia e dei sintomi costituzionali, con conseguente miglioramento della qualità di vita dei pazienti (22,42,43).

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 (41,42).

In caso di pazienti con Mielofibrosi asintomatica è infine possibile ricorrere a un approccio “*wait and see*” con stretto *follow-up* clinico-laboratoristico (22).

1.3 Modificazioni stromali midollari nella Mielofibrosi: patogenesi ed impatto clinico

1.3.1 Patogenesi delle alterazioni stromali in corso di Mielofibrosi

Il microambiente midollare comprende cellule stromali, fibre proteiche strutturali e matrice extracellulare (44). Le cellule stromali midollari includono macrofagi, fibroblasti, adipociti, cellule endoteliali e cellule mesenchimali staminali. Le più importanti proteine strutturali del midollo osseo sono invece la laminina, la fibronectina e il collagene. Quest'ultimo si organizza in due strutture proteiche principali: (i) le fibre reticoliniche (*i.e.* singole fibrille o piccoli gruppi di fibre collagene di tipo III, organizzate attorno a un *core* di collagene di tipo I e avvolte da glicoproteine e glicosamminoglicani); e (ii) il collagene propriamente detto (spessi aggregati di fibre collagene di tipo I). Questi elementi compongono il tessuto connettivo midollare e forniscono supporto alle cellule progenitrici ematopoietiche (45).

Come precedentemente descritto, caratteristica peculiare della PMF e della SMF è la presenza di fibrosi degli spazi inter-trabecolari. Originariamente, la fibrosi midollare è stata ritenuta *primum movens* delle anomalie ematologiche della Mielofibrosi. Studi più recenti hanno tuttavia dimostrato che la fibrosi inter-trabecolare è il risultato di alterazioni che coinvolgono primariamente la cellula staminale ematopoietica (45).

Nella Mielofibrosi, l'attivazione costitutiva della via di JAK/STAT comporta, infatti, una disregolazione della megacariocitopoiesi e un'abnorme proliferazione di megacariociti atipici. Tali megacariociti (e le piastrine da essi prodotte) stimolano la proliferazione e l'attivazione dei fibroblasti midollari attraverso la secrezione di fattori di crescita pro-fibrotici, quali il *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF), il *Transforming Growth Factor* β (TGF- β), il *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) e il *Fibroblast Growth Factor* (FGF). Tali fattori di crescita sono contenuti all'interno dei granuli- α dei megacariociti (46,47).

L'abnorme secrezione midollare di PDGF, TGF- β , VEGF e FGF in corso di Mielofibrosi sembrerebbe dovuta a un alterato *cross-talk* tra megacariociti e leucociti attraverso la via della P-selectina. In condizioni normali, la P-selectina media l'interazione tra megacariociti e leucociti, favorendo l'emperipolesi di questi ultimi all'interno dei megacariociti. Nella Mielofibrosi, si osserva un incremento dell'emperipolesi (48) e una maggiore espressione di P-selectina a livello dei vacuoli intracitoplasmatici e dei sistemi di demarcazione della membrana dei megacariociti (46).

Tali osservazioni hanno portato a ipotizzare un'interazione diretta tra P-selectina sui granuli- α dei megacariociti e PSGL-1 sulla membrana dei neutrofilo in emperipolesi, con conseguente attivazione di quest'ultimi. Ciò, a sua volta, determinerebbe l'apoptosi dei neutrofilo, il rilascio dei loro granuli litici nel citoplasma dei megacariociti, la distruzione dei granuli- α e l'abnorme liberazione di TGF- β , PDGF, VEGF e FGF (48,49).

Di questi fattori di crescita, il TGF- β è uno dei più potenti attivatori della proliferazione fibroblastica e della produzione di matrice extra-cellulare (50). Il TGF- β inibisce inoltre la degradazione delle proteine stromali, riducendo la sintesi di metalloproteasi di tipo-3 (MMP3) e stimolando la produzione dell'inibitore tissutale delle metalloproteasi di tipo-1 (TIMP-1) (46). Il TGF- β è infine un importante mediatore dell'osteosclerosi, in quanto stimola la produzione di Osteoprotegerina (OPG), inducendo l'attività degli osteoblasti e inibendo quella degli osteoclasti. In linea con queste osservazioni, i livelli di mRNA per l'OPG sono significativamente superiori nei megacariociti della PMF in fase fibrotica rispetto a quanto osservato in controlli sani o in pazienti con PMF in fase pre-fibrotica (51,52).

1.3.2 Impatto prognostico delle alterazioni stromali in corso di Mielofibrosi

Oltre al suo indiscusso valore diagnostico, la fibrosi midollare correla anche con la prognosi dei pazienti con Mielofibrosi (25). In particolare, fibrosi di grado severo (MF-2/MF-3) si associano ad anemia grave, a leuco-eritroblastosi, a incremento dei mieloblasti circolanti e a splenomegalia severa (53). Alti gradi di fibrosi sono stati inoltre associati a un'età avanzata, alla presenza di sintomi costituzionali, a più elevati livelli sierici di LAD e a *score* di rischio clinico più alti (IPSS score *IR-2* e *high risk*). Da un punto di vista molecolare, la presenza di fibrosi severa (MF-2/MF-

3) si associa a mutazioni HMR, specialmente a carico dei geni *ASXL1* ed *EZH2* (23,5%-26% e 8,2%-13,2% dei casi, rispettivamente) (54,55) Nonostante questi dati suggeriscano la rilevanza prognostica della fibrosi in corso di PMF/SMF, la maggior parte degli *score* prognostici in uso non considera le alterazioni stromali midollari e si basa unicamente su parametri clinico-laboratoristici e molecolari.

Muovendo da queste premesse, un recente studio ha valutato la rilevanza clinica delle alterazioni stromali midollari in corso di PMF, correlandole con l'IPSS. Tale studio ha dimostrato una relazione direttamente proporzionale tra lo *score* IPSS, il grado di fibrosi e l'incidenza di epatosplenomegalia, i livelli di mieloblasti circolanti, il rischio di progressione blastica e il fabbisogno trasfusionale dei pazienti. All'interno di singole classi di rischio IPSS, è stata inoltre documentata una variabilità dei livelli sierici di LAD e della conta piastrinica in relazione al grado di fibrosi. Ciò dimostra una solo parziale corrispondenza tra *score* IPSS e severità della fibrosi midollare, suggerendo l'opportunità di una valutazione integrata di IPSS e alterazioni stromali per una migliore stratificazione prognostica dei pazienti. In linea con queste osservazioni, pazienti con IPSS *low risk* e fibrosi di grado MF-0 avevano curve di sopravvivenza migliori rispetto a quelle di pazienti sulla base del solo *score* clinico o istologico. Analogamente, pazienti IPSS *high risk* con fibrosi di grado MF-3 avevano prognosi significativamente peggiore rispetto a quella di pazienti classificati ad alto rischio sulla base di un solo *score* (56).

Più recentemente, un altro studio ha valutato il valore prognostico delle alterazioni stromali midollari, considerando la combinazione di fibrosi reticolinica, depositi di collagene e osteosclerosi. Tale valutazione si è basata sulla formulazione di uno *score* integrato (definito *score* RCO), che attribuisce a ciascuno dei parametri considerati un punteggio compreso tra 0 e 3. Lo *score* RCO finale è rappresentato dalla somma dei punteggi relativi a ciascun parametro (*range* dello *score* RCO: 0-9). Per la valutazione prognostica, la casistica è stata divisa in due sottogruppi istologici (*i.e.* pazienti con RCO-*low grade*: *score* RCO compreso tra 0 e 4; pazienti con RCO-*high grade*: *score* RCO compreso tra 5 e 9).

I pazienti RCO-*high grade* erano caratterizzati da PMF in stadio clinico avanzato, con gradi più severi di anemia, trombocitopenia e leucocitosi, più elevati livelli sierici di LAD e maggior quota di mieloblasti circolanti. La sopravvivenza dei pazienti RCO-*high grade* era inoltre significativamente inferiore a quella dei pazienti RCO-*low grade* (3.5 versus 12.5 anni). La stratificazione secondo lo *score*

RCO identificava inoltre una quota di pazienti con PMF in fase avanzata con caratteristiche clinico-prognostiche simili a quelle della PMF in fase pre-fibrotica. Infine, rispetto al solo *score* IPSS, la valutazione integrata IPSS/RCO stratificava i pazienti in classi di rischio più solide e clinicamente più rilevanti: (i) pazienti a *basso rischio* (IPSS *low/IR-1* + RCO *low grade*); (ii) pazienti a *rischio moderato* (IPSS *low/IR-1* + RCO *high grade* oppure IPSS *IR-2/high* + RCO *low grade*); e (iii) pazienti a *rischio alto* (IPSS *IR-2/high* + RCO *high grade*). Questo studio ha dunque suggerito il valore prognostico indipendente di score istologici che considerino non solo la fibrosi reticolinica, ma anche i depositi di collagene e le alterazioni delle trabecole ossee (57).

1.3.3 Modificazioni stromali in corso di terapia

Alcune delle terapie approvate per il trattamento della Mielofibrosi sono associate a miglioramento delle alterazioni stromali midollari. È questo in particolare il caso dell'alloSCT, della terapia con interferone- α ricombinante e della terapia con Ruxolitinib.

1.3.3.1 *Trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche*

Numerosi studi hanno dimostrato una regressione della fibrosi reticolinica in pazienti con PMF, sottoposti a condizionamento mieloablativo *standard* e alloSCT. La regressione della fibrosi midollare è stata in particolare documentata tra il terzo e il quinto mese post-trapianto. L'alloSCT non sembra tuttavia associato a miglioramento dell'osteosclerosi (58).

Risultati simili sono stati ottenuti in pazienti trattati con condizionamento mieloablativo a intensità ridotta. In questo caso, un miglioramento della fibrosi reticolinica (da MF-2/MF-3 a MF-1/MF-0) è stato documentato tra il giorno +30 e il giorno +100 post trapianto. Al giorno +180, il 90% dei pazienti ha dimostrato una regressione completa o quasi completa della fibrosi midollare (40). Da un punto di vista fisiopatologico, gli effetti benefici dell'alloSCT sulla fibrosi midollare sono spiegati dalla completa scomparsa delle cellule staminali neoplastiche con riduzione dell'interazione tra i megacariociti atipici e i granulociti neutrofilici. Ciò, a sua volta, determina una significativa riduzione della secrezione di fattori di crescita pro-fibrotici con ridotta attivazione dei fibroblasti midollari (40,58,59).

