

UNIVERSITY OF MODENA AND REGGIO EMILIA

PhD Program of Clinical and Experimental Medicine (CEM)

XXXV Doctorate Cycle

Director of the PhD Program: Prof. Marco Vinceti

**IMPROVEMENT OF PROGNOSTIC SCORES IN
PRIMARY MYELOFIBROSIS**

**Supervisor:
Prof. Stefano Luminari**

**Candidate:
Domenico Penna**

INDICE

ABSTRACT.....	pag 6
ABSTRACT (ENGLISH VERSION).....	pag 8
CAPITOLO 1: Introduzione.....	pag 11
1. Malattie mieloproliferative croniche.....	pag 11
2. Malattie mieloproliferative JAK2 associate.....	pag 13
3. Mielofibrosi primaria.....	pag 15
a. L'epidemiologia.....	pag 15
b. Le basi molecolari.....	pag 16
c. La patogenesi.....	pag 20
d. Il ruolo dell'inflammatione cronica.....	pag 23
e. La storia naturale di malattia e il quadro clinico.....	pag 26
f. Diagnosi.....	pag 30
g. Prognosi e cause di morte.....	pag 31
h. Terapie.....	pag 32
i. Evoluzione del sistema di scoring.....	pag 42
CAPITOLO 2: Lo studio	pag 49
1. Ipotesi della ricerca e obiettivi.....	pag 49
2. Materiali e metodi.....	pag 51
3. Risultati.....	pag 53
4. Discussione.....	pag 63
CHAPTER 1: Introduction.....	pag 68
1. Chronic myeloproliferative diseases.....	pag 68
2. JAK2 associated myeloproliferative disorders.....	pag 70
3. Primary myelofibrosis.....	pag 72

a. The epidemiology.....	pag 72
b. The molecular basis.....	pag 73
c. The pathogenesis.....	pag 76
d. The role of chronic inflammation.....	pag 80
e. The natural history of disease and the clinical picture.....	pag 83
f. Diagnosis.....	pag 86
g. Prognosis and causes of death.....	pag 88
h. Therapies.....	pag 89
i. Evolution of the scoring system.....	pag 99
CHAPTER 2: The research.....	pag 106
5. Research hypotheses and objectives.....	pag 106
6. Materials and methods.....	pag 108
7. Results.....	pag 110
8. Discussion.....	pag 120
BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY.....	pag 125

ABSTRACT

La mielofibrosi primaria (PMF) è caratterizzata da un decorso eterogeneo in termini di carico di malattia e tempo di progressione. L'aspettativa di vita è, quindi, molto variabile, ed è necessario personalizzare l'approccio terapeutico. Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche è ancora l'unica modalità curativa, ma questa procedura è correlata a un alto tasso di morbilità e mortalità per complicanze post-trapianto. Dal 2009 sono stati creati diversi modelli prognostici per identificare gruppi di pazienti con diversa aspettativa di vita e guidare le scelte terapeutiche. Nonostante i recenti progressi nella diagnostica molecolare, gli scores prognostici più utilizzati nella pratica clinica includono variabili scarsamente standardizzate come la conta dei blasti circolanti e i sintomi costituzionali. Obiettivo di questo studio è stato verificare la possibilità di migliorare la performance degli scores prognostici pubblicati utilizzando parametri più oggettivi. A questo scopo abbiamo scelto di utilizzare la conta delle cellule CD34+ nel sangue periferico e l'indice di cachessia (cachexia index) recentemente proposti dal gruppo Mayo Clinic come markers alternativi di ridotta sopravvivenza.

Lo studio retrospettivo ha incluso 77 pazienti con diagnosi di PMF stabilita tra il 2004 e il 2022 e seguiti presso l'Ematologia di Reggio Emilia. La citometria a flusso a 8 colori è stata utilizzata per contare le cellule CD34 + circolanti. Il cachexia index è stato calcolato dopo aver determinato i livelli sierici di colesterolo e albumina alla diagnosi di ciascun paziente secondo la metodica utilizzata dal gruppo di Tefferi. Sono stati utilizzati metodi statistici standard per determinare differenze significative tra gruppi di variabili continue o nominali. L'analisi di sopravvivenza globale è stata condotta considerando il periodo dalla diagnosi alla data di morte (uncensored) o l'ultima visita di follow-up (censored). Un valore $P < 0,05$ è stato considerato significativo.

Lo studio ha innanzitutto evidenziato che il valore di cut-off di $15 \times 10^9/L$ cellule CD34+ circolanti, identificato in lavori precedenti come predittore della diagnosi di PMF, è anche un marker che ha un impatto negativo sulla prognosi. Inoltre, questo marker ha un potere predittivo maggiore rispetto alla determinazione morfologica della percentuale di blasti circolanti. In secondo luogo, il cachexia index è stato validato su una coorte esterna, confermando il suo valore come indice prognostico. In particolare, la classe di alto-rischio ha un potere predittivo più significativo della presenza dei sintomi costituzionali nel predire una ridotta sopravvivenza. Infine, è stato effettuato un confronto tra gli scores di rischio classici e quelli modificati integrando le nuove variabili, evidenziando la

superiorità di questi ultimi.

Pertanto, i nostri dati mostrano l'importanza di valutare la conta delle cellule CD34+ circolanti sul sangue periferico e la classe di rischio in base al cachexia index nei pazienti con PMF al momento della diagnosi. L'incorporazione delle informazioni relative a questi due dati potrebbe, infatti, non solo aiutare a standardizzare ulteriormente gli scores di rischio prognostico nella PMF, ma anche perfezionarli aumentando il loro potere predittivo. Questo studio è, ovviamente, preliminare e richiederà un'ulteriore convalida su una popolazione esterna più ampia. Inoltre, è attualmente in corso l'analisi di dati di biologia molecolare esaminati mediante metodica NGS per valutare se anche i più moderni punteggi prognostici possano trarre vantaggio dall'integrazione di tali dati.

ABSTRACT (ENGLISH VERSION)

A heterogeneous course characterizes primary myelofibrosis (PMF) in terms of disease burden and time to progression. Life expectancy is, therefore, very variable, and there is a need to customize the therapeutic approach. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is still the only curative modality, but this procedure is related to a high morbidity and mortality rate from post-transplant complications. Since 2009, several prognostic models have been created to identify groups of patients with different life expectancies and guide therapeutic choices. Despite recent advances in molecular diagnostics, the prognostic scores most used in clinical practice include poorly standardized variables such as circulating blast counts and constitutional symptoms. This study aimed to verify whether it was possible to improve the performance of the current prognostic scores using more objective parameters. We have chosen to use the CD34 + cell count in peripheral blood and the cachexia index recently proposed by the Mayo Clinic group as alternative markers of reduced survival.

The retrospective study included 77 patients with a diagnosis of PMF performed between 2004 and 2022 and followed up at the Hematology of Reggio Emilia. 8-color flow cytometry was used to count circulating CD34 + cells. The cachexia index was calculated after having determined the serum levels of cholesterol and albumin at each patient's diagnosis according to the method used by Tefferi's group. Standard statistical methods were used to determine significative differences between groups of continuous or nominal variables. The overall survival analysis was conducted considering the period from diagnosis to the date of death (uncensored) or the last follow-up visit (censored). A P-value <0.05 was considered to be significant.

The study first highlighted that the cut-off value of $15 \times 10^9 / L$ circulating CD34 + cells, identified in previous works as a predictor of PMF diagnosis, is also a marker that negatively impacts prognosis. Furthermore, this marker has greater predictive power than determining the circulating blast rate. Secondly, the cachexia index was validated on an external cohort, confirming that it can effectively predict survival. In particular, the high-risk class has a predictive power which is more significant than the presence of constitutional symptoms for predicting reduced survival. Finally, a comparison was made between the classic risk scores and those modified by integrating the new variables, highlighting the latter's superiority.

Therefore, our data shows the importance of assessing the circulating CD34+ cell count

on peripheral blood and the risk class according to the cachexia index in patients with PMF at the time of diagnosis. The incorporation of information relating to these two data could, in fact, not only help to further standardize the prognostic risk scores in PMF but also refine them by increasing their predictive power. This study is, of course, preliminary and will require further validation on a larger external population. Furthermore, the NGS data analysis is currently underway to see if even the most modern prognostic scores can benefit from the integration of such data.

CAPITOLO 1

Introduzione

1– Malattie mieloproliferative croniche

Il concetto di "disordini mieloproliferativi" fu introdotto da William Dameshek in un editoriale del 1951 su Blood. [1] Questo gruppo di malattie era caratterizzato dall'eccessiva presenza di cellule mature nel sangue periferico e dall'iperproliferazione di multiple linee cellulari nel midollo osseo. Queste due caratteristiche principali erano talvolta associate anche a epatosplenomegalia, fibrosi del midollo osseo e progressione leucemica. Dameshek propose il termine "disordini mieloproliferativi" per indicare che queste entità avrebbero potuto rappresentare un continuum di sindromi correlate.



Immagine 1 – William Dameshek.

Tuttavia, il concetto di “neoplasie mieloproliferative” (MPN) è stato introdotto solo nel 2008 per sottolineare la natura clonale di queste patologie legate alla proliferazione incontrollata delle progenitrici staminali mieloidi. [2] Nel tempo, la classificazione patogenetica si è arricchita. Al giorno d’oggi, sono riconosciuti sette gruppi principali di patologia in base a specifiche caratteristiche genetiche, morfologiche e cliniche (Tabella 1). [3]

Malattie mieloproliferative croniche - WHO (2016)	
1 - Leucemia mieloide cronica, <i>BCR/ABL</i> positiva (CML)	
2 - Policitemia vera (PV)	
3 - Trombocitemia essenziale (ET)	
4 - Mielofibrosi primaria (PMF)	a. in stadio prefibrotico (early stage) b. in stadio fibrotico conclamato
5 - Leucemia eosinofila cronica non altrimenti specificata (CEL, NOS)	
6 - Leucemia cronica a neutrofili (CNL)	
7 - Malattia mieloproliferativa cronica non classificabile (MPN-U)	

Tabella 1 – Classificazione delle malattie mieloproliferative croniche, WHO 2016.

Tra queste malattie, grazie alle specifiche caratteristiche citogenetiche descritte da Nowell e Hungeford nel 1960 a Philadelphia, fu presto possibile isolare la leucemia mieloide cronica. [4] Questa patologia è infatti distinta dalle altre per la presenza della traslocazione cromosomica tra il gene Abelson (ABL) posto sul cromosoma 9 e la regione del cluster breakpoint (BCR - breakpoint cluster region) sita nel cromosoma 22. La formazione del cosiddetto “cromosoma Philadelphia” stimola la proliferazione leucemica producendo una chinasi costitutivamente attiva sui mieloblasti.

Contrariamente alla leucemia mieloide cronica, i restanti disordini mieloproliferativi sono stati storicamente denominati “Philadelphia-negativi”. Sebbene, i “disordini mieloproliferativi Philadelphia-negativi” compendano entità estremamente differnti l’una dall’altra, è stato presto possibile raggrupparne alcune in un’unica famiglia in base alle caratteristiche epidemiologiche e cliniche. Il sottogruppo delle "malattie mieloproliferative croniche Philadelphia-negative classiche" comprende policitemia vera (PV), trombocitemia essenziale (ET) e mielofibrosi primaria (PMF). Queste patologie, sebbene caratterizzate da comuni tratti distintivi, sono per lungo tempo rimaste orfane di una eziologia comune. La base genetica unificante è infatti emersa solo nel 2005 con la scoperta della mutazione JAK2 V617F presente, con diversa frequenza, in tutte e tre le patologie. [5-9] Per questo motivo è oggi possibile fare riferimento a questo gruppo di patologie anche con il termine di "malattie mieloproliferative JAK2 associate".

2 – Malattie mieloproliferative JAK2 associate

Le malattie mieloproliferative JAK2 associate sono neoplasie rare (incidenza di circa 6 persone ogni 100.000 all'anno) che coinvolgono prevalentemente pazienti di mezza età o anziani. [10, 11] Come riportato in Tabella 2, la classificazione nosologica in tre entità separate è ancora oggi di fondamentale importanza a livello prognostico. Sebbene tutte e tre le patologie comportino infatti un'aspettativa di vita media inferiore a quella della popolazione generale, il tasso di sopravvivenza diminuisce, passando da ET a PV e da quest'ultima a PMF. [12, 13]

	Clinical and morphological features	Driver genes	Relationships between genotype, phenotype, and clinical outcome
PV	Erythrocytosis frequently combined with thrombocytosis and/or leukocytosis (that is, polycythemia) and typically associated with suppressed endogenous erythropoietin production. Bone marrow hypercellularity for age with trilineage growth (that is, panmyelosis)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>JAK2</i> (V617F) in about 96% of patients • <i>JAK2</i> exon 12 mutations in about 4% of patients (isolated erythrocytosis in most of these patients) • Patients with wild-type <i>JAK2</i> extremely rare, if any 	<ul style="list-style-type: none"> • PV patients are at increased risk of thrombosis • PV may progress to myelofibrosis and less commonly to a blast phase similar to AML, sometimes preceded by a myelodysplastic phase
ET	Thrombocytosis. Normocellular bone marrow with proliferation of enlarged megakaryocytes	<ul style="list-style-type: none"> • <i>JAK2</i> (V617F) in 60%-65% of patients • <i>CALR</i> exon 9 indels in 20%-25% of patients • <i>MPL</i> exon 10 mutations* in about 4%-5% of patients • Noncanonical <i>MPL</i> mutations *in <1% of patients • About 10% of patients do not carry any of the above somatic mutations (the so-called triple-negative cases) 	<ul style="list-style-type: none"> • ET involves increased risk of thrombosis and bleeding, and may progress to more aggressive myeloid neoplasms • <i>JAK2</i> (V617F)-mutant ET involves a high risk of thrombosis, and may progress to PV or myelofibrosis • <i>CALR</i>-mutant ET involves lower risk of thrombosis and higher risk of progression to myelofibrosis • Triple-negative ET is an indolent disease with low incidence of vascular events
PMF	<u>Prefibrotic PMF</u> <ul style="list-style-type: none"> • Various abnormalities of peripheral blood • Granulocytic and megakaryocytic proliferation in the bone marrow with lack of reticulin fibrosis 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>JAK2</i> (V617F) in 60%-65% of patients • <i>CALR</i> exon 9 indels in 25%-30% of patients • <i>MPL</i> exon 10 mutations* in about 4%-5% of patients • Noncanonical <i>MPL</i> mutations *in <1% of patients • About 5%-10% of patients do not carry any of the above somatic mutations (the so-called triple-negative cases) 	<ul style="list-style-type: none"> • PMF is associated with the greatest symptom burden and the worst prognosis within MPNs, with a variable risk of progression to AML • <i>CALR</i>-mutant PMF is associated with longer survival compared with other genotypes • <i>JAK2</i> (V617F)- and <i>MPL</i>-mutant PMF have worse prognosis than <i>CALR</i>-mutant PMF • Triple-negative PMF is an aggressive myeloid neoplasm characterized by prominent myelodysplastic features and high risk of leukemic evolution
	<u>Overt PMF</u> <ul style="list-style-type: none"> • Various abnormalities of peripheral blood. Bone marrow megakaryocytic proliferation with atypia, accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis grades 2/3. Abnormal stem cell trafficking with myeloid metaplasia (extramedullary hematopoiesis in the liver and/or the spleen) 		

Tabella 2 – Malattie mieloproliferative JAK2 associate: caratteristiche cliniche, morfologiche e molecolari.

Nell'ultimo decennio, una migliore comprensione delle basi genetico-molecolari di queste patologie ha notevolmente facilitato la diagnosi e il trattamento. In particolare, oltre alla già citata mutazione JAK2 V617F, è stato chiarito il ruolo delle mutazioni MPL associate all'insorgenza di ET e PMF, delle mutazioni dell'esone 12 di JAK2 associate all'insorgenza di PV e, infine, delle mutazioni di CALR associate all'insorgenza di ET e PMF. [14-17]

Tuttavia, nonostante le nuove conoscenze derivanti dalla biologia molecolare il corretto inquadramento diagnostico di queste patologie è ancora oggi difficile a causa della mancanza di specifiche alterazioni citogenetiche e della frequente sovrapposizione dei quadri clinici di esordio. La diagnosi differenziale si pone con le neoplasie mieloproliferative (comprese le forme meno comuni), le sindromi mielodisplastiche e le forme reattive. [18] Di seguito è riportato un riepilogo delle principali caratteristiche dei disordini mieloproliferativi associati a JAK2. [19]

3 – Mielofibrosi primaria

La PMF è una malattia appartenente al gruppo delle malattie mieloproliferative JAK2 associate. Fu descritta per la prima volta da Gustav Heuck nel 1879. Il chirurgo tedesco descrisse due casi di osteosclerosi con associata epatosplenomegalia. I pazienti presentavano anche anemia, eritrociti nucleati e leucocitosi con leucociti atipici. [20] Heuck fu, quindi, il primo a evidenziare il processo fibrotico sottolineando la differenza tra leucemia mieloide cronica e PMF.

Il nome mielofibrosi primaria evidenzia le due caratteristiche fondamentali di questa patologia: da un lato, il processo fibrotico cronico a cui sono sottoposti questi pazienti, e dall'altro, come questo processo non sia secondario ad un'altra condizione. In particolare, in accordo a quanto raccomandato dalla revisione delle linee guida internazionali del 2016, per il corretto inquadramento diagnostico, bisogna escludere che tale fibrosi rappresenti l'esito di un'altra malattia mieloproliferativa (mielofibrosi secondaria). [21]

L'epidemiologia

Non ci sono dati validati sulla fase prefibrotica; pertanto, tutti i dati epidemiologici si riferiscono a PMF in fase fibrotica. Per quanto riguarda l'incidenza, diversi studi hanno documentato un'incidenza annua compresa tra 0,22 e 0,99 casi per 100.000 abitanti, con un'incidenza complessiva di 0,47 casi per 100.000 abitanti per anno. [22] La patologia è prevalente nei pazienti di sesso maschile e nel paziente anziano. In particolare, un'ampia casistica di pazienti seguiti presso la Mayo Clinic riporta una età media alla diagnosi di circa 67 anni, con un rapporto maschi-femmine di 1,6. In tale casistica solo il 2% ha ricevuto una diagnosi prima dei 30 anni. [23] Una maggiore incidenza di PMF è stata poi registrata nelle persone di discendenza ebraica ashkenazita. [24]

Per quanto riguarda i fattori predisponenti, considerando la ricorrenza di malattie mieloproliferative in alcune famiglie, è stata indagata una possibile predisposizione genetica. [25] Questa predisposizione è stata confermata con l'identificazione di soggetti portatori di un particolare aplotipo JAK2 (chiamato "46/1" o "GGCC") che è associato ad un'aumentata incidenza di MPN. [26] I portatori di questa variante genetica (24% della popolazione europea) hanno un rischio circa 3-4 volte maggiore di sviluppare MPN. Dal punto di vista dei fattori di rischio ambientale, non sono state documentate associazioni significative con il PMF, sebbene siano state suggerite correlazioni con radiazioni, benzene e solventi industriali. [27-29]

Le basi molecolari

La PMF è caratterizzata da proliferazione incontrollata di precursori delle serie granulopoietica e piastrinopoietica a livello del midollo osseo. In particolare, il clone megacariocitario giocherebbe un ruolo preminente nell'instaurarsi del quadro fibrotico caratteristico di questa patologia, rilasciando gli stimoli fibrogenici alla base dell'aumento del deposito di fibre nel microambiente midollare. [30-32]

Il primo evento a determinare l'insorgenza della malattia mieloproliferativa è, quindi, un evento mutazionale "driver", in grado di determinare la comparsa di tale clone neoplastico.

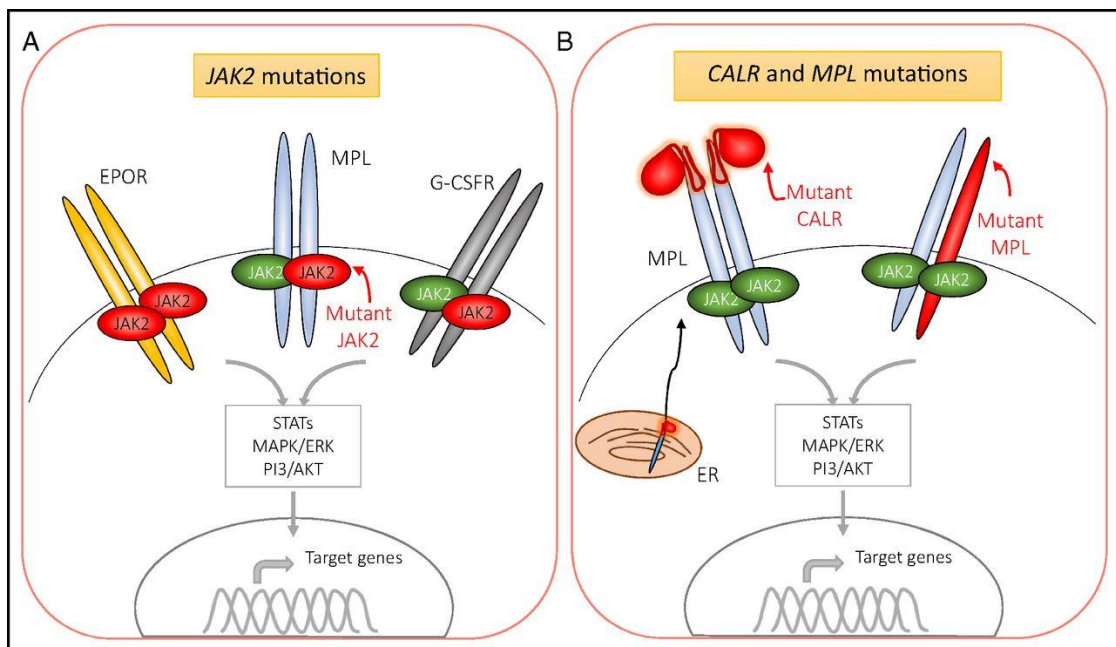


Figura 2 – Le mutazioni di JAK2, CALR e MPL comportano un'eccessiva mieloproliferazione attivando costituzionalmente la via di segnalazione di JAK-STAT

Come mostrato nella Figura 2, nello sviluppo della PMF, sono in particolare coinvolte tre mutazioni "driver" (generalmente mutualmente esclusive). Le mutazioni a carico dei geni JAK2 (Janus chinasi 2; localizzato sul cromosoma 9p24), CALR (calreticulina; localizzato sul cromosoma 19p13.2) e MPL (virus della leucemia mieloproliferativa; localizzato sul cromosoma 1p34) portano infatti all'attivazione costituzionale della via di segnalazione JAK-STAT rendendo il clone neoplastico indipendente dall'azione dei fattori di crescita. [33] Queste lesioni molecolari sono state identificate negli ultimi vent'anni grazie alla disponibilità di indagini di biologia molecolare sempre più approfondite.

Nel 2005, 4 gruppi di ricercatori indipendenti hanno identificato la presenza della mutazione puntiforme V617F nel gene JAK2, localizzato sul braccio corto del cromosoma 9. [6-8, 34] La mutazione insorge spontaneamente in una cellula staminale pluripotente. Tuttavia, colpisce solo le cellule mieloidi con recettori per eritropoietina, G-CSF e trombopoietina. La proteina Jak2 è, infatti, solitamente presente in forma inattiva sulla porzione intracitoplasmatica di questi recettori. La stimolazione da parte dei rispettivi ligandi determina normalmente la dimerizzazione della proteina Jak2 e l'attivazione di diverse vie di trasduzione del segnale intracellulare (STAT3/5, MAPK, PI3K), con conseguente induzione della proliferazione, differenziazione e sopravvivenza cellulare. [35] La mutazione V617F provoca una riduzione della capacità della proteina Jak2 di inattivarsi e, di conseguenza, un aumento della trasduzione del segnale e un maggior grado di proliferazione. [36-37]

Nel 2006 sono state poi identificate mutazioni attivanti a carico del codone 515 (W515L, W515K) e, più raramente, del codone 505 (S505N) del gene MPL. [38] Tale gene codifica per il recettore della trombopoietina, che normalmente promuove la proliferazione dei megacariociti e svolge un ruolo nel mantenimento delle cellule staminali ematopoietiche all'interno del midollo osseo attraverso le stesse vie di trasduzione del segnale attivate da JAK2. Le mutazioni MPL rendono il recettore della trombopoietina costitutivamente attivo. Il conseguente aumento del drive proliferativo è simile a quello causato dalla mutazione JAK2 V617F.

Infine, nel 2013, grazie a più sofisticate tecniche di sequenziamento genetico, sono state identificate inserzioni e delezioni ricorrenti nell'esone 9 del gene CALR, codificante per la proteina calreticulina. [16-17] La calreticulina è una proteina localizzata nel reticolo endoplasmatico ed è principalmente coinvolta nel ripiegamento delle glicoproteine di nuova sintesi e nell'omeostasi del calcio. Tutte le mutazioni osservate provocano uno spostamento del codice di lettura (frameshift), che si traduce nella produzione di una proteina neomorfica con una porzione C-terminale diversa. Si pensa che queste proteine mutate attivino direttamente o indirettamente il recettore della trombopoietina portando, anche in questo caso, all'attivazione delle vie di trasduzione del segnale (STAT3/5, MAPK, PI3K) con conseguente proliferazione cellulare. [39-42]

Come riportato in figura 3, le mutazioni sopra elencate sono dunque responsabili dell'insorgenza della maggior parte delle PMF. In particolare, la mutazione JAK2 è presente nel 50-60% dei casi, inserzioni o delezioni del gene CALR si riscontrano nel 20-25% dei casi e mutazioni del gene MPL sono rilevabili nel 6-7% dei casi. [43] In circa il

10-15% dei casi, tuttavia, è impossibile identificare qualsiasi lesione genetica. Questo sottogruppo di pazienti viene definito "triplo negativo". [12, 44] Sembra opportuno sottolineare che la semplice acquisizione di una di queste mutazioni non porta necessariamente all'espansione clonale poiché questo ulteriore passaggio richiede un microambiente permissivo all'interno del quale la cellula possa trovare un vantaggio evolutivo. [43]

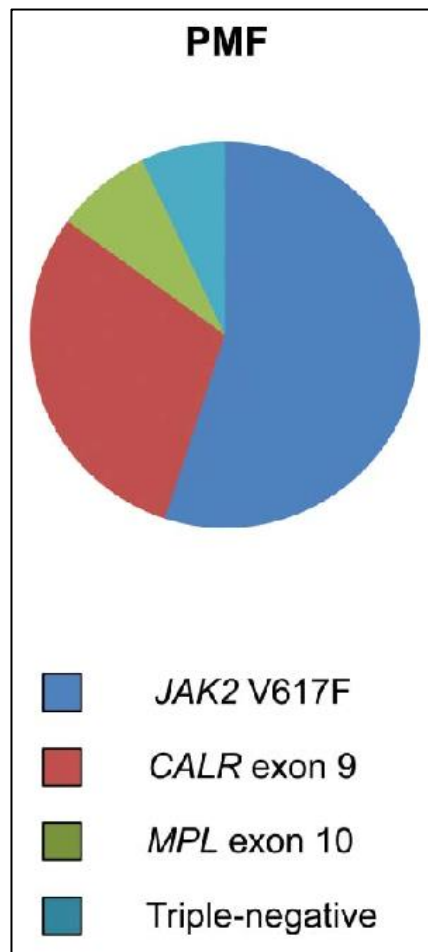


Figura 3 – Frequenza delle mutazioni "driver" in Mielofibrosi Primaria

Lo stato mutazionale "driver" influenza il fenotipo della malattia e la prognosi del paziente. [45-47] Come mostrato nella tabella 3, la presenza della mutazione CALR di tipo 1 ha un impatto significativo sulla sopravvivenza globale con una maggiore aspettativa di vita.

Mutation	Mutational frequency	Phenotypic implications	Prognostic implications
JAK2V617F	50–60%	Older age Higher hemoglobin level Higher WBC count Lower PLT count Highly thrombophilic	Compared with CALR+, MPL+, and triple-negative cohorts: Intermediate overall survival [6]
CALR	20–25% overall Up to 74% cases of JAK2/MPL unmutated [5*]	Compared with JAK2V617F+: Less thrombophilic [26*]	Compared with JAK2V617F+ and triple-negative cohorts (type 1/2 variants confounded): Lower DIPPS plus scores [5*] Lower rates leukemic transformation [6,37] Superior overall survival [5*]
CALR type 1/like Exon 9, 52-bp deletion	~70% of CALR mutations	Compared with JAK2V617F+: Younger age Less frequent anemia Less frequent leukocytosis Higher PLT count [28,36]	Compared with JAK2V617F/CALR type 2/MPL-mutated or triple-negative: Superior overall survival [50]
CALR type 2/like Exon 9, 5-bp insertion	~15% of CALR mutations	Compared with CALR type 1+: Higher WBC count Higher circulating blast% [28,36]	Compared with CALR type 1+: Higher DIPPS plus scores Inferior overall survival [6,36]
MPL Predominantly MPLW515L and W515K	6–7%	Compared with JAK2V617F+: Less thrombophilic	Compared with JAK2V617F+, CALR+ and triple-negative cohorts: Intermediate overall survival [6]
Triple-negative	10–15%	Older age Lower hemoglobin level Lower WBC count Lower PLT count [26*,39] Compared with JAK2V617F+: Less thrombophilic	Compared with JAK2V617F/CALR/MPL+ cohorts: Higher IPSS scores [26*,39] Higher rates leukemic transformation and inferior overall survival [5*,6,50]

Tabella 3 – Mutazioni driver nella mielofibrosi e loro implicazioni

La prognosi può inoltre essere influenzata da alterazioni cariotipiche e dall'insorgenza di mutazioni “aggiuntive” che coinvolgono geni implicati nel controllo epigenetico del DNA e nello splicing del messaggero dell'RNA.

Le anomalie cromosomiche, sebbene non specifiche, sono comuni nei pazienti con PMF. Queste alterazioni possono influenzare il decorso della malattia e avere un diverso impatto prognostico. La più recente classificazione del rischio citogenetico classifica i cariotipi come favorevoli, sfavorevoli e ad altissimo rischio (VHR) in base all'impatto sulla sopravvivenza. [48]

Un altro fattore prognostico importante è la presenza di mutazioni “aggiuntive”. Queste lesioni molecolari, rilevabili anche in altre patologie mieloidi, sono infatti in grado sia di influenzare il fenotipo della malattia, sia di aumentare significativamente l'instabilità genetica e il rischio di evoluzione leucemica. [49] In particolare, le mutazioni con impatto prognostico avverso meglio caratterizzate sono IDH 1/2, EZH2, SRSF2, ASXL1 e U2AF1 Q157. [49-52] Queste mutazioni, di particolare importanza clinica, sono associate a una prognosi infausta. [53]

Va infine ricordato che l'evoluzione clonale in questa patologia è un processo complesso e articolato senza una chiara gerarchia. [54] Le mutazioni “driver”, le alterazioni citogenetiche e le mutazioni “aggiuntive” possono apparire in nessun ordine particolare in qualsiasi momento. Lo stesso fenotipo clinico della malattia e il rischio di progressione leucemica possono derivare da diverse combinazioni di lesioni molecolari sottostanti.

La patogenesi

Quando l'evento mutazionale comporta un vantaggio di sopravvivenza per il clone megacariocitario si innesca il processo di proliferazione cellulare e rilascio citochinico che determina il fenotipo di malattia. Come anticipato nel paragrafo precedente, il processo clonale, è evidenziabile per la presenza dei markers genetici di clonalità su tutta la linea mieloide (eritrociti, granulociti e megacariociti) sebbene le cellule maggiormente coinvolte siano i megacariociti, che mostrano le classiche atipie citologiche a livello midollare. Megacariociti, piastrine e monociti clonali sono responsabili del rilascio di numerosi fattori di crescita in grado non solo di innescare il progressivo processo di fibrosi midollare, ma anche di influire su ematopoiesi extramidollare e sintomatologia costituzionale.