1.3.3.2 Interferone- α ricombinante

L'Interferone- α ricombinante è utilizzato nel trattamento delle MPN classiche Philadelphia-negative, determinando remissioni ematologiche complete nel 70% dei pazienti affetti da PV/ET, con consensuale riduzione del *burden* allelico della mutazione di *JAK2* (60,61).

Nei pazienti con PMF e SMF, l'Interferone- α ricombinante migliora l'emocromo e riduce/stabilizza la splenomegalia. Da un punto di vista istologico, la somministrazione di interferone riduce la densità di megacariociti e migliora la fibrosi midollare. Per quanto i meccanismi di tale risposta siano poco noti, si suppone che l'interferone riduca la quota di cellule emopoietiche neoplastiche con conseguente inibizione della fibrogenesi midollare (62).

1.3.3.3 Ruxolitinib

Come precedentemente citato, la terapia a breve termine con Ruxolitinib migliora significativamente il quadro clinico e la sintomatologia dei pazienti. Tale trattamento non si associa tuttavia a miglioramenti delle alterazioni istologiche midollari. La somministrazione a lungo termine di Ruxolitinib è invece associata a riduzione o stabilizzazione della fibrosi reticolinica, dei depositi di collagene e delle alterazioni delle trabecole ossee (63). Oltre agli effetti diretti sullo stroma midollare, la terapia a lungo termine (6-12 mesi) con Ruxolitinib può ridurre il numero e le atipie dei megacariociti midollari (64).

Questi dati dimostrano la dinamicità delle alterazioni midollari in corso di Mielofibrosi e confermano l'importanza della valutazione istologica del midollo osseo per la diagnosi, la stratificazione prognostica e il monitoraggio della risposta alle terapie. Per quanto rilevanti, tali osservazioni si basano tuttavia su un numero ancora limitato di studi e su casistiche talora poco numerose. Poco inoltre si sa su eventuali differenze tra PMF e SMF riguardo l'impatto clinico delle alterazioni stromali midollari.

2. SCOPO DELLO STUDIO

Scopi del presente studio sono:

- Descrivere le caratteristiche clinico-patologiche della PMF/SMF;
- Valutare le alterazioni stromali midollari in corso di PMF/SMF;
- Definire il ruolo prognostico delle alterazioni stromali midollari e di altri parametri clinico-laboratoristici in corso di PMF/SMF.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Popolazione dello studio

Questo studio retrospettivo monocentrico ha considerato le caratteristiche clinico-patologiche di una serie di 103 Mielofibrosi (PMF/SMF), diagnosticate presso l'U.O.C. di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedale Università di Padova nel periodo compreso tra gennaio 2017 e maggio 2022. Ai fini dello studio, sono stati considerati i seguenti criteri di inclusione: (i) età >18 anni; (ii) diagnosi clinico-patologica di PMF o SMF; (iii) disponibilità di dati clinico/terapeutici e dello *score* IPSS; e (iv) *follow-up* clinico di almeno 3 mesi. In tutti i casi disponibili è stato valutato uno *score* integrato delle alterazioni stromali midollari (*score* RCO) (26,28). Le attività relative al progetto sono state svolte nel rispetto della Dichiarazione di Helsinki e previo consenso informato dei pazienti.

3.2 Raccolta e valutazione dei dati clinico-prognostici

Ai fini del progetto, per ciascun paziente sono stati considerati i seguenti dati clinico-prognostici: (i) sesso ed età alla diagnosi; (ii) valori emocromocitometrici alla diagnosi di WBC, Hb e PLTS, (iii) livelli sierici di LAD alla diagnosi; (iv) presenza/assenza di splenomegalia alla diagnosi; (v) presenza/assenza di sintomi sistemici alla diagnosi; (vi) percentuale di blasti su sangue periferico alla diagnosi; (vii) terapie somministrate; (viii) presenza/assenza di progressione di malattia (fase blastica); (ix) *out-come* ed eventuali cause del decesso.

3.3 Valutazione istologica dei campioni di BOM

I preparati istologici di BOM sono stati ottenuti dagli archivi dell'U.O.C. di Anatomia Patologica dell'Azienda Ospedale Università di Padova. Tutti i campioni sono stati rivalutati da due ematopatologi non a conoscenza della diagnosi clinica. Dopo conferma della diagnosi di PMF/SMF, sono stati raccolti i seguenti dati istologici: (i) cellularità; (ii) rapporto mielo-eritroide (M:E ratio); (iii) numero di megacariociti per campo a forte ingrandimento; (iv) presenza (e tipo) di *clusters* di megacariociti; (v) caratteristiche citologiche dei megacariociti; (vi) presenza/assenza di aggregati linfoidi; (vii) presenza ed entità della fibrosi reticolinica (MF-0, MF-1, MF-2, MF-3 sec. Classificazione WHO 2017) (26); (viii) presenza ed entità dei depositi di collagene (Co-0, Co-1, Co-2, Co-3 sec. *score*

RCO) (28); (ix) presenza ed entità delle alterazioni a carico delle trabecole ossee (Ost-0, Ost-1, Ost-2, Ost-3 sec. *score* RCO); (x) percentuale di precursori midollari CD-34 positivi (28).

Le immagini istologiche e i dati morfometrici sono stati acquisiti utilizzando la fotocamera digitale Leica DFC295 e il software LAS X (Leica Microsystems; Milano – Italia).

3.4 Analisi istochimiche e immunoistochimiche

La valutazione dei depositi di fibre reticoliniche e collagene è stata eseguita mediante colorazione con impregnazione argentea (kit Bio Optica, Milano – Italia). In casi di difficile interpretazione è stata inoltre eseguita colorazione tricromica di Masson per valutare i depositi di fibre collagene (Goldner; Bio Optica).

Le analisi immunoistochimiche sono state realizzate su sezioni di tessuto fissato in formalina/incluso in paraffina dello spessore di 4 μm , utilizzando il Bond Polymer Refine Detection kit in un coloratore automatizzato (BOND-MAX system; Leica Biosystems – Newcastle upon Tyne, UK). Le colorazioni sono state effettuate su sezioni intere, utilizzando i seguenti anticorpi primari: anti-CD34 (clone QBEnd/10, BIOCARE Medical, USA), anti-CD117 (clone C8/144B, Dako, Danimarca).

3.5 Elaborazione dei dati e analisi statistiche

Le differenze tra variabili qualitative sono state valutate mediante Fisher's exact test, quelle tra variabili quantitative con test t di Student. Per il calcolo della OS e della PFS si sono applicati il metodo Kaplan-Meier e il test *log-rank*.

L'OS è stata calcolata dalla data della diagnosi alla data del decesso/ultimo *follow-up*. I pazienti persi al *follow-up* sono stati censiti al momento dell'ultimo contatto. La PFS è stata calcolata dalla data della diagnosi fino alla data di progressione/recidiva di malattia o fino alla data dell'ultimo *follow-up*. Le analisi multivariate sono state eseguite con il modello di regressione Cox, tenendo conto delle variabili con *p*-value <0.2.

I dati sono stati analizzati usando il software SPSS 21.0 (IBM; Chicago – IL, USA) e il programma statistico SAS (SAS-PC, *version* 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC). Le differenze tra i gruppi sono state considerate statisticamente significative per valori di *p*<0,05.

4. RISULTATI

4.1 Caratteristiche cliniche della popolazione in studio

Il presente studio ha considerato 68/103 (66%) pazienti affetti da PMF (fase precoce/pre-fibrotica: 28/68 [41%]; fase fibrotica/avanzata: 40/68 [59%]) e 35/103 (34%) pazienti affetti da SMF (MF post-PV: 13/35 [37%]; MF post-ET: 22/35 [63%]). La popolazione di studio aveva età media alla diagnosi di 68,4 anni (*range*: 25,0-87,3 anni) ed è risultata prevalentemente composta da pazienti di sesso maschile (rapporto M:F=1,6:1).

Alla diagnosi, 22/99 (22%) pazienti presentavano sintomi sistemici quali febbre, calo ponderale o sudorazioni notturne. Splenomegalia era presente in 58/86 (67%) pazienti. In nessun caso sono stati documentati eventi trombotico-emorragici alla diagnosi. Gli esami emocromocitometrici hanno documentato anemia in 32/103 (31%), leucocitosi in 44/103 (43%), piastrinosi in 40/103 (39%) e piastrinopenia in 20/103 (19%). Leucoeritroblastosi è stata riportata in 30/103 (29%) pazienti, mentre un incremento dei livelli sierici di LAD è stato documentato in 69/89 (78%) casi (Tabella 1). La stratificazione prognostica alla diagnosi in base allo *score* IPSS ha documentato 16/103 (15,5%) in classe di rischio *low*, 36/103 (35%) in classe di rischio *IR-1*, 35/103 (34%) in classe di rischio *IR-2* e 16/103 (15,5%) casi in classe di rischio *high*.

L'età media dei pazienti con PMF in fase pre-fibrotica è risultata sovrapponibile a quella dei pazienti in fase fibrotica. I pazienti con PMF in fase pre-fibrotica hanno dimostrato livelli di Hb e PTLs alla diagnosi significativamente maggiori rispetto ai pazienti con PMF in fase fibrotica ($p < 0.05$; Tabella 1). I livelli di LAD sono risultati significativamente inferiori nei pazienti con PMF in fase pre-fibrotica rispetto ai pazienti con PMF in fase fibrotica. La leucoeritroblastosi è invece risultata più frequente nei pazienti con PMF in fase avanzata. Le caratteristiche clinico-epidemiologiche della PMF in fase fibrotica sono risultate del tutto sovrapponibili a quelle della SMF (Tabella 1).

Dal punto di vista terapeutico, 71/103 (69%) pazienti sono stati trattati con Idrossiurea e 44/102 (43%) con Ruxolitinib. In totale, 7/103 (7%) pazienti sono andati incontro ad alloSCT.