In particolare, per quanto riguarda la fibrosi midollare in tabella 4 è riportato un elenco dei principali fattori di crescita coinvolti con il relativo meccanismo di azione, le evidenze in modelli animali e su campioni di pazienti con MPN. [55]

Soluble factor	Mechanism of action	Evidences from mice models	Patient specimens
TGF-β	<ul style="list-style-type: none"> - Increases the synthesis of types I, III and IV collagen, FN, proteoglycans and tenascin in stromal cells. - Down-regulation of metalloproteinases (MMPs) and up-regulation of tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMP). - Favor Endothelial Mesenchymal Transition (EndMT). 	<ul style="list-style-type: none"> - Significantly increased in the extracellular fluid of the BM, plasma and platelet extracts in the TPO^{high} and the GATA-1^{low} mice. - Homozygous TGF-β1 null mice are protected from reticulin deposition after TPO overexpression. 	<ul style="list-style-type: none"> - Quantitative alterations of TGF-β and its receptors in Mk, platelets, and CD34+ progenitor cells from MPN patients. - Aberrant TGF-β signaling in BM and spleen of PMF patients.
PDGF	<ul style="list-style-type: none"> - Enhances the replication, survival, and migration of myofibroblasts but also modulates the production and release of several pro- and anti-inflammatory mediators. 	<ul style="list-style-type: none"> - Conditional deletion of the PDGFR-α gene and inhibition of PDGFR-α by imatinib in leptin receptor+ stromal cells suppress their expansion and ameliorate BM fibrosis in mice 	<ul style="list-style-type: none"> - Increased levels of PDGF in plasma and urine from patients with MPNs - Up regulation of PDGFRs and PDGF in BM biopsies of PMF patients.
FGF	<ul style="list-style-type: none"> Basic FGF is a potent angiogenic factor (Folkman & Klagsbrun, 1987); moreover, it is a mitogen for human bone marrow stromal cells Basic FGF is a potent angiogenic factor (Folkman & Klagsbrun, 1987); moreover, it is a mitogen for human bone marrow stromal cells - Sustains angiogenesis and is a potent mitogen factor for stromal cells. 	N/A	<ul style="list-style-type: none"> - Increased expression in circulating Mks and platelets of PMF patients.

VEGF	- Angiogenic factor	N/A	- Significantly higher level of VEGF in plasma samples of MPN patients.
THBS	- Anti-angiogenic factor - TGF- β activator	- Tsp-1-null/TPO ^{high} mice develop a myeloproliferative syndrome with higher grade compared to wild type mice.	- Significantly overexpressed in BM biopsies of PMF patients when compared to controls.
PF4	- Induce activation and migration of myofibroblasts	N/A	- No correlation between BM fibrosis and plasma levels or the platelet content of CXCL4 in MPN patients.
MIP 1α and 1β	- Pro-inflammatory chemokines	- Increased levels in Mks of NBEAL2 ^{-/-} , a GPS mouse model which display BM fibrosis.	- Increased in plasma samples of PMF patients.
IL-8	- Stimulates neutrophil chemotaxis - Sustains neo-angiogenesis - Negative regulator of Mk proliferation	N/A	- IL-8 level is strongly increased in the serum and plasma of patients with PMF
LCN2	- LCN2 generates increased reactive oxygen species, leading to increased DNA strand breaks and apoptosis of normal, but not PMF, CD34(+) cells. - Increases generation of osteoblasts and fibroblasts, but not adipocytes, from mesenchymal stem cells.	N/A	- Increased in plasma samples of PMF patients.
Spp1	- SPP1 promotes fibroblasts and mesenchymal stromal cells proliferation and collagen production	N/A	- SPP1 plasma levels are significantly higher in PMF compared with ET and PV patients. - Higher SPP1 plasma levels in PMF patients correlate with a more severe fibrosis degree and a shorter overall survival
BMPs	- BMP-1 is an activator of latent TGF- β and processor of collagen precursors.	N/A	- Expression of BMP1, BMP6, BMP7, and BMP-receptor 2 are significantly increased in advanced stages of myelofibrosis compared with controls
OSM	- Stimulates growth of fibroblasts and microvascular endothelial cells and induces the production of angiogenic and profibrogenic cytokines (HGF, VEGF, and SDF-1) in BM fibroblasts.	N/A	- OSM mRNA levels are increased in the BM of patients with MPNs compared to control patients

Tabella 4 – Lista di citochine megacariocitarie implicate nell'evoluzione del processo fibrotico

I fibroblasti non clonali presenti nello spazio midollare reagiscono a tali stimoli con incremento della proliferazione cellulare e della deposizione di fibre collagene determinando il progressivo sovvertimento della normale architettura midollare. Alcune citochine come FGF e VEGF sono inoltre capaci di indurre processi di neoangiogenesi che determinano infine un'ulteriore alterazione di tale spazio. [56] Il risultato finale di questo processo è il progressivo danneggiamento della nicchia ematopoietica midollare con conseguente difficoltà di produzione di globuli rossi, leucociti e piastrine maturi e immissione in circolo di elementi immaturi.

La progressiva distorsione del microambiente midollare e gli alterati livelli citochinici sono anche alla base del processo di ematopoiesi extramidollare. Infatti, a causa del danneggiamento della nicchia ematopoietica il clone mutato non va incontro solo ad espansione clonale midollare, ma anche ad un processo di migrazione dal midollo osseo (egressione) e di attecchimento in sedi extramidollari (metaplasia mieloide). Come mostrato in figura 4, a livello citochinico tale processo è sostenuto dalla riduzione dei livelli di GATA1, e dalla iperstimolazione della via di segnalazione CXCL12/CXCR4. [57] Il quadro di metaplasia mieloide è in particolare favorito dalla presenza di elevati livelli di TNF-alpha, HGF, MIG e IL-1RA, che vengono secreti da parte dei cloni mutati. I siti extramidollari maggiormente interessati sono fegato e milza (metaplasia mieloide epatosplenica), mentre in rari casi possono essere coinvolti altri organi o tessuti (metaplasia mieloide non epatosplenica). A livello clinico i pazienti con metaplasia mieloide in genere sono dunque caratterizzati da presenza di epato-splenomegalia.

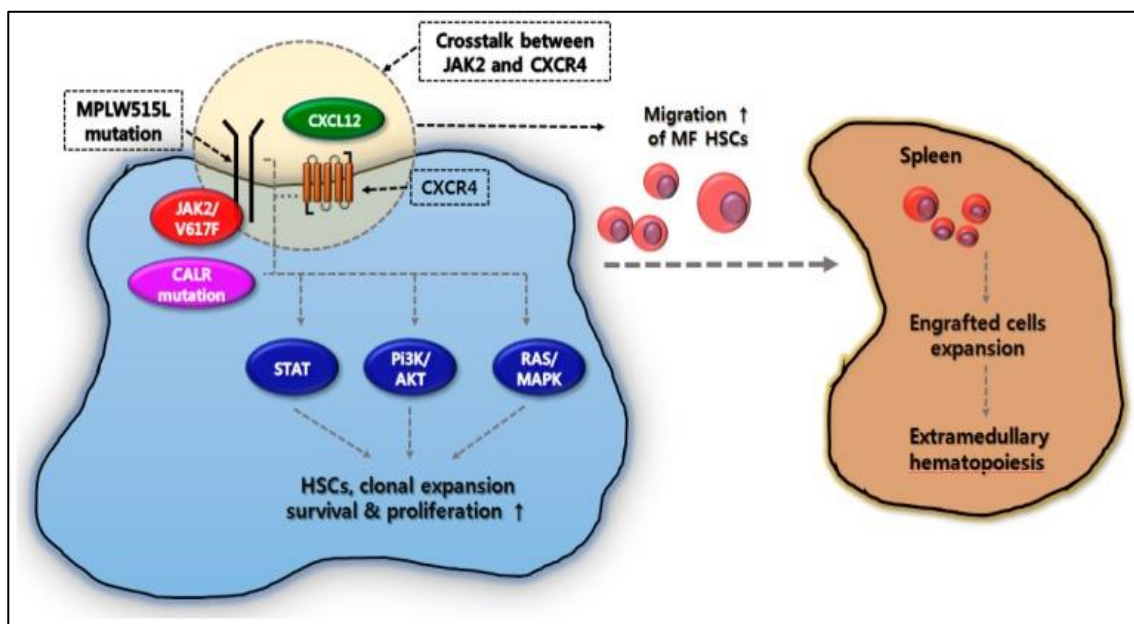


Figura 4 – Ematopoiesi extramidollare a livello splenico nella mielofibrosi.

La deregolazione dei livelli citochinici è infine anche all'origine del complesso di sintomi costituzionali che caratterizzano la malattia. [58-59] Tale sintomatologia è molto eterogenea e può includere con differente intensità e frequenza spossatezza, depressione o ansia, sazietà precoce, calo ponderale, difficoltà di concentrazione, prurito, disfunzioni sessuali, sudorazioni notturne, algie ossee e febbre. La presenza di tali sintomi nel paziente affetto da PMF è quindi un marcatore indiretto di deregolazione citochinica e quindi di attività della malattia.

Il ruolo dell'infiammazione cronica

Come evidenziato nel paragrafo precedente la deregolazione citochinica indotta dal clone mutato è uno dei processi chiave per l'instaurarsi della PMF. Tale deregolazione non si limita però a influenzare soltanto fibrosi, metaplasia mieloide e sintomatologia, ma è un fenomeno più complesso. Nei pazienti con PMF, infatti, è stato osservato l'incremento significativo di diverse citochine proinfiammatorie (TNF- α , IL6, IL-8). È stata dunque ipotizzata una interazione tra stato infiammatorio cronico e PMF. In particolare, si è ipotizzato che la deregolazione citochinica potesse impattare significativamente su rischio di progressione leucemica e rischio trombotico. [60-71]

Per quanto riguarda il processo di evoluzione leucemica Hans C. Hasselbalch in un articolo del 2013 (Figura 5) propose un modello basato sul processo di infiammazione cronica non solo come elemento alla base dell'evoluzione clonale, ma come elemento comune tra le diverse malattie mieloproliferative JAK2 associate. [72]

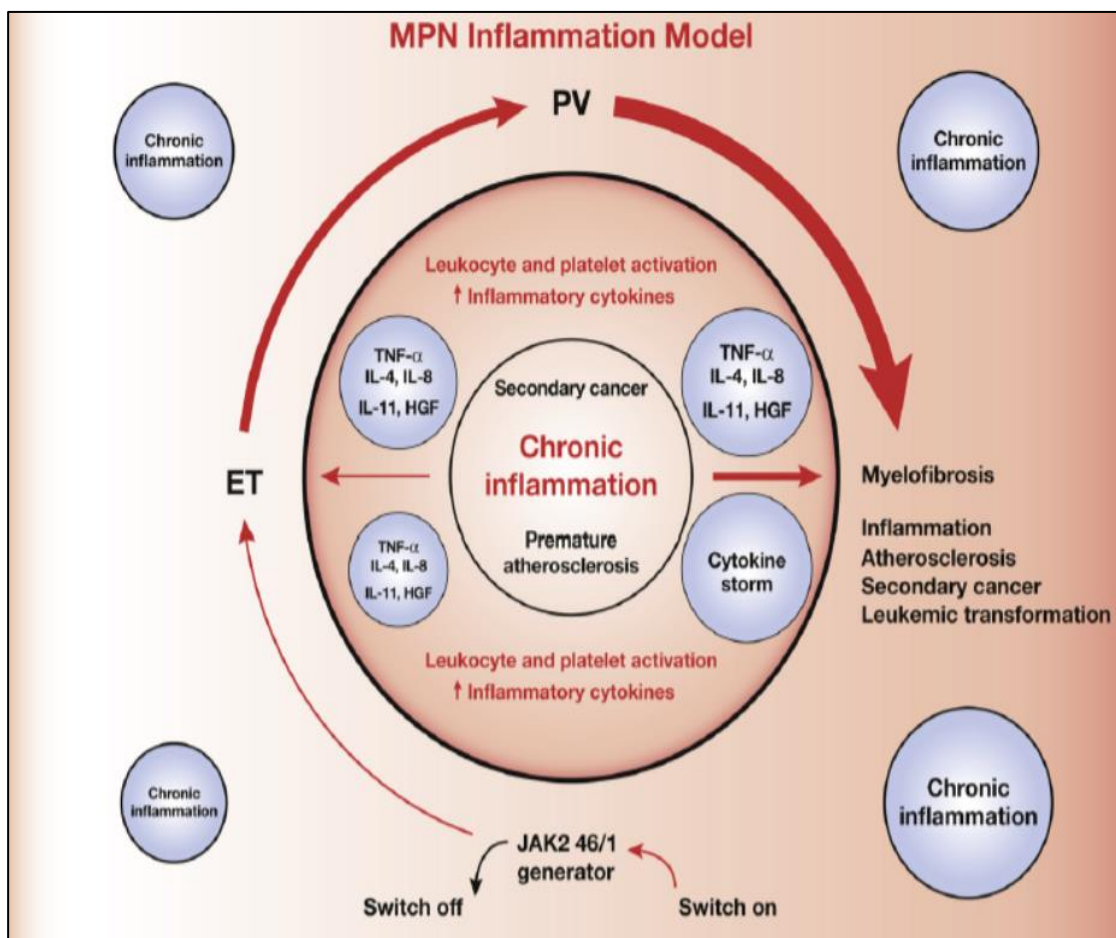


Figura 5 – Processo infiammatorio nel continuum biologico di ET, PV, and MF

In accordo all'ipotesi proposta dall'autore danese (Figura 6), l'infiammazione cronica avrebbe il ruolo di selezionare progressivamente cloni maligni più resistenti favorendo quindi sia l'evoluzione leucemica che l'insorgenza di tumori aggressivi. A sostegno di tale ipotesi andrebbero due osservazioni cliniche: la prima è che l'insorgenza di PMF in pazienti con malattie infiammatorie croniche o malattie autoimmuni è maggiore della norma; la seconda è che pazienti con PMF vi è un rischio più elevato di sviluppare tumori secondari.

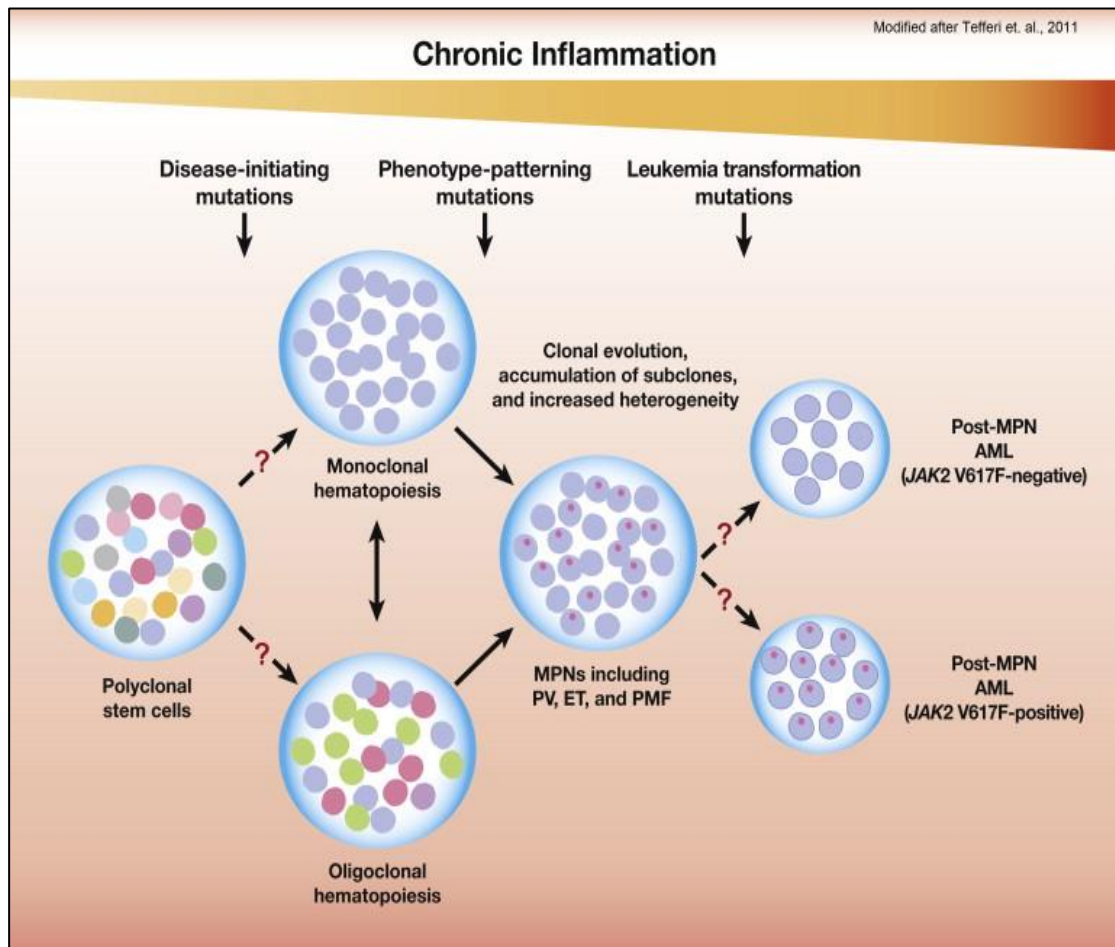


Figura 6 – Infiammazione cronica elemento che guida mutagenesi ed evoluzione clonale nelle MPN

L'infiammazione avrebbe anche un ruolo nell'incrementare il rischio trombotico. Come mostrato in Figura 7 l'attivazione costante della cascata infiammatoria indotta da leucociti e piastrine mutati faciliterebbe la disfunzione endoteliale, l'attivazione della cascata della coagulazione e l'interazione leucocitario-piastrinica. [73] Tale modello, valido anche per altre neoplasie mieloproliferative, renderebbe ragione dei numerosi eventi trombotici nei pazienti con tali patologie.

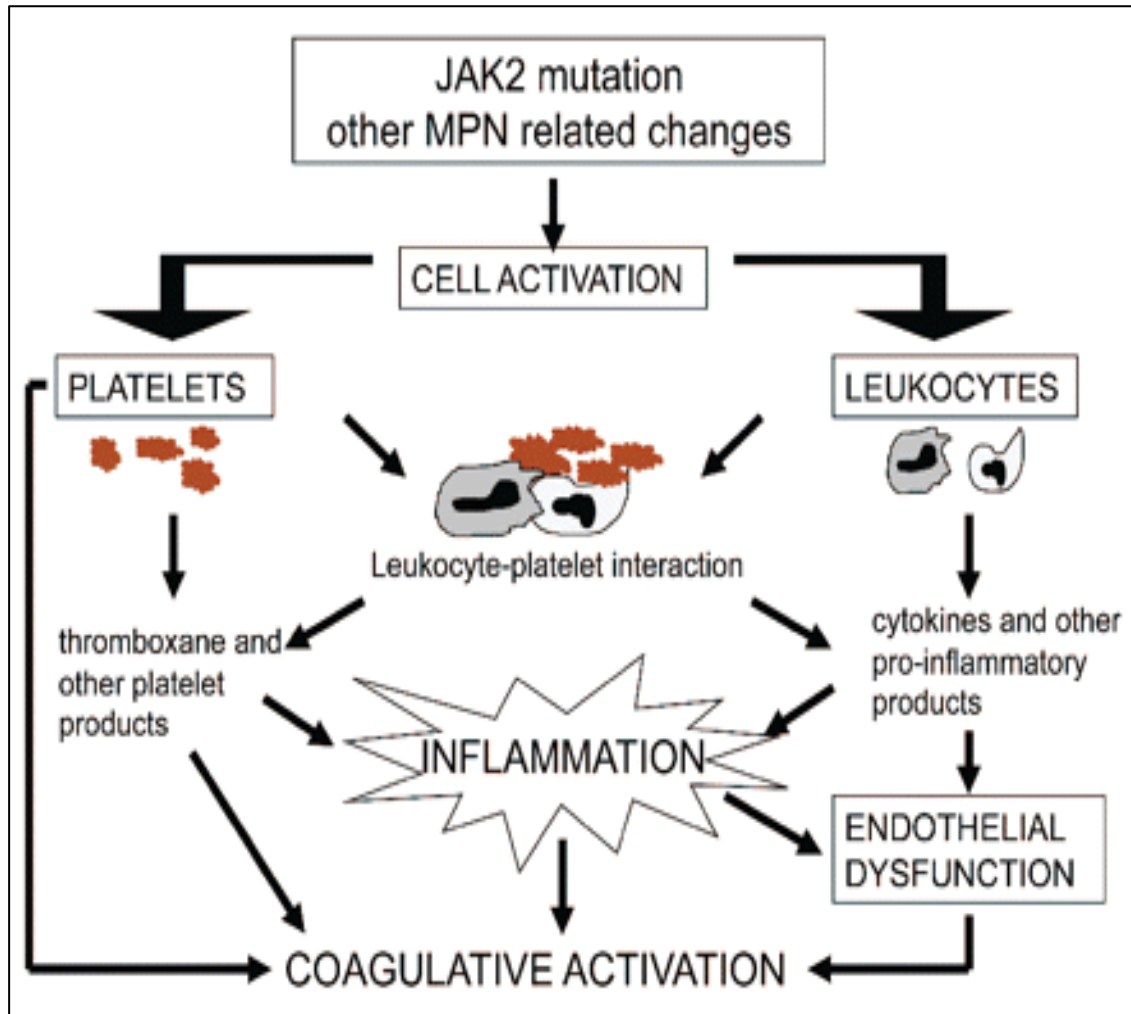


Figura 7 – Interazione tra infiammazione e processo di coagulazione nelle MPN

Questi modelli teorici sono stati confermati nel corso negli anni successivi da numerosi studi che hanno indagato l’impatto della deregolazione citochinica nella “real life” sia in termini di sopravvivenza globale, sia in termini di evoluzione leucemica. In particolare, è emerso come l’incremento di IL-8, l’IL-12, l’IL-15 e del recettore per IL-2 siano validi predittori di mortalità e di trasformazione leucemica. [74-76]

La storia naturale di malattia e il quadro clinico

A livello midollare (figure 8A e 8B) la storia naturale della malattia si divide in due fasi ben distinte:

- 1) stadio prefibrotico (early stage): caratterizzato da ipercellularità del midollo osseo associata a fibrosi reticolinica di grado lieve o assente;
- 2) stadio fibrotico conclamato: caratterizzato da diminuzione della cellularità midollare e incremento della fibrosi reticolinica e/o collagenosica. [77-79]

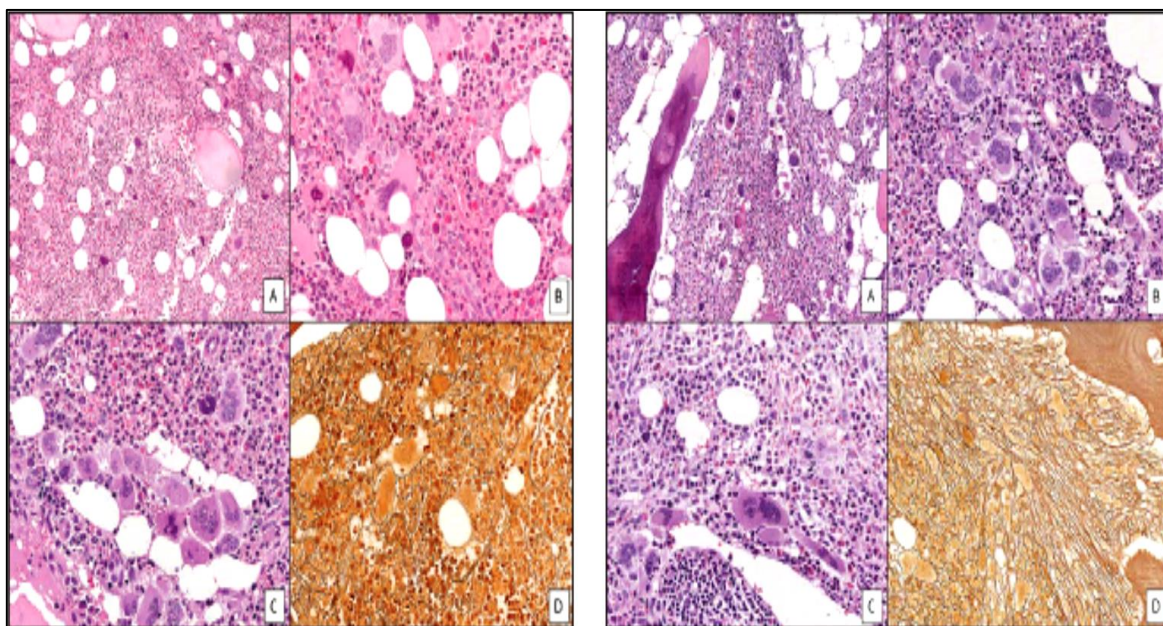


Figura 8A - PMF in fase prefibrotica: midollo emopoietico ipercellulare per età, con proliferazione delle serie granulopoietica e piastrinopoietica (A); i megacariociti sono aumentati di numero, mostrano atipie citologiche (B) e formano aggregati densi (C). La fibrosi reticolinica è di grado lieve (MF-1) (D).

Figura 8B - PMF in fase fibrotica conclamata: midollo ipercellulare per età, con proliferazione delle serie granulopoietica e piastrinopoietica (A); i megacariociti sono molto numerosi, marcatamente atipici e formano ampi aggregati densi (B); talora appaiono deformati e dismorfici per la presenza di fibrosi (C). La fibrosi collagenica è evidente e di grado avanzato (MF-3) (D).

Queste alterazioni istologiche non sono rilevanti solamente dal punto di vista anatomicopatologico, ma anche da quello clinico. I pazienti con PMF in fase prefibrotica sono infatti generalmente asintomatici. Il sospetto diagnostico viene posto talvolta per la presenza di epato-splenomegalia e più spesso per alterazioni degli esami ematologici (anemia, piastrinosi, piastrinopenia, leucopenia, leucocitosi), ematochimici (LDH, vitamina B12), o del riscontro di leucoeritroblastosi ed anisopoichilocitosi delle emazie con dacriociti a livello periferico. [80-86]

Nella maggior parte dei casi, tuttavia, la diagnosi viene formulata in stadio fibrotico conclamato. [77, 80, 82-85, 87-88] Oltre all'ulteriore alterazione degli esami ematochimici ed alla possibile comparsa di rilevanti citopenie, tipici di questa fase di malattia sono anche la presenza di sintomi costituzionali, organomegalie e manifestazioni trombotiche (Figura 9). [89-90]

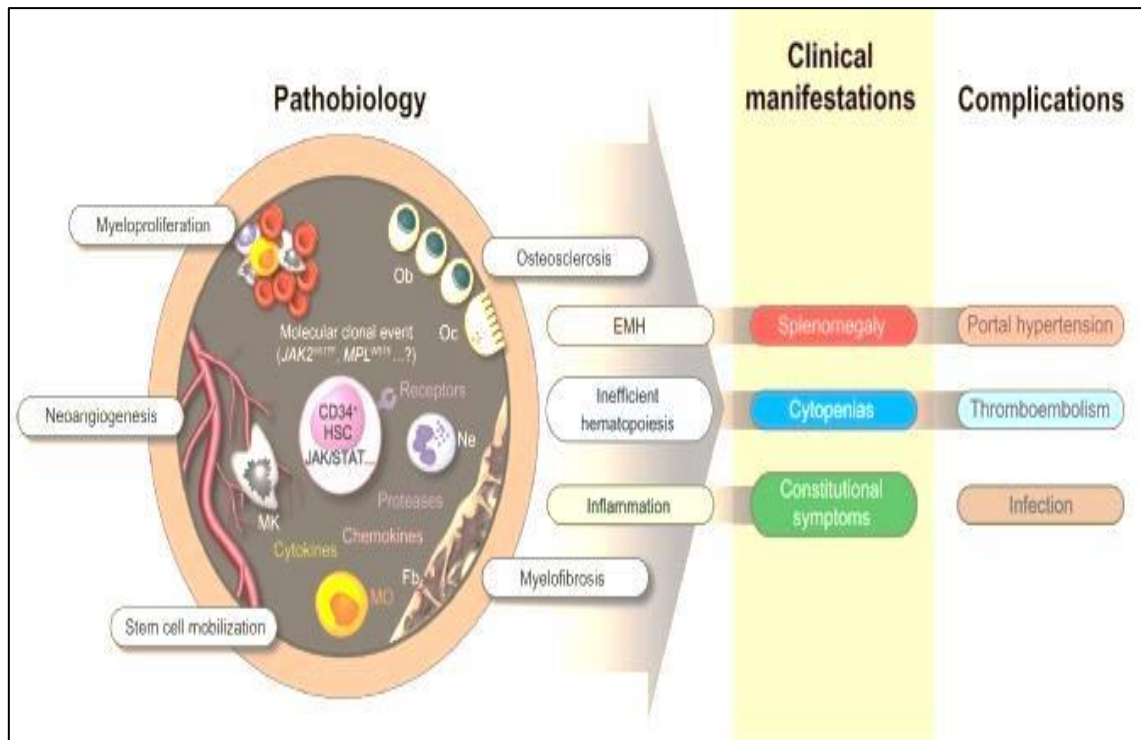


Figura 9 – Patobiologia, principali manifestazioni cliniche e complicanze comuni della mielofibrosi.

- Gli esami ematochimici possono presentare significative alterazioni ematologiche come anemia, leucocitosi e piastrinopenia. Sono inoltre spesso presenti elevati livelli di lattato deidrogenasi (LDH), un numero di cellule CD34+ circolanti incrementato e talvolta blasti mieloidi nel sangue periferico. [77, 80, 87]
- I sintomi costituzionali, come detto in precedenza, possono essere molto variabili, tuttavia i più comuni sono astenia, febbre, algie diffuse, sudorazioni notturne, calo ponderale, prurito acquagenico e sintomatologia da ingombro splenico. Tra questi il più frequente è l'astenia che può arrivare a interessare il 90% dei pazienti (tale sintomo può essere naturalmente influenzato anche dall'eventuale anemia concomitante). [27,86, 91-93] Febbre, algie diffuse, sudorazioni notturne e calo ponderale sono invece espressione dello stato ipercatabolico indotto dall'infiammazione cronica e proprio per tale motivo sono, come vedremo in seguito, estremamente responsivi al trattamento con inibitori di

JAK2. Un altro sintomo che ben risponde a questo tipo di approccio terapeutico è il prurito acquagenico (che insorge al contatto con l'acqua). Tale sintomo, presente in gran parte dei pazienti, può essere espressione sia del quadro infiammatorio sottostante, che dell'eosinofilia che spesso accompagna la neoplasia mieloproliferativa. [94] Infine, la sintomatologia da ingombro splenico è presente in circa il 50% dei pazienti e si può manifestare con sensazione di peso localizzato in ipocondrio sinistro, sazietà precoce (secondaria a compressione dello stomaco) e talvolta con episodi acuti di dolore ai quadranti di sinistra (da infarto splenico). [95] Come già detto, la presenza di sintomatologia costituzionale riflette indirettamente l'attività della PMF ed ha dunque valore prognostico. Inoltre, i pazienti con PMF e sintomi costituzionali hanno in genere una qualità di vita ridotta e potrebbero richiedere specifico trattamento. [12, 96] È dunque di fondamentale importanza documentarne la presenza attraverso l'utilizzo di appositi questionari. [97] Diversi sistemi di scoring sono stati proposti nel corso del tempo (figura 10).

Item	MPN-10 (Mayo Clinic)	MFSAF v2.0 (Incyte)	MFSAF- revised (Gilead)	MFSF v4.0 (Critical Path Institute)
Fatigue	X		X	X
Night sweats	X	X	X	X
Itching	X	X	X	X
Abdominal discomfort	X	X	X	X
Pain under ribs on left side		X	X	X
Early satiety	X	X	X	X
Bone pain	X	X*	X	X
Inactivity	X	X**	X**	
Concentration problems	X			
Fever	X			
Weight loss	X			
Scale score range	0-100	0-60	0-70	0-70

Figura 10 – Scores di rilevazione dei sintomi in mielofibrosi.