Nell'intera coorte, l'OS è risultata di 28,8 mesi (*range*: 0,5-65,6) e la PFS di 28,1 mesi (*range*: 0,0-65,6). Progressione a fase blastica è stata documentata in 9/103

Tabella 1. Caratteristiche clinico-laboratoristiche dei pazienti con Mielofibrosi

	ePMF (n=28)	aPMF (n=40)	SMF (n=35)	ePMF vs aPMF (p-value)	aPMF vs SMF (p-value)
Sesso (%)					
<i>Maschi</i>	15 (54)	26 (65)	23 (66)	n.s.	n.s.
<i>Femmine</i>	13 (46)	14 (35)	12 (34)		
Età (anni)	69,2 (25-87,3)	70,4 (41,1-86,3)	65,4 (44,2-79,9)	n.s.	n.s.
Hb alla diagnosi (g/dL)	12,9 (8,7-16,4)	10,5 (7,7-14,2)	11,0 (6,5-17,11)	<0.01	n.s.
WBC alla diagnosi (x10⁹/L)	11,8 (3,1-42,2)	14,5 (2,4-75,1)	14,0 (2,1-56,3)	n.s.	n.s.
PLTS alla diagnosi (x10⁹/L)	667,3 (105-1342)	291,8 (29-789)	324,4 (19-799)	<0.01	n.s.
LAD alla diagnosi (IU/L)	309,3 (100-578)	745,1 (249-2507)	677,3 (265-2163)	<0.01	n.s.
Presenza di blasti su SP (%)	/	16/40 (40)	14/35 (40)	<0.01	n.s.
Splenomegalia (%)	14/24 (58)	24/34 (71)	20/28 (71)	n.s.	n.s.
Sintomi costituzionali (%)	4/28 (14)	13/37(35)	5/34 (15)	n.s.	n.s.
Score IPSS					
<i>Low</i>	7/28 (25)	2/40 (5)	7/35 (20)	0.03	n.s.
<i>IR-1</i>	15/28 (54)	10/40 (25)	18/35 (51)	0.02	n.s.
<i>IR-2</i>	6/28 (21)	18/40 (45)	9/35 (26)	<0.01	n.s.
<i>High</i>	/	10/40 (25)	1/35 (3)	<0.01	n.s.
Evoluzione blastica (%)	/	4/40 (10)	5/35 (14)	n.s.	n.s.
Decesso malattia-correlato (%)	2/28 (7)	12/40 (30)	10/35 (29)	0.03	n.s.

Abbreviazioni: Hb= emoglobina; IPSS= International Prognostic Scoring System; IR-1= intermedio-1; IR-2=intermedio-2; LAD= lattato deidrogenasi; PLTS= piastrine; SP= sangue periferico; WBC= globuli bianchi

(9%) pazienti. In totale, durante il *follow-up* 24/103 (23%) pazienti sono deceduti per complicanze correlate alla malattia. Il confronto tra sottogruppi di malattia ha documentato miglior OS nei pazienti con PMF in fase pre-fibrotica rispetto ai pazienti con fibrosi avanzata (Figura 1).

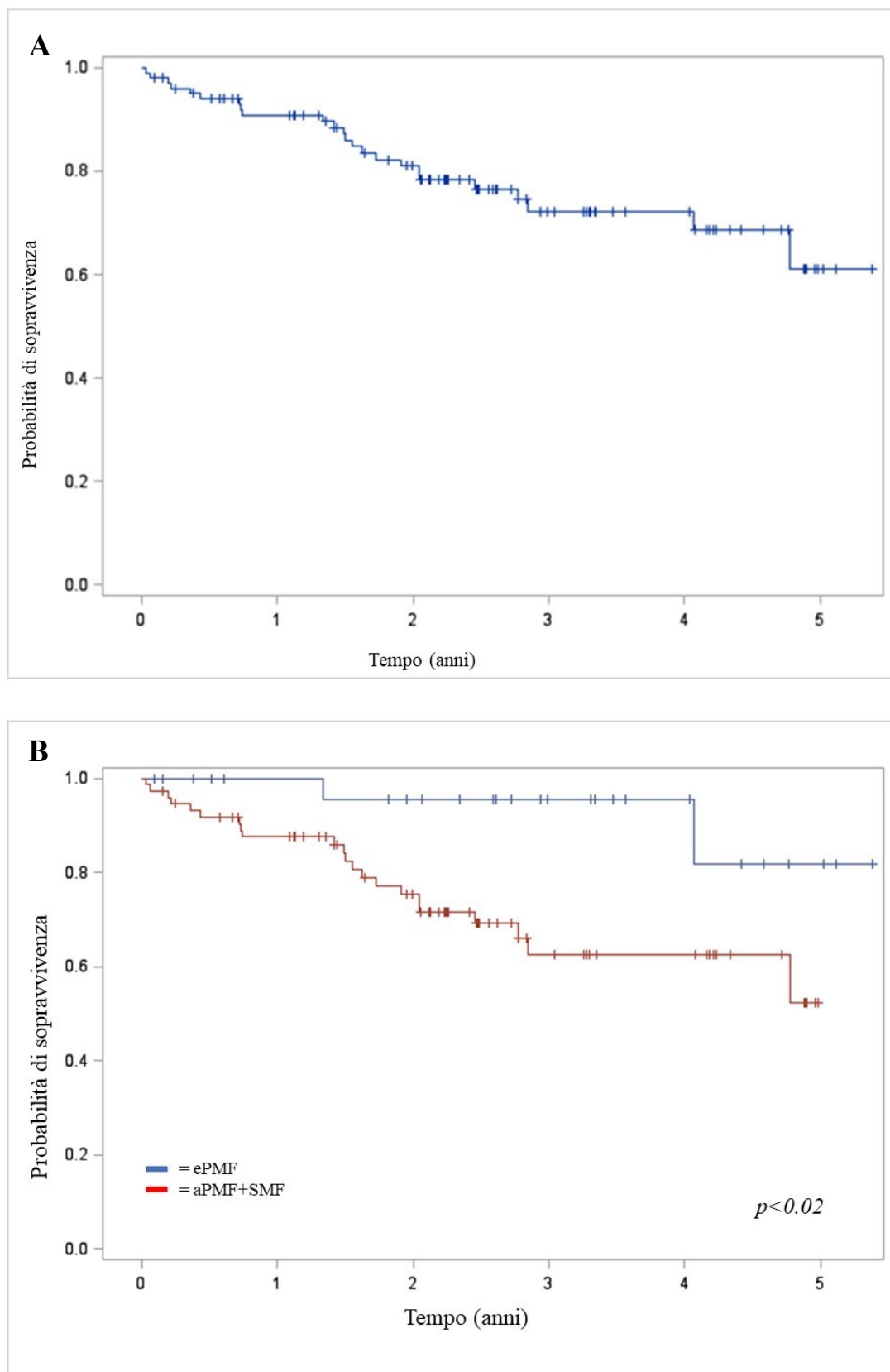


Figura 1. Curve di sopravvivenza dei pazienti con Mielofibrosi. A. Sopravvivenza generale dell'intera coorte (103 pazienti). B. Curva di sopravvivenza differenziate sulla base del sottotipo di malattia (PMF in fase pre-fibrotica [ePMF]: 28/103 casi; PMF in fase fibrotica [aPMF] e Mielofibrosi secondaria [SMF]: 75/103 casi). La differenza di sopravvivenza tra ePMF e aPMF/SMF è risultata statisticamente significativa ($p < 0.02$).

Tabella 2. Caratteristiche istologiche delle Mielofibrosi Primitive e Secondarie §

	ePMF (n=28)	aPMF (n=40)	SMF (n=35)
Cellularità media (%)	71,3 (25,0-95,0)	68,2 (5,0-95,0)	77,0 (5,0-95,0)
Rapporto mielo:eritroide	3,9:1 (1:1-20:1)	4,8:1 (2,5:1-10:1)	4,5:1 (1,5:1-10:1)
Megagariociti (n°/HPF)	19,6 (8-50)	24,9 (<1-80)	25,7 (4-70)
Clusters di Megacariociti (%)			
<i>Presenti</i>	27/27 (100)	36/38 (95)	33/34 (97)
<i>Assenti</i>	/	2/38 (5)	1/34 (3)
Aggregati linfoidi (%)			
<i>Presenti</i>	12/26 (46)	14/38 (37)	7/35 (20)
<i>Assenti</i>	14/26 (54)	24/38 (63)	28/35 (80)
Fibrosi reticolinica (%)			
<i>MF-0</i>	3/28 (11)	/	/
<i>MF-1</i>	25/28 (89)	/	/
<i>MF-2</i>	/	17/40 (43)	13/35 (37)
<i>MF-3</i>	/	23/40 (57)	22/35 (63)
Fibrosi collagena (%)			
<i>Co-0</i>	25/28 (89)	/	/
<i>Co-1</i>	3/28 (11)	9/40 (23)	4/35 (11)
<i>Co-2</i>	/	11/40 (28)	14/35 (40)
<i>Co-3</i>	/	20/40 (50)	17/35 (49)
Osteosclerosi (%)			
<i>Ost-0</i>	22/27 (81)	10/39 (26)	10/35 (29)
<i>Ost-1</i>	4/27 (15)	14/39 (36)	17/35 (49)
<i>Ost-2</i>	1/27 (4)	11/39 (28)	7/35 (20)
<i>Ost-3</i>	/	4/39 (10)	1/35 (3)
Score RCO (%)			
<i>Low-grade*</i>	27/27 (100)	12/39 (31)	5/35 (14)
<i>High-grade*</i>	/	27/39 (69)	30/35 (86)

Note: § il confronto tra i sottogruppi di malattia non ha documentato differenze statisticamente significative per nessuna delle variabili considerate. *RCO score *low-grade*: 0-4 punti; *high-grade*: 5-9 punti. **Abbreviazioni:** aPMF= Mielofibrosi primitiva in fase avanzata; ePMF: Mielofibrosi primitiva in fase precoce; HPF= campo a forte ingrandimento; SMF=Mielofibrosi secondaria.