- Le organomegalie sono uno dei tratti distintivi della PMF in fase fibrotica. Come anticipato il quadro più frequente è la metaplasia mieloide epatosplenica che interessa organi embriogeneticamente sede di emopoiesi come milza e fegato, causando la comparsa di splenomegalia ed epatomegalia. La splenomegalia, in particolare, è il quadro più rilevante dal punto di vista clinico potendo essere di dimensioni tali da interessare i quadranti addominali inferiori, mentre l'epatomegalia, sebbene di dimensioni più contenute, è comunque estremamente frequente (40-70% dei pazienti). [92, 98]. L'epatomegalia può inoltre comparire se non precedentemente presente, o peggiorare se già presente in caso di splenectomia. [99-102]. Complicanze comuni legate alla presenza di metaplasia mieloide epatosplenica sono gli infarti splenici e l'ipertensione portale con conseguente comparsa di ascite, varici esofagee e talvolta encefalopatia epatica. [103] La metaplasia mieloide non epatosplenica è invece un fenomeno estremamente raro e che difficilmente si associa a organomegalie. Questo processo può potenzialmente interessare qualsiasi organo (linfonodi, sierose, tratto gastrointestinale, genito-urinario, polmonare, sistema nervoso centrale, cute) determinando quadri clinici e complicanze estremamente variabili correlati al sito di insorgenza. [99, 104-111]
- Infine, per quanto riguarda gli eventi trombotici (arteriosi e venosi) il paziente con PMF ha un rischio incrementato rispetto a quello della popolazione generale. In particolare, l'evento trombotico che maggiormente si associa a questa condizione è la trombosi venosa portale, che spesso rappresenta la manifestazione clinica di esordio della malattia. [112] Rispetto alle altre patologie mieloproliferative il rischio trombotico dei pazienti con PMF è inferiore se paragonato a quello dei pazienti con PV, mentre è simile a quello dei pazienti con ET. [113] Per tale motivo è stato recentemente validato l'IPSET thrombosis (strumento di predizione del rischio trombotico originariamente pensato per i pazienti con TE) su una corte di pazienti con PMF. [114] Secondo tale modello quattro sono i fattori di rischio che possono concorrere a incrementare significativamente le probabilità di trombosi nel caso del paziente con PMF: età superiore a 60 anni, presenza di mutazione JAK2, anamnesi positiva per trombosi, presenza di fattori di rischio cardiovascolare classico. La rilevazione di tali fattori di rischio è dunque un altro aspetto fondamentale per la corretta gestione del paziente con PMF.

Diagnosi

Come riportato in tabella 5, per porre diagnosi di PMF in accordo alla classificazione WHO 2016 si integrano informazioni morfologiche, cliniche, genetiche e molecolari. [9] Tali informazioni sono classificate in criteri diagnostici maggiori e minori: per porre diagnosi è necessaria la presenza di tre criteri maggiori e di almeno un criterio minore.

	Prefibrotic/early PMF (pre-PMF)	Overt PMF
Major criteria		
1	Megakaryocytic proliferation and atypia ^b , without reticulin fibrosis > grade 1 ^c , accompanied by increased age-adjusted BM cellularity, granulocytic proliferation and often decreased erythropoiesis	Megakaryocyte proliferation and atypia ^b accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis (grade 2 or 3)
2	Not meeting WHO criteria for BCR-ABL1 + CML, PV, ET, MDS, or other myeloid neoplasm	Not meeting WHO criteria for BCR-ABL1 + CML, PV, ET, MDS or other myeloid neoplasm
3	Presence of JAK2, CALR, or MPL mutation or in the absence of these mutations, presence of another clonal marker ^d or absence of minor reactive BM reticulin fibrosis ^e	Presence of JAK2, CALR, or MPL mutation or in the absence, the presence of another clonal marker ^d or absence of evidence for reactive BM fibrosis ^f
Minor criteria		
1	<ul style="list-style-type: none"> a) Anemia not attributed to a comorbid condition b) Leukocytosis $\geq 11 \times 10^9/L$ c) Palpable splenomegaly d) LDH level above the upper limit of the institutional reference range 	<ul style="list-style-type: none"> a) Anemia not attributed to a comorbid condition b) Leukocytosis $\geq 11 \times 10^9/L$ c) Palpable splenomegaly d) LDH level above the upper limit of the institutional reference range e) Leukoerythroblastosis

Tabella 5 – Criteri maggiori e minori per la diagnosi di mielofibrosi (WHO 2016).

Una volta posto il sospetto diagnostico si procede dunque alla biopsia osteo-midollare, esame fondamentale che, a seconda della fase di malattia, può evidenziare diversi tipi di cellularità (normocellularità, ipercellularità, ipocellularità), dismegacariocitopoiesi (micromegacariociti, megacariociti giganti con nucleo abnorme, solitamente disposti in “cluster”) e disgranulopoiesi (granulociti con nucleo ipersegmentato o con anomalia di Pelger- Huet). [115] In particolare tale accertamento diagnostico è in grado di individuare quadri istopatologici compatibili con PMF in fase prefibrotica (fibrosi midollare di grado 0-1) o PMF in fase fibrotica (fibrosi midollare di grado 2-3). [3]

Oltre alla determinazione del grado di fibrosi la biopsia osteo-midollare facilita il processo di diagnostica differenziale sia di condizioni ematologiche caratterizzate da quadri clinico-laboratoristici di esordio simili a quello di PMF, sia di patologie non

ematologiche caratterizzate da fibrosi. In particolare, a livello diagnostico è di fondamentale importanza escludere la presenza di altre patologie mieloidi come leucemia mieloide cronica, neoplasie mieloproliferative e mielodisplasie. A tale scopo è essenziale in questa fase escludere la presenza di riarrangiamento BCR-ABL.

Sempre dal punto di vista molecolare è essenziale condurre un accurato accertamento citogenetico e molecolare (JAK2, MPL e CALR) volto a individuare la presenza di un marker di clonalità.

Infine, a completamento del processo diagnostico va verificata la presenza di almeno uno dei criteri minori: la presenza di anemia non legata ad altre cause, la presenza di leucocitosi (superiore a 11×10^9 leucociti/L), splenomegalia palpabile, LDH superiore al limite di normalità, leucoeritroblastosi periferica).

Prognosi e cause di morte

La mediana di sopravvivenza sino al 1995 era di 5 anni, dati più recenti hanno rivisto tale dato portandolo a 6 anni per i pazienti con diagnosi in fase fibrotica e 15 anni per i pazienti in fase pre-fibrotica o per i pazienti di età inferiore ai 60 anni. [10, 12, 87, 116-121] Le cause di morte sono nella maggior parte dei casi legate a eventi cardiovascolari, infezioni secondarie alla citopenia ed eventi trombotico-emorragici, mentre solo nel 20% dei pazienti è stata documentata progressione leucemica. [49, 122] Il dato inerente alla trasformazione leucemica è tuttavia verosimilmente sottostimato per le difficoltà legate all'individuazione di tale trasformazione nel paziente mielofibrotico (biopsia osteo midollare non sempre sufficiente a documentare lo stato di progressione di malattia; presenza di elementi immaturi in circolo non indicativa di progressione; presenza di citopenie non indicativa di progressione).

In caso di progressione leucemica la prognosi è estremamente sfavorevole con una mediana di sopravvivenza dal momento della progressione di circa tre mesi. [123] Sebbene, nella maggior parte dei casi si tratti di trasformazioni leucemiche mieloidi, sono state documentate anche leucemie linfoidei, eritroidi, megacariocitiche, e bifenotipiche. Il riscontro di tali quadri di evoluzione leucemica rafforza l'ipotesi di una generalizzata instabilità genetica indotta dall'ambiente infiammatorio che faciliterebbe la selezione di cloni aggressivi.

Terapie

Dal 2005, anno di scoperta della mutazione di JAK2, la progressiva maggior comprensione dei meccanismi molecolari alla base della PMF ha condotto allo sviluppo di strategie terapeutiche sempre più mirate. Al momento, tuttavia, l'unico trattamento che potenzialmente può modificare la storia naturale della malattia è il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche, mentre splenectomia e terapia farmacologica hanno in questi pazienti solo un valore palliativo. [124-129]

Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche

Come anticipato, il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche è l'unica procedura terapeutica potenzialmente curativa. Sfortunatamente tale procedura nei pazienti con PMF è gravata da un rilevante rischio di morte legato al trattamento e alle comorbidità secondarie a terapia immunosoppressiva post-trapianto o legate all'insorgenza di GVHD cronica [125, 130]

In presenza di donatore HLA-compatibile, tale procedura è oggi eseguibile sino ai 75 anni, tuttavia, in considerazione del rischio di mortalità e morbilità è essenziale una accurata valutazione e selezione del paziente. Come vedremo in seguito, giocano in questo contesto un ruolo essenziale gli score di rischio prognostico in grado di identificare al momento della diagnosi i pazienti di età inferiore ai 75 anni potenzialmente candidabili a tale procedura. Per quanto riguarda invece i pazienti a rischio basso al momento della diagnosi, la strategia attuale consiste nella periodica rivalutazione del rischio in relazione al decorso della malattia e nell'attivazione del percorso trapiantologico in caso di comparsa di alto rischio. [131-133]

Per quanto riguarda il regime di condizionamento attualmente non vi sono particolari evidenze a favore di regimi mieloablativi o di regimi ad intensità ridotta in termini di overall survival e non-relapse mortality. Tale scelta va dunque fatta in base alle caratteristiche cliniche del paziente e alle caratteristiche biologiche della malattia. I regimi di condizionamento a intensità ridotta sono una scelta generalmente preferita in larga parte dei pazienti poiché consentono di candidare a trapianto allogenico pazienti più anziani o clinicamente fragili, in cui non sarebbe possibile utilizzare un regime di condizionamento mieloablativo. [134-143] Anche l'utilizzo di tali regimi, infatti, permette il raggiungimento di un chimerismo completo e della remissione molecolare di malattia. [140, 144-145]

Per quanto riguarda invece l'attecchimento, inizialmente la presenza di fibrosi midollare avanzata era stata indicata come fattore prognostico negativo. Studi successivi non hanno tuttavia mostrato un significativo impatto del livello di fibrosi sulla percentuale di attecchimento. [146] I fattori che invece influenzano tale aspetto possono essere divisi in caratteristiche legate alla fonte di cellule staminali da reinfondere e a caratteristiche legate al ricevente. [147] Dal punto di vista della fonte di cellule staminali sono stati documentati migliori risultati con donatore familiare HLA-identico e prelievo di cellule staminali emopoietiche da sangue periferico. Dal punto di vista del ricevente hanno invece influito positivamente una pregressa splenectomia e l'assenza di piastrinopenia pre-trapianto.

Infine, per quanto riguarda la sopravvivenza numerosi sono i fattori che nel corso del tempo hanno dimostrato di poter giocare un ruolo in tal senso. In particolare, sono predittori positivi di sopravvivenza: la presenza di un donatore familiare HLA-identico, la giovane età, la fase di malattia cronica, l'assenza di osteomielosclerosi e i livelli di emoglobina superiori a 10 g/dl. [148-150] Hanno invece un impatto negativo l'utilizzo di un donatore non familiare, un'età avanzata, il pregresso ricorso a supporto trasfusionale eritrocitario intensivo, o la presenza al momento del trapianto di sintomi costituzionali o rilevante splenomegalia. [139, 142] Infine dati discordanti in termini di sopravvivenza globale sono emersi per quanto riguarda il ruolo della splenectomia, che va quindi valutata in base alle specifiche condizioni del paziente. [146,151-152]

Per i pazienti che ricadono o si dimostrano resistenti alla procedura trapiantologica non vi è attualmente un trattamento specifico. Opzioni terapeutiche utilizzabili in questo sub-setting di pazienti (figura 11) comprendono il ricorso alle reinfusione dei linfociti (DLI), un eventuale secondo trapianto, o, se disponibile, l'inserimento in trial clinici.

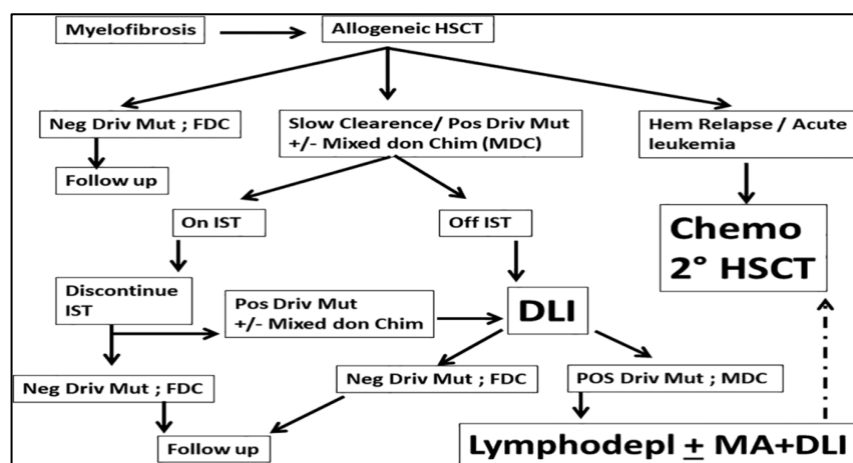


Figura 11 – Possibile algoritmo di gestione trapiantologica nel paziente mielofibrotico.

La splenectomia e radioterapia splenica

La splenectomia è stata sino al 2011 l'unica opzione terapeutica in grado di alleviare la sintomatologia del paziente splenomegalico con PMF. Il suo ruolo si è ridotto nel corso degli ultimi anni con l'avvento degli inibitori di JAK2. Tuttavia, rimane una utile opzione terapeutica nel paziente refrattario o non candidabile a tali trattamenti. Le indicazioni a tale procedura comprendono la presenza di anemia trasfusione-dipendente o di importante sintomatologia da ingombro splenico. [153] Tali pazienti infatti sono gravati non solo dal discomfort addominale legato all'ingombro meccanico, ma anche da complicanze come infarti splenici ricorrenti, trombocitopenia refrattaria o ipertensione portale. [131, 153-156] La splenectomia è in grado nell'immediato di ridurre queste problematiche, sebbene nel lungo periodo possano ripresentarsi. [153, 157]

Il ricorso a tale opzione terapeutica va però valutato attentamente (figura 12). La splenectomia è infatti gravata da un rischio di mortalità intraoperatoria (compresa tra il 7 e il 10%) e da un non trascurabile rischio di mortalità e morbidità post-operatorie legate all'insorgenza di infezioni (sepsi), eventi trombotici (ictus, embolia polmonare, trombosi portale), sanguinamenti (emorragie intra-addominale) o al peggioramento della metaplasia epatica. [153-155] In caso di necessità di riduzione delle dimensioni spleniche in paziente non eleggibile a procedura di splenectomia va infine considerato il ricorso alla radioterapia splenica a scopo palliativo.

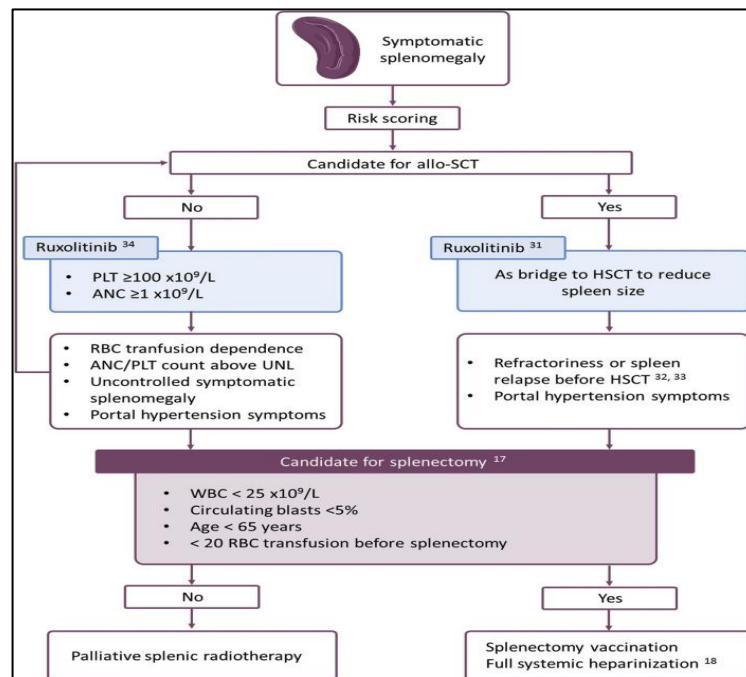


Figura 12 – Possibile algoritmo decisionale per il ricorso alla splenectomia in mielofibrosi.

La terapia farmacologica

L'introduzione degli inibitori di JAK2 (ruxolitinib nel 2012 e fedratinib nel 2022) nel setting della PMF ha profondamente cambiato la gestione terapeutica di questa malattia. Questo evento segna dunque una divisione netta per quanto riguarda la storia della terapia farmacologica della PMF che può dunque essere schematicamente suddivisa come segue.

L'era pre avvento degli inibitori di JAK2

1) Idrossiurea

L'idrossiurea è il farmaco chemioterapico di scelta per il trattamento di prima linea della PMF nel paziente adulto poiché efficace, specialmente nei pazienti con mutazione di JAK2, nel controllare di trombocitosi, leucocitosi, sintomi costituzionali e splenomegalia. [158-163] L'utilizzo del farmaco a lungo termine è stato tuttavia associato all'insorgenza di complicanze, e in particolare allo sviluppo di secondi tumori a livello cutaneo.

2) Busulfano

Il busulfano nei pazienti con PMF può dare un beneficio in termini di splenomegalia, leucocitosi e trombocitosi tuttavia il suo utilizzo è limitato dall'insorgenza di citopenie severe e prolungate. [164] Inoltre, l'utilizzo di questo trattamento è associato ad un'accresciuta evoluzione leucemica. Per tale motivo il suo utilizzo al momento è limitato al contesto del paziente anziano resistente o intollerante ad altre opzioni terapeutiche.

3) Interferone-alfa

L'IFN α è l'opzione terapeutica di scelta nel paziente giovane, poiché rispetto ai farmaci precedenti si associa all'insorgenza di meno effetti collaterali a lungo termine. Inoltre, è l'unico trattamento al momento disponibile durante la gravidanza poiché privo di effetti teratogeni. Il farmaco è associato a buone risposte ematologiche e a discreto controllo della splenomegalia. [165] Tuttavia l'utilizzo di questa opzione terapeutica è stato caratterizzato da alti tassi di discontinuazione causati dalla presenza di sintomatologia simil influenzale post-somministrazione. [166-168] Il recente sviluppo di forme peghilate sembra aver superato questo problema riducendo in modo significativo l'insorgenza di tali complicanze. [169-172]

4) Gli agenti immunomodulanti

Nel paziente con citopenie clinicamente rilevanti (in particolare anemia e trombocitopenia) si può considerare l'utilizzo di agenti immunomodulanti in grado di ridurre tali problematiche. Talidomide, lenalidomide e pomalidomide sono stati tutti sperimentati nel setting del paziente mielofibrotico. Il primo dei tre farmaci, talidomide, non solo ha dimostrato la capacità di controllare efficacemente i valori di emocromo, ma anche di ridurre sintomi costituzionali e talvolta la splenomegalia. [173-177] L'utilizzo del farmaco è limitato dall'insorgenza di effetti collaterali sia ematologici (neutropenia, leucocitosi, trombocitosi), sia non ematologici (sonnolenza, stipsi, astenia, neuropatia periferica) che diventano più frequenti con l'incremento della posologia. [175-180] Tali effetti collaterali possono essere limitati dall'associazione con terapia steroidea. [179,181] Il secondo agente immunomodulante utilizzato in PMF è stato lenalidomide (un analogo di talidomide) che si è dimostrato efficace nel ridurre la trombocitopenia. [182] L'efficacia del farmaco inoltre è maggiormente marcata nei pazienti con delezione del braccio lungo del cromosoma 5 (5q-) in cui bisognerebbe sempre prendere in considerazione tale trattamento. [183] Anche in questo caso gli eventi avversi si sono dimostrati dipendenti dalla posologia del farmaco e limitabili con l'utilizzo di terapia steroidea. [184-185] Infine, per quanto riguarda la pomalidomide, il farmaco si è dimostrato particolarmente efficace nel ridurre l'anemia e caratterizzato da un buon profilo di tolleranza anche in assenza di associazione a trattamento steroideo. [186-187]

5) Agenti stimolanti l'eritropoiesi

Uno dei maggiori problemi che, specialmente nelle fasi avanzate di malattia, affligge il paziente con PMF peggiorandone la prognosi è la presenza di anemia. L'utilizzo di agenti che stimolano l'eritropoiesi ha lo scopo di limitare tale problematica, tuttavia, tale opzione terapeutica è sconsigliata se presente splenomegalia, per il rischio di incentivare il processo di metaplasia mieloide epato-splenica. Tassi di risposta variabili in termini di miglioramento dell'anemia sono stati registrati sia con l'utilizzo di danazolo (androgeno) sia con l'utilizzo di epoietina ricombinante. [188-193] Fattori che limitano l'utilizzo di danazolo sono presenza di disfunzione epatica, carcinoma della prostata e l'induzione di effetti virilizzanti nella donna. Non vi sono invece particolari controindicazioni all'utilizzo di eritropoietina che tuttavia è meno efficace nei pazienti con livelli sierici nella norma o alti. [194-196]

L'avvento degli inibitori di JAK2

1) Ruxolitinib

Ruxolitinib è stato il primo inibitore di JAK2 ad essere approvato per il trattamento del paziente con PMF splenomegalico o con sintomi costituzionali. Il farmaco, disponibile in Italia dal 2012, ha rivoluzionato il trattamento della PMF introducendo ufficialmente in questo ambito la terapia target. La sua azione deriva da un'inibizione della via di segnalazione di JAK/STAT e non è dipendente dallo status mutazionale "driver". [197-200] Come evidenziato dagli studi registrativi di fase III COMFORT-I (ruxolitinib versus placebo) e COMFORT-II (ruxolitinib versus migliore terapia disponibile), il farmaco è, in confronto alle oltre opzioni terapeutiche, estremamente efficace nel ridurre splenomegalia e i sintomi nella maggior parte dei pazienti. [197-198, 201-202] Sebbene non sia ancora del tutto chiaro se tali vantaggi in termini di controllo della malattia si traducano anche in un vantaggio in termini di sopravvivenza globale, alcuni dati preliminari sembrerebbero supportare tale ipotesi. [200-205] Il farmaco sembra invece risultare inefficace nel prevenire la trasformazione leucemica. [206] Gli effetti collaterali che limitano maggiormente l'utilizzo di questo farmaco osservati nel corso degli studi comprendono, oltre alla comparsa di importanti citopenie (anemia, trombocitopenia), lo sviluppo di complicanze infettive (batteriche, fungine, virali e riattivazioni di TBC). [207-215]

2) Fedratinib

Alcuni pazienti con PMF possono essere resistenti, intolleranti, non idonei o perdere la risposta a Ruxolitinib. Fedratinib è un inibitore di JAK e FLT3 attivo in questo setting di pazienti. Già all'inizio del 2013 gli studi clinici di fase II e III JAKARTA (randomizzati, controllati con placebo) avevano mostrato una significativa riduzione in termini di sintomatologia e dimensioni spleniche nei pazienti trattati con fedratinib. [216-219] Nonostante questi risultati, lo sviluppo di questo nuovo inibitore JAK è stato interrotto, nel novembre 2013, a seguito di complicazioni neurologiche, tra cui encefalopatia di Wernicke. [217] Sebbene l'encefalopatia si fosse verificata solo nell'1% dei pazienti e la maggior parte dei casi non fosse encefalopatia di Wernicke, per tale motivo sono stati sospesi in via precauzionale gli studi JAKARTA e JAKARTA-2. Recentemente, grazie agli studi FREEDOM, ideati con l'obiettivo di acquisire maggiore esperienza e integrare le informazioni mancanti dagli studi JAKARTA, fedratinib è stato ufficialmente approvato sia in prima, che in seconda linea per il trattamento del paziente con PMF.

L'era post avvento degli inibitori di JAK2

Come emerge chiaramente dalla figura 13, negli ultimi anni la più profonda conoscenza della biologia molecolare alla base del processo mielofibrotico ha consentito un'enorme evoluzione delle opzioni terapeutiche in questo setting. Attualmente sono in corso numerosi trials che coinvolgono agenti farmacologici attivi su differenti bersagli molecolari. Di seguito saranno esposti le opzioni terapeutiche attualmente più promettenti dividendole in: 1) nuovi JAK inibitori; 2) nuovi farmaci di combinazione ai JAK inibitori; 3) nuovi farmaci alternativi ai JAK inibitori.

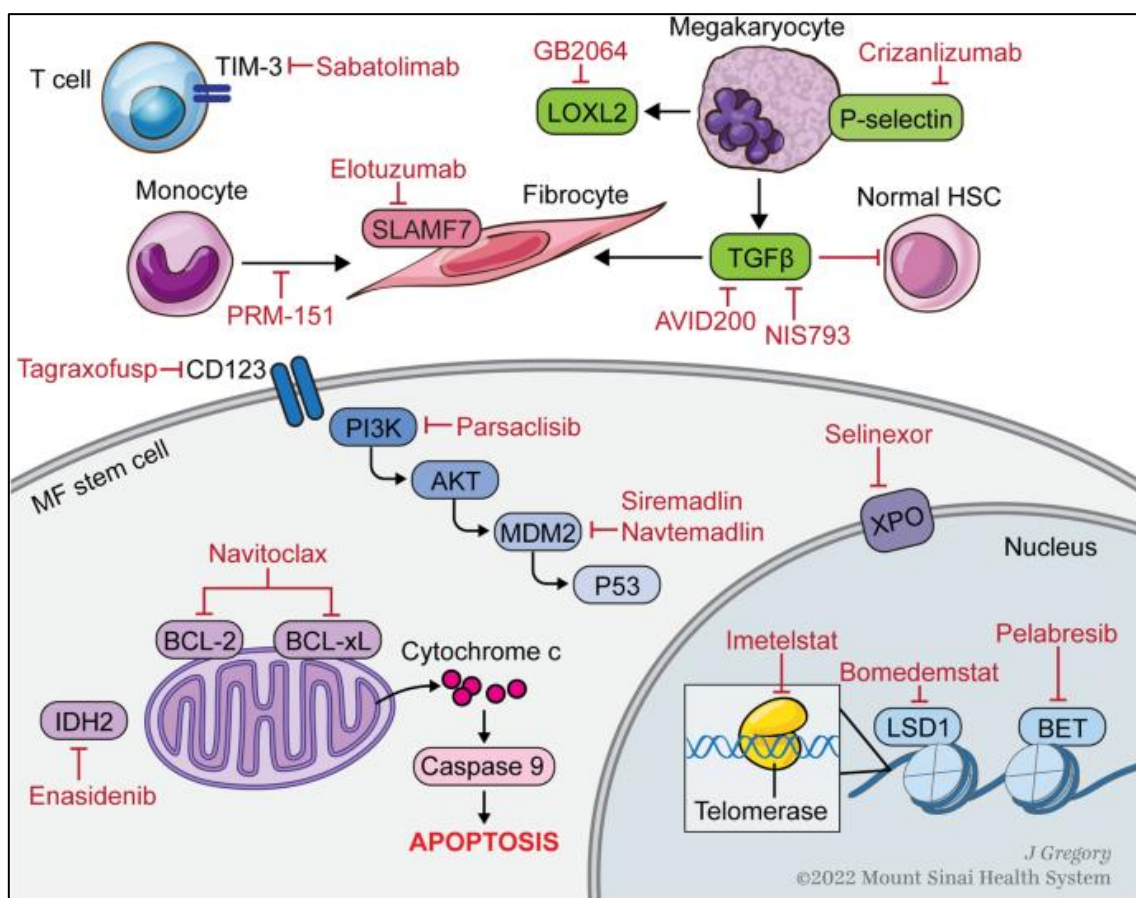


Figura 13 – Farmaci in corso di sperimentazione in mielofibrosi.

1) Nuovi JAK inibitori

Momelotinib e Pacritinib sono due promettenti JAK inibitori, attualmente in fase di sperimentazione, di cui potrebbero beneficiare i pazienti con PMF e concomitante anemia o trombocitopenia. In particolare, Momelotinib è un farmaco promettente nel setting del paziente anemico. L'anemia indotta dalla malattia o dal trattamento è infatti uno dei problemi più comuni nei pazienti affetti da PMF e ha un impatto significativo sull'OS.

Questo JAK inibitore è capace di inibire anche il recettore dell'attivina di tipo 1, riducendo la produzione di epidina nel fegato e aumentando i livelli di ferro ed emoglobina. [220] I primi studi (SIMPLIFY-1 e SIMPLIFY-2) non solo hanno documentato un'attività simile a ruxolitinib in termini di controllo dei sintomi o splenomegalia, ma hanno anche mostrato un vantaggio in termini di controllo dell'anemia. [221-222] Il farmaco è dunque attualmente oggetto di uno studio (MOMENTUM) volto a valutare tale vantaggio. La principale limitazione legata all'utilizzo del farmaco pare essere l'insorgenza di significativa trombocitopenia in alcuni pazienti. Pacritinib è invece un inibitore relativamente non mielosoppressivo delle chinasi JAK2 e FLT3 particolarmente promettente nel setting del paziente trombocitopenico. La trombocitopenia indotta dalla malattia o dal trattamento è infatti un altro problema significativo, nonché un fattore prognostico avverso nei pazienti affetti da PMF. Negli studi PERSIST-1 e PERSIST-2 Pacritinib non solo si è dimostrato efficace nel migliorare i livelli piastrinici, ma anche nel ridurre splenomegalia, migliorare i sintomi costituzionali e incrementare i livelli emoglobinici. [223] Gli eventi avversi più frequenti sono state lievi complicanze gastrointestinali, mentre il farmaco ha dimostrato un buon profilo di sicurezza per quanto riguarda il rischio cardiaco ed emorragico. [224] Attualmente, lo studio di registrazione di fase III PACIFICA sta valutando l'attività del farmaco nel setting dei pazienti con PMF e trombocitopenia grave ($<50 \times 10^9/L$). [225]

2) Nuovi farmaci di combinazione ai JAK inibitori

I JAK inibitori sono verosimilmente destinati ad acquisire sempre maggiore spazio nel trattamento della PMF nei prossimi anni. Il loro utilizzo può essere tuttavia limitato dall'insorgenza di rilevanti citopenie, da risposte sub-ottimali a trattamento, o da resistenza al farmaco. Alcuni agenti in fase di valutazione si pongono l'obiettivo quello di superare tali problematiche attraverso la terapia di combinazione al JAK inibitore. Di seguito riportiamo una lista dei farmaci più promettenti in questo setting. Il primo farmaco in via di sperimentazione è Luspatercept, un nuovo agente di stimolazione dell'eritropoiesi. L'anemia rappresenta infatti una delle principali complicanze legate all'utilizzo degli inibitori di JAK. Luspatercept agisce come ligando del recettore dell'attivina inducendo la maturazione eritroide e riducendo i livelli di anemia, come già sperimentato nella sindrome mielodisplastica. [226-227] L'associazione tra ruxolitinib e luspatercept ha mostrato risultati incoraggianti. [228] Il farmaco è stato, infatti, in grado di aumentare significativamente i livelli di emoglobina e ridurre il tasso di trasfusioni nei

pazienti trattati. Il secondo farmaco di associazione che ha mostrato risultati incoraggianti è Parsaclisib, un inibitore che agisce sulla via di segnalazione del fosfatidil-inositolo 3-fosfatocinasi (PI3K), che si colloca a valle del pathway JAK/STAT. Questo PI3Kδ inibitore ha un'attività sinergica a quella dei JAK inibitori in grado di potenziarne l'azione e ridurre i tassi di risposta sub-ottimale. [229] Parsaclisib consente dunque di ottenere risposte (spleniche e sintomatologiche) con posologie inferiori di ruxolitinib riducendo le tossicità legate al trattamento. Inoltre, il farmaco ha mostrato limitati eventi avversi di grado 3 e 4 ed è stato generalmente ben tollerato, per cui a breve tale terapia di combinazione sarà oggetto di uno studio di fase 3. [230] Alcuni pazienti, tuttavia, possono mostrare immediata resistenza al trattamento con JAK inibitori. Due agenti in via di sperimentazione paiono in grado di poter prevenire o superare tale resistenza sono Navitoclax e Pelabresib. Navitoclax è un inibitore non selettivo di Bcl2 con effetto pro-apoptotico. In combinazione con ruxolitinib ha migliorato i tassi di risposta al trattamento in pazienti con PMF caratterizzato da alto grado di resistenza alle precedenti linee di terapia. I risultati sono particolarmente incoraggianti data l'efficacia del trattamento in una popolazione solitamente caratterizzata da opzioni terapeutiche limitate e spesso da una bassa aspettativa di vita. Inoltre, la combinazione è stata generalmente ben tollerata e pertanto è ora in corso uno studio randomizzato di fase 3 volto a valutare l'efficacia anche in pazienti naïve. [231] Infine, Pelabresib è un inibitore delle vie di segnalazione di NFκB e TGF-β. [232] Nello studio MANIFEST i tassi di risposta splenica e sintomatologica sono risultati significativi su una popolazione di pazienti refrattari a ruxolitinib. [233] Inoltre, sono stati registrati miglioramenti dei livelli emoglobinici e di fibrosi midollare verosimilmente legati all'inibizione del TGFβ, citochina con attività pro-fibrotica. Lo studio di fase 3 MANIFEST-2 sta attualmente valutando l'efficacia di questa associazione in una larga corte di pazienti.

3) Nuove terapie alternative ai JAK inibitori

Diversi farmaci alternativi ai JAK inibitori hanno negli ultimi anni cominciato a suscitare l'interesse della comunità medico-scientifica per la loro potenziale applicazione nel setting del paziente refrattario o non elegibile al trattamento con JAK inibitori. Le strategie terapeutiche alternative in fasi più avanzate di ricerca comprendono inibitori delle telomerasi, inibitori di MDM2 e farmaci attivi sui meccanismi di regolazione epigenetica. Le telomerasi sono enzimi responsabili del continuo mantenimento dei telomeri, e proteggono le estremità dei cromosomi dal danneggiamento. Nelle cellule in

cui tali proteine mancano o sono inibite, i telomeri si accorciano ad ogni replicazione cellulare e questo impatta negativamente sulla durata della sopravvivenza. [234] Tra gli inibitori delle telomerasi testati nei pazienti con PMF resistenti a terapia con JAK inibitori il farmaco più promettente sembra essere Imetelstat. [235] Nell'ambito dello studio di fase 2 IMBARK il farmaco, che si distribuisce in modo specifico nel midollo osseo, ha infatti mostrato non solo un vantaggio in termini di riduzione delle dimensioni della milza e dei sintomi, ma anche un vantaggio significativo in termini di sopravvivenza globale. [236] Sono inoltre stati documentati casi di remissioni completa molecolare e di normalizzazione della fibrosi. [237] Alla luce di questi risultati incoraggianti è attualmente in corso lo studio di fase 3 che si pone come endpoint primario il vantaggio in termini di sopravvivenza nella corte trattata con Imetelstat. Altra molecola promettente in alternativa ai JAK inibitori è KRT232 un farmaco con potente attività inibitoria nei confronti di MDM2. La proteina prodotta da questo gene induce infatti l'ubiquitinazione dell'oncosoppressore p53 incrementando l'instabilità genomica e il rischio di evoluzione di malattia. L'inibizione di MDM2 ripristina l'attività antitumorale di p53. Tale meccanismo d'azione è particolarmente importante nei pazienti con PMF in cui l'espressione di MDM2 è incrementata a causa della deregolazione della via di JAK/STAT. [238] Uno studio preliminare di fase 2 su pazienti affetti da PMF ricaduti o refrattari alla terapia con JAK inibitori ha mostrato incoraggianti risposte spleniche e sintomatologiche associate a buona tollerabilità del farmaco. [239] È attualmente in corso lo studio di fase 3 volto a verificare l'efficacia del farmaco in confronto alla migliore terapia alternativa disponibile. Infine, come già visto in precedenza, nei pazienti con PMF sono state osservate numerose mutazioni somatiche a carico di meccanismi di regolazione epigenetica. Per tale motivo numerosi studi hanno studiato l'efficacia di farmaci attivi su tali meccanismi d'azione. Bomedemstat è il farmaco più promettente in questo setting. Il farmaco è un inibitore della demetilasi lisina-specifica 1 (LSD1), un enzima sovraespresso nei pazienti con PMF capace di promuovere l'eritropoiesi, la granulopoiesi, la trombopoiesi, l'infiammazione e la fibrosi. [240] In uno studio di fase 2, l'utilizzo di Bomedemstat in pazienti con PMF resistenti o intolleranti a ruxolitinib ha prodotto miglioramento in termini di sintomi, splenomegalia, fibrosi midollare e anemia. [241] Inoltre, non sono state identificate tossicità dose-limitanti o dose massima tollerata. Il farmaco è dunque al momento oggetto di ulteriori studi. Naturalmente quanto qui riportato è un elenco parziale che coinvolge esclusivamente i farmaci alternativi ai JAK inibitori in fase di sperimentazione più avanzata.

Evoluzione del sistema di scoring

International Prognostic Score System (IPSS)

L'evoluzione dei sistemi di stratificazione del rischio cominciò nel 2009 con lo sviluppo del sistema di score prognostico internazionale (IPSS). [242] Una casistica di 1054 pazienti con PMF seguiti in sette diversi centri ematologici venne analizzata per determinare i fattori di rischio alla diagnosi con maggior impatto sulla sopravvivenza.

All'analisi multivariata sono stati identificati 5 predittori indipendenti di rischio:

- 1) età superiore a 65 anni (1 punto);
- 2) emoglobina inferiore 10 g/dL (1 punto);
- 3) leucociti superiori $25 \times 10^9/L$ (1 punto);
- 4) presenza di blasti circolanti (1 punto);
- 5) presenza di sintomi costituzionali (1 punto).

In base al numero di predittori presenti il rischio specifico del paziente è suddiviso in 4 classi: 0 - basso rischio (sopravvivenza mediana 135 mesi); 1 - rischio intermedio-1 (sopravvivenza mediana 95 mesi); 2 - rischio intermedio-2 (sopravvivenza mediana 48 mesi); >2 - alto rischio (sopravvivenza mediana 27 mesi).

Dynamic International Prognostic Score System (DIPSS)

L'anno seguente il gruppo internazionale di lavoro per la ricerca e il trattamento delle neoplasie mieloproliferative (IWG-MRT) sviluppò una versione dinamica del precedente modello prognostico capace di valutare meglio l'impatto dei fattori di rischio prognostici avversi nel corso del tempo. [243] Nacque così il DIPSS che risulta utilizzabile in qualunque momento del decorso della malattia e si calcola in base a:

- 1) età superiore a 65 anni (1 punto);
- 2) emoglobina inferiore 10 g/dL (2 punti);
- 3) leucociti superiori $25 \times 10^9/L$ (1 punto);
- 4) presenza di blasti circolanti (1 punto);
- 5) presenza di sintomi costituzionali (1 punto).

In base al punteggio il paziente viene poi classificato come segue: 0= basso rischio; 1 o 2 = rischio intermedio-1; 3 o 4 = rischio intermedio-2; 5 o 6 = alto rischio. Le 4 classi di rischio derivanti dalla nuova classificazione mostrano un valore predittivo sia in termini di sopravvivenza globale che in termini di evoluzione leucemica: basso rischio

(sopravvivenza mediana non raggiunta e incidenza di sviluppo di fase blastica di 0.3 per 100 pazienti/anno); rischio intermedio-1 (sopravvivenza mediana 9.8 anni e incidenza di sviluppo di fase blastica di 0.7 per 100 pazienti/anno); rischio intermedio-2 (sopravvivenza mediana 4.8 anni e incidenza di sviluppo di fase blastica di 2.6 per 100 pazienti/anno); alto rischio (sopravvivenza mediana 2.3 anni e incidenza di sviluppo di fase blastica di 8.6 per 100 pazienti/anno). [244]

Dynamic International Prognostic Score System-Plus (DIPSS+)

Negli anni successivi vennero individuati altri fattori di rischio indipendenti da IPSS o DIPSS: in particolare fu messa in luce la rilevanza di cariotipo sfavorevole (comprendenti le alterazioni +8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p- o riarrangiamento 11q23), trasfusione dipendenza e conta piastrinica inferiore a $100 \times 10^9/L$. [245-247]

Lo score DIPSS venne quindi modificato, integrando i nuovi fattori di rischio e divenendo DIPSS+. [71] Tale nuovo score dinamico si calcola in base a:

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

In base al punteggio ottenuto le categorie di rischio risultanti sono: 0 punti - basso rischio (sopravvivenza mediana 15.4 anni); 1 punto - rischio intermedio-1 (sopravvivenza mediana 6.5 anni); 2 o 3 punti - rischio intermedio-2 (sopravvivenza mediana 2.9 anni); oltre 3 punti - alto rischio (sopravvivenza mediana 1.3 anni). È inoltre stato osservato che a parità di fattori di classe di rischio i pazienti più giovani hanno un'aspettativa di vita maggiore. Per contro, i pazienti con cariotipo monosomico o con inv(3)/ i(17q), o due alterazioni fra blasti circolanti maggiori del 9%, conta leucocitaria superiore a 40.000/ml o presenza di altre caratteristiche citogenetiche sfavorevoli hanno un rischio di mortalità e trasformazione leucemica molto elevati.

TABLE 5: Prognostic scoring systems for primary myelofibrosis			
Risk factor	IPSS	D-IPSS	D-IPSS-plus
Age > 65 years	1	1	1
Constitutional symptoms	1	1	1
Hemoglobin < 10 g/dL	1	2	1
Leukocytes > 25 x 10 ⁹ /L	1	1	1
Blood blasts ≥ 1%	1	1	1
Platelet count < 100 x 10 ⁹ /L			1
Transfusion dependence			1
Unfavorable karyotype			1
Risk stratification (median survival)			
Low	0 points (11.2 years)	0 points (not reached)	0 points (15.4 years)
Intermediate-1	1 point (7.9 years)	1–2 points (14.2 years)	1 point (6.5 years)
Intermediate-2	2 points (4 years)	3–4 points (4 years)	2–3 points (2.9 years)
High	≥ 3 points (2.3 years)	5–6 points (1.5 years)	≥ 4 points (1.3 years)
IPSS = International Prognostic Scoring System; D-IPSS = Dynamic International Prognostic Scoring System			

Tabella 6 – Schema riassuntivo i 3 primi sistemi di scoring (IPSS, DIPSS, DIPSS-plus)

Era post DIPSS+

Negli anni successivi all'avvento del DIPSS+, grazie anche all'utilizzo sempre più estensivo di nuove tecnologie come la next generation sequencing (NGS), si è progressivamente raffinata la conoscenza dei processi biologici e delle alterazioni molecolari alla base della PMF. Nell'impossibilità di trattare tali acquisizioni in maniera completa, ci si limiterà a evidenziare alcuni elementi chiave al fine di questa tesi.

- a) Per quanto riguarda lo stato mutazionale alla base della malattia si ricorda innanzitutto, come anticipato in precedenza, il vantaggio prognostico attribuito dalla mutazione driver CALR tipo 1. [46]
- b) In secondo luogo, il ruolo delle cosiddette mutazioni “aggiuntive” ha progressivamente acquisito maggiore rilevanza poiché, sebbene non responsabile del fenotipo clinico della malattia, ha un chiaro impatto prognostico (prevalentemente relato a precoce evoluzione leucemica). Le mutazioni maggiormente caratterizzate sono: IDH 1/2, EZH2, SRSF2, ASXL1 e U2AF1 Q157. [49-52] È stato dimostrato inoltre che la presenza di molteplici mutazioni ha un ulteriore impatto sulla sopravvivenza rispetto alla presenza di una singola mutazione, descrivendo diversi livelli di elevato rischio molecolare. [53]
- c) In terzo luogo, anche i criteri citogenetici sono stati recentemente aggiornati: distinguendo le possibili mutazioni del cariotipo all'esordio di malattia in 3 categorie: favorevoli, sfavorevoli e a rischio molto alto (VHR). [48]

- d) Infine, alcuni dei precedenti predittori di rischio clinico sono stati nuovamente analizzati e leggermente modificati o aggiornati. In particolari, i blasti circolanti hanno mantenuto una rilevanza prognostica solo se superiori al 1% e il livello di anemia è stato corretto in base al sesso (inferiore a 10 g/dL per le donne e gli 11 g/dL per gli uomini).

Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis (MIPSS70)

Nel corso degli ultimi anni, grazie a tali nuove acquisizioni, sono stati sviluppati 3 nuovi score prognostici. Il primo è stato il MIPSS70, un sistema prognostico sviluppato nei pazienti di età uguale o inferiore a 70 anni, in modo da avere uno strumento di particolare efficacia nei pazienti in età da trapianto. [248] Lo score originariamente comprendeva 9 variabili: 3 genetiche (assenza di mutazione CALR tipo 1; alto rischio molecolare inteso come presenza di una sola mutazione tra ASXL1, SRSF2, EZH2, IDH1 o IDH2; presenza di 2 o più mutazioni tra ASXL1, SRSF2, EZH2, IDH1 o IDH2) e sei cliniche (emoglobina inferiore a 10 g/dL; leucociti superiori a $25 \times 10^9/L$; piastrine inferiori $100 \times 10^9/L$; blasti circolanti superiori a 1%; fibrosi midollare di grado superiore a 1; presenza di sintomi costituzionali). A leucocitosi, piastrinopenia e presenza di 2 o più mutazioni ad alto rischio molecolare fu assegnato un punteggio di 2, mentre alle altre variabili un solo punto. Le tre categorie di rischio così individuate erano: 0 o 1 punto – basso rischio (sopravvivenza a 5 anni 96%); da 2 a 4 punti - rischio intermedio (sopravvivenza a 5 anni 67%); oltre 4 punti - alto rischio (sopravvivenza a 5 anni 34%).

MIPSS70 plus (MIPSS70+) e MIPSS70 plus version 2 (MIPSS70+v2)

Il MIPSS70+ e il MIPSS70+ versione 2.0 nascono come versione migliorata del precedente sistema di scoring incorporando le innovazioni della revisione citogenetica precedentemente citata, inserendo tra le lesioni ad alto rischio molecolare la mutazione U2AF1 Q157 e, infine, integrando la nozione di anemia corretta in base al sesso. [48, 52, 249] Il MIPSS70+v2 in particolare include nel suo sistema di valutazione 9 variabili valutate all'esordio di malattia di cui 5 genetiche (cariotipo sfavorevole = 3 punti, rischio cariotipico particolarmente elevato = 4 punti, presenza di una sola mutazione ad alto rischio molecolare = 2 punti, presenza di più mutazioni ad alto rischio molecolare = 3, punti assenza di mutazione CALR tipo 1 = 2 punti); e 4 variabili cliniche (sintomi costituzionali = 2 punti, anemia moderata ossia emoglobina tra 8 e 9.9 g/dL nelle donne

e 9 e 10.9 g/dL negli uomini = 1 punto, anemia severa ossia emoglobina inferiore 8 g/dL nelle donne e 9 g/dL negli uomini = 2 punti e presenza di blasti circolati maggiore del 1% = 1 punto). [250] Le categorie di rischio definite in questo modello e i rispettivi punteggi sono: oltre gli 8 punti - rischio particolarmente alto (sopravvivenza a 10 anni inferiore al 3%); dai 5 agli 8 punti - rischio alto (sopravvivenza a 10 anni 10%); dai 3 ai 4 punti - rischio intermedio (sopravvivenza a 10 anni 30%); 1 o 2 punti - basso rischio (sopravvivenza a 10 anni 50%); 0 punti - rischio particolarmente basso (sopravvivenza a 10 anni 86%).

Genetically Inspired Prognostic Scoring System (GIPSS)

Da ultimo, è stato elaborato un sistema di scoring esclusivamente basato su variabili genetico-molecolari e definito GIPSS. [251] Le variabili di riferimento di questo sistema di score prognostico sono:

- 1) Cariotipo particolarmente sfavorevole (2 punti);
- 2) Cariotipo sfavorevole (1 punto);
- 3) Assenza di mutazioni di CALR tipo1 o simil-tipo1 (1 punto);
- 4) Mutazioni di ASXL1, SRSF2 o U2AF1Q157 (1 punto).

Le 4 categorie di rischio previste da questo sistema di scoring comprendevano: 0 punti - basso rischio (sopravvivenza mediana pari a 26.4 anni); 1 punto - rischio intermedio-1 (sopravvivenza mediana pari a 8 anni); 2 punti - rischio intermedio-2 (sopravvivenza mediana pari a 4.2 anni); oltre 2 punti - alto rischio (sopravvivenza mediana pari a 2 anni).

Ulteriori fattori di rischio prognostico

Oltre a quanto già riportato nella precedente trattazione, nel corso degli ultimi anni sono emersi ulteriori fattori di rischio associati a peggiore sopravvivenza globale, ma attualmente non inseriti in score di rischio prognostico codificati formalmente. Tra questi, quelli con maggior impatto sulla sopravvivenza globale sono i livelli delle citochine circolanti e lo status mutazionale di esordio.

I livelli citochinici sono di particolare interesse perché descrivono l'attività metabolica della PMF direttamente. Uno studio della Mayo Clinic non solo ha dimostrato un'ampia deregolazione di tali livelli nei pazienti con PMF, ma ha anche mostrato l'impatto sull'aspettativa di vita. In particolare, elevati livelli di IL-8 e IL-2R possono essere di ausilio per individuare i pazienti rischio DIPSS+ intermedio con minore aspettativa di vita. [76]

Per quanto invece attiene lo status mutazionale “driver”, oltre al già menzionato effetto protettivo associato alla mutazione CALR tipo-1, è stato chiarito anche il ruolo prognostico delle restanti condizioni. In particolare, la sopravvivenza mediana era di 15.9 anni nei pazienti CALR-mutati, di 9.9 anni nei pazienti MPLmutati, di 5.9 anni nei pazienti JAK2mutati e di 2.3 anni nei pazienti privi di queste mutazioni (triplo negativi). [12] I pazienti triplo negativi sono dunque i pazienti con sopravvivenza significativamente peggiore. [252]

Utilizzo degli score prognostici oggi

Grazie a questi continui miglioramenti, oggi, nei centri che hanno la possibilità di utilizzare le nuove tecniche di biologia molecolare, è possibile integrare GIPSS e MIPSS70+v2 raggiungendo una elevatissima sensibilità e specificità nella selezione dei pazienti da avviare a trapianto allogenico di cellule staminali come mostrato in figura 14 e 15.

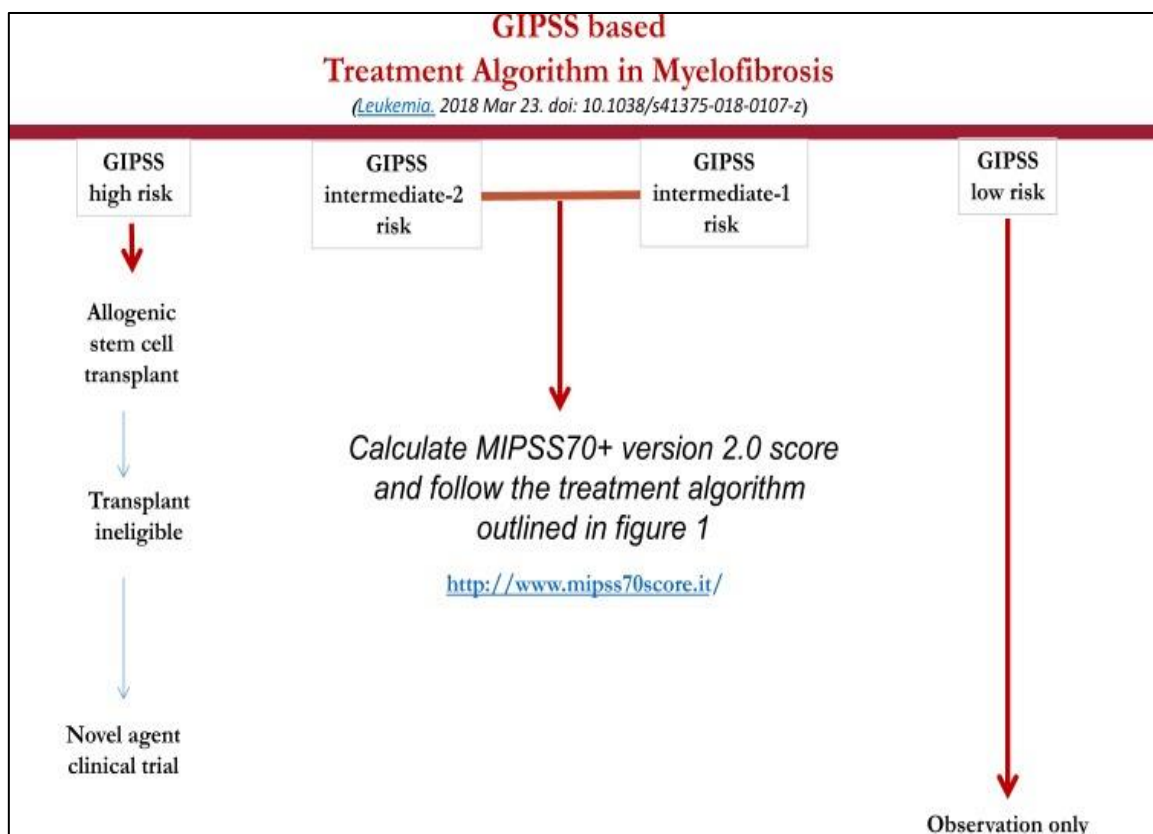


Figura 14 – Algoritmo terapeutico 2018: GIPSS

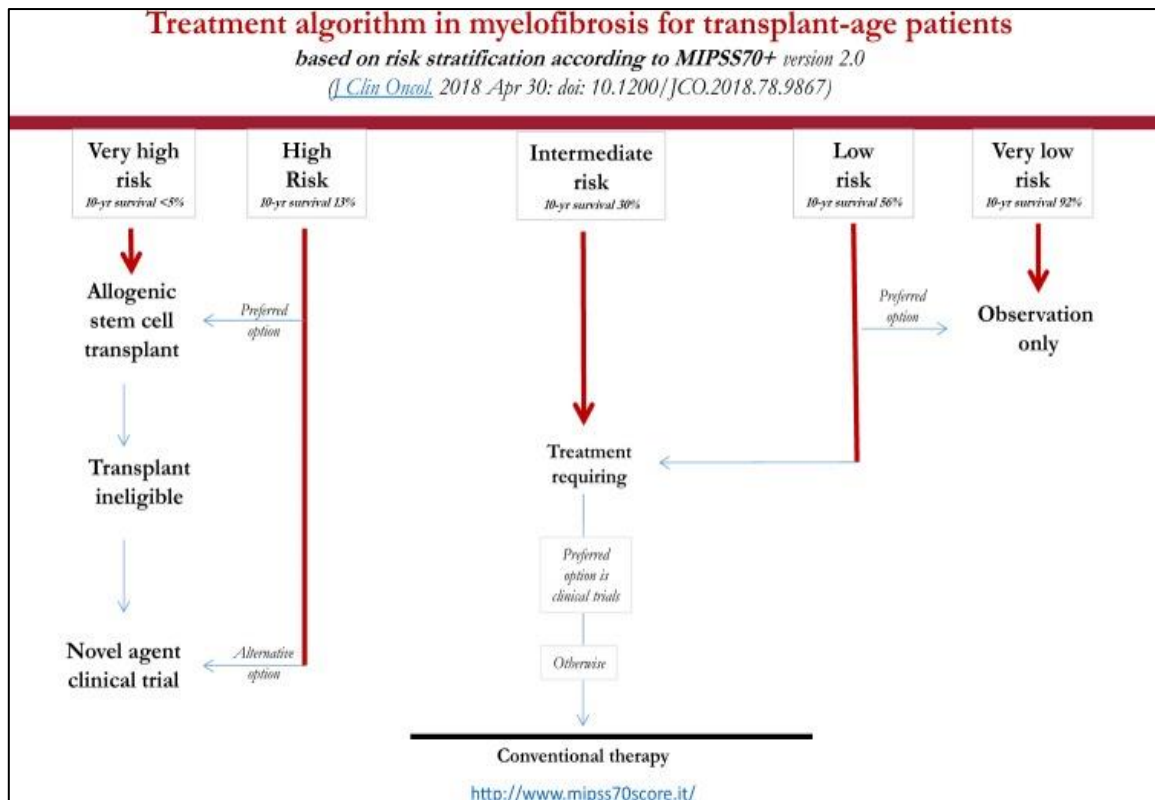


Figura 15 – Algoritmo terapeutico 2018: MIPSS70+ versione 2.0

Tuttavia, in molti centri la possibilità di eseguire analisi di biologia molecolare avanzata (NGS) è riservata a pazienti selezionati potenzialmente candiabli a percorso trapiantologico o a trattamento con le nuove terapie a bersaglio molecolare. Per la corretta gestione clinica e il follow-up dei pazienti con PMF rimane dunque essenziale l'integrazione tra le informazioni fornite dai tradizionali score di rischio clinico e i moderni score di rischio genetico.

CAPITOLO 2

Lo studio

2.1 – Ipotesi della ricerca e obiettivi

Come evidenziato nei capitoli precedenti, la patogenesi della PMF è un processo complesso caratterizzato da diversi tipi di lesioni molecolari. In particolare, nel corso dell'ultimo ventennio, è stata fatta progressivamente maggiore chiarezza sia sul ruolo delle differenti mutazioni driver, responsabili del fenotipo clinico della malattia, sia sul ruolo delle lesioni citogenetico-molecolari aggiuntive. [5, 14, 17, 48, 60] Dal punto di vista clinico la PMF è caratterizzata da anemia, epatosplenomegalia e sintomi costituzionali. [91-95] In generale, questi disturbi possono essere molto eterogenei in termini di carico dei sintomi e tempo alla progressione della malattia, ponendo la necessità di una personalizzazione del percorso clinico e dell'approccio terapeutico. Il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche è ancora l'unica modalità curativa, ma assegnare un paziente alla procedura è la decisione più impegnativa dal punto di vista del medico a causa della sua tossicità correlata al trattamento. [125, 253] Per facilitare le scelte terapeutiche, sono stati creati modelli prognostici capaci di individuare gruppi di pazienti con diversa aspettativa di vita e indirizzare di conseguenza il trattamento. Dal 2009 a oggi sono stati realizzati diversi sistemi di scoring prognostico sia esclusivamente basati su variabili cliniche, che integrati con dati genetici supplementari. Nonostante i recenti miglioramenti, alcune variabili scarsamente standardizzate, come la conta dei blasti circolanti o la presenza di sintomi costituzionali sono ancora incluse nella maggior parte degli score prognostici. In particolare, queste variabili influenzano fortemente gli score prognostici attualmente più utilizzati nella pratica clinica: IPSS, DIPSS e DIPSS+.

La conta dei blasti su sangue periferico è un indice di disfunzione midollare. La sua determinazione si basa sulla valutazione morfologica degli strisci di sangue periferico ed è perciò largamente dipendente dall'operatore, soprattutto tenendo in considerazione che la quantità di blasti circolanti necessaria ad incrementare il rischio è solo dell'1%. Inoltre, bisogna considerare che l'identificazione della cellula blastica può essere particolarmente difficile nel caso di stadi immaturi della linea monocitica, riducendo ulteriormente

l'affidabilità di questa variabile. Sebbene non sia equivalente, precedenti studi hanno evidenziato l'associazione tra il numero assoluto di cellule CD34 + e la quota di blasti circolanti: in particolare una quota di cellule CD34 + > $15 \times 10^9 / L$ è fortemente associata alla diagnosi di PMF. [79, 242] Questo marker, facilmente ottenibile e non operatore dipendente, potrebbe dunque avere significative potenzialità di utilizzo come marker prognostico alternativo ai blasti circolanti.

I sintomi costituzionali (definiti come la presenza di una perdita di peso > 10% del basale nell'anno precedente la diagnosi, sudorazione eccessiva inspiegabile o febbre persistente per almeno un mese) sono invece l'espressione dell'aberrante rilascio di citochine infiammatorie che accompagna la patologia in fase attiva. [242, 254] L'importanza di questo dato deriva dunque dall'essere associato allo stato ipercatabolico/cachettico della malattia stessa in grado di influenzare non solo la qualità di vita, ma anche la sopravvivenza. Tuttavia, la rilevazione di questa variabile può non essere totalmente affidabile, nonostante l'utilizzo degli appositi tool diagnostici, in quanto non totalmente oggettivabile. Per ovviare a tale problema recentemente il gruppo della Mayo Clinic ha proposto di monitorare questo aspetto attraverso markers di laboratorio (colesterolo totale e albumina) facilmente ottenibili: cachexia index. [255] Anche questo strumento potrebbe aiutare a definire con maggiore precisione il rischio prognostico.

Obiettivo di questo lavoro di ricerca è stato dunque quello di verificare se fosse possibile ottenere, utilizzando parametri maggiormente oggettivi al posto delle variabili meno standardizzate, score prognostici clinici altrettanto accurati.

2.2 – Materiali e metodi

1) Pazienti

Questo studio ha analizzato i pazienti con diagnosi di PMF seguiti tra il 2004 e il 2022 presso l'Ematologia di Reggio Emilia. Per assicurare una corretta analisi della casistica, in collaborazione con il Centro Tumori, è stata prima eseguita una revisione di tutte le diagnosi di tumore ematologico (7.578 pazienti) fatte nella provincia di Reggio Emilia descrivendone i dati relativi a incidenza, mortalità e sopravvivenza. Questo lavoro epidemiologico è attualmente in corso di pubblicazione.

Dal database di questo primo studio sono stati isolati i pazienti con PMF procedendo alla costruzione di un apposito database di patologia contenente 152 pazienti. Di questi, ai fini dello studio, sono stati considerati eleggibili i pazienti: 1) di età superiore a 18 anni; 2) con diagnosi di PMF rivista secondo i criteri WHO del 2016. Sono invece stati considerati criteri di esclusione: 1) la presenza di trattamento citoreducente in atto al momento della diagnosi; 2) la presenza di trattamento con statine in atto al momento della diagnosi.

Per ogni paziente sono raccolti i seguenti dati alla diagnosi: età, sesso, presenza di sintomi costituzionali, presenza di splenomegalia palpabile, grado di fibrosi midollare, presenza di mutazione JAK2, CALR o MPL, presenza di citogenetica sfavorevole (secondo quanto previsto per lo score DIPSS+), valori di emocromo (in particolare presenza di leucocitosi, anemia o piastrinopenia), necessità di supporto trasfusionale eritrocitario, livelli di albumina, colesterolo e cellule CD34+ circolanti. Sono infine stati inseriti i dati relativi a sopravvivenza e follow-up.

Le cartelle mediche sono state utilizzate sia per la raccolta dei dati di laboratorio, che per l'estrazione delle variabili cliniche.

2) Analisi statistica

Le variabili continue sono state sintetizzate come mediana e range o media e deviazione standard a seconda dell'analisi statistica effettuata, mentre le variabili categoriche come conta e frequenza di ciascuna. Per ciò che attiene l'analisi statistica, le differenze tra le categorie nella distribuzione delle variabili continue sono state analizzate attraverso il test di Mann-Whitney (per il confronto di due gruppi) o utilizzando il test di Kruskal-Wallis (per il confronto di tre o più gruppi). I gruppi di pazienti con variabili nominali sono stati confrontati attraverso il test χ^2 . Sono stati usati metodi statistici standard per determinare la significatività delle differenze tra i gruppi nella distribuzione di variabili continue o

nominali. L'analisi di sopravvivenza globale (overall-survival) è stata condotta considerando il periodo dalla diagnosi fino alla data di morte (uncensored) o all'ultima visita di follow-up (censored). Le analisi di overall-survival sono state preparate utilizzando il metodo Kaplan-Meier e confrontate tra loro con il Log-rank test. Il modello di regressione del rischio proporzionale di Cox è stato applicato per l'analisi multivariata. Un P-value <0.05 è stato considerato come significativo. La versione 14.0.0 del software JMP® Pro prodotto dal SAS Institute, (Cary, NC, USA), è stato utilizzato per eseguire tutti i calcoli.

2.3 – Risultati

Su un totale di 152 pazienti con PMF riferiti al nostro centro nel periodo in esame, 77 sono risultati idonei allo studio per quanto riguarda criteri di inclusione ed esclusione. Le caratteristiche della popolazione in esame sono mostrate nella tabella 7.

Alla diagnosi l'età mediana dei pazienti era 66 anni, di cui il 53% era oltre i 65 anni. I pazienti di sesso maschile erano il 62%. Dal punto di vista clinico il 17% presentava sintomi costituzionali, il 29% aveva una splenomegalia palpabile e il 4% era trasfusione dipendente. Un grado di fibrosi elevato (≥ 2) era presente solo nel 23% dei casi. L'assetto mutazionale driver è stato determinato nel 91% dei casi: JAK2V617F 72%, CALR tipo1 o tipo 2 20%, MPLW515L/K 4%, triplo negativi 4%. La citogenetica è risultata disponibile solo nel 61% dei pazienti, di questi il 9% mostrava cariotipo sfavorevole. Per quanto riguarda i valori di emocromo il 5% dei pazienti aveva livelli di emoglobina inferiori a 10 g/dl, il 4% aveva piastrine inferiori a $100 \times 10^9/L$, il 3% aveva leucoti superiori a $25 \times 10^9/L$ e il 10% presentava blastosi periferica. Le cellule CD34+ circolanti sono risultate superiori a $15 \times 10^9/L$ nel 26% dei pazienti. Infine, il 73% dei pazienti aveva livelli di albumina inferiori a 4.3 mg/dl e il 14% dei pazienti livelli di colesterolo inferiori a 122 mg/dl.