4.2 Caratteristiche istologiche e molecolari della popolazione in studio

La valutazione istologica del midollo osseo ha documentato un incremento della cellularità in 90/97 (93%) pazienti con rapporto mielo:eritroide variabile da 1:1 a

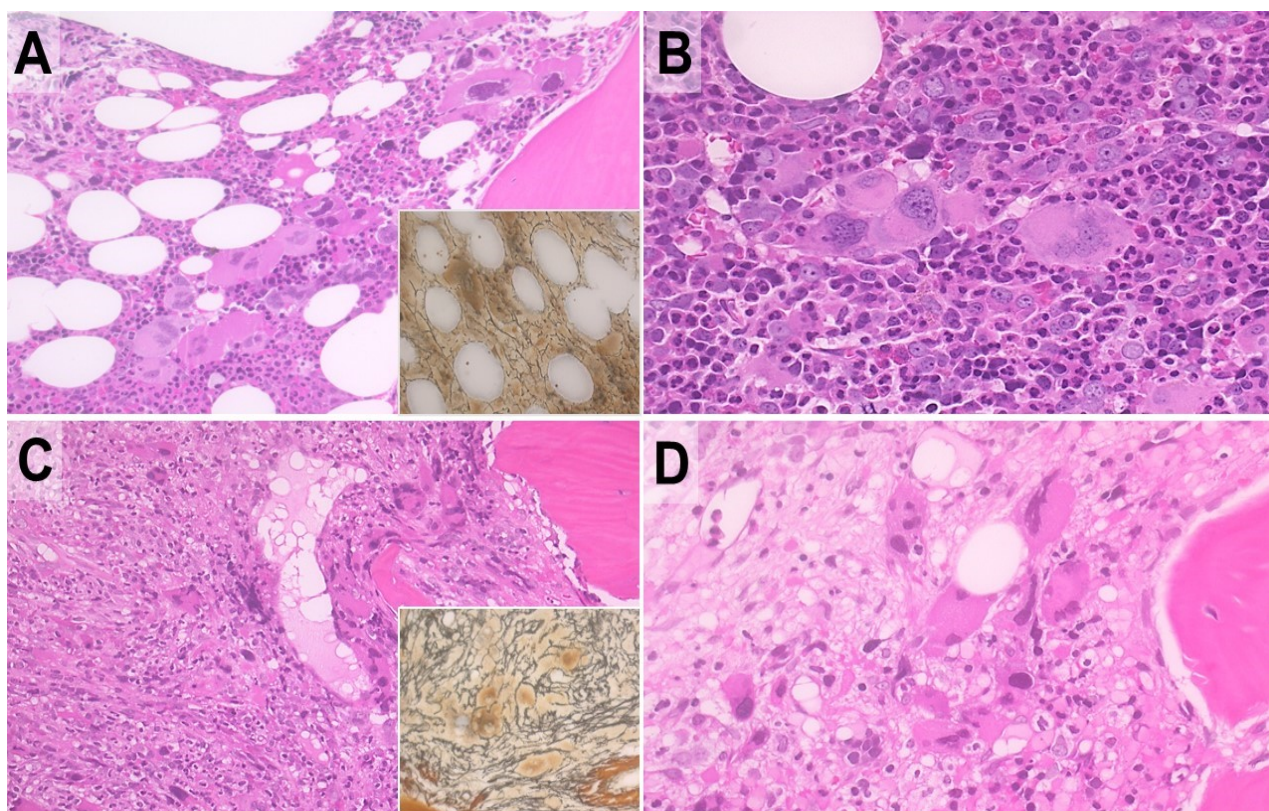


Figura 2. Caratteristiche istologiche della Mielofibrosi. A-B. In corso di PMF in fase pre-fibrotica, il midollo è ipercellulato con espansione della granulopoiesi e della megacariocitopoiesi (A) e con minimo infittimento della trama reticolinica (pannello A, *inserto*). A forte ingrandimento, sono evidenti *clusters* di megacariociti con nucleo bulboso (B). C-D. La PMF in fase fibrotica e la SMF presentano midollo da iper- a ipo-cellulato, con ectasia dei sinusoidi (C) e marcata fibrosi interstiziale (pannello C, *inserto*). I megacariociti si organizzano in *clusters* e possono assumere aspetti dismaturativi/displastici (D). (Colorazione con ematossilina/eosina e impregnazione argentea; ingrandimento originali: 20x e 40x).

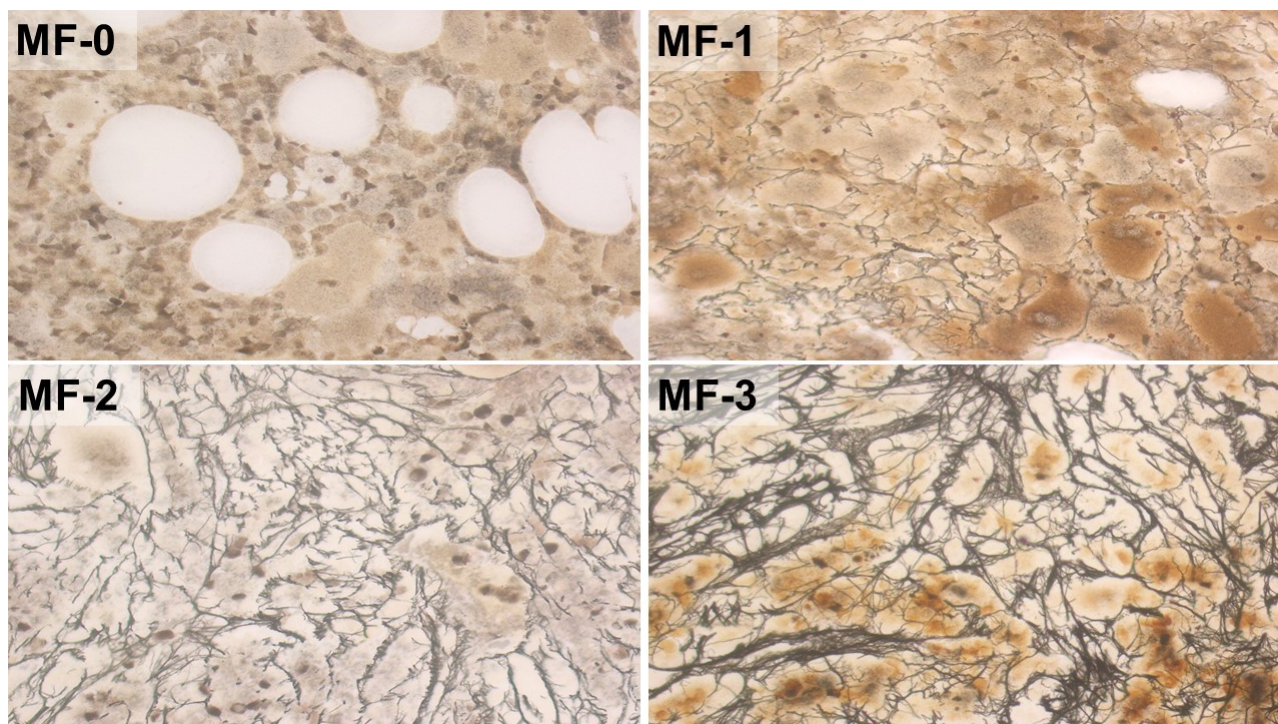


Figura 3. Grading istologico della fibrosi reticolinica (score MF). La fibrosi reticolinica viene valutata con il seguente score: **MF-0** (fibre reticoliniche non aumentate), **MF-1** (fibrosi reticolinica costituita da sottili fibre con numerose intersezioni, specialmente in sede peri-vascolare), **MF-2** (marcato e diffuso infittimento delle fibre reticoliniche, con estese intersezioni e focali fasci di fibre collagene), **MF-3** (marcato e diffuso infittimento delle fibre reticoliniche, con estese intersezioni e ampi fasci di fibre collagene). (Colorazione con impregnazione argentea; ingrandimento originale: 20x).

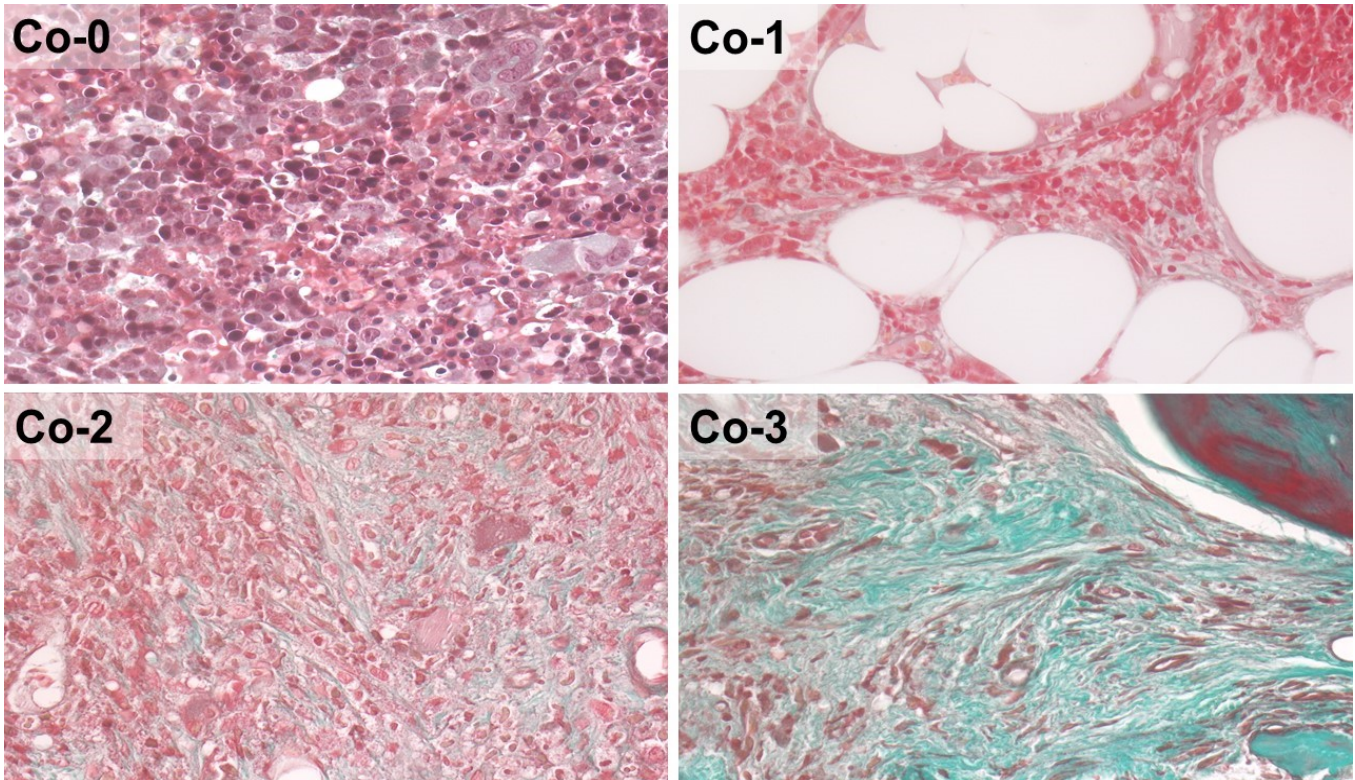


Figura 4. Grading istologico della fibrosi collagena. La fibrosi collagena viene valutata con il seguente *score*: **Co-0** (collagene presente solo a livello peri-vascolare), **Co-1** (focali depositi di collagene in zona paratrabecolare o centro-lacunare), **Co-2** (depositi di collagene in zona paratrabecolare o centro-lacunare con focali interconnessioni, oppure diffusi depositi paratrabecolari di collagene), **Co-3** (intersezioni diffuse in >30% delle lacune midollari). (Colorazione con tricromica di Masson; ingrandimento originale: 20x).

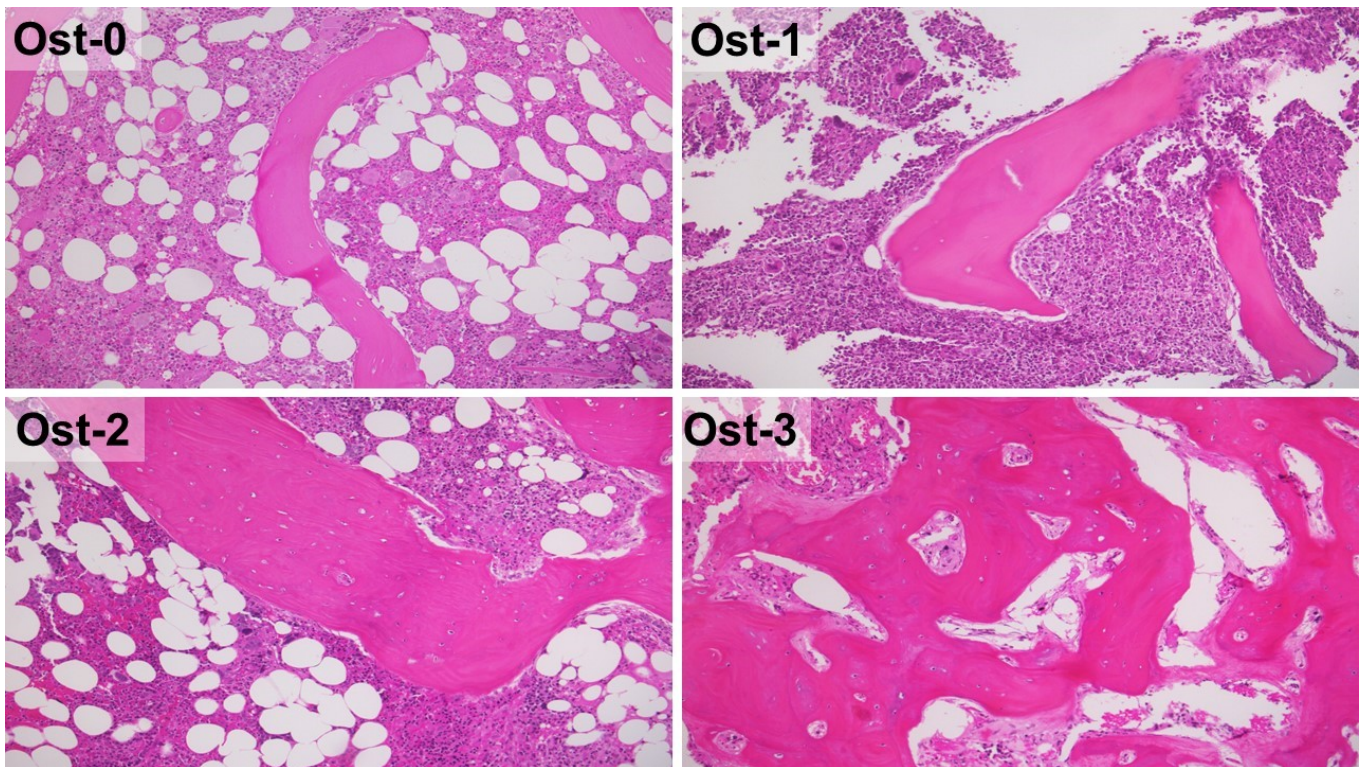


Figura 5. Grading istologico dell'osteosclerosi midollare. Le alterazioni delle trabecole ossee vengono valutate sulla base del seguente *score*: **Ost-0** (trabecole ossee regolari), **Ost-1** (focali spicole, *budding* o apposizione di osso neoformato), **Ost-2** (diffusa apposizione paratrabecolare di osso neoformato con ispessimento trabecolare e con focali ponti inter-trabecolari), **Ost-3** (estesi ponti inter-trabecolari con oblitterazione delle lacune midollari). (Colorazione con ematossilina/eosina; ingrandimento originale: 10x).

20:1 (valore medio 4,4:1). In 99/100 (99%) casi è stato documentato un incremento della megacariocitopoiesi (valore medio di megacariociti/HPF: 23.7; *range*: <1-80) con megacariociti con nuclei bulbosi/iposegmentati. *Clusters* densi di megacariociti sono stati documentati in 96/99 (97%) casi e aggregati centro-lacunari di linfociti in 33/99 (33%) casi. Il valore medio di precursori CD34-positivi è risultato pari a 2,35% della cellularità totale (*range*: <1%-19%). Fibrosi di grado MF-0 è stata documentata in 3/103 (3%) casi, di grado MF-1 in 25/103 (24%) casi, di grado MF-2 in 30/103 (29%) pazienti e di grado MF-3 in 45/103 (44%) dei casi. Un incremento di fibre collagene è stato documentato in 78/103 (75%) casi (Co-1: 16/103 [16%]; Co-2: 25/103 [24%]; Co-3: 37/103 [36%]), mentre un significativo rimaneggiamento delle trabecole ossee è stato rilevato in 59/101 (59%) casi (Ost-1: 35/101 [35%]; Ost-2: 19/101 [19%]; Ost-3: 5/101 [5%]). Nell'intera coorte, uno *score* RCO basso (RCO *score* ≤4) è stato riportato in 44/101 (44%) casi, mentre uno *score* RCO elevato (RCO *score* >5) è stato documentato in 57/101 (56%) casi (Tabella 2). Dati molecolari riguardo alle mutazioni *driver* di MPN erano disponibili in 98/103 (95%) casi. In totale, 71/98 (72%) casi erano positivi per la mutazione V617F di *JAK2*, 15/98 (15%) casi per mutazioni di *CALR* e 11/98 (11%) casi per mutazioni di *MPL*. Un solo caso 1/98 (1%) è risultato TN.

4.3 Distribuzione e caratteristiche dei casi secondo lo *score* RCO

Tutti casi sono stati stratificati secondo lo *score* RCO, come precedentemente riportato (57). In particolare, uno *score* RCO ≤4 (*i.e.* RCO *low-grade*) è stato documentato in 44/101 (44%) casi, mentre uno *score* RCO >4 (*i.e.* RCO *high-grade*) è stato riportato in 57/101 (56%) casi. Tutti i pazienti con diagnosi di PMF in fase pre-fibrotica (27/101 [27%]) appartenevano alla categoria RCO *low-grade*, mentre le PMF in fase fibrotica e le SMF avevano distribuzione più eterogenea (RCO *low-grade*: 12/39 [31%] casi di PMF in fase fibrotica e 5/35 [14%] casi di SMF; RCO *high-grade*: 27/39 [69%] casi di PMF in fase fibrotica e 30/35 [86%] casi di SMF). Le differenze nella distribuzione secondo *score* RCO tra PMF in fase pre-fibrotica e Mielofibrosi conclamate (*i.e.* PMF in fase fibrotica e SMF) sono risultate statisticamente significative ($p < 0.01$). PMF in fase fibrotica e SMF hanno invece dimostrato simile distribuzione sulla base dello *score* RCO (Tabella 2). Per quanto riguarda la presentazione clinica, i casi RCO *high-grade* erano

Tabella 3. Caratteristiche cliniche della coorte stratificata secondo lo *score* RCO

	Low-grade* (n=44)	High-grade* (n=57)	p-value
Sesso (%)			
<i>Maschi</i>	26 (59)	37 (65)	n.s.
<i>Femmine</i>	18 (41)	20 (35)	
Età (anni)	69,9 (25-87,3)	66,9 (44,2-85,5)	n.s.
Hb alla diagnosi (g/Dl)	12,4 (8,3-16,4)	10,5 (6,5-17,1)	<0.01
WBC alla diagnosi (x10⁹/L)	12,9 (2,4-75,1)	14,0 (2,1-56,3)	n.s.
PLTS alla diagnosi (x10⁹/L)	564,4 (55-1342)	285 (19-789)	<0.01
LAD alla diagnosi (IU/L)	392,1 (100-983)	763 (249-2507)	<0.01
Presenza di blasti su SP (%)	1/44 (2)	29/57 (51)	<0.01
Splenomegalia (%)	19/36 (53)	38/49 (78)	0.02
Sintomi costituzionali (%)	11/44 (25)	10/43 (19)	n.s.
Score IPSS			
<i>Low</i>	10/44 (23)	6/57 (11)	0.01
<i>IR-1</i>	20/44 (45)	15/57 (26)	
<i>IR-2</i>	11/44 (25)	23/57 (40)	
<i>High</i>	3/44 (7)	13/57 (23)	
Evoluzione blastica (%)	1/44 (2)	8/57 (14)	n.s.
Decesso malattia-correlato (%)	7/44 (16)	17/57 (43)	n.s.

Note: * RCO score *low-grade*: 0-4 punti; *high-grade*: 5-9 punti. **Abbreviazioni:** Hb= emoglobina; IPSS= International Prognostic Scoring System; IR-1= intermedio-1; IR-2=intermedio-2; LAD= lattato deidrogenasi; PLTS= piastrine; SP= sangue periferico; WBC= globuli bianchi.

caratterizzati da maggior frequenza di anemia, leucoeritroblastosi periferica, splenomegalia e da più alti livelli sierici di LAD rispetto ai casi RCO *low-grade*. I pazienti RCO *low-grade* presentavano inoltre livelli di PLTS alla diagnosi superiori rispetto i pazienti RCO *high-grade* (Tabella 3). Da un punto di vista istologico, il confronto tra casi RCO *low-grade* e *high-grade* non ha documentato differenze statisticamente significative per nessuna delle variabili considerate.

4.4 Valutazione prognostica dello *score* RCO e delle variabili cliniche

Le differenze tra sottogruppi RCO *low-grade* e RCO *high-grade* suggeriscono un'eterogeneità biologica potenzialmente correlata alla prognosi. Per valutare l'impatto clinico dello *score* RCO sono state quindi condotte analisi di sopravvivenza uni- e multi-variate.