Baseline Characteristics	All Patients (n=77)
Age in years; median (range)	66 (22-97)
Age >65 years; n (%)	41 (53)
Sex (male); n (%)	48 (62)
Presence of constitutional symptoms; n (%)	13 (17)
Presence of palpable splenomegaly; n (%)	22 (29)
Bone marrow fibrosis degree ≥ 2 ; n (%)	18 (23)
Driver mutation; n (%) "N" evaluable= 70 (91%)	
JAK2V617F; n (%)	50 (72)
CALR tipe-1 and tipe-2; n (%)	14 (20)
MPLW515K/L; n (%)	3 (4)
Triple negative; n (%)	3 (4)
Unfavorable karyotype; n (%) "N" evaluable= 47 (61%)	4 (9)
Hemoglobin <10 g/dl; n (%)	4 (5)
Transfusion dependency; n (%)	3 (4)
Platelets <100 x10 ⁹ /L; n (%)	3 (4)
Leukocytes >25x10 ⁹ /L; n (%)	2 (3)
Circulating blasts $\geq 1\%$; n (%)	8 (10)
Albumin levels < 4.3 mg/dl	56 (73)
Cholesterol levels < 122 mg/dl; n (%)	11 (14)
Circulating CD34+ cells > 15x10 ⁹ /l; n (%)	20 (26)

Tabella 7: Caratteristiche cliniche e laboratoristiche dei 77 pazienti in esame

Si è quindi proceduto a verificare se la conta delle cellule CD34+ circolanti potesse essere un predittore di disfunzione midollare accurato quanto la presenza di blastosi periferica. Per fare ciò, si è innanzitutto proceduto a verificare se nella popolazione in analisi, la soglia di $15 \times 10^9/l$ cellule CD34+ in PMF avesse non solo valore diagnostico, come precedentemente segnalato dal gruppo di Barosi, ma anche valore prognostico. A tal fine sono state create curve di sopravvivenza basate sulla quantità di cellule CD34+ circolanti (figura 16). La sopravvivenza dei due gruppi di pazienti si è ben distinta: in particolare, il gruppo di pazienti con cellule CD34+ circolanti superiori a $15 \times 10^9/l$ (20 pazienti) ha avuto una sopravvivenza globale inferiore (sopravvivenza mediana raggiunta a 6 anni dalla diagnosi), mentre il gruppo con CD34+ circolanti inferiori al valore soglia (57 pazienti) ha avuto una sopravvivenza globale nettamente migliore (sopravvivenza mediana non raggiunta).

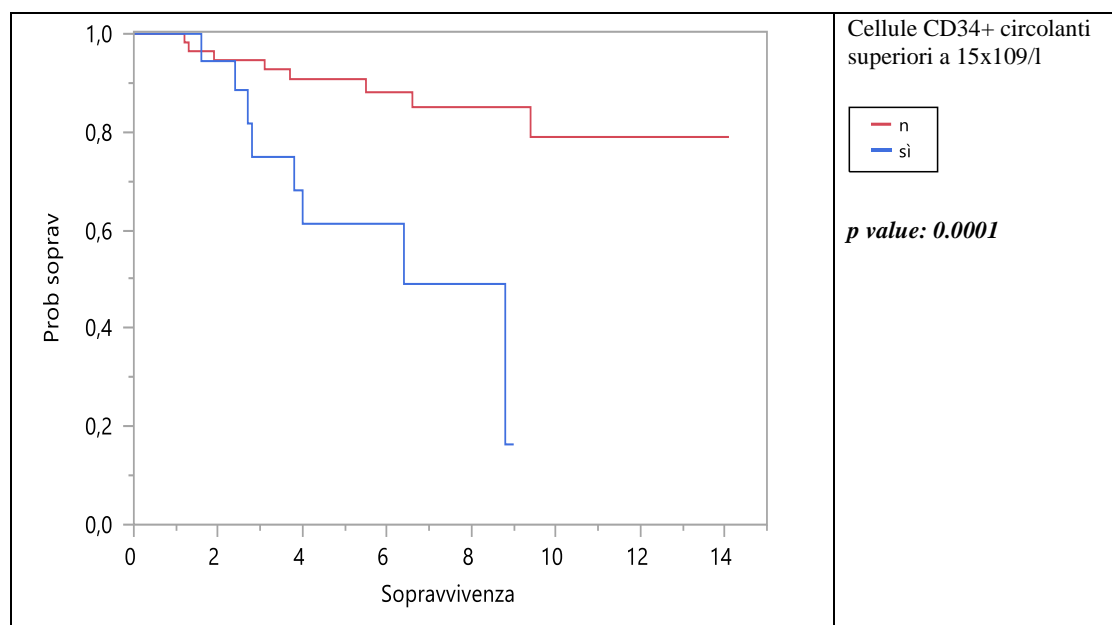


Figura 16 - Analisi di sopravvivenza in base a quantità di cellule CD34+ circolanti all'esordio di malattia

Si è poi passati a valutare il valore predittivo della blastosi periferica nella nostra popolazione (figura 17). Anche in questo caso le curve di sopravvivenza basate sulla presenza o assenza di blastosi periferica hanno mostrato un buon potere predittivo dividendo la popolazione in due gruppi ben distinti. In particolare, il gruppo di pazienti senza blastosi periferica all'esordio (69 pazienti) ha avuto una sopravvivenza globale migliore (sopravvivenza mediana non raggiunta) dei pazienti con percentuali di blasti maggiore o uguale al 1% (8 pazienti) in cui la mortalità è stata più elevata (sopravvivenza mediana raggiunta a 6 anni dalla diagnosi).

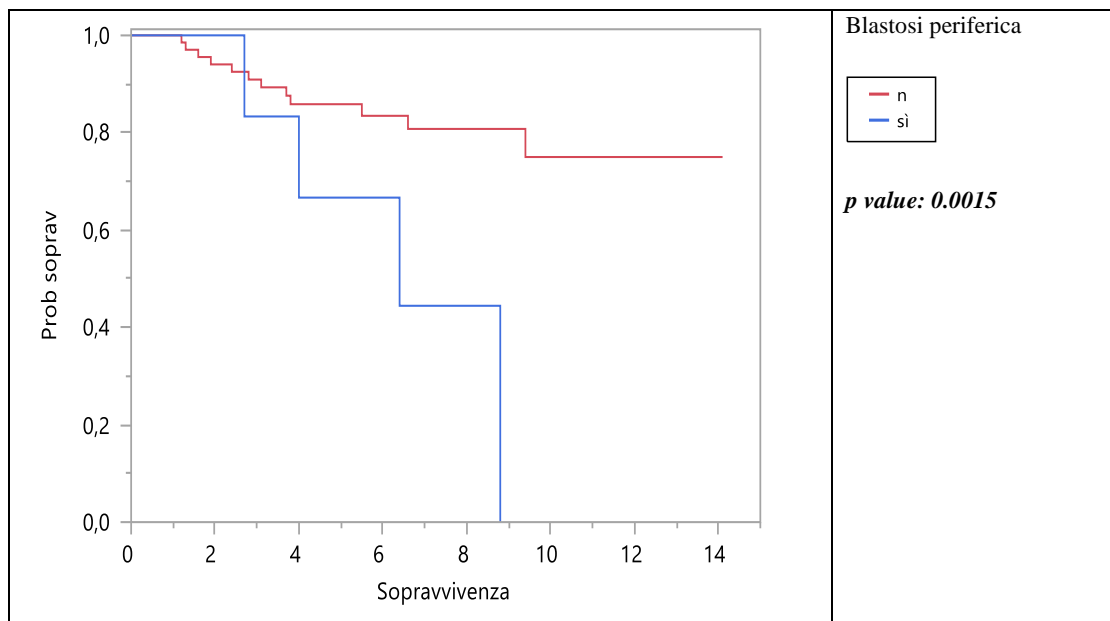


Figura 17 - Analisi di sopravvivenza in base a presenza di blastosi periferica all'esordio di malattia

Entrambe le variabili hanno mostrato dunque potere predittivo per quanto riguarda la sopravvivenza globale dei pazienti con PMF. Tuttavia, come riportato in tabella 8, se confrontate direttamente solo la quantità di cellule CD34+ circolanti rimane significativa ($p = 0.0269$).

Baseline Characteristics	Univariate analysis p value	Multivariate analysis p value
Circulating blasts > or = 1%	0.0111	0.61
Circulating CD34+ cells > 15x10 ⁹ /l	0.0009	0.0269

Tabella 8: Impatto sulla sopravvivenza globale dei blasti e delle cellule CD34+ circolanti all'esordio di malattia

Nella nostra casistica, dunque, il valore prognostico delle cellule CD34+ circolanti non solo sembrerebbe confermato, ma sembrerebbe superiore a quello della quota blastica.

Baseline Characteristics	Circulating CD34+ cells < or = 15x10 ⁹ /l (n=57)	Circulating CD34+ cells > 15x10 ⁹ /l (n=20)	p value
Age >65 years; n (%)	27 (47)	14 (70)	0.11
Presence of constitutional symptoms; n (%)	12 (21)	1 (5)	0.16
Presence of palpable splenomegaly; n (%)	9 (13)	13 (65)	<0.0001
Bone marrow fibrosis degree > or = 2; n (%)	5 (9)	13 (65)	<0.0001
Unfavorable karyotype; n (%) "N" evaluable= 47 (61%)	2 (6)	2 (14)	0.57
Hemoglobin <10 g/dl; n (%)	2 (4)	2 (10)	0.27
Transfusion dependency; n (%)	1 (2)	2 (10)	0.16
Platelets <100 x10 ⁹ /L; n (%)	1 (2)	2 (10)	0.16
Leukocytes >25x10 ⁹ /L; n (%)	1 (2)	1 (5)	0.45
Circulating blasts > or = 1%; n (%)	0	8 (100)	<0.0001

Tabella 9: Fenotipo del paziente con elevate cellule CD34+ circolanti all'esordio di malattia

Per meglio comprendere il ruolo di tale marcatore si è quindi passati all'analisi delle associazioni fenotipiche (tabella 9). Nella nostra casistica livelli incrementati di cellule CD34+ circolanti sono risultati associati non solo a blastosi periferica ($p < 0.0001$), ma anche a livelli di fibrosi midollare più alti ($p < 0.0001$) e a più frequente riscontro di splenomegalia ($p < 0.0001$).

L'analisi si è quindi focalizzata sull'individuazione del miglior marker di disfunzione metabolica indotta dallo stato di ipercatabolismo e dalla deregolazione citochinica tipici del paziente con PMF. In particolare, è stato analizzato il ruolo del cachexia index e della sintomatologia costituzionale e il loro impatto sulla sopravvivenza globale. Si è cominciato verificando se il cachexia index, recentemente proposto dal gruppo di Tefferi mantenesse il suo ruolo predittivo anche nella nostra corte di pazienti. In accordo a quanto proposto dal gruppo americano i pazienti sono stati divisi in gruppi in base alla presenza di 1, 2 o nessun fattore di rischio tra: 1) livelli di colesterolo inferiori a 122 mg/dl; 2) livella di albumina inferiori a 4.3 mg/dl. Ne sono risultate tre curve di sopravvivenza ben distinte (19 pazienti con 0 fattori di rischio, 49 pazienti con 1 fattore di rischio, 9 pazienti con 2 fattori di rischio), che confermano per la prima volta il valore predittivo di questo strumento su una corte esterna. In particolare, le curve di sopravvivenza dei pazienti non ad alto rischio (0 o 1 solo fattore di rischio presenti) non hanno raggiunto la mediana di sopravvivenza, mentre i pazienti con entrambi i fattori di rischio presenti all'esordio di malattia hanno avuto una prognosi nettamente peggiore caratterizzata da una sopravvivenza del 50% a 5 anni dalla diagnosi (figura 18).

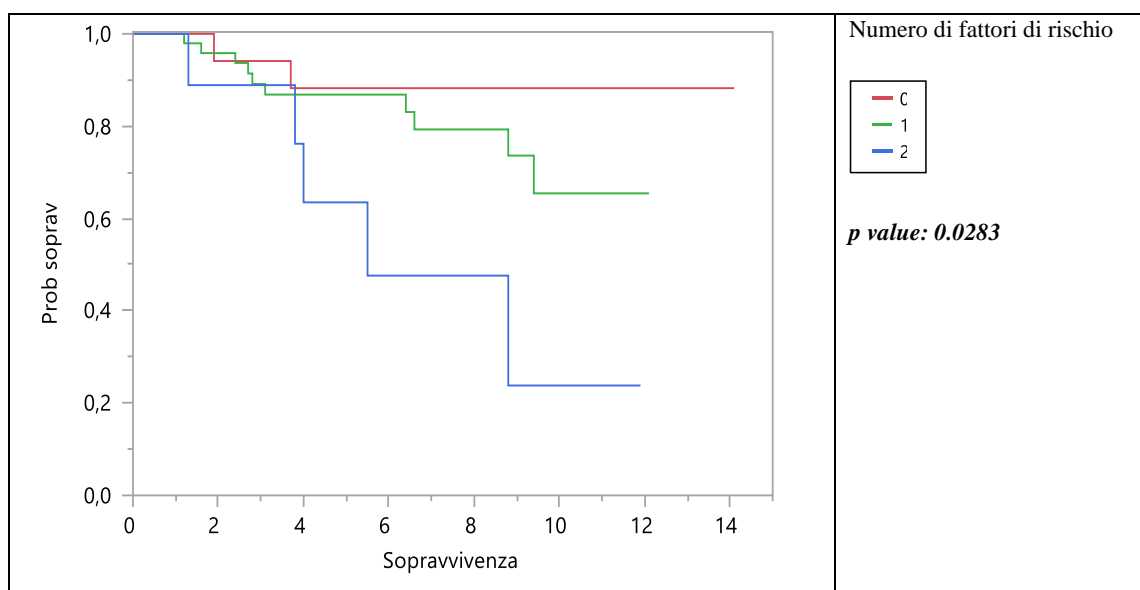


Figura 18: Analisi di sopravvivenza in base al numero di fattori di rischio secondo Cachexia Index

In base a quanto osservato si è deciso di eseguire nuovamente l'analisi di sopravvivenza in base alla presenza o meno di impatto prognostico (figura 19). I pazienti sono stati dunque divisi in soli due gruppi in base alla presenza di alto rischio secondo cachexia index (9 pazienti con entrambi i fattori di rischio sopra menzionati presenti) e non alto rischio secondo cachexia index (68 pazienti con solo uno o nessun fattore di rischio presente). Le due curve sottolineano come una rilevante alterazione del metabolismo (rilevabile dal cachexia index) rappresenti un efficace predittore di mortalità.

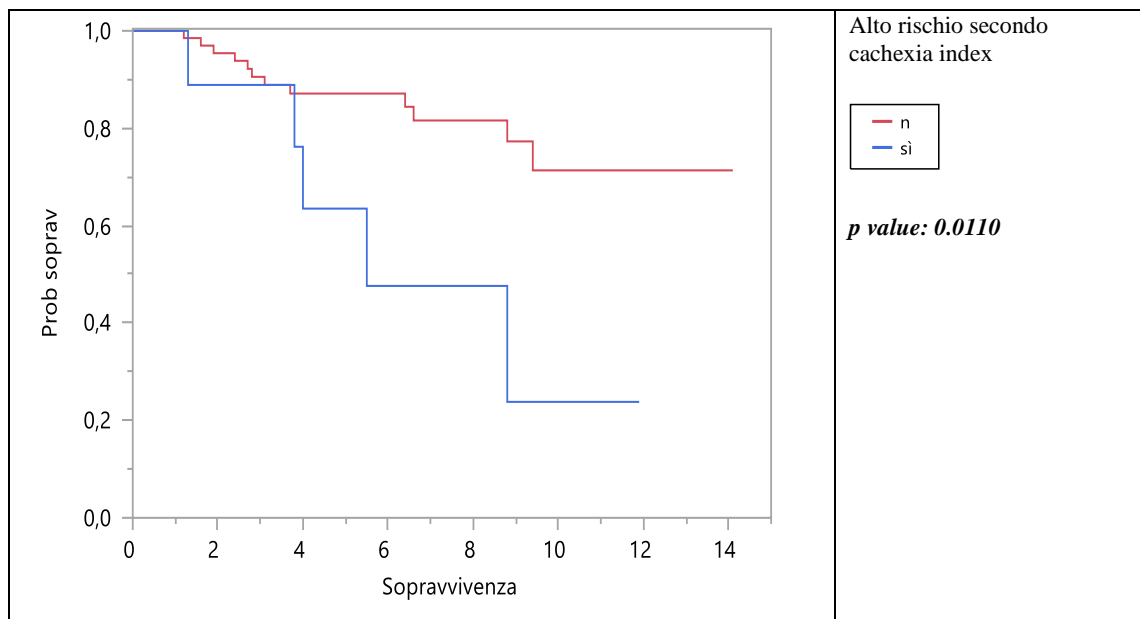


Figura 19: Analisi di sopravvivenza in base alla classe di rischio secondo Cachexia Index

Si è quindi passati ad analizzare l'impatto prognostico legato alla presenza di sintomatologia costituzionale nella nostra popolazione. Anche in questo caso sono state costruite 2 curve secondo il metodo di Kaplan e Meier. Tuttavia, come evidenziabile da figura 20, le due curve hanno andamenti simili e nessuna delle due raggiunge la mediana di sopravvivenza. La presenza di sintomatologia costituzionale all'esordio di malattia nella nostra casistica (13 pazienti) non si traduce dunque in un fattore prognostico predittivo di scarsa sopravvivenza rispetto all'assenza di tale sintomatologia (64 pazienti).

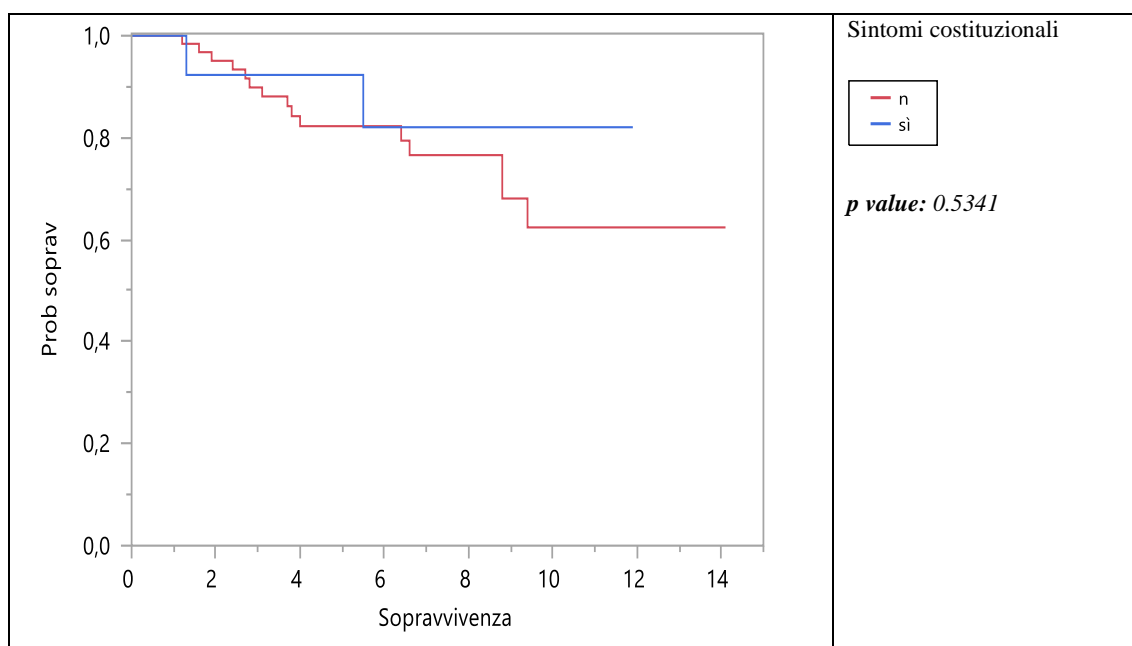


Figura 20: Analisi di sopravvivenza in base alla presenza di sintomi costituzionali

La differente forza predittiva di sintomi costituzionali e cachexia index alto nell'ambito del nostro studio diventa ancor più evidente se viene eseguita il confronto diretto tra le variabili.

Baseline Characteristics	Univariate analysis p value	Multivariate analysis p value
Presence of constitutional symptoms	0.5147	0.19
Cachexia index high	0.0322	0.0157

Tabella 10: Impatto sulla sopravvivenza globale di sintomi costituzionali e cachexia index alto all'esordio di malattia

Come illustrato in tabella 10, un cachexia index elevato è un indicatore di mortalità nettamente più potente della presenza di sintomatologia costituzionale ($p=0.0157$).

Baseline Characteristics	Cachexia index low or intermediate (n=68)	Cachexia index high (n=9)	p value
Age >65 years; n (%)	33 (49)	8 (89)	0.0318
Presence of constitutional symptoms; n (%)	9 (13)	4 (44)	0.0393
Presence of palpable splenomegaly; n (%)	17 (25)	5 (56)	0.10
Bone marrow fibrosis degree > or = 2; n (%)	13 (19)	5 (56)	0.0283
Unfavorable karyotype; n (%) "N" evaluable= 47 (61%)	3 (7)	1 (17)	0.43
Hemoglobin <10 g/dl; n (%)	0	4 (44)	<0.0001
Transfusion dependency; n (%)	0	3 (33)	0.0011
Platelets <100 x10 ⁹ /L; n (%)	2 (3)	1 (11)	0.31
Leukocytes >25x10 ⁹ /L; n (%)	2 (3)	0	1
Circulating blasts > or = 1%; n (%)	5 (7)	3 (33)	0.0468

Tabella 11: Fenotipo del paziente con cachexia index alto all'esordio di malattia

Anche in questo caso per comprendere a pieno il ruolo di tale marker di rischio prognostico è necessario studiarne le associazioni fenotipiche. In tabella 11 è possibile osservare come un paziente con alto cachexia index alla diagnosi oltre ad avere spesso sintomatologia costituzionale ($p=0.393$), sia anche caratterizzato da età significativamente più avanzata ($p=0.0318$), maggior grado di fibrosi midollare ($p=0.0157$), livelli emoglobinici più bassi ($p<0.0001$), necessità di trasfusione dipendenza ($p=0.0011$) e blastosi periferica ($p=0.0468$).

In base a questi dati preliminari, si è deciso di approfondire ulteriormente l'analisi con l'obiettivo di verificare se conta delle cellule CD34+ circolanti e cachexia index potessero rappresentare un'alternativa alle variabili tradizionali all'interno dei sistemi di scoring prognostico. Si è proceduto quindi a incorporare i dati relativi ai livelli di cellule CD34+ circolanti e cachexia index all'interno degli score di rischio classico al posto di sintomi costituzionali e della quota blastica. Dagli score IPSS, DIPSS e DIPSS+ sono stati generati gli score modified-IPSS, modified-DIPSS e modified-DIPSS+. Per facilitare l'analisi ed evidenziare le differenze prognostiche tra gli score classici e quelli modificati si è deciso di dividere in pazienti a rischio maggiore (comprendente i pazienti a rischio alto e intermedio-2) da quelli a rischio minore (comprendente i pazienti a rischio intermedio 1 e basso) in accordo ai rispettivi sistemi di stratificazione. Ne sono risultati i seguenti gruppi: rischio maggiore IPSS (17 pazienti), rischio minore IPSS (60 pazienti), rischio maggiore DIPSS (5 pazienti), rischio minore DIPSS (72 pazienti), rischio maggiore DIPSS+ (19 pazienti), rischio minore DIPSS+ (32 pazienti), rischio maggiore modified-IPSS (18 pazienti), rischio minore modified-IPSS (59 pazienti), rischio maggiore modified-DIPSS (8 pazienti), rischio minore modified-DIPSS (69 pazienti), rischio maggiore modified-DIPSS+ (19 pazienti), rischio minore modified-DIPSS+ (32 pazienti). Infine, sono stati confrontati gli scores di rischio classici e quelli modificati.

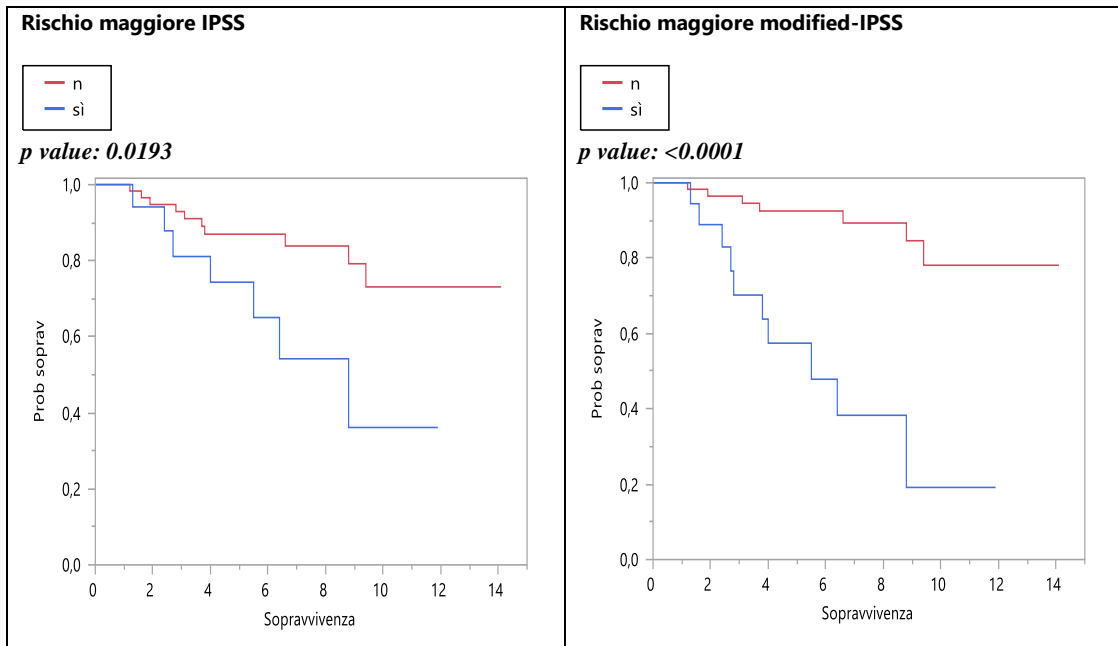


Figura 21 - Analisi di sopravvivenza in base alla presenza o assenza di rischio maggiore IPSS e modified-IPSS

	<i>p value</i>
Rischio maggiore IPSS	0.0346
Rischio maggiore modified-IPSS	0.0001

Tabella 12: Impatto sulla sopravvivenza globale del rischio maggiore IPSS e modified-IPSS

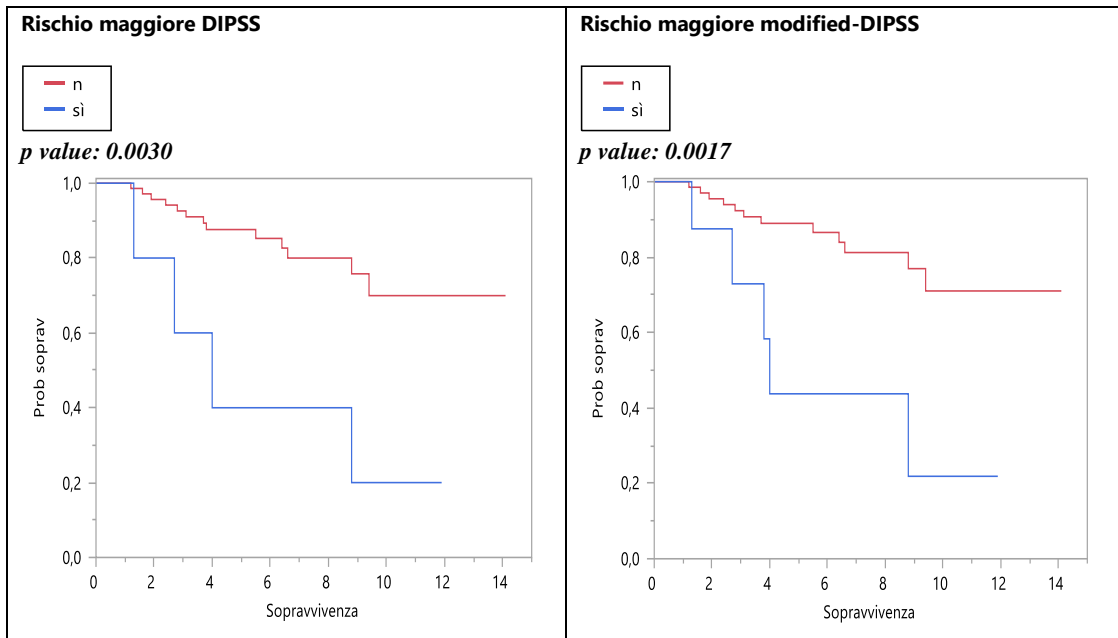


Figura 22 - Analisi di sopravvivenza in base alla presenza o assenza di rischio maggiore DIPSS e modified-DIPSS

	<i>p value</i>
Rischio maggiore DIPSS	0.0206
Rischio maggiore modified-DIPSS	0.0119

Tabella 13: Impatto sulla sopravvivenza globale del rischio maggiore DIPSS e modified-DIPSS

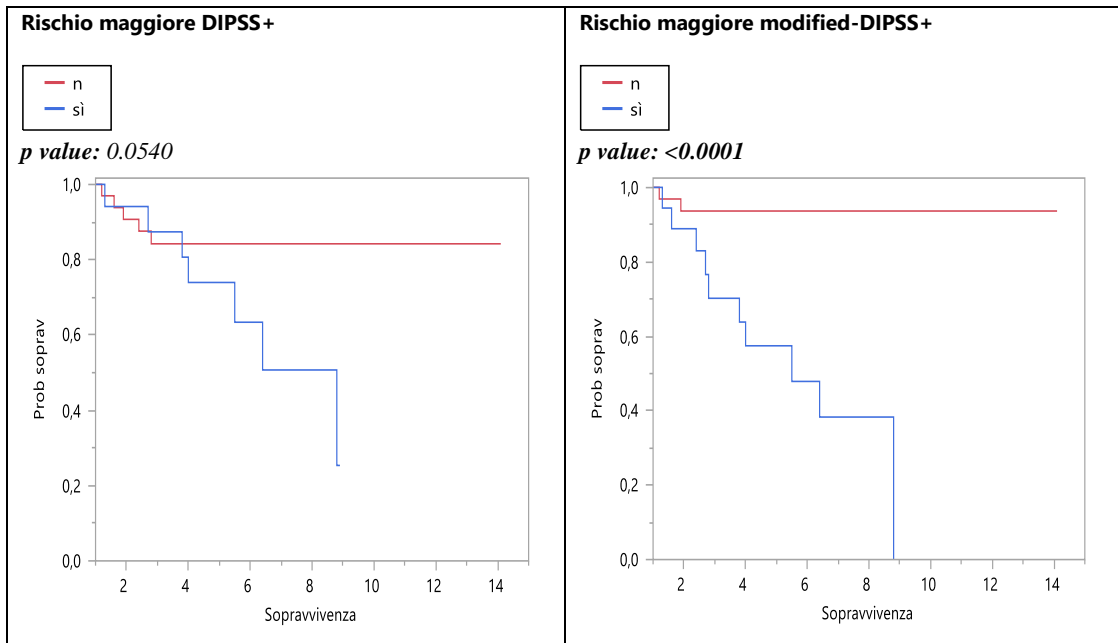


Figura 23 - Analisi di sopravvivenza in base alla presenza o assenza di rischio maggiore DIPSS+ e modified-DIPSS+

	<i>p value</i>
Rischio maggiore DIPSS+	<i>0.06</i>
Rischio maggiore modified-DIPSS+	<i>0.0001</i>

Tabella 14: Impatto sulla sopravvivenza globale del rischio maggiore DIPSS+ e modified-DIPSS+

Come emerge dalle figure 21, 22, 23 e dalle relative tabelle (12, 13 e 14) sopra riportate, tutti gli score di rischio clinico classici, non solo non hanno perso potere predittivo, ma hanno anzi beneficiato in termini di accuratezza prognostica dell'integrazione delle nuove variabili cliniche. Si è quindi cercato di capire quali fossero i tassi di sopravvivenza a cinque anni nei pazienti con rischio maggiore secondo gli score modificati.

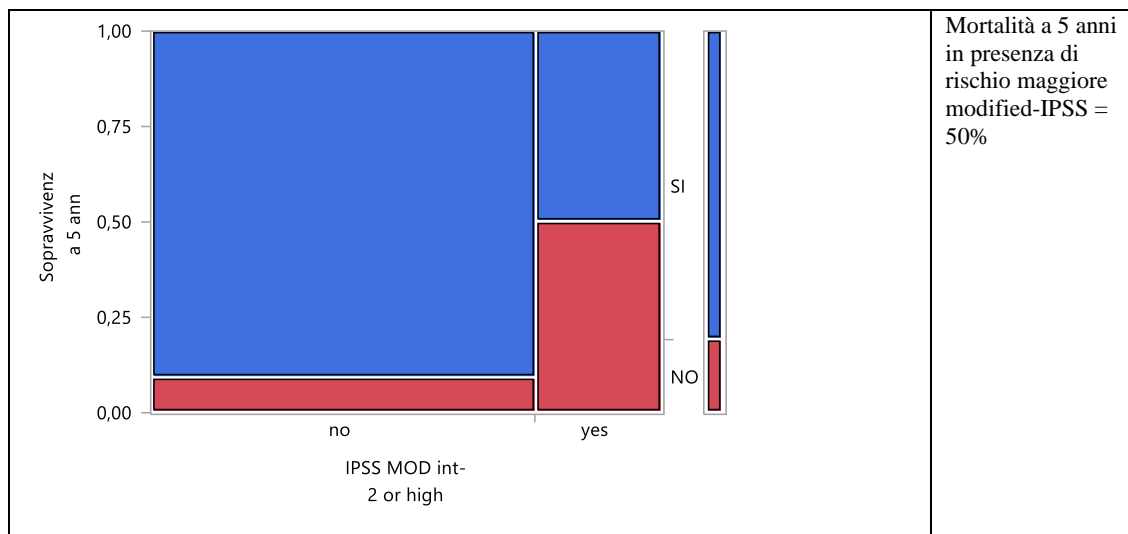


Figura 24 - Tassi di sopravvivenza a 5 anni in presenza di rischio maggiore modified-IPSS

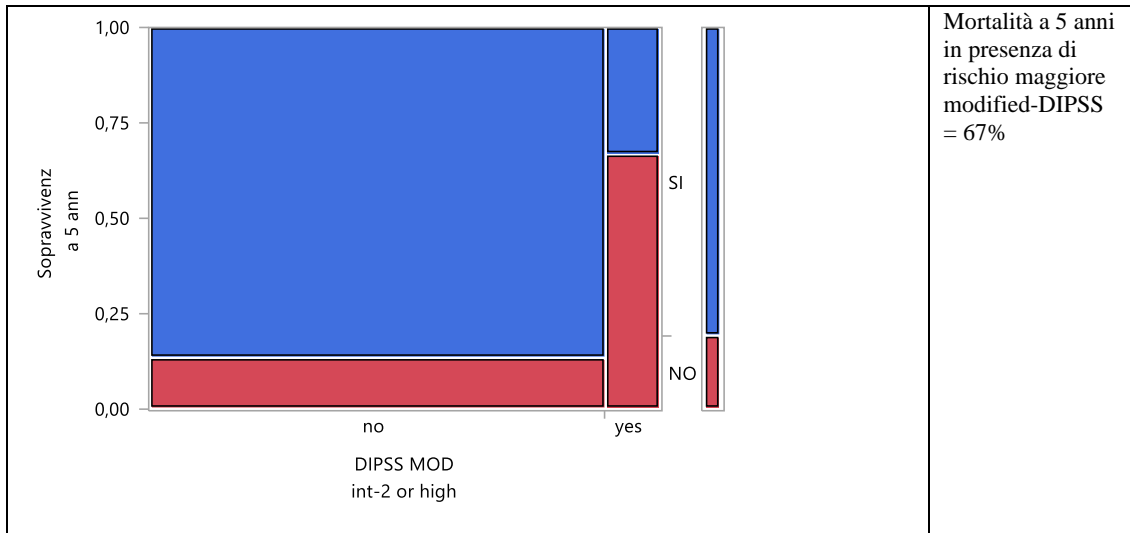


Figura 25 - Tassi di sopravvivenza a 5 anni in presenza di rischio maggiore modified-DIPSS

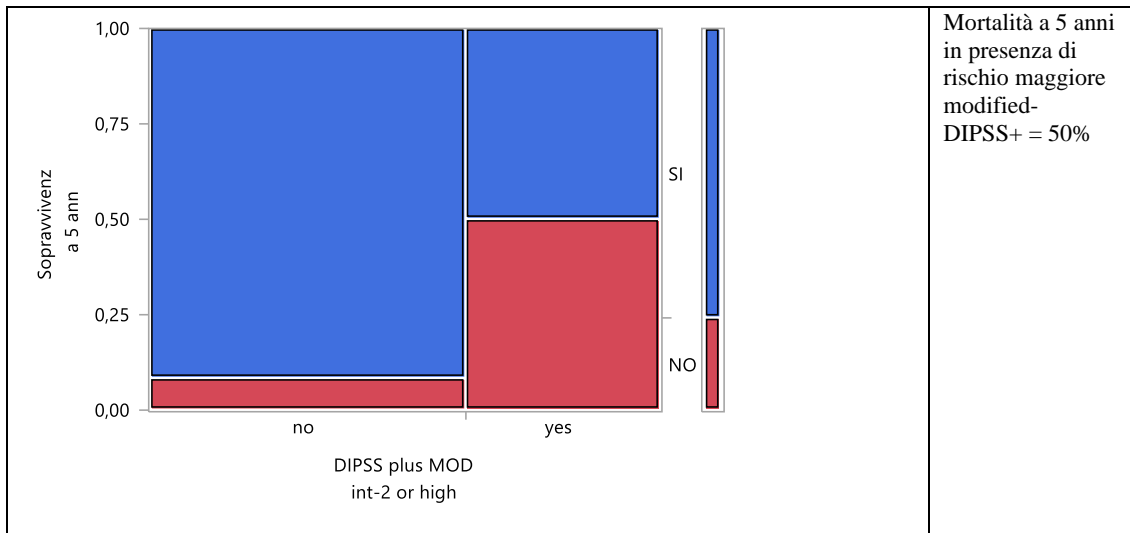


Figura 26 - Tassi di sopravvivenza a 5 anni in presenza di rischio maggiore modified-DIPSS+

Nella nostra popolazione, la mortalità a 5 anni (figure 24, 25 e 26) in presenza di rischio maggiore secondo modified-IPSS, modified DIPSS e modified DIPSS+ è stata rispettivamente del 50%, 67% e 50%. Attraverso l'utilizzo di tali score è dunque possibile già alla diagnosi individuare un gruppo di pazienti con decorso particolarmente infausto e potenzialmente candidabili a trattamenti maggiormente intensivi.

2.4 – Discussione

Nel corso degli ultimi 15 anni le progressive scoperte in ambito di biologia molecolare ci hanno aiutato a caratterizzare sempre meglio la PMF. È oggi evidente che tale malattia sia caratterizzata da un decorso eterogeneo sia in termini di burden di malattia, che in termini di tempo alla progressione. Tale variabilità è il risultato di un processo multifattoriale estremamente complesso. In particolare, per quanto riguarda la prognosi giocano sicuramente un ruolo di primaria importanza non solo il processo di proliferazione clonale, ma anche la progressiva disfunzione midollare e lo stato ipermetabolico/cachettico secondario all'infiammazione cronica che accompagna la patologia.

Dal momento che l'aspettativa di vita è estremamente variabile, si pone dunque la necessità di personalizzare l'approccio terapeutico in base alle caratteristiche specifiche del paziente. Se fino a pochi anni fa infatti le opzioni terapeutiche in questo setting erano limitate, oggi l'orizzonte del trattamento si è esteso enormemente e pone il clinico di fronte a sfide complesse. Da un lato, infatti, il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche rappresenta ancora l'unica modalità curativa, sebbene caratterizzata da un alto tasso di mortalità e morbidità. Dall'altro nel corso degli ultimi 10 anni sono emersi numerosi nuovi farmaci a bersaglio molecolare potenzialmente in grado di cambiare la storia naturale della patologia, ma che richiedono un attento monitoraggio e selezione del paziente.

Per identificare i pazienti con peggior aspettativa di vita, che potrebbero potenzialmente beneficiare di una precoce intensificazione della strategia terapeutica, dal 2009 ad oggi sono stati creati diversi modelli prognostici. In particolare, con l'avvento della Next Generation Sequencing (NGS) sono stati prodotti nuovi scores che integrano le informazioni di biologia molecolare permettendo una selezione più accurata del paziente a rischio di evoluzione di malattia. Il limite principale legato all'utilizzo di tali strumenti di stratificazione del rischio è legato alla limitata disponibilità dell'analisi NGS (analisi caratterizzata da costi elevati), che viene normalmente eseguita su pazienti selezionati in cui la malattia è particolarmente attiva e vi è un rischio evolutivo maggiore. Rimangono dunque oggi di essenziale importanza gli score di rischio clinico classici (basati su variabili cliniche) in grado non solo di garantire il monitoraggio del paziente con PMF, ma anche in grado di rilevare alterazioni dell'attività di malattia meritevoli di ulteriori approfondimenti molecolari.

La maggior parte degli scores prognostici, tuttavia, includono variabili cliniche scarsamente standardizzate e rischiano di sottostimare i pazienti con aspettativa di vita ridotta.

In particolare, la conta dei blasti circolanti è un predittore di mortalità che riflette sia la disfunzione midollare secondaria al processo fibrotico, sia la progressione leucemica di malattia. Il ruolo prognostico della blastosi periferica è stato confermato in numerosi studi, tuttavia, il suo potere predittivo rimane limitato dall'essere operatore-dipendente, dalla difficoltà di rilevazione di tale variabile in specifiche condizioni e della bassa soglia di blasti circolanti necessaria a fare di questa variabile un fattore di rischio (blasti $> 0 = 1\%$).

Analoghe considerazioni possono essere fatte per la presenza o assenza di sintomatologia costituzionale. Tale condizione è infatti specchio del dismetabolismo associato al processo infiammatorio cronico che accompagna la PMF. Anche in questo caso il ruolo prognostico di tale predittore di sopravvivenza è stato confermato in numerosi studi, tuttavia la corretta rilevazione di questi sintomi non è semplice. Sebbene vi siano numerosi questionari per la rilevazione della sintomatologia costituzionale del paziente con PMF il loro utilizzo nella quotidiana pratica clinica non è sempre agevole. Inoltre, la rilevazione del dato non dipende esclusivamente dall'operatore, ma anche dal paziente ed è dunque difficilmente oggettivabile.

È stato obiettivo di questo studio verificare se fosse possibile migliorare la performance degli scores prognostici attuali utilizzando parametri più oggettivi. La variabile scelta come potenziale indice di disfunzione midollare è stata la conta delle cellule CD34+ su sangue periferico, mentre per quanto riguarda lo stato ipermetabolico/infiammatorio si è deciso di utilizzare il cachexa index recentemente proposto dal gruppo Mayo Clinic. La ricerca ha tentato di chiarire il ruolo di questi predittori di sopravvivenza e di delinearne un ruolo nel contesto della PMF.

Per quanto riguarda i livelli di cellule CD34+ circolanti all'esordio di malattia, nella nostra corte di pazienti, è emerso, innanzitutto, che il valore di cut-off di $15 \times 10^9/L$ cellule CD34 + circolanti, identificato in lavori precedenti come predittore della diagnosi di PMF, è anche un marker prognostico associato a ridotta aspettativa di vita. In considerazione delle associazioni fenotipiche (blastosi periferica, alto grado di fibrosi midollare e splenomegalia) è verosimile che il ruolo prognostico di questo marker sia correlato a un elevato livello di disfunzione midollare, piuttosto che a possibili quadri di evoluzione leucemica.

I livelli di CD34+ circolanti hanno inoltre dimostrato un maggior potere predittivo nel discriminare i pazienti con bassa aspettativa di vita rispetto alla blastosi periferica. Il potere predittivo maggiore delle cellule CD34+ potrebbe sia risiedere nella tecnica utilizzata per rilevare le due variabili (citofluorimetria per le cellule CD34+, conta manuale per le cellule blastiche), sia riflettere una maggior sensibilità delle cellule CD34+ nel rilevare un quadro di disfunzione midollare più precoce. Bisogna infatti ricordare che entrambe queste variabili sono in grado di riflettere non solo il sovvertimento midollare, ma anche l'evoluzione di malattia. È verosimile che la blastosi periferica, infatti, sia maggiormente specifica nel predire l'evoluzione leucemica (e quindi si alteri maggiormente in fasi avanzate), mentre l'incremento di cellule CD34+ circolanti sia un marker più sensibile di disfunzione midollare (e quindi sia associato a fasi di malattia più precoci). Il ruolo della blastosi periferica non perderebbe dunque la sua importanza ma verrebbe ridefinito poiché associato a stadi più avanzati di malattia (sebbene il cut-off sarebbe verosimilmente da rivalutare).

Per quanto riguarda il cachexia index invece si è proceduto per la prima volta ad una valutazione su una corte esterna. Lo strumento di rischio prognostico del gruppo di Tefferi ha confermato il proprio potere predittivo sebbene dall'analisi sia emerso come necessaria una rilevante alterazione del metabolismo perché questa possa avere un impatto sulla sopravvivenza globale. La classe di alto-rischio secondo cachexia index è infatti associata ad una bassa aspettativa di vita è dunque un buon predittore di mortalità. Il cachexia index elevato sembrerebbe essere marker capace di rilevare l'impatto prognostico di diverse condizioni: età avanzata, infiammazione cronica (sintomi costituzionali), malattia avanzata (fibrosi avanzata e blastosi periferica), anemia (livelli emoglobinici inferiori a 10 g/dl e trasfusione dipendenza). È possibile, inoltre, che su questo indicatore prognostico possano influire anche fenomeni di senescenza cellulare e comorbidità tipiche di un paziente anziano e con malattia in fase avanzata in cui la disfunzione metabolica può rappresentare una problematica maggiore. Non solo, dunque, una rilevazione più oggettiva della variabile, ma anche una differente sensibilità potrebbero rendere ragione del differente potere prognostico. Anche in questo caso bisogna dunque sottolineare che il ruolo dei sintomi costituzionali come predittore di mortalità, già confermato in numerosi studi, non verrebbe messo in discussione, ma potrebbe essere integrato da un indicatore di condizioni non legate esclusivamente allo stato infiammatorio di malattia che possono incidere sull'aspettativa di vita del paziente (copatologie, età avanzata, disfunzioni indotte da una malattia avanzata, anemia).

Si è quindi passati ad integrare le due nuove variabili, sostituendole alle precedenti, negli score di rischio classico. È stato poi effettuato un confronto tra gli scores di rischio classici e quelli modificati sulla base della presenza o assenza di rischio maggiore (inteso come presenza di rischio intermedio-2 o alto rischio in accordo ai vari score). I tre score di rischio modificati hanno mostrato un potere predittivo superiore rispetto a quelli tradizionali. L'integrazione di queste variabili è stata dunque in grado di individuare una quota di pazienti che sarebbero stati normalmente considerati a rischio intermedio-1 o basso secondo IPSS, DIPSS o DIPSS+, ma caratterizzati da bassa aspettativa di vita.

L'aspettativa di vita a 5 anni per i pazienti con rischio maggiore alla diagnosi è stata infatti pari o inferiore al 50%. Il gruppo di pazienti a rischio maggiore sarebbe dunque risultato meritevole di intensificazione del percorso terapeutico (trapianto; valutazione alternative terapeutiche) o a intensificazione del follow-up.

I dati emersi da questo studio, dunque, non solo confermano che la valutazione dei livelli delle cellule CD34+ circolanti e del cachexia index potrebbero essere variabili utili a standardizzare gli score di rischio, ma che l'incorporazione delle informazioni relative a queste due variabili all'interno di tali scores potrebbe anche incrementarne il loro potere predittivo. Naturalmente questo studio pilota è caratterizzato dai limiti intrinseci legati alla scarsa numerosità del campione e all'assenza di validazione su popolazioni esterne, ma proprio per l'importanza delle implicazioni sopra descritte sarà presto condotto uno studio di conferma su una popolazione allargata. In particolare, si cercherà di valutare: 1) l'utilità dei livelli delle cellule CD34+ come marker dinamico e la possibile interferenza delle terapie citoreduttive; 2) il ruolo del cachexia index nel paziente anziano con comorbidità; 3) l'utilità di cachexia index e livelli di CD34+ circolanti come predittori di risposta precoce al trattamento con inibitori di JAK2.

CHAPTER 1

Introduction

1– Chronic myeloproliferative diseases

The concept of "myeloproliferative disorders" was introduced in 1951 by William Dameshek in an editorial on Blood. [1] This group of diseases was characterized by the excessive presence of mature cells in the peripheral blood and the hyperproliferation of multiple cell lines in the bone marrow. These two main features were also sometimes associated with hepatosplenomegaly, bone marrow fibrosis, and leukemic progression. Dameshek proposed "myeloproliferative disorders" to indicate that these entities could represent a continuum of related syndromes.



Image 1 – William Dameshek.

However, the concept of "myeloproliferative neoplasms" (MPN) was introduced only in 2008, underlying the clonal nature of these pathologies linked to the uncontrolled proliferation of myeloid stem progenitor cells. [2] Over time, the pathogenetic classification has been enriched. Nowadays, seven main disease groups are recognized based on specific genetic, morphological, and clinical characteristics (Table 1). [3]

Chronic myeloproliferative diseases - WHO (2016)	
1 - Chronic myeloid leukemia, BCR/ABL positive (CML)	
2 - Polycythemia vera (PV)	
3 - Essential thrombocythemia (ET)	
4 - Primary myelofibrosis (PMF)	c. in prefibrotic stage (early stage) d. in overt fibrotic stage
5 - Chronic eosinophilic leukemia not otherwise specified (CEL, NOS)	
6 - Chronic Neutrophil Leukemia (CNL)	
7 - Unclassifiable chronic myeloproliferative disease (MPN-U)	

Table 1 – Classification of chronic myeloproliferative diseases, WHO 2016.

Among these diseases, thanks to the specific cytogenetic characteristics described by Nowell and Hungerford in 1960 in Philadelphia, it was soon possible to isolate chronic myeloid leukemia. [4] This pathology is distinguished from the others by the chromosomal translocation between the Abelson gene (ABL) on chromosome 9 and the breakpoint cluster region (BCR - breakpoint cluster region) on chromosome 22. The so-called "Philadelphia chromosome" formation stimulates leukemic proliferation by producing a constitutively active kinase on myeloblasts.

In contrast to chronic myeloid leukemia, the remaining myeloproliferative disorders have historically been called "Philadelphia-negative". Although the "Philadelphia-negative myeloproliferative disorders" include highly different entities, grouping some of them into a single family based on epidemiological and clinical characteristics was soon possible. The subgroup of "classic Philadelphia-negative chronic myeloproliferative diseases" includes polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET), and primary myelofibrosis (PMF). Although characterized by shared features, these pathologies have long remained orphans of a common etiology. The unifying genetic basis emerged only in 2005 with the discovery of the JAK2 V617F mutation present, with different frequencies, in all three pathologies. [5-9] For this reason, it is now possible to refer to this group of pathologies also with the term "JAK2-associated myeloproliferative diseases".

2 – JAK2 associated myeloproliferative disorders

JAK2-associated myeloproliferative disorders are rare malignancies (incidence of approximately 6 per 100,000 person-years), predominantly involving middle-aged or elderly patients. [10, 11] As reported in Table 2, the nosological classification into three separate entities is still of fundamental importance at the prognostic level. Although all three pathologies have a lower average life expectancy than the general population, the survival rate decreases, passing from ET to PV and from the latter to PMF. [12, 13]

	Clinical and morphological features	Driver genes	Relationships between genotype, phenotype, and clinical outcome
PV	Erythrocytosis frequently combined with thrombocytosis and/or leukocytosis (that is, polycythemia) and typically associated with suppressed endogenous erythropoietin production. Bone marrow hypercellularity for age with trilineage growth (that is, panmyelosis)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>JAK2</i> (V617F) in about 96% of patients • <i>JAK2</i> exon 12 mutations in about 4% of patients (isolated erythrocytosis in most of these patients) • Patients with wild-type <i>JAK2</i> extremely rare, if any 	<ul style="list-style-type: none"> • PV patients are at increased risk of thrombosis • PV may progress to myelofibrosis and less commonly to a blast phase similar to AML, sometimes preceded by a myelodysplastic phase
ET	Thrombocytosis. Normocellular bone marrow with proliferation of enlarged megakaryocytes	<ul style="list-style-type: none"> • <i>JAK2</i> (V617F) in 60%-65% of patients • <i>CALR</i> exon 9 indels in 20%-25% of patients • <i>MPL</i> exon 10 mutations* in about 4%-5% of patients • Noncanonical <i>MPL</i> mutations* in <1% of patients • About 10% of patients do not carry any of the above somatic mutations (the so-called triple-negative cases) 	<ul style="list-style-type: none"> • ET involves increased risk of thrombosis and bleeding, and may progress to more aggressive myeloid neoplasms • <i>JAK2</i> (V617F)-mutant ET involves a high risk of thrombosis, and may progress to PV or myelofibrosis • <i>CALR</i>-mutant ET involves lower risk of thrombosis and higher risk of progression to myelofibrosis • Triple-negative ET is an indolent disease with low incidence of vascular events
PMF	<p><u>Prefibrotic PMF</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Various abnormalities of peripheral blood • Granulocytic and megakaryocytic proliferation in the bone marrow with lack of reticulin fibrosis <p><u>Overt PMF</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Various abnormalities of peripheral blood. Bone marrow megakaryocytic proliferation with atypia, accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis grades 2/3. Abnormal stem cell trafficking with myeloid metaplasia (extramedullary hematopoiesis in the liver and/or the spleen) 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>JAK2</i> (V617F) in 60%-65% of patients • <i>CALR</i> exon 9 indels in 25%-30% of patients • <i>MPL</i> exon 10 mutations* in about 4%-5% of patients • Noncanonical <i>MPL</i> mutations* in <1% of patients • About 5%-10% of patients do not carry any of the above somatic mutations (the so-called triple-negative cases) 	<ul style="list-style-type: none"> • PMF is associated with the greatest symptom burden and the worst prognosis within MPNs, with a variable risk of progression to AML • <i>CALR</i>-mutant PMF is associated with longer survival compared with other genotypes • <i>JAK2</i> (V617F)- and <i>MPL</i>-mutant PMF have worse prognosis than <i>CALR</i>-mutant PMF • Triple-negative PMF is an aggressive myeloid neoplasm characterized by prominent myelodysplastic features and high risk of leukemic evolution

Table 2 - Associated JAK2 myeloproliferative disorders: clinical, morphological and molecular features.

Over the past decade, a better understanding of the molecular-genetic basis of these diseases has dramatically facilitated diagnosis and treatment. Besides the already mentioned JAK2 V617F mutation, the role of the MPL mutations associated with the onset of ET and PMF has been clarified as well as the role of the JAK2 exon 12 mutations associated with the onset of PV and, finally, that of the CALR mutations associated with the onset of ET and PMF. [14-17]

However, despite the new knowledge derived from molecular biology, the correct diagnostic classification of these pathologies is still difficult today due to the lack of specific cytogenetic alterations and the frequent overlapping of clinical onset pictures. The differential diagnosis includes myeloproliferative neoplasms (including the less common forms), myelodysplastic syndromes, and reactive forms. [18] The following is a summary of the main features of JAK2-associated myeloproliferative disorders. [19]

3 – Primary myelofibrosis

PMF is a disease belonging to the group of JAK2-associated myeloproliferative disorders. Gustav Heuck first described it in 1879. The German surgeon described two cases of osteosclerosis with associated hepatosplenomegaly. Patients also had anemia, nucleated red blood cells, and leukocytosis with atypical white blood cells. [20] Heuck was, therefore, the first to highlight the fibrotic process by emphasizing the difference between chronic myeloid leukemia and PMF.

The name primary myelofibrosis highlights the two fundamental characteristics of this pathology: on the one hand, the chronic fibrotic process to which these patients are subjected, and on the other, how this process is not secondary to another condition. Following the recommendations of the 2016 revised international guidelines, in order to obtain the correct diagnostic classification it is necessary to exclude the fact that this fibrosis represents the result of another myeloproliferative disease (secondary myelofibrosis). [21]

The epidemiology

There are no validated data on the prefibrotic stage; therefore, all epidemiological data refer to PMF in the fibrotic stage. As regards the incidence, several studies have documented an annual incidence of between 0.22 and 0.99 cases per 100,000 inhabitants, with an overall incidence of 0.47 cases per 100,000 inhabitants per year. [22] The pathology is prevalent in male patients and elderly patients. In particular, an extensive series of patients followed up at the Mayo Clinic report an average age at diagnosis of about 67 years, with a male-female ratio of 1.6. In this series, only 2% received a diagnosis before 30. [23] A higher incidence of PMF was then recorded in people of Ashkenazi Jewish descent. [24]

As regards the predisposing factors, considering the recurrence of myeloproliferative diseases in some families, a possible genetic predisposition was investigated. [25] This predisposition was confirmed with the identification of subjects carrying a particular JAK2 haplotype (called "46/1" or "GGCC") which is associated with an increased incidence of MPN. [26] Carriers of this genetic variant (24% of the European population) have an approximately 3-4 times higher risk of developing MPN. From the point of view of environmental risk factors, no significant associations with PMF have been documented, although correlations with radiation, benzene, and industrial solvents have

been suggested. [27-29]

The molecular basis

The uncontrolled proliferation of granulopoiesis and thrombopoiesis precursors in the bone marrow characterizes PMF. In particular, the megakaryocytic clone would play a prominent role in establishing the fibrotic picture characteristic of this pathology by releasing the fibrogenic stimuli underlying the increase in fiber deposition in the marrow microenvironment. [30-32]

The first event to determine the onset of the myeloproliferative disease is, therefore, a "driver" mutational event which is able to determine the appearance of this neoplastic clone.

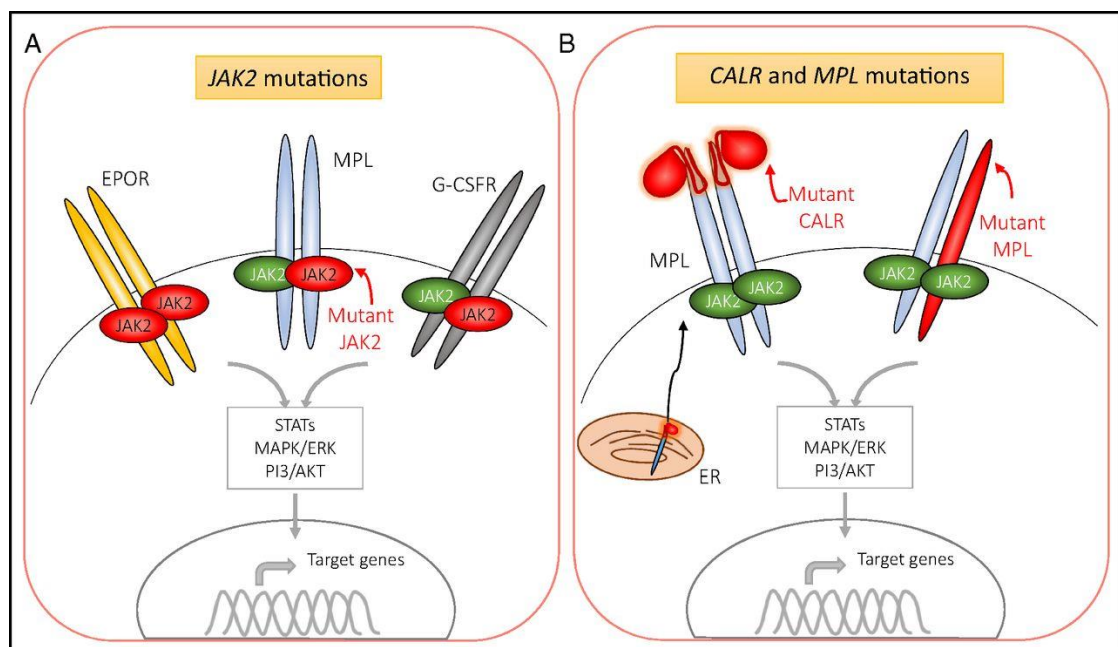


Figure 2 – JAK2, CALR and MPL mutations lead to excessive myeloproliferation by constitutively activating the JAK-STAT signaling pathway

As shown in Figure 2, three "driver" mutations (generally mutually exclusive) are mainly involved in the development of PMF. Mutations affecting the genes JAK2 (Janus kinase 2; located on chromosome 9p24), CALR (calreticulin; located on chromosome 19p13.2), and MPL (myeloproliferative leukemia virus; located on chromosome 1p34) lead in fact to the constitutional activation of the of JAK-STAT signaling, making the neoplastic clone independent of the action of growth factors. [33] These molecular lesions have been identified in the last twenty years thanks to the availability of increasingly in-depth molecular biology investigations.

In 2005, 4 groups of independent researchers identified the presence of the V617F point mutation in the JAK2 gene, located on the short arm of chromosome 9. [6-8, 34] The mutation arises spontaneously in a pluripotent stem cell. However, it only affects myeloid cells with receptors for erythropoietin, G-CSF, and thrombopoietin. The Jak2 protein is, in fact, usually present in an inactive form on the intracytoplasmic portion of these receptors. Stimulation by the respective ligands typically results in the dimerization of the Jak2 protein and the activation of several intracellular signal transduction pathways (STAT3/5, MAPK, PI3K), resulting in the induction of cell proliferation, differentiation, and survival. [35] The V617F mutation causes a reduction in the ability of the Jak2 protein to inactivate itself and, consequently, an increase in signal transduction and a greater degree of proliferation. [36-37]

In 2006, activating mutations were identified in codon 515 (W515L, W515K) and, more rarely, in codon 505 (S505N) of the MPL gene. [38] This gene encodes the thrombopoietin receptor, which usually promotes megakaryocyte proliferation and plays a role in maintaining hematopoietic stem cells within the bone marrow through the same signal transduction pathways activated by JAK2. MPL mutations make the thrombopoietin receptor constitutively active. The resulting increase in the proliferative drive is similar to that caused by the JAK2 V617F mutation.

Finally, in 2013, thanks to more sophisticated genetic sequencing techniques, recurrent insertions and deletions were identified in exon 9 of the CALR gene, encoding for the protein calreticulin. [16-17] Calreticulin is a protein located in the endoplasmic reticulum and is mainly involved in folding newly synthesized glycoproteins and calcium homeostasis. All observed mutations cause a frameshift, which results in the production of a neomorphic protein with a different C-terminal portion. These mutated proteins are thought to directly or indirectly activate the thrombopoietin receptor, activating signal transduction pathways (STAT3/5, MAPK, PI3K), resulting in cell proliferation. [39-42] As shown in Figure 3, the mutations listed above are, therefore, responsible for the onset of most PMFs. In particular, the JAK2 mutation is present in 50-60% of cases, insertions or deletions of the CALR gene are found in 20-25% of cases, and mutations of the MPL gene are detectable in 6-7% of cases. [43] In about 10-15% of cases, however, it is impossible to identify any genetic lesion. This subgroup of patients is referred to as "triple negative". [12, 44] It seems appropriate to underline that the simple acquisition of one of these mutations does not necessarily lead to clonal expansion. This further step requires a permissive microenvironment where the cell can find an evolutionary advantage. [43]

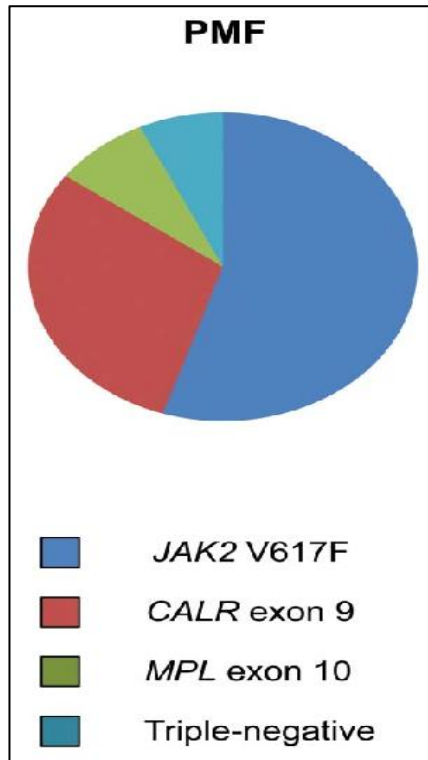


Figure 3 - Frequency of "driver" mutations in Primary Myelofibrosis

The "driver" mutational status influences disease phenotype and patient prognosis. [45-47] As shown in Table 3, the presence of CALR type 1 mutation significantly impacts overall survival with increased life expectancy.