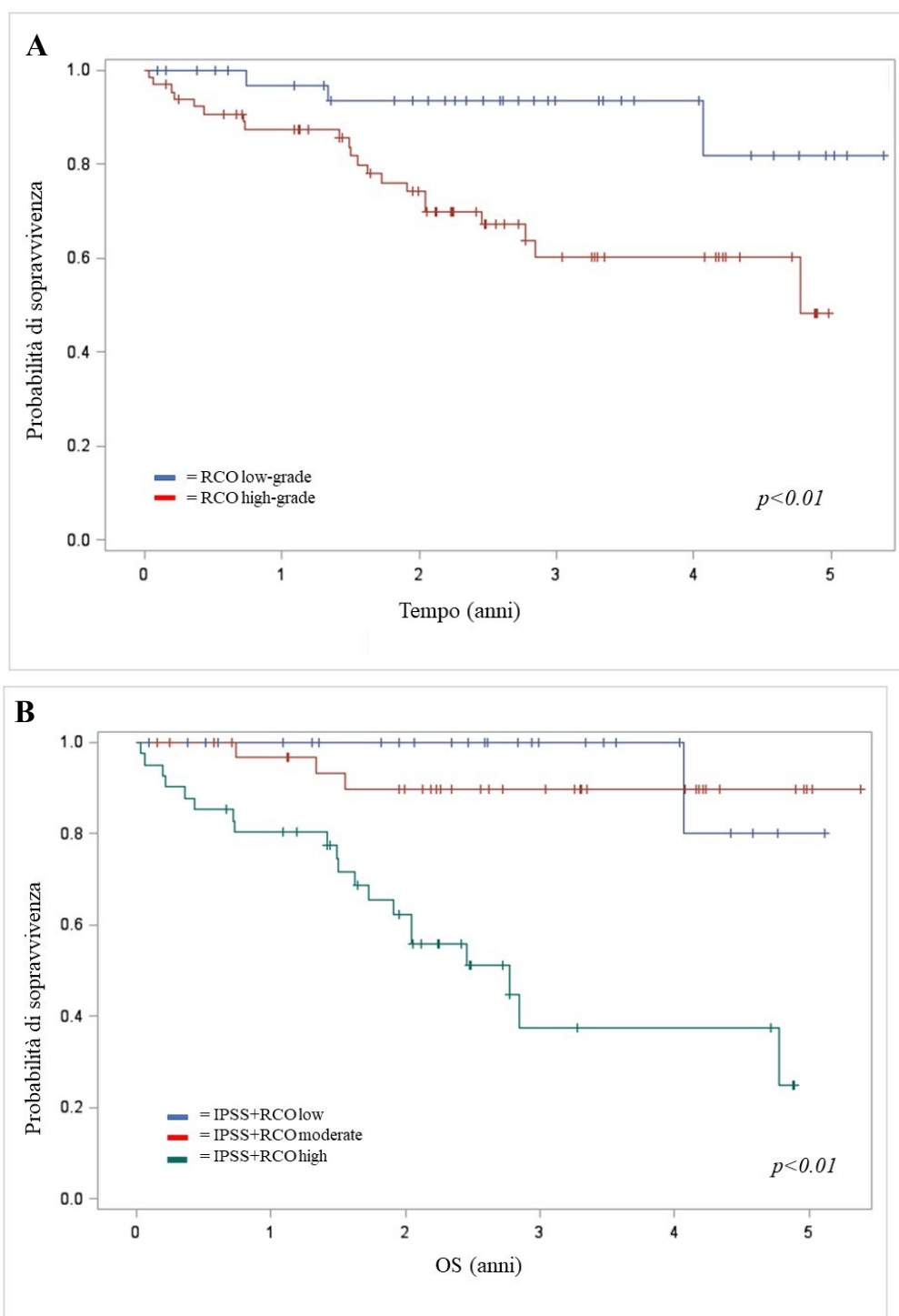


Figura 6. Curve di sopravvivenza in base allo score RCO e allo score integrato IPSS/RCO. **A.** Curva di sopravvivenza dell'intera coorte stratificata secondo lo score RCO (RCO *low-grade* ≤ 4 punti; RCO *high-grade* > 5 punti). La differenza tra le sottopopolazioni di pazienti è risultata statisticamente significativa ($p < 0.01$).; **B.** Curva di sopravvivenza della popolazione stratificata secondo lo score integrato IPSS/RCO (IPSS+RCO low= IPSS *low/IR-1* + RCO *low-grade*; IPSS+RCO moderate= IPSS *low/IR-1* + RCO *high-grade* o IPSS *IR-2/high* + RCO *low-grade*; IPSS+RCO high= IPSS *IR-2/high* + RCO *high-grade*). La curva di sopravvivenza dei pazienti con score IPSS+RCO high è risultata significativamente peggiore rispetto a quella delle altre categorie di pazienti ($p < 0.01$).

Analisi preliminari hanno anzitutto documentato un'associazione statisticamente significativa tra score RCO e *outcome* clinico ($p < 0.01$). Tale dato è stato confermato mediante analisi univariata con *log-rank* test (Figura 6a). Elevati score

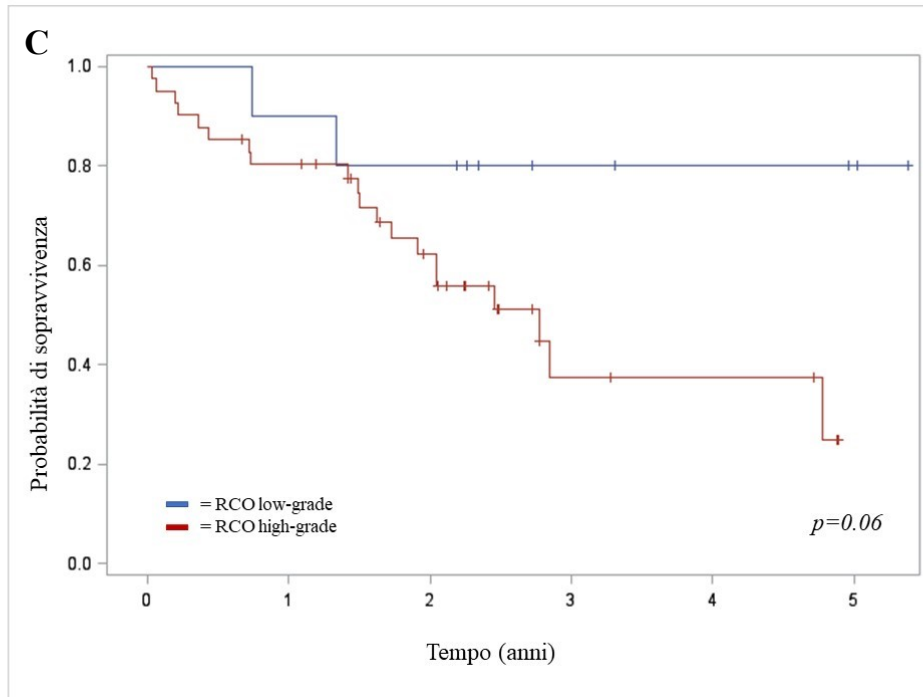


Figura 7. Curva di sopravvivenza de pazienti con IPSS IR-2/high stratificati secondo lo score RCO. I pazienti con score RCO *high-grade* erano caratterizzati da sopravvivenza inferiore rispetto ai pazienti con score RCO *low-grade* (trend di significatività statistica; $p=0.06$).

RCO erano inoltre associati a categorie IPSS prognosticamente sfavorevoli ($p < 0.01$). Nessuna associazione è stata invece documentata tra *score* RCO e rischio di evoluzione leucemica.

Per definire con maggior precisione l'impatto prognostico dello *score* RCO, sono state quindi condotte analisi multivariate, considerando altre variabili correlate all'*outcome* (i.e. *score* IPSS, presenza di sintomi sistemici, anemia ed elevati livelli di PLTS). Tali analisi hanno dimostrato un valore prognostico indipendente per il solo *score* IPSS.

Per valutare il possibile impatto dello *score* RCO sulla stratificazione prognostica dell'IPSS, è stato prodotto anche uno *score* integrato IPSS-RCO (*cf*r paragrafo 1.3.2). Tale *score* ha permesso un'ottima stratificazione dei pazienti in termini di *outcome*, senza tuttavia ottenere risultati superiori a quelli del solo IPSS (valore predittivo positivo per mortalità correlata a Mielofibrosi: 44.4% per lo *score* IPSS/RCO; 44.0% per il solo IPSS; Figura 6b). Tale analisi ha tuttavia documentato curve di sopravvivenza significativamente peggiori nei pazienti con alto IPSS/RCO *high-grade* rispetto a pazienti con alto IPSS/RCO *low-grade*. In accordo con tale osservazione, l'applicazione dello *score* RCO a categorie di rischio IPSS intermedio/elevato (classi *IR-2* e *High*) ha permesso di identificare sottogruppi di pazienti con curve di sopravvivenza diversificate (Figura 6c; *trend* di significatività

statistica, $p= 0.06$). Tale stratificazione non era possibile con la sola valutazione della fibrosi reticolinica.

5. DISCUSSIONE

Le MPN Philadelphia-negative a impronta mielofibrotica costituiscono un sottogruppo eterogeneo di neoplasie ematologiche, caratterizzate da presentazione clinica, istologia midollare e *outcome* molto variabili (8). Il presente studio ha avuto l'obiettivo di definire le caratteristiche clinico-patologiche e la prognosi della PMF e della SMF, correlandole specificamente con l'entità delle alterazioni stromali midollari.

In linea con quanto precedentemente riportato (18,53), l'analisi della nostra coorte di pazienti ha documentato significative differenze in merito alla presentazione clinico-laboratoristica della PMF in fase precoce rispetto alla PMF in fase fibrotica/avanzata (livelli più elevati di Hb e PLTS; livelli inferiori di LAD sierica; minor frequenza di leucoeritroblastosi). La PMF in fase precoce si associava inoltre a miglior OS rispetto alla fase fibrotica di malattia. Il confronto tra PMF avanzata e SMF non ha invece documentato significative differenze in termini di presentazione clinica, esami emocromocitometrici e *outcome* (Tabella 1). Nel complesso, tali risultati confermano la minor aggressività biologica della PMF in fase pre-fibrotica e giustificano l'assimilazione di PMF in fase avanzata e SMF in un'unica categoria nosologica per analisi cliniche e di *outcome*.

Nel nostro studio, le alterazioni stromali midollari sono state analizzate mediante *score* RCO (57). Tale *score* ha permesso la valutazione integrata delle alterazioni a carico delle principali componenti dello stroma midollare (*i.e.* fibroblasti; osteoblasti/osteoclasti della nicchia ossea; proteine della matrice extra-cellulare). Il *grading* dei depositi di fibre reticoliniche e collagene rispecchia, in particolare, le alterazioni funzionali a carico dei fibroblasti midollari, mentre la valutazione della struttura dell'osso trabecolare correla con la biologia e la funzione di osteoblasti e osteoclasti (45). In linea con la biologia delle fasi precoci di malattia, uno *score* RCO *low-grade* è stato documentato nella totalità dei casi PMF in fase precoce. Le Mielofibrosi conclamate (*i.e.* PMF in fase avanzata e SMF) hanno invece documentato *score* RCO più variabili (RCO *low-grade*: in 12/39 [31%] casi di PMF in fase fibrotica e 5/35 [14%] casi di SMF; RCO *high-grade*: in 27/39 [69%] casi di PMF in fase fibrotica e 30/35 [86%] casi di SMF). Questi risultati suggeriscono l'esistenza di sottogruppi di malattia con caratteristiche biologiche e istologiche potenzialmente associate alla presentazione clinica e all'*outcome* dei pazienti.