Mutation	Mutational frequency	Phenotypic implications	Prognostic implications
JAK2V617F	50–60%	Older age Higher hemoglobin level Higher WBC count Lower PLT count Highly thrombophilic	Compared with CALR+, MPL+, and triple-negative cohorts: Intermediate overall survival [6]
CALR	20–25% overall Up to 74% cases of JAK2/MPL unmutated [5*]	Compared with JAK2V617F+: Less thrombophilic [26*]	Compared with JAK2V617F+ and triple-negative cohorts (type 1/2 variants confounded): Lower DIPPS plus scores [5*] Lower rates leukemic transformation [6,37] Superior overall survival [5*]
CALR type 1/like Exon 9, 52-bp deletion	~70% of CALR mutations	Compared with JAK2V617F+: Younger age Less frequent anemia Less frequent leukocytosis Higher PLT count [28,36]	Compared with JAK2V617F/CALR type 2/MPL-mutated or triple-negative: Superior overall survival [50]
CALR type 2/like Exon 9, 5-bp insertion	~15% of CALR mutations	Compared with CALR type 1+: Higher WBC count Higher circulating blast% [28,36]	Compared with CALR type 1+: Higher DIPPS plus scores Inferior overall survival [6,36]
MPL Predominantly MPLW515L and W515K	6–7%	Compared with JAK2V617F+: Less thrombophilic	Compared with JAK2V617F+, CALR+ and triple-negative cohorts: Intermediate overall survival [6]
Triple-negative	10–15%	Older age Lower hemoglobin level Lower WBC count Lower PLT count [26*,39] Compared with JAK2V617F+: Less thrombophilic	Compared with JAK2V617F/CALR/MPL+ cohorts: Higher IPSS scores [26*,39] Higher rates leukemic transformation and inferior overall survival [5*,6,50]

Table 3 – Driver mutations in myelofibrosis and their implications

The prognosis may also be influenced by karyotypic changes and the onset of "additional" mutations involving genes implicated in DNA epigenetic control and messenger RNA splicing.

Chromosomal abnormalities, although nonspecific, are common in patients with PMF. These alterations may influence the course of the disease and have a different prognostic impact. The most recent cytogenetic risk classification classifies karyotypes as favorable, unfavorable, and very high risk (VHR) based on their impact on survival. [48]

Another important prognostic factor is the presence of "additional" mutations. These molecular lesions, also detectable in other myeloid pathologies, can influence the phenotype of the disease and significantly increase genetic instability and the risk of leukemic evolution. [49] In particular, the best-characterized mutations with adverse prognostic impact are IDH 1/2, EZH2, SRSF2, ASXL1, and U2AF1 Q157. [49-52] These mutations, of particular clinical importance, are associated with a poor prognosis. [53]

Finally, it should be remembered that clonal evolution in this pathology is a complex and articulated process without a clear hierarchy. [54] "Driver" mutations, cytogenetic alterations, and "additional" mutations may appear in no particular order at any time. The same clinical phenotype of the disease and the risk of leukemic progression can result from different combinations of underlying molecular lesions.

The pathogenesis

When the mutational event leads to a survival advantage for the megakaryocytic clone, cell proliferation, and cytokine release are triggered, determining the disease phenotype. As anticipated in the previous paragraph, the clonal process can be highlighted by genetic markers of clonality in the myeloid lineage (erythrocytes, granulocytes, and megakaryocytes) and especially in the megakaryocytes, which show the classic cytological atypia at the medullary level. Megakaryocytes, platelets, and clonal monocytes release numerous growth factors capable of triggering the progressive process of bone marrow fibrosis and influencing extramedullary hematopoiesis and constitutional symptomatology.

In particular, regarding medullary fibrosis, Table 4 lists the principal growth factors involved with the relative mechanism of action, the evidence in animal models, and samples of patients with MPN. [55]

Soluble factor	Mechanism of action	Evidence from mice models	Patient specimens
TGF-β	- Increases the synthesis of types I, III and IV collagen, FN, proteoglycans and tenascin in stromal cells.- Down-regulation of metalloproteinases (MMPs) and up-regulation of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP).- Favor Endothelial Mesenchymal Transition (EndMT).	- Significantly increased in the extracellular fluid of the BM, plasma and platelet extracts in the TPO ^{high} and the GATA-1 ^{low} mice. - Homozygous TGF- β 1 null mice are protected from reticulin deposition after TPO overexpression.	- Quantitative alterations of TGF- β and its receptors in Mk, platelets, and CD34 ⁺ progenitor cells from MPN patients. - Aberrant TGF- β signaling in BM and spleen of PMF patients.
PDGF extension	- Enhances the replication, survival, and migration of myofibroblasts but also modulates the production and release of several pro- and anti-inflammatory mediators.	- Conditional deletion of the PDGFR- α gene and inhibition of PDGFR- α by imatinib in leptin receptor ⁺ stromal cells suppress their expansion and ameliorate BM fibrosis in mice	- Increased levels of PDGF in plasma and urine from patients with MPNs - Up regulation of PDGFRs and PDGF in BM biopsies of PMF patients.
FGF	Basic FGF is a potent angiogenic factor (Folkman & Klagsbrun, 1987); moreover, it is a mitogen for human bone marrow stromal cells Basic FGF is a potent angiogenic factor (Folkman & Klagsbrun, 1987); moreover, it is a mitogen for human bone marrow stromal cells- Sustains angiogenesis and is a potent mitogen factor for stromal cells.	N/A	- Increased expression in circulating Mks and platelets of PMF patients.
VEGF	- Angiogenic factor	N/A	- Significantly higher level of VEGF in plasma samples of MPN patients.
THB extension	- Anti-angiogenic factor-TGF- β activator	- Tsp-1-null/TPO ^{high} mice develop a myeloproliferative syndrome with higher grade compared to wild type mice.	- Significantly overexpressed in BM biopsies of PMF patients when compared to controls.
PF4	- Induce activation and migration of myofibroblasts	N/A	- No correlation between BM fibrosis and plasma levels or the platelet content of CXCL4 in MPN patients.
MIP 1α and 1β	- Pro-inflammatory chemokines	- Increased levels in Mks of NBEAL2 ^{-/-} , a GPS mouse model which display BM fibrosis.	- Increased in plasma samples of PMF patients.
IL-8	- Stimulates neutrophil chemotaxis- Sustains neo-angiogenesis- Negative regulator of Mk proliferation	N/A	- IL-8 level is strongly increased in the serum and plasma of patients with PMF
LCN2	- LCN2 generates increased reactive oxygen species, leading to increased DNA strand breaks and apoptosis of normal, but not PMF, CD34(+) cells. - Increases generation of osteoblasts and fibroblasts, but not adipocytes, from mesenchymal stem cells.	N/A	- Increased in plasma samples of PMF patients.
Spp1	- SPP1 promotes fibroblasts and mesenchymal stromal cells proliferation and collagen production	N/A	- SPP1 plasma levels are significantly higher in PMF compared with ET and PV patients. - Higher SPP1 plasma levels in PMF patients correlate with a more severe fibrosis

			degree and a shorter overall survival
BMPs	- BMP-1 is an activator of latent TGF- β and processor of collagen precursors.	N/A	- Expression of BMP1, BMP6, BMP7, and BMP-receptor 2 are significantly increased in advanced stages of myelofibrosis compared with controls
MDG extension	- Stimulates growth of fibroblasts and microvascular endothelial cells and induces the production of angiogenic and profibrogenic cytokines (HGF, VEGF, and SDF-1) in BM fibroblasts.	N/A	- OSM mRNA levels are increased in the BM of patients with MPNs compared to control patients

Table 4 – List of megakaryocyte cytokines implicated in the evolution of the fibrotic process

The non-clonal fibroblasts in the medullary space react to these stimuli with increased cell proliferation and the deposition of collagen fibers, which causes the progressive subversion of the normal medullary architecture. Some cytokines, such as FGF and VEGF, are also capable of inducing processes of neoangiogenesis which ultimately determine a further alteration of this space. [56] The final result of this process is the progressive damage of the bone marrow hematopoietic niche with consequent difficulty in producing mature red blood cells, leukocytes, and platelets and releasing immature elements into the circulation.

The progressive distortion of the marrow microenvironment and the altered cytokine levels are also at the basis of the extramedullary hematopoiesis process. Due to damage to the hematopoietic niche, the mutated clone undergoes clonal expansion, migration from the bone marrow (egression), and engraftment in extramedullary sites (myeloid metaplasia). As shown in figure 4, this process is supported by the reduction of GATA1 levels and the hyperstimulation of the CXCL12/CXCR4 signaling pathway. [57] High TNF-alpha, HGF, MIG, and IL-1RA levels, secreted by the mutated clones, particularly favor myeloid metaplasia. The extramedullary sites most affected are the liver and spleen (hepatosplenic myeloid metaplasia), while in rare cases, other organs or tissues may be involved (non-hepatosplenic myeloid metaplasia). Clinically, patients with myeloid metaplasia are, therefore, generally characterized by the presence of hepatosplenomegaly.

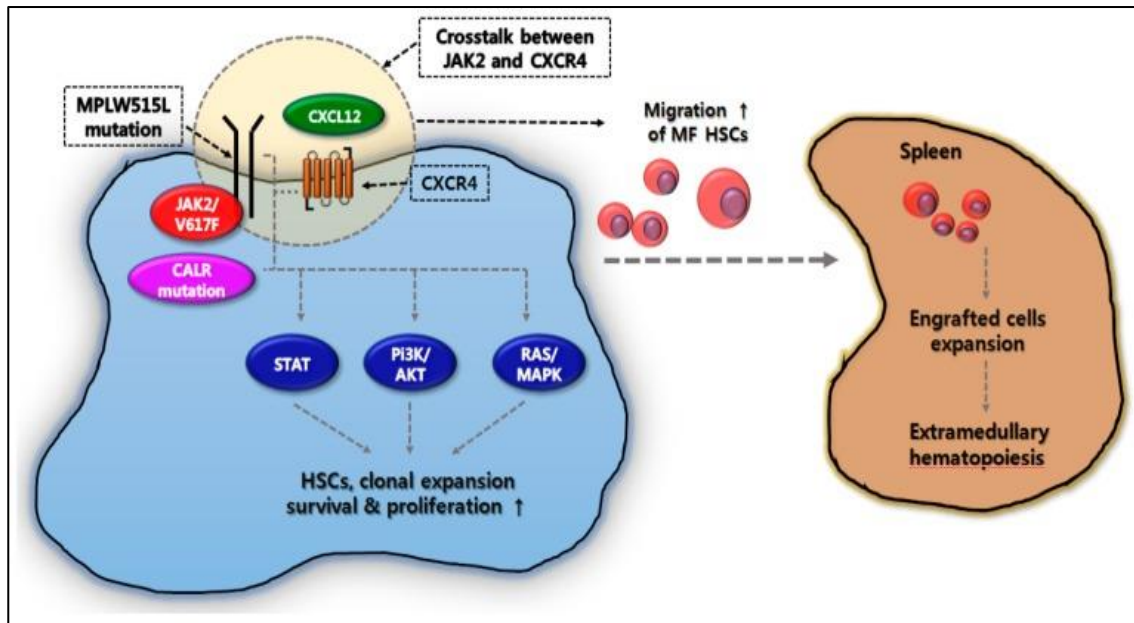


Figure 4 – Extramedullary hematopoiesis at the splenic level in myelofibrosis.

Finally, the deregulation of cytokine levels is also at the origin of the constitutional symptoms that characterize the disease. [58-59] These heterogeneous symptoms include fatigue, depression or anxiety, early satiety, weight loss, difficulty concentrating, itching, sexual dysfunction, night sweats, bone pain, and fever. Therefore, these symptoms in patients affected by PMF are an indirect marker of cytokine deregulation and disease activity.

The role of chronic inflammation

As highlighted in the previous paragraph, the cytokine deregulation induced by the mutant clone is one of the key processes for PMF. However, this deregulation not only influences fibrosis, myeloid metaplasia, and symptoms but is a more complex phenomenon. In patients with PMF, a significant increase in several proinflammatory cytokines (TNF-alpha, IL6, IL-8) was observed. An interaction between the chronic inflammatory state and PMF has therefore been hypothesized. In particular, cytokine deregulation was hypothesized to impact leukemic progression and thrombotic risk significantly. [60-71] As regards the leukemic evolution process, Hans C. Hasselbalch, in a 2013 article (Figure 5), proposed a model based on the chronic inflammation process not only as an element at the base of clonal evolution but as a common element between the different myeloproliferative diseases JAK2 associated. [72]

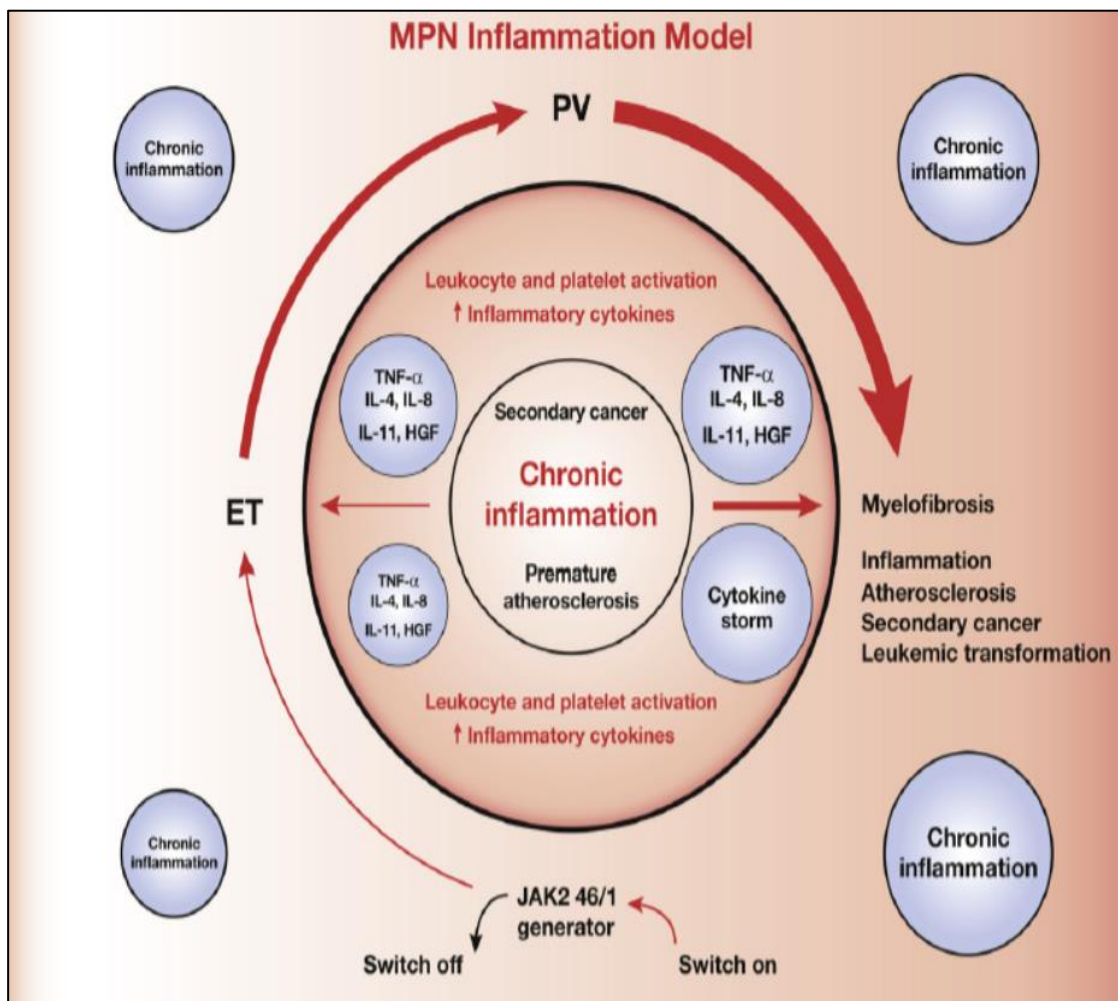


Figure 5 – Inflammatory process in the biological continuum of ET, PV, and MF

Following the hypothesis proposed by the Danish author (Figure 6), chronic inflammation would have the role of progressively selecting more resistant malignant clones, thus favoring both leukemic evolution and the onset of aggressive tumors. Two clinical observations support this hypothesis: the first is that the onset of PMF in patients with chronic inflammatory diseases or autoimmune diseases is higher than the average; the second is that PMF patients have a higher risk of developing secondary cancers.

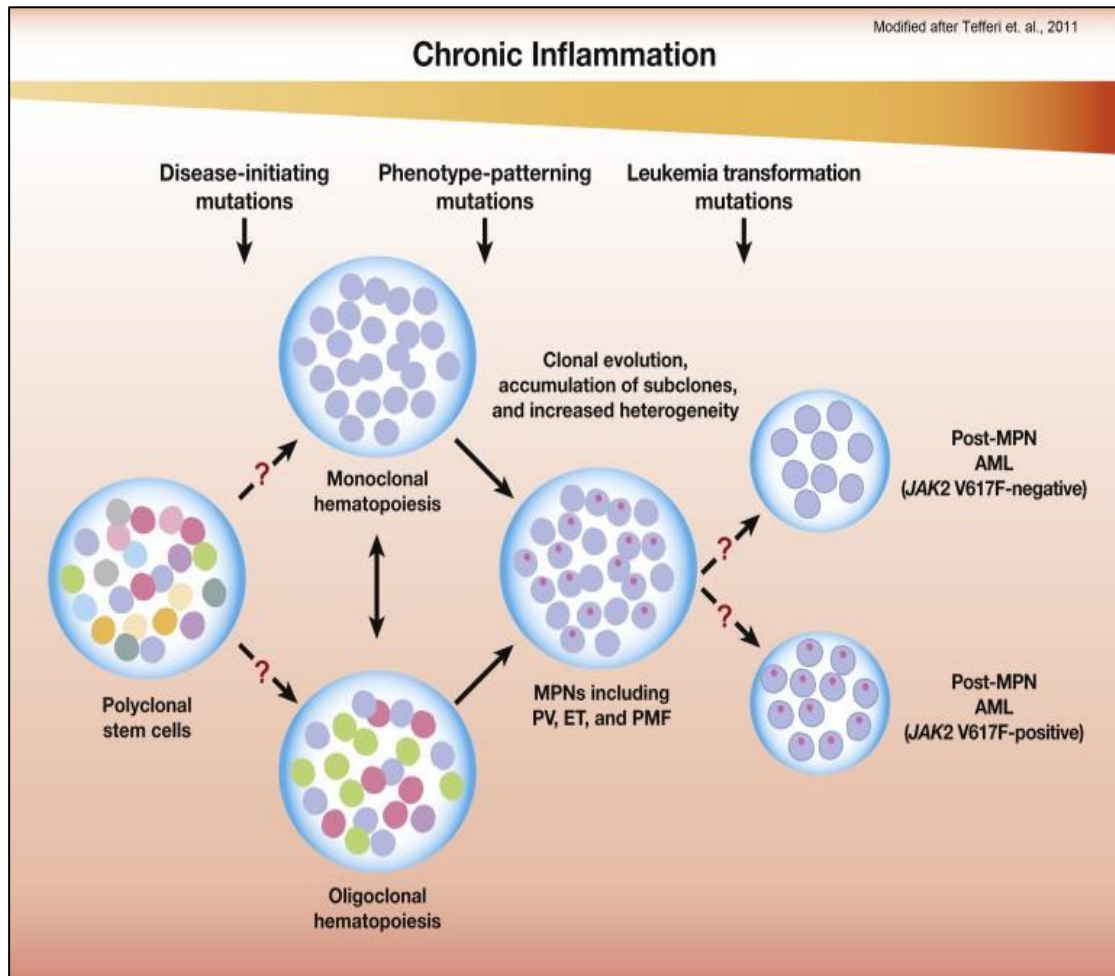


Figure 6 – Chronic inflammation driving mutagenesis and clonal evolution in MPNs

Inflammation may also play a role in increasing thrombotic risk. As shown in Figure 7, the constant activation of the inflammatory cascade induced by mutated leukocytes and platelets would facilitate endothelial dysfunction, activation of the coagulation cascade, and leukocyte-platelet interaction. [73] This model, also valid for other myeloproliferative neoplasms, would account for the numerous thrombotic events in patients with these pathologies.

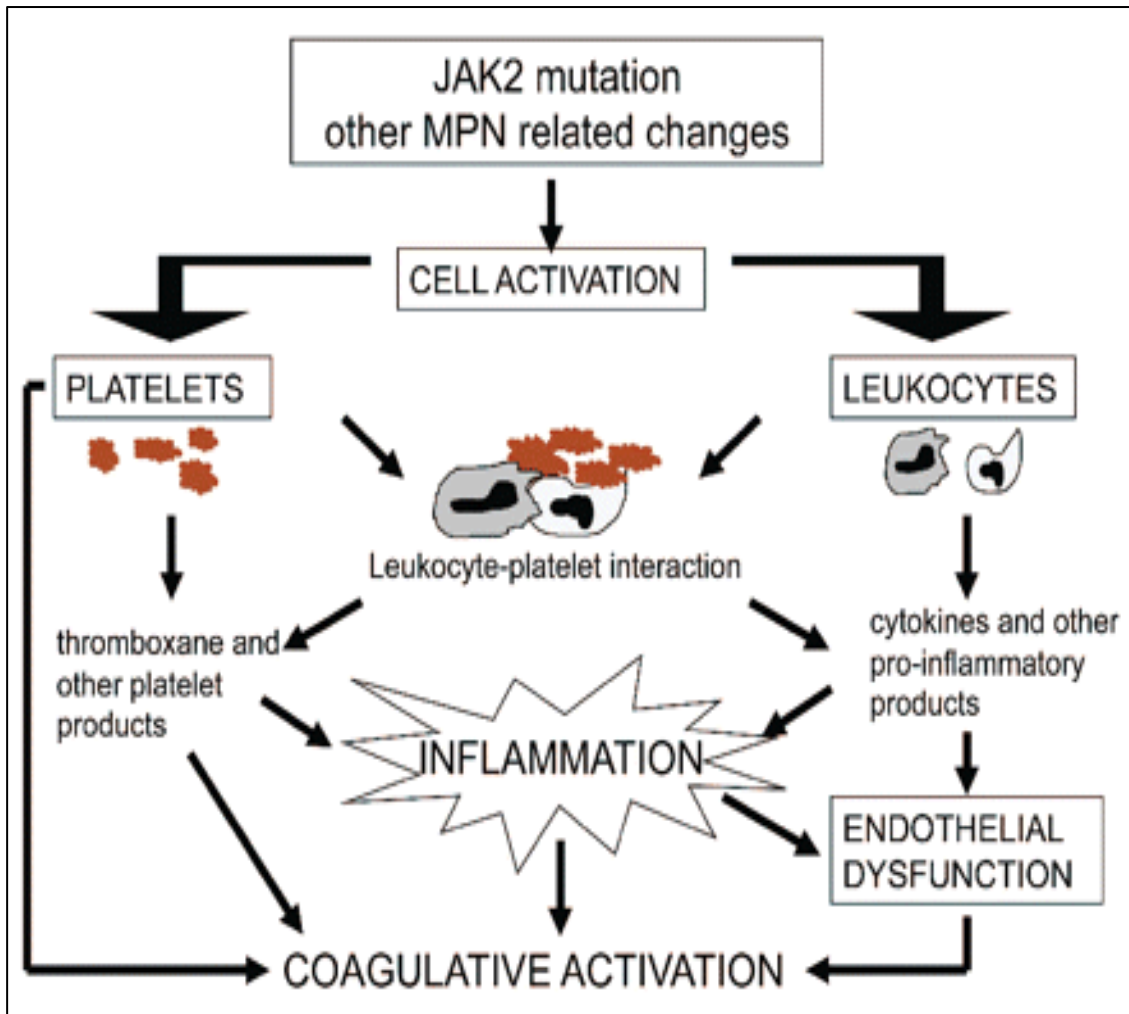


Figure 7 – Interaction between inflammation and the coagulation process in MPNs

These theoretical models were confirmed over the following years by numerous studies investigating the impact of cytokine deregulation on "real life," both in terms of overall survival and leukemic evolution. In particular, the increase in IL-8, IL-12, IL-15, and the IL-2 receptor are valid predictors of leukemia and leukemia transformation. [74-76]

The natural history of disease and the clinical picture

The natural history of the disease is divided into two distinct phases (figures 8A and 8B):

- 3) prefibrotic stage (early stage): characterized by bone marrow hypercellularity associated with mild or absent reticulin fibrosis;
- 4) overt fibrotic stage: characterized by decreased bone marrow cellularity and increased reticulin and collagenic fibrosis. [77-79]

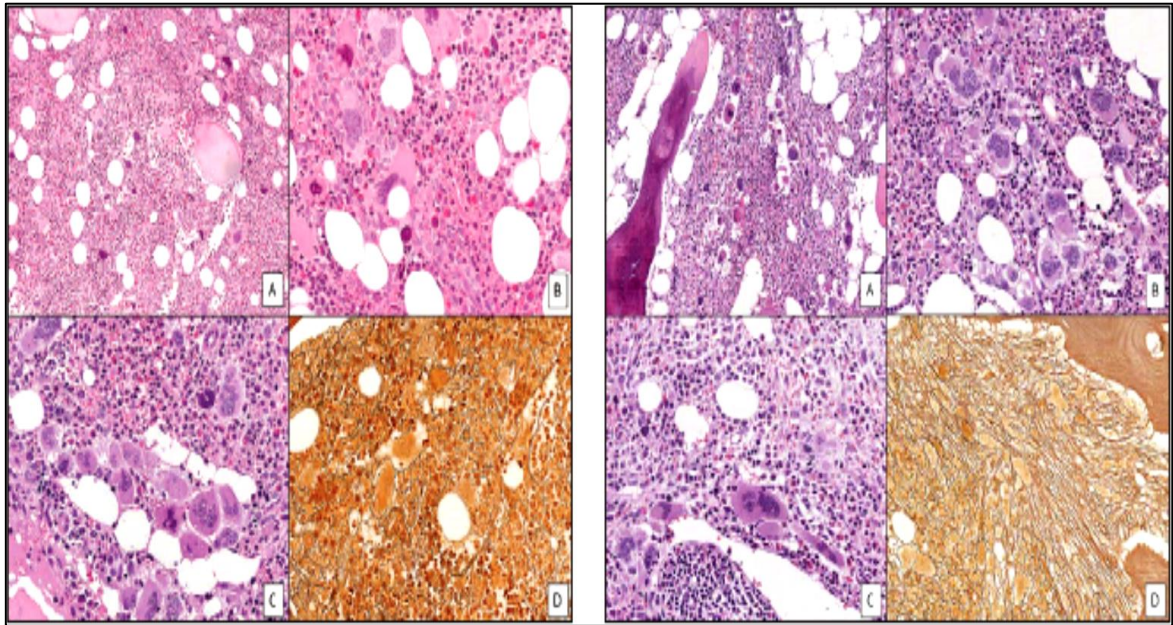


Figure 8A - PMF in the prefibrotic phase: age-hypercellular hematopoietic marrow, with proliferation of the granulopoietic and platelet-forming series (A); megakaryocytes are increased in number, show cytological atypia (B), and form dense aggregates (C). Reticulin fibrosis is mild (MF-1) (D).

Figure 8B - PMF in the overt fibrotic phase: hypercellular bone marrow due to age, with proliferation of the granulopoietic and platelet-like series (A); megakaryocytes are very numerous, markedly atypical and form large dense aggregates (B); sometimes they appear deformed and dysmorphic due to the presence of fibrosis (C). Collagen fibrosis is evident and advanced (MF-3) (D).

These histological alterations are relevant from an anatomical-pathological point of view and a clinical one. Patients with prefibrotic PMF are generally asymptomatic. The diagnosis is sometimes suspected due to the presence of hepato-splenomegaly and more often due to alterations in the hematological tests (anemia, thrombosis, thrombocytopenia, leukopenia, leukocytosis), blood tests (LDH, vitamin B12), or the detection of leukoerythroblastosis and anisopoikilocytosis of the red blood cells with peripheral dacryocytes. [80-86]

In most cases, however, the diagnosis is made in the overt fibrotic stage. [77, 80, 82-85,

87-88] Not only blood chemistry tests are usually furtherly altered, but relevant cytopenias, constitutional symptoms, organomegalies, and thrombotic manifestations are also typical of this phase of the disease (Figure 9). [89-90]

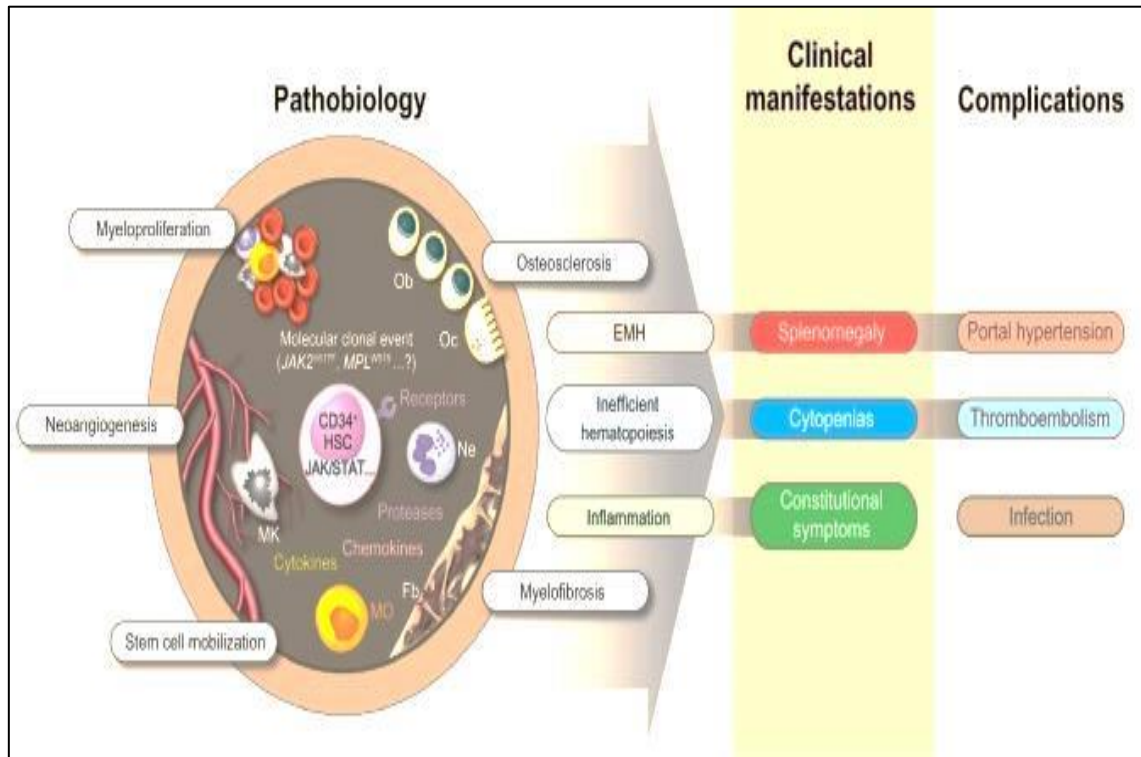


Figure 9 – Pathobiology, main clinical manifestations and common complications of myelofibrosis.

- Blood chemistry tests may show significant hematological abnormalities such as anemia, leukocytosis, and thrombocytopenia. There are also often elevated lactate dehydrogenase (LDH) levels, increased circulating CD34+ cells, and sometimes myeloid blasts in the peripheral blood. [77, 80, 87]
- The constitutional symptoms, as previously mentioned, can be variable and include asthenia, low-grade fever, widespread pain, night sweats, weight loss, aquagenic itching, and splenic obstruction symptoms. Among these, the most frequent is asthenia which can affect 90% of patients (this symptom can naturally also be influenced by any concomitant anemia). [27,86, 91-93] Low-grade fever, widespread pain, night sweats, and weight loss are instead an expression of the hypercatabolic state induced by chronic inflammation. For this reason, they are also highly responsive to treatment with JAK2 inhibitors. Another symptom that responds well to this type of therapeutic approach is aquagenic itching (which arises with water). This symptom, present in most patients, can express both the

underlying inflammatory picture and the eosinophilia that often accompanies myeloproliferative neoplasia. [94] Finally, symptoms of splenic obstruction are present in about 50% of patients. They can manifest themselves with a sensation of weight in the left hypochondrium, early satiety (secondary to stomach compression), and sometimes acute pain in the left quadrants (from splenic infarction). [95] As already mentioned, constitutional symptoms indirectly reflect the activity of PMF and therefore have a prognostic value. Furthermore, patients with PMF and constitutional symptoms generally have a reduced quality of life and may require specific treatment. [12, 96] It is of fundamental importance to document their presence through specific questionnaires. [97] Different scoring systems have been proposed over time (figure 10).