Per verificare tale ipotesi, sono state dapprima confrontate le caratteristiche clinico-laboratoristiche dei casi con *score* RCO *low-* e *high-grade*. Tale valutazione ha dimostrato maggior frequenza di anemia, di blastosi periferica e di splenomegalia nei casi con RCO *high-grade*. I casi RCO *low-grade* avevano invece inferiori livelli sierici di LAD (Tabella 3). Tali risultati sono in linea con quanto recentemente osservato in una coorte indipendente di PMF, cui è stata applicata la stratificazione secondo *score* RCO (57) e confermano che le alterazioni stromali midollari si associano a fenotipi di malattia diversi.

In base a tali risultati, si è quindi valutato l'impatto prognostico dello *score* RCO sull'intera coorte di pazienti. Analisi preliminari hanno dimostrato che la stratificazione in RCO *low-* e *high-grade* correlava significativamente con l'OS, ma non con il rischio di evoluzione leucemica. Per quanto limitati dalla ridotta incidenza di fasi blastiche di malattia, tali risultati sono in linea con i dati di precedenti studi (57) e suggeriscono l'esistenza di meccanismi patogenetici stroma-indipendenti, in grado di promuovere l'evoluzione leucemica nei pazienti con MPN. Questi potrebbero in particolare comprendere la progressiva acquisizione di alterazioni geniche nelle cellule staminali dell'MPN o, in alternativa, la trasformazione di cellule emopoietiche *by-stander*, a seguito di mutazioni indotte dai cloni MPN (65).

La presenza di una correlazione statisticamente significativa tra *score* RCO e OS ha indotto ad approfondire la natura di tale associazione mediante analisi multivariate, che considerassero altri fattori potenzialmente correlati all'*outcome*. Tali analisi hanno dimostrato un valore prognostico indipendente per il solo *score* IPSS, escludendo un ruolo primario per lo *score* RCO nella stratificazione prognostica dei pazienti. In linea con questi risultati, è stata dimostrata una forte associazione diretta tra *score* IPSS e *score* RCO, in base alla quale severe alterazioni stromali (*i.e.* RCO *high-grade*) erano significativamente associate a categorie di rischio IPSS intermedio/elevato (*score* IPSS Int-2/High). Nel complesso, tali risultati confermano la rilevanza dello *score* IPSS per la valutazione clinica dei pazienti con PMF/SMF e dimostrano che l'impatto prognostico dello *score* RCO dipende dalla sua stretta associazione con l'IPSS. La valutazione di uno *score* integrato IPSS/RCO ha tuttavia documentato una prognosi significativamente peggiore per i pazienti con alto IPSS/RCO *high-grade* rispetto a pazienti con dissociazione dei due *score*. Tale risultato suggerisce l'esistenza di un sottogruppo

di pazienti non facilmente identificabili con il solo IPSS, per i quali la valutazione RCO potrebbe avere un valore prognostico.

Per verificare questa ipotesi, si è quindi valutato l'impatto prognostico dello *score* RCO in pazienti con alto IPSS (categoria *Int-2/High*). Analisi focalizzate su questi casi hanno, in effetti, dimostrato curve di sopravvivenza peggiori per i pazienti con *score* RCO *high-grade*. Per quanto caratterizzati solamente da un *trend* di significatività statistica, tali risultati suggeriscono una possibile applicazione dello *score* RCO per la stratificazione prognostica di sottogruppi di PMF/SMF. Futuri studi su più ampie coorti di pazienti sono necessari per confermare questi dati preliminari.

I risultati del presente studio sono ampiamente in accordo con quanto riportato in letteratura sul valore clinico-prognostico delle alterazioni stromali midollari in corso di Mielofibrosi (53,57). La nostra analisi conferma in particolare un'associazione statisticamente rilevante tra specifiche caratteristiche clinico-laboratoristiche, IPSS e alterazioni stromali midollari, documentando anche una correlazione tra OS e *score* RCO. Diversamente da altri studi (53,57), la nostra analisi ha tuttavia dimostrato la non superiorità di *score* clinico-patologici integrati per la stratificazione prognostica dei pazienti con Mielofibrosi e, in particolare, l'assenza di valore prognostico indipendente per lo *score* RCO. Tali differenze sono attribuibili a vari fattori, tra cui: (i) l'eterogeneità delle coorti di studio; (ii) l'inclusione nella nostra coorte di casi di SMF (mai analizzati in precedenza); (iii) la diversa durata del *follow-up* e il limitato numero di eventi prognosticamente rilevanti registrati nei singoli studi; (iv) l'eterogeneità delle valutazioni statistiche. Riguardo quest'ultimo aspetto, è rilevante notare che nessuno degli studi pubblicati in letteratura ha in particolare condotto analisi multivariate per stimare l'impatto prognostico indipendente delle alterazioni stromali in corso di Mielofibrosi. È quindi possibile che parte delle discrepanze registrate tra gli studi siano risolvibili con analisi integrate volte a uniformare le singole casistiche.

Da un punto di vista clinico-assistenziale, i risultati del presente studio hanno rilevanti implicazioni pratiche. In primo luogo, la presenza di bassi *score* RCO (*i.e.* *score* RCO *low-grade*) in tutti i casi di PMF pre-fibrotica rende virtualmente inutile la valutazione sistematica delle fibre collagene e delle alterazioni ossee in questo sottogruppo di pazienti. Ai fini diagnostici e prognostici, la sola valutazione delle fibre reticoliniche potrebbe quindi essere sufficiente, evitando valutazioni

istologiche non contributive e reazioni istochimiche inutili. Allo stesso modo, l'assenza di un valore prognostico indipendente per lo *score* RCO nelle Mielofibrosi con *score* IPSS basso (categorie di rischio: *Low/Int-1*) suggerisce la valutazione delle alterazioni stromali midollari solo in specifici sottogruppi di pazienti (PMF/SMF con IPSS *Int-2/High*) o su indicazione clinica. Ciò contribuirebbe a un'ottimizzazione delle risorse e a una più razionale formulazione dei referti istologici.

In sintesi, la valutazione delle alterazioni stromali midollari in corso di Mielofibrosi correla con specifici parametri clinico-prognostici e può avere un valore clinico in alcuni sottogruppi di pazienti. L'applicazione sistematica dello *score* RCO è consigliabile per scopi di ricerca e/o per valutare la risposta midollare a determinate terapie.

6. CONCLUSIONI

Le alterazioni stromali midollari in corso di Mielofibrosi comprendono la deposizione di fibre reticoliniche, la deposizione di collagene e il rimaneggiamento delle trabecole ossee. La valutazione integrata di tali parametri (*score* RCO) correla con specifiche caratteristiche clinico-laboratoristiche e con lo *score* prognostico IPSS. Lo *score* RCO può inoltre contribuire alla stratificazione prognostica di specifici sottogruppi di pazienti (*i.e.* PMF/SMF con rischio IPSS *Int-2/High*). Ulteriori studi su più ampie coorti di pazienti sono necessari per confermare questi risultati preliminari.

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. Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L, et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*. 2014 Oct 16;124(16):2507–13.
3. Besses C, Cervantes F, Pereira A, Florensa L, Solé F, Hernández-Boluda JC, et al. Major vascular complications in essential thrombocythemia: a study of the predictive factors in a series of 148 patients [Internet]. Vol. 13, *Leukemia*. 1999. Available from: <http://www.stockton-press.co.uk/leu>
4. Spivak JL. Myeloproliferative Neoplasms. Longo DL, editor. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2017 Jun;376(22):2168–81. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMra1406186>
5. Quintás-Cardama A, Verstovsek S. Molecular pathways: JAK/STAT pathway: Mutations, inhibitors, and resistance. Vol. 19, *Clinical Cancer Research*. 2013. p. 1933–40.
6. Chang YC, Lin HC, Chiang YH, Chen CGS, Huang L, Wang WT, et al. Targeted next-generation sequencing identified novel mutations in triple-negative myeloproliferative neoplasms. *Medical Oncology*. 2017 May 1;34(5).
7. Cerquozzi S, Tefferi A. Blast transformation and fibrotic progression in polycythemia vera and essential thrombocythemia: A literature review of incidence and risk factors. Vol. 5, *Blood Cancer Journal*. Nature Publishing Group; 2015.
8. Sabattini E, Pizzi M, Agostinelli C, Bertuzzi C, Sacchetti CAS, Palandri F, et al. Progression in Ph-chromosome-negative myeloproliferative neoplasms: An overview on pathologic issues and molecular determinants. Vol. 13, *Cancers*. MDPI; 2021.
9. Lancman G, Brunner A, Hoffman R, Mascarenhas J, Hobbs G. Outcomes and predictors of survival in blast phase myeloproliferative neoplasms. *Leuk Res*. 2018 Jul 1;70:49–55.
10. Czader M, Orazi A. Acute myeloid leukemia and other types of disease progression in myeloproliferative neoplasms. Vol. 144, *American Journal of Clinical Pathology*. American Society of Clinical Pathologists; 2015. p. 188–206.
11. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: A consensus statement from the international

-
- working group for myelofibrosis research and treatment [6]. Vol. 22, *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2008. p. 437–8.
12. Mesa RA, Verstovsek S, Cervantes F, Barosi G, Reilly JT, Dupriez B, et al. Primary myelofibrosis (PMF), post polycythemia vera myelofibrosis (post-PV MF), post essential thrombocythemia myelofibrosis (post-ET MF), blast phase PMF (PMF-BP): Consensus on terminology by the international working group for myelofibrosis research and treatment (IWG-MRT). *Leuk Res*. 2007 Jun;31(6):737–40.
 13. Tefferi A. Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia. *New England Journal of Medicine*. 2000 Apr 27;342(17):1255–65.
 14. Altura RA, Head DR, Wang WC. Long-term survival of infants with idiopathic myelofibrosis. Vol. 109, *British Journal of Haematology*. 2000.
 15. Mughal TI, Vaddi K, Sarlis NJ, Verstovsek S. Myelofibrosis-associated complications: Pathogenesis, clinical manifestations, and effects on outcomes. *Int J Gen Med*. 2014 Jan 29;7:89–101.
 16. Passamonti F, Mora B, Barraco D, Maffioli M. Post-ET and Post-PV Myelofibrosis: Updates on a Distinct Prognosis from Primary Myelofibrosis. Vol. 13, *Current Hematologic Malignancy Reports*. Current Science Inc.; 2018. p. 173–82.
 17. Cervantes F, Dupriez B, Passamonti F, Vannucchi AM, Morra E, Reilly JT, et al. Improving survival trends in primary myelofibrosis: An international study. *Journal of Clinical Oncology*. 2012 Aug 20;30(24):2981–7.
 18. Guglielmelli P, Pacilli A, Rotunno G, Rumi E, Rosti V, Delaini F, et al. Presentation and outcome of patients with 2016 WHO diagnosis of prefibrotic and overt primary myelofibrosis Key Points. 2017; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/129/24/3227/1401167/blood761999.pdf>
 19. Akyol P, Yıldız A, Albayrak M, Öztürk HBA, Maral S, Aras MR, et al. Analysis of Demographic and Clinical Characteristics of Primary Myelofibrosis and Post-Polycythemia Vera/Essential Thrombocythemia Myelofibrosis Patients. *Gulhane Medical Journal*. 2021;63(2):117–22.
 20. Vener C, Novembrino C, Bamonti Catena F, Fracchiolla NS, Gianelli U, Savi F, et al. Oxidative stress is increased in primary and post-polycythemia vera myelofibrosis. *Exp Hematol*. 2010 Nov;38(11):1058–65.
 21. Barosi G, Viarengo G, Pecci A, Rosti V, Piaggio G, Marchetti M, et al. Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34 cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia [Internet]. 2001. Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/98/12/3249/1678624/h8230103249.pdf>

-
22. Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2021 Jan 1;96(1):145–62.
 23. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM, Elala Y, Hanson CA, Ketterling RP, et al. Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. *Blood Adv*. 2016 Dec 13;1(2):105–11.
 24. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, Biamonte F, Pardanani A, Pereira A, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2013 Sep;27(9):1861–9.
 25. Thiele J, Kvasnicka HM. Hematopathologic findings in chronic idiopathic myelofibrosis. *Semin Oncol*. 2005;32(4):380–94.
 26. Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, Franco V, van der Walt J, Orazi A. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. Vol. 90. 2005.
 27. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Vol. 127, *Blood*. American Society of Hematology; 2016. p. 2391–405.
 28. Kvasnicka HM, Beham-Schmid C, Bob R, Dirnhofer S, Hussein K, Kreipe H, et al. Problems and pitfalls in grading of bone marrow fibrosis, collagen deposition and osteosclerosis - a consensus-based study. *Histopathology*. 2016 May 1;68(6):905–15.
 29. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: Recommendations from an ad hoc international expert panel. Vol. 110, *Blood*. American Society of Hematology; 2007. p. 1092–7.
 30. Cervantes F, Pereira A, Esteve J, Rafel M, Cobo F, Rozman C, et al. Identification of “short-lived” and “long-lived” patients at presentation of idiopathic myelofibrosis.
 31. Dupriez B, Morel P, Demon JL, Lai JL, Simon M, Plantier I, et al. Prognostic Factors in Agnogenic Myeloid Metaplasia: A Report on 195 Cases With a New Scoring System.
 32. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International working group for myelofibrosis research and treatment. *Blood*. 2009 Mar 26;113(13):2895–901.
 33. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood* [Internet]. 2010;115:1703–8.

Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/115/9/1703/1326575/zh800910001703.pdf>

34. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS plus: A refined dynamic international prognostic scoring system for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *Journal of Clinical Oncology*. 2011 Feb 1;29(4):392–7.
35. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Mudireddy M, Mannarelli C, Nicolosi M, et al. JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol* [Internet]. 2017;36:310–8. Available from: <https://doi.org/10.1200/JCO.2017>.
36. Tefferi A, Finke CM, Lasho TL, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N, et al. MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. *Leukemia*. 2018 Oct 1;32(10):2274–8.
37. Tefferi A, Nicolosi M, Mudireddy M, Lasho TL, Gangat N, Begna KH, et al. Revised cytogenetic risk stratification in primary myelofibrosis: Analysis based on 1002 informative patients. *Leukemia*. 2018 May 1;32(5):1189–99.
38. Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, Mannelli F, Mudireddy M, Bartalucci N, et al. GIPSS: Genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis. *Leukemia*. 2018 Jul 1;32(7):1631–42.
39. Kröger NM, Deeg JH, Olavarria E, Niederwieser D, Bacigalupo A, Barbui T, et al. Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: A consensus process by an EBMT/ELN international working group. Vol. 29, *Leukemia*. Nature Publishing Group; 2015. p. 2126–33.
40. Kröger N, Thiele J, Zander A, Schwerdtfeger R, Kobbe G, Bornhäuser M, et al. Rapid regression of bone marrow fibrosis after dose-reduced allogeneic stem cell transplantation in patients with primary myelofibrosis. *Exp Hematol*. 2007 Nov;35(11):1719–22.
41. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European leukemiaNet. Vol. 29, *Journal of Clinical Oncology*. 2011. p. 761–70.
42. Tefferi A. New insights into the pathogenesis and drug treatment of myelofibrosis. *Curr Opin Hematol*. 2006 Mar;13(2):87–92.
43. Harrison CN, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Knoops L, et al. Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. *Leukemia*. 2016 Aug 1;30(8):1701–7.

-
44. Travlos GS. Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. *Toxicol Pathol.* 2006;34(5):548–65.
 45. Kuter DJ, Bain B, Mufti G, Bagg A, Hasserjian RP. Bone marrow fibrosis: Pathophysiology and clinical significance of increased bone marrow stromal fibres. Vol. 139, *British Journal of Haematology.* 2007. p. 351–62.
 46. Garmezzy B, Schaefer JK, Mercer J, Talpaz M. A provider's guide to primary myelofibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. Vol. 45, *Blood Reviews.* Churchill Livingstone; 2021.
 47. Tefferi A. Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Journal of Clinical Oncology.* 2005;23(33):8520–30.
 48. Schmitt A, Jouault H, Guichard J, Wendling F, Drouin A, Cramer EM. Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. 2000.
 49. Centurione L, di Baldassarre A, Zingariello M, Bosco D, Gatta V, Rana RA, et al. Increased and pathologic emperipolesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1low mice. *Blood.* 2004 Dec 1;104(12):3573–80.
 50. Chagraoui H, Komura E, Tulliez M, Giraudier S, Vainchenker W, Wendung F. Prominent role of TGF- β 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood.* 2002 Nov 15;100(10):3495–503.
 51. Kreipe H, Büsche G, Bock O, Hussein K. Myelofibrosis: molecular and cell biological aspects [Internet]. 2010. Available from: <http://www.fibrogenesis.com/content/5/S1/S2>.
 52. Bock O, Loch G, Schade U, Büsche G, von Wasielewski R, Wiese B, et al. Osteosclerosis in advanced chronic idiopathic myelofibrosis is associated with endothelial overexpression of osteoprotegerin. *Br J Haematol.* 2005 Jul;130(1):76–82.
 53. Thiele J, Kvasnicka HM. Grade of bone marrow fibrosis is associated with relevant hematological findings - A clinicopathological study on 865 patients with chronic idiopathic myelofibrosis. *Ann Hematol.* 2006 Apr;85(4):226–32.
 54. Vener C, Fracchiolla NS, Gianelli U, Calori R, Radaelli F, Iurlo A, et al. Prognostic implications of the European consensus for grading of bone marrow fibrosis in chronic idiopathic myelofibrosis. 2008; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/111/4/1862/1221339/zh800408001862.pdf>
 55. Guglielmelli P, Rotunno G, Pacilli A, Rumi E, Rosti V, Delaini F, et al. Prognostic impact of bone marrow fibrosis in primary myelofibrosis. A study of the AGIMM group on 490 patients. *Am J Hematol.* 2016 Sep 1;91(9):918–22.

-
56. Gianelli U, Vener C, Bossi A, Cortinovis I, Iurlo A, Fracchiolla NS, et al. The European Consensus on grading of bone marrow fibrosis allows a better prognostication of patients with primary myelofibrosis. *Modern Pathology*. 2012 Sep;25(9):1193–202.
 57. Gianelli U, Fiori S, Cattaneo D, Bossi A, Cortinovis I, Bonometti A, et al. Prognostic significance of a comprehensive histological evaluation of reticulin fibrosis, collagen deposition and osteosclerosis in primary myelofibrosis patients. *Histopathology*. 2017 Dec 1;71(6):897–908.
 58. Thiele J, Kvasnicka HM, Dietrich H, Stein G, Hann M, Kaminski A, et al. Dynamics of bone marrow changes in patients with chronic idiopathic myelofibrosis following allogenic stem cell transplantation. [cited 2022 Aug 17]; Available from: <http://www.hh.um.es>
 59. Tamari R, Mughal TI, Rondelli D, Hasserjian R, Gupta V, Odenike O, et al. Allo-SCT for myelofibrosis: Reversing the chronic phase in the JAK inhibitor era. Vol. 50, *Bone Marrow Transplantation*. Nature Publishing Group; 2015. p. 628–36.
 60. Quintás A, Quintás-Cardama Q, Abdel-Wahab O, Manshouri T, Kilpivaara O, Cortes J, et al. Molecular analysis of patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia receiving pegylated interferon α -2a. 2013; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>
 61. Stauffer Larsen T, Iversen KF, Hansen E, Mathiasen AB, Marcher C, Frederiksen M, et al. Long term molecular responses in a cohort of Danish patients with essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis treated with recombinant interferon alpha. *Leuk Res*. 2013 Sep;37(9):1041–5.
 62. Pizzi M, Silver RT, Barel A, Orazi A. Recombinant interferon- α in myelofibrosis reduces bone marrow fibrosis, improves its morphology and is associated with clinical response. *Modern Pathology*. 2015 Oct 3;28(10):1315–23.
 63. Kvasnicka HM, Thiele J, Bueso-Ramos CE, Sun W, Cortes J, Kantarjian HM, et al. Long-term effects of ruxolitinib versus best available therapy on bone marrow fibrosis in patients with myelofibrosis. *J Hematol Oncol*. 2018 Mar 15;11(1).
 64. Wilkins BS, Radia D, Woodley C, el Farhi S, Keohane C, Harrison CN. Resolution of bone marrow fibrosis in a patient receiving JAK1/JAK2 inhibitor treatment with ruxolitinib. *Haematologica*. 2013 Dec 1;98(12):1872–6.
 65. Kagoya Y, Yoshimi A, Tsuruta-Kishino T, Arai S, Satoh T, Akira S, et al. Regular Article MYELOID NEOPLASIA JAK2V617F 1 myeloproliferative neoplasm clones evoke paracrine DNA damage to adjacent normal cells through secretion of lipocalin-2. 2014; Available from: <http://ashpublications.org/blood/article-pdf/124/19/2996/1381193/2996.pdf>