Item	MPN-10 (Mayo Clinic)	MFSAF v2.0 (Incyte)	MFSAF- revised (Gilead)	MFSF v4.0 (Critical Path Institute)
Fatigue	X		X	X
Night sweats	X	X	X	X
Itching	X	X	X	X
Abdominal discomfort	X	X	X	X
Pain under ribs on left side		X	X	X
Early satiety	X	X	X	X
Bone pain	X	X*	X	X
Inactivity	X	X**	X**	
Concentration problems	X			
Fever	X			
Weight loss	X			
Scale score range	0-100	0-60	0-70	0-70

Figure 10 – Symptom detection scores in myelofibrosis.

- Organomegalies are one of the hallmarks of fibrotic-phase PMF. As anticipated, the most frequent picture is hepatosplenic myeloid metaplasia which affects organs such as the spleen and liver, causing the appearance of splenomegaly and

hepatomegaly. Splenomegaly is the most relevant picture from a clinical point of view since it can be of such dimensions to affect the lower abdominal quadrants; hepatomegaly is extremely frequent (40-70% of patients) despite usually being less clinically relevant. [92, 98]. Hepatomegaly can also appear or worsen in the case of splenectomy. [99-102]. Common complications related to hepatosplenic myeloid metaplasia are splenic infarctions and portal hypertension with consequent ascites, esophageal varices, and sometimes hepatic encephalopathy. [103] Contrary to hepatosplenic myeloid metaplasia, non-hepatosplenic myeloid metaplasia is extremely rare and not associated with organomegaly. This process can potentially affect any organ (lymph nodes, serosa, gastrointestinal tract, genitourinary, pulmonary, central nervous system, skin), resulting in highly variable clinical pictures and complications related to the site of onset. [99, 104-111]

- Finally, regarding thrombotic events (arterial and venous), PMF patients have an increased risk compared to the general population. In particular, the thrombotic event most commonly associated with this condition is portal vein thrombosis, which often represents the clinical manifestation of the disease's onset. [112] Compared to other myeloproliferative disorders, the thrombotic risk of PMF patients is lower compared to that of PV patients and similar to that of ET patients. [113] For this reason, the IPSET thrombosis (thrombotic risk prediction tool initially designed for patients with ET) has been recently validated on a cohort of patients with PMF. [114] According to this model, four risk factors can significantly increase the probability of thrombosis in the case of the patient with PMF: age over 60 years, presence of JAK2 mutation, history of thrombosis, and presence of cardiovascular risk factors. Detecting these risk factors is, therefore, fundamental for correctly managing the patient with PMF.

Diagnosis

As shown in Table 5, to diagnose PMF according to the WHO 2016 classification, the morphological, clinical, genetic, and molecular data should be integrated. [9] The data are classified into major and minor diagnostic criteria: the presence of three major criteria and one minor criterion is diagnostic of PMF.

	Prefibrotic/early PMF (pre-PMF)	Overt PMF
Major criteria		
1	Megakaryocytic proliferation and atypia, without reticulin fibrosis > grade 1c, accompanied by increased age-adjusted BM cellularity, granulocytic proliferation and often decreased erythropoiesis	Megakaryocyte proliferation and atypia accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis (grade 2 or 3)
2	Not meeting WHO criteria for BCR-ABL1 + CML, PV, ET, MDS, or other myeloid neoplasm	Not meeting WHO criteria for BCR-ABL1 + CML, PV, ET, MDS or other myeloid neoplasm
3	Presence of JAK2, CALR, or MPL mutation or in the absence of these mutations, presence of another clonal marker or absence of minor reactive BM reticulin fibrosis	Presence of JAK2, CALR, or MPL mutation or in the absence, the presence of another clonal marker or absence of evidence for reactive BM fibrosis
Minor criteria		
1	<ul style="list-style-type: none"> a) Anemia not attributed to a comorbid condition b) Leukocytosis $\geq 11 \times 10^9/L$ c) Palpable splenomegaly d) LDH level above the upper limit of the institutional reference range 	<ul style="list-style-type: none"> a) Anemia not attributed to a comorbid condition b) Leukocytosis $\geq 11 \times 10^9/L$ c) Palpable splenomegaly d) LDH level above the upper limit of the institutional reference range e) Leukoerythroblastosis

Table 5 – Major and minor criteria for the diagnosis of myelofibrosis (WHO 2016).

Therefore, a bone marrow biopsy is carried out when PMF suspicion arises. The biopsy is a fundamental examination that, depending on the stage of the disease, can highlight different types of cellularity (normal-cellularity, hyper-cellularity, hypo-cellularity), dysmegakaryocytopoiesis (micro-megakaryocytes, giant megakaryocytes with an abnormal nucleus, usually arranged in "clusters") and dysgranulopoiesis (granulocytes with hypersegmented nucleus or with Pelger-Huet anomaly). [115] In particular, this diagnostic assessment can identify histopathological pictures compatible with PMF in the prefibrotic phase (grade 0-1 marrow fibrosis) or PMF in the fibrotic phase (grade 2-3 marrow fibrosis). [3]

The bone marrow biopsy not only allows the degree of fibrosis definition but also facilitates the differential diagnosis allowing to distinguish PMF from other hematological conditions characterized by similar clinical-laboratory pictures and non-hematological pathologies characterized by fibrosis.

In particular, it is crucial to exclude the presence of other myeloid diseases, such as chronic myeloid leukemia, myeloproliferative neoplasms, and myelodysplasias. For this purpose, it is essential to exclude the presence of BCR-ABL rearrangement.

From the molecular point of view, it is also vital to conduct an accurate cytogenetic and molecular investigation (JAK2, MPL, and CALR) to identify the presence of a clonality

marker.

Finally, to complete the diagnostic process, at least one of the following minor criteria must be verified: anemia unrelated to other causes; leukocytosis (greater than 11×10^9 leukocytes/L); palpable splenomegaly; elevated LDH; peripheral leukoerythroblastosis.

Prognosis and causes of death

The median survival until 1995 was five years for all patients. More recent data have revised the median survival to 6 years for patients diagnosed in the fibrotic phase and 15 years for patients in the pre-fibrotic phase or patients younger than 60. [10, 12, 87, 116-121] The causes of death are, in most cases, related to cardiovascular events, infections secondary to cytopenia, and thrombotic-hemorrhagic events, while leukemic progression was documented in only 20% of patients. [49, 122] However, the data relating to leukemic transformation is probably underestimated due to the difficulties associated with identifying this transformation in myelofibrotic patients (bone marrow biopsy is not always sufficient to confirm the state of disease progression; the presence of immature elements in the peripheral blood is not always a sign of progression; the presence of cytopenias is not strictly associated to progression in these patients).

In the case of leukemic progression, the prognosis is poor, with a median survival from the time of progression of about three months. [123] Although most cases are myeloid leukemic transformations, documentation also shows lymphoid, erythroid, megakaryocytic, and biphenotypic leukemias. The finding of such pictures of leukemic evolution strengthens the hypothesis of a generalized genetic instability induced by the inflammatory environment, which would facilitate the selection of aggressive clones.

Therapies

Since 2005, the year of the discovery of the JAK2 mutation, the increasing understanding of the molecular mechanisms underlying PMF has led to the development of many new therapeutic strategies. However, splenectomy and pharmacological therapy are only palliative in these patients. At the same time, the only treatment capable of modifying the natural history of the disease is the allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells. [124-129]

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

As anticipated, allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is the only potentially curative therapeutic procedure. Unfortunately, this procedure in patients with PMF is burdened by a relevant risk of death related to treatment and comorbidities secondary to post-transplant immunosuppressive therapy or related to the onset of chronic GVHD. [125, 130]

In the presence of an HLA-compatible donor, this procedure can nowadays be performed up to the age of 75. However, considering the risk of mortality and morbidity, careful evaluation and selection of the patient are essential. As we will see later, an essential role is played in this context by prognostic risk scores capable of identifying patients under the age of 75 potentially eligible for this procedure at the time of diagnosis. Regarding low-risk patients, the current strategy consists of periodic re-evaluation of the prognostic risk and activation of the transplant program in case of high-risk onset. [131-133]

Concerning the conditioning regimen, there is currently no particular evidence in favor of myeloablative regimens or reduced intensity regimens regarding overall survival and non-relapse mortality. This choice must therefore be based on the patient's clinical characteristics and the disease's biological features. Reduced-intensity conditioning regimens are generally preferred for most patients because they allow older or clinically frail patients, in whom a myeloablative conditioning regimen would not be feasible, to be candidates for allogeneic transplantation. [134-143] Even such regimens allow the achievement of complete chimerism and the disease's molecular remission. [140, 144-145]

Advanced marrow fibrosis was initially indicated as an adverse prognostic factor for engraftment. However, subsequent studies have not shown a significant fibrosis impact on the engraftment rate. [146] The factors that instead influence this aspect can be divided

into characteristics related to the source of stem cells to be re-infused and characteristics related to the recipient. [147] Concerning the stem cell source, better results have been documented with HLA-identical family donors and peripheral blood hematopoietic stem cell harvesting. Regarding the recipient, the presence of previous splenectomy and the absence of pre-transplant thrombocytopenia had a positive influence.

Finally, as far as survival is concerned, numerous factors have shown a role over time. In particular, the following are positive predictors of survival: the presence of an HLA-identical family donor, young age, the stage of chronic disease, the absence of osteomyelosclerosis, and hemoglobin levels above 10 g/dl. [148-150] On the other hand, the use of a non-family donor, advanced age, previous use of intensive red blood cell transfusion support, or the presence of constitutional symptoms at the time of transplantation or significant splenomegaly have a negative impact. [139, 142] Finally, discordant data on the overall survival have emerged regarding the role of splenectomy, which must therefore be evaluated based on the patient's specific conditions.

There is currently no specific treatment for patients who relapse or are resistant to the transplant procedure. Therapeutic options that can be used in this sub-setting of patients (figure 11) include lymphocyte reinfusion (DLI), a possible second transplant, or, if available, inclusion in clinical trials.

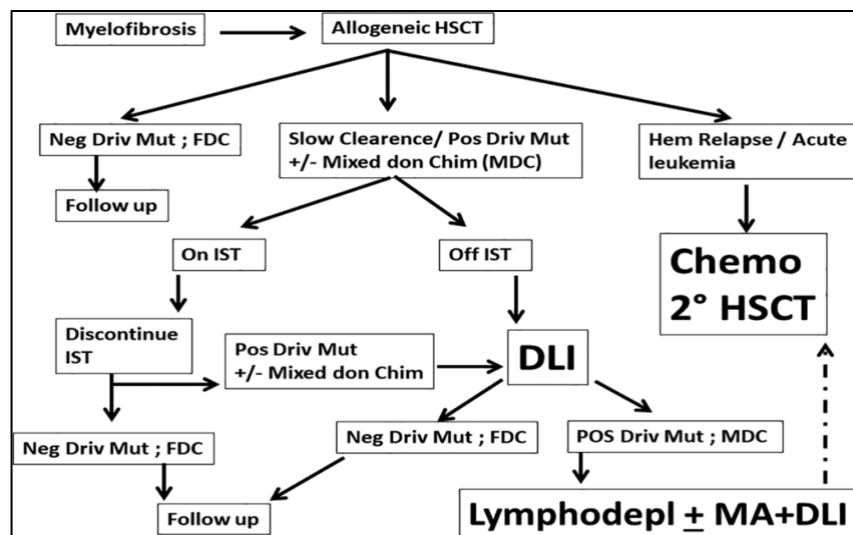


Figure 11 – Possible transplant management algorithm in the myelofibrotic patient.

Splenectomy and splenic radiotherapy

Until 2011, splenectomy was the only therapeutic option to relieve splenomegaly symptoms in PMF patients. Its role has diminished over the last few years with the advent

of JAK2 inhibitors. However, it remains a valuable therapeutic option in patients who are refractory or unsuitable for such treatments. Indications for this procedure include the presence of transfusion-dependent anemia or significant splenic obstruction symptoms. [153] These patients are burdened by abdominal discomfort related to mechanical bulk and complications such as recurrent splenic infarctions, refractory thrombocytopenia, or portal hypertension. [131, 153-156] Splenectomy can immediately reduce these problems, although they may recur in the long term. [153, 157] However, this therapeutic option must be carefully evaluated (figure 12). Splenectomy is burdened by a risk of intraoperative mortality (between 7 and 10%) and by a non-negligible risk of postoperative mortality and morbidity related to the onset of infections (sepsis), thrombotic events (stroke, pulmonary embolism, portal thrombosis), bleeding (intra-abdominal hemorrhage) or worsening liver metaplasia. [153-155] In case of the need to reduce the splenic dimensions in patients not eligible for splenectomy procedure, the use of splenic radiotherapy for palliative purposes should finally be considered.

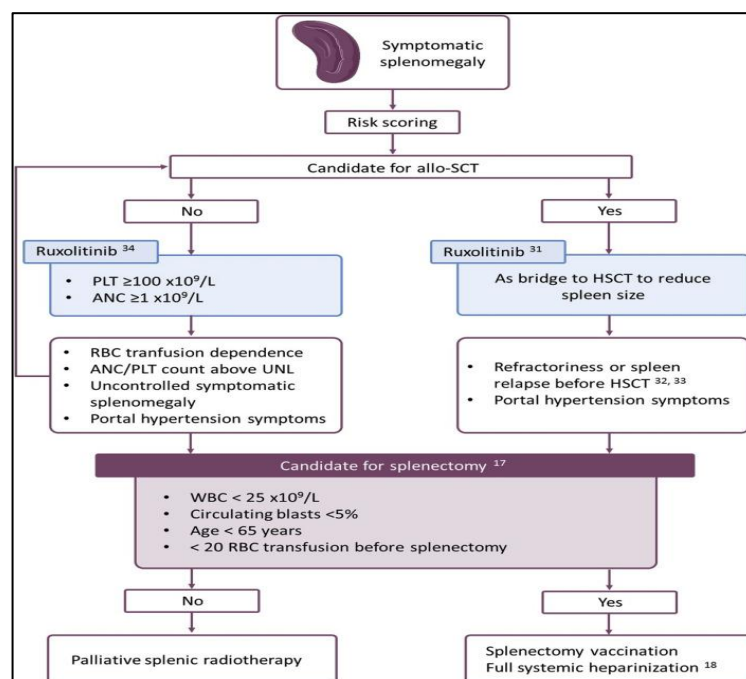


Figure 12 – Possible decision algorithm for resorting to splenectomy in myelofibrosis.

Pharmacological therapy

The introduction of JAK2 inhibitors (ruxolitinib in 2012 and fedratinib in 2022) in the PMF setting has profoundly changed the therapeutic management of this disease. Therefore, this event marks a clear division regarding the history of pharmacological therapy of PMF, which can therefore be schematically divided as follows.

The pre- JAK2 inhibitors era

1) Hydroxyurea

Hydroxyurea is the first-line treatment of PMF adult patients. It is especially effective in controlling thrombocytosis, leukocytosis, constitutional symptoms, and splenomegaly in patients with JAK2 mutation. [158-163] However, the long-term use of the drug has been associated with the onset of complications, particularly with the development of second skin cancers.

2) Busulfan

Busulfan is another effective therapeutic option for PMF patients regarding splenomegaly, leukocytosis, and thrombocytosis; however, its use is limited by the onset of severe and prolonged cytopenias. [164] Furthermore, the use of this treatment is associated with increased leukemic evolution. For this reason, its use is currently limited to the context of elderly patients resistant or intolerant to other therapeutic options.

3) Interferon-alpha

IFN α is the therapeutic option of choice in young patients since, compared to previous drugs, it is associated with fewer long-term side effects. Furthermore, it is currently the only treatment available during pregnancy as it has no teratogenic effects. The drug is associated with good hematological responses and mild control of splenomegaly. [165] However, this therapeutic option has been characterized by high discontinuation rates due to post-administration flu-like symptoms. [166-168] The recent development of pegylated forms seems to have overcome this problem by significantly reducing such complications. [169-172]

4) Immunomodulatory agents

In patients with clinically relevant cytopenias (particularly anemia and thrombocytopenia), the use of immunomodulatory agents can be considered. Thalidomide, lenalidomide, and pomalidomide have all been tested in the myelofibrotic patient setting. The first of the three drugs, thalidomide, has been shown to effectively control blood counts and reduce constitutional symptoms and sometimes splenomegaly. [173-177] The use of the drug is limited by the onset of both hematological (neutropenia,

leukocytosis, thrombocytosis) and non-hematological (drowsiness, constipation, asthenia, peripheral neuropathy) side effects, which become more frequent with the increase in dosage. [175-180] Such side effects may be limited by association with steroid therapy. [179,181] The second immunomodulatory agent used in PMF was lenalidomide (a thalidomide analog), effectively reducing thrombocytopenia. [182] The drug's efficacy is also marked in patients with deletion of the long arm of chromosome 5 (5q-), in which such treatment should always be considered. [183] Also, in this case, the adverse events proved to be dependent on the dosage of the drug and limited by the use of steroid therapy. [184-185] Finally, concerning pomalidomide, the drug proved particularly effective in reducing anemia and was characterized by a good tolerance profile even without association with steroid treatment.

5) Erythropoiesis stimulating agents

One of the main problems that, especially in the advanced stages of the disease, afflicts the patient with PMF, worsening the prognosis, is the presence of anemia. The use of agents that stimulate erythropoiesis aims to limit this problem; however, this therapeutic option is not recommended if there is splenomegaly due to the risk of stimulating the process of hepato-splenic myeloid metaplasia. Variable response rates in terms of improvement of anemia have been recorded with danazol (androgen) and recombinant epoetin. [188-193] Factors limiting the use of danazol are the presence of liver dysfunction, prostate cancer, and the induction of virilizing effects in women. There are no particular contraindications to using erythropoietin; however, it is less effective in patients with normal or high serum levels. [194-196]

The JAK2 inhibitors era

1) Ruxolitinib

Ruxolitinib was the first JAK2 inhibitor approved for treating PMF patients with splenomegaly or constitutional symptoms. The drug, available in Italy since 2012, has revolutionized the treatment of PMF by officially introducing targeted therapy in this setting. Its action results from an inhibition of the JAK/STAT signaling pathway and is not dependent on the "driver" mutational status. [197-200] As evidenced by the COMFORT-I (ruxolitinib versus placebo) and COMFORT-II (ruxolitinib versus best available therapy) pivotal phase III studies, the drug is, compared to other therapeutic

options, highly effective in reducing splenomegaly and symptoms in most patients. [197-198, 201-202] Although it is not yet entirely clear whether these advantages in terms of disease control translate into an advantage in terms of overall survival, some preliminary data support this hypothesis. [200-205] The drug, on the other hand, appears to be ineffective in preventing leukemic transformation. [206] The side effects that most limit the use of this drug observed during the studies include the appearance of cytopenias (anemia, thrombocytopenia) and the development of infectious complications (such as bacterial, fungal, viral, and reactivation of tuberculosis). [207-215]

2) Fedratinib

Some patients with PMF may be resistant, intolerant, unfit, or lose response to ruxolitinib. Fedratinib is a JAK and FLT3 inhibitor active in this setting. In 2013 the JAKARTA phase II and III clinical trials (randomized, placebo-controlled) showed a significant reduction in symptoms and splenic size in PMF patients treated with fedratinib. [216-219] Despite these findings, the development of this new JAK inhibitor was halted in November 2013 following neurological complications, including Wernicke's encephalopathy. [217] Although encephalopathy occurred in only 1% of patients and most cases were not Wernicke encephalopathy, for this reason, the JAKARTA and JAKARTA-2 studies were suspended as a precaution. Thanks to the FREEDOM studies, designed to gain more experience and integrate the information missing from the JAKARTA studies, Fedratinib has been recently approved as the official first-line or second-line treatment for PMF patients.

The post-JAK2 inhibitors era

As shown in Figure 13, in recent years, the more profound knowledge of molecular biology underlying the myelofibrotic process has allowed an enormous evolution of therapeutic options. Numerous trials are currently underway involving pharmacological agents operating on different molecular targets. The currently most promising therapeutic options are presented below: 1) new JAK inhibitors; 2) new JAK inhibitor combination drugs; 3) new alternative drugs to JAK inhibitors.

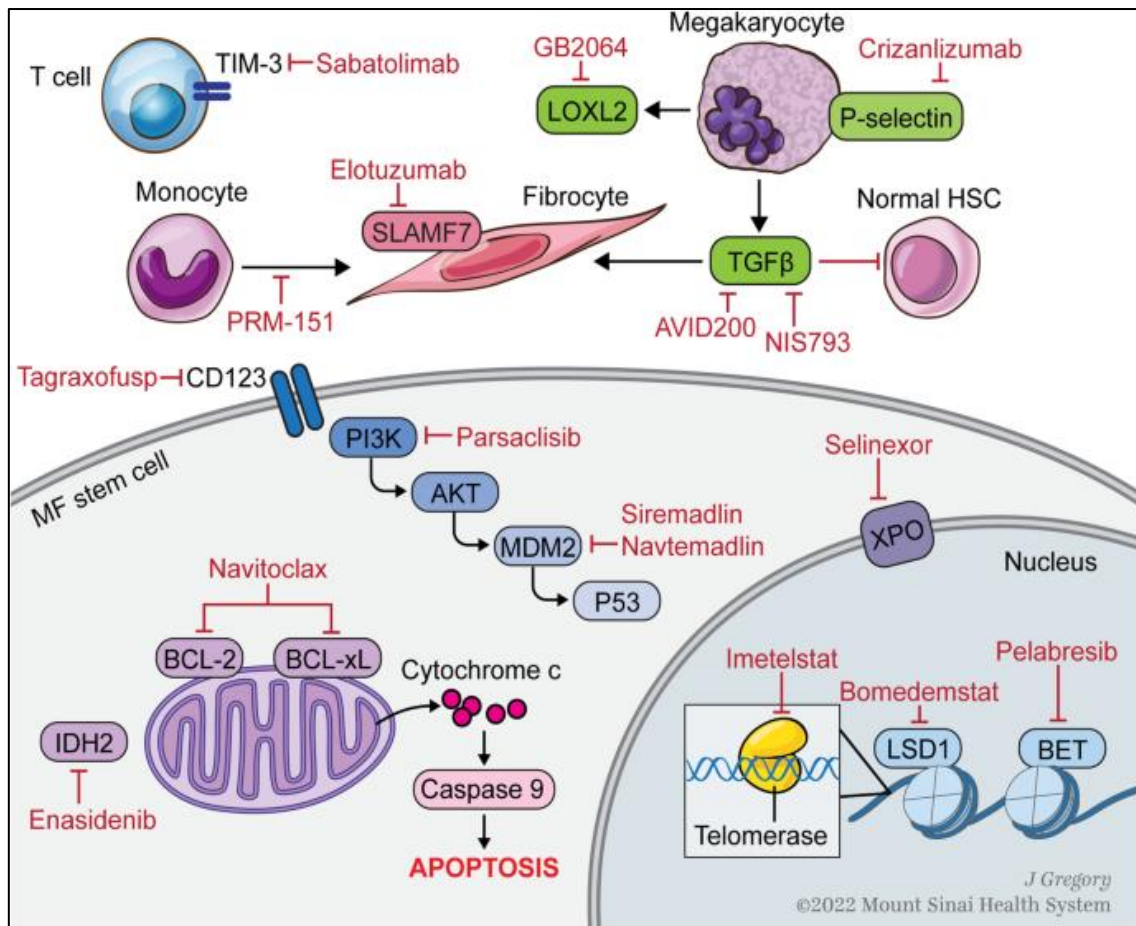


Figure 13 – Investigational drugs in myelofibrosis.

1) New JAK inhibitors

Momelotinib and pacritinib are two promising JAK inhibitors currently under investigation, and from which patients with PMF and concomitant anemia or thrombocytopenia could benefit. In particular, Momelotinib is a promising drug in the setting of anemic patients. Disease- or treatment-induced anemia is one of the most common problems in PMF patients with a significant impact on OS. This JAK inhibitor can also inhibit the type 1 activin receptor, reducing hepcidin production in the liver and increasing iron and hemoglobin levels. [220] Early studies (SIMPLIFY-1 and SIMPLIFY-2) documented similar activity to ruxolitinib regarding symptom or splenomegaly control and showed an advantage in anemia control. [221-222] The drug is currently the subject of a study (MOMENTUM) to evaluate precisely this advantage. The main limitation linked to drug use is the onset of significant thrombocytopenia in some patients. On the other hand, pacritinib is a relatively non-myelosuppressive inhibitor of the JAK2 and FLT3 kinases, particularly promising in the setting of the thrombocytopenic patient. Disease- or treatment-induced thrombocytopenia is, in fact, another significant

problem, as well as an adverse prognostic factor in patients with PMF. In the PERSIST-1 and PERSIST-2 studies, pacritinib effectively improved platelet levels, reduced splenomegaly, improved constitutional symptoms, and increased hemoglobin levels. [223] The most frequent adverse events were mild gastrointestinal complications, while the drug demonstrated a good safety profile concerning cardiac and bleeding risk. [224] Currently, the phase III PACIFICA registration study is evaluating the drug's activity in the setting of patients with PMF and severe thrombocytopenia ($<50 \times 10^9/L$). [225]

2) New combination treatments with JAK inhibitors

In the coming years, JAK inhibitors will likely gain more space in PMF treatment. However, their use may be limited by the onset of significant cytopenias, suboptimal responses to treatment, or drug resistance. Some agents under evaluation aim to overcome these problems through combination therapy with the JAK inhibitor. Below is a list of the most promising drugs in this setting. The first drug under investigation is Luspatercept, a new erythropoiesis-stimulating agent. Anemia represents one of the main complications associated with JAK inhibitors use. Luspatercept acts as a receptor ligand for activin, inducing erythroid maturation and reducing anemia levels, as documented in the myelodysplastic syndrome setting. [226-227] The combination of ruxolitinib and luspatercept has shown encouraging results. [228] The drug was, in fact, able to significantly increase hemoglobin levels and reduce the transfusion rate in treated patients. The second combination drug that has shown encouraging results is Parsaclisib, an inhibitor that acts on the phosphatidylinositol 3-phosphokinase (PI3K) signaling pathway, which lies downstream of the JAK/STAT pathway. This PI3K δ inhibitor synergizes with JAK inhibitors potentiating their action and reducing sub-optimal response rates. [229] Parsaclisib allows obtaining responses (splenic and symptomatological) with lower doses of ruxolitinib, reducing treatment-related toxicities. In addition, the drug had limited grade 3 and 4 adverse events and was generally well tolerated, therefore a phase 3 study will soon investigate the combination therapy. [230] Some patients, however, may show immediate resistance to treatment with JAK inhibitors. Two agents under investigation that appear to be able to prevent or overcome this resistance are Navitoclax and Pelabresib. Navitoclax is a non-selective Bcl2 inhibitor with a pro-apoptotic effect. Combined with ruxolitinib, it improved treatment response rates in PMF patients with high resistance to previous lines of therapy. The results are particularly encouraging given the efficacy of the treatment in a population usually

characterized by limited treatment options and often by a low life expectancy. Furthermore, the combination was generally well tolerated; therefore, a randomized phase 3 study is now underway to evaluate efficacy in naïve patients. [231] Finally, Pelabresib is an inhibitor of NFκB and TGF-β signaling pathways. [232] In the MANIFEST study, splenic response and symptom response rates were significant in ruxolitinib-refractory patients. [233] Furthermore, improvements in hemoglobin levels and bone marrow fibrosis have been recorded, possibly related to the inhibition of TGFβ, a cytokine with pro-fibrotic activity.

3) New therapies alternative to JAK inhibitors

In recent years, several alternative drugs to JAK inhibitors have begun to arouse the interest of the medical-scientific community due to their potential application in patients who are refractory or ineligible for JAK inhibitors. Alternative therapeutic strategies in advanced stages of research include telomerase inhibitors, MDM2 inhibitors, and drugs operating on epigenetic regulation. Telomerases are enzymes responsible for the continued maintenance of telomeres, protecting the ends of chromosomes from damage. In cells with these proteins missing or inhibited, telomeres shorten with each cell replication, negatively impacting survival. [234] Among the telomerase inhibitors tested in PMF patients resistant to JAK inhibitors, the most promising drug is Imetelstat. [235] In the phase 2 IMBARK study, this drug, distributed mainly in the bone marrow, showed an advantage in spleen size and symptom reduction and a significant advantage in terms of overall survival. [236] Cases of complete molecular remissions and normalization of fibrosis have also been documented. [237] In light of these encouraging results, a phase 3 study is currently underway, with the primary endpoint to show the advantage in terms of survival of the cohort treated with Imetelstat. Another promising molecule as an alternative to JAK inhibitors is KRT232, a drug with potent inhibitory activity against MDM2. The protein produced by this gene induces the ubiquitination of the p53 tumor suppressor, increasing genomic instability and the risk of disease evolution. Inhibition of MDM2 restores the antitumor activity of p53. This mechanism of action is critical in PMF patients in whom MDM2 expression is increased due to the deregulation of the JAK/STAT pathway. [238] A preliminary phase 2 study of patients with PMF who relapsed or was refractory to JAK inhibitor therapy showed encouraging splenic and symptom responses associated with good drug tolerability. [239] The phase 3 study is underway to verify the drug's efficacy compared to the best available alternative therapy.

Finally, as previously seen, numerous somatic mutations affecting epigenetic regulatory mechanisms have been observed in patients with PMF. For this reason, numerous studies have investigated the efficacy of active drugs on these mechanisms of action. Bomedemstat is the most promising drug in this setting. The drug is an inhibitor of lysine-specific demethylase 1 (LSD1), an enzyme overexpressed in PMF patients capable of promoting erythropoiesis, granulopoiesis, thrombopoiesis, inflammation, and fibrosis. [240] In a phase 2 study, using bomedemstat in patients with ruxolitinib-resistant or intolerant PMF improved symptoms, splenomegaly, bone marrow fibrosis, and anemia. [241] Furthermore, no dose-limiting toxicities or maximum tolerated dose were identified. The drug is, therefore, currently the subject of further studies.

Evolution of the scoring system

International Prognostic Score System (IPSS)

The evolution of risk stratification systems began in 2009 with the development of the International Prognostic Score System (IPSS). [242] A case series of 1054 patients with PMF followed up at seven different blood establishments was analyzed to determine risk factors at diagnosis that may impact survival. In multivariate analysis, five independent predictors of risk were identified:

- 1) age over 65 (1 point);
- 2) hemoglobin less than 10 g/dL (1 point);
- 3) upper leukocytes $25 \times 10^9/L$ (1 point);
- 4) presence of circulating blasts (1 point);
- 5) presence of constitutional symptoms (1 point).

Based on the number of predictors present, the patient's specific risk is divided into four classes: 0 - low risk (median survival 135 months); 1 - intermediate-1 risk (median survival 95 months); 2 - intermediate-2 risk (median survival 48 months); >2 - high risk (median survival 27 months).

Dynamic International Prognostic Score System (DIPSS)

The following year, the international working group for the research and treatment of myeloproliferative neoplasms (IWG-MRT) developed a dynamic version of the previous prognostic model capable of better assessing the impact of adverse prognostic risk factors over time. [243] Thus was born the DIPSS, which can be used at any time during the disease and is calculated based on the following:

- 1) age over 65 (1 point);
- 2) hemoglobin less than 10 g/dL (2 points);
- 3) upper leukocytes $25 \times 10^9/L$ (1 point);
- 4) presence of circulating blasts (1 point);
- 5) presence of constitutional symptoms (1 point).

Based on the score, the patient is classified as 0 = low risk; 1 or 2 = intermediate-1 risk; 3 or 4 = intermediate-2 risk; 5 or 6 = high risk. The four risk classes deriving from the new classification show a predictive value both in terms of overall survival and in terms of leukemic evolution: low risk (median survival not reached and incidence of development of blast phase of 0.3 per 100 patients/year); intermediate-1 risk (median survival 9.8 years

and incidence of blast phase development 0.7 per 100 patient-years); intermediate-2 risk (median survival 4.8 years and incidence of blast phase development of 2.6 per 100 patient-years); high risk (median survival 2.3 years and incidence of blast phase development of 8.6 per 100 patient-years). [244]

Dynamic International Prognostic Score System Plus (DIPSS+)

In the following years, other risk factors independent of IPSS or DIPSS were identified: in particular, it was highlighted the relevance of unfavorable karyotype (including the alterations +8, -7/7q-, i(17q), inv(3), - 5/5q-, 12p- or 11q23 rearrangement), transfusion dependence and platelet count less than 100x10⁹/L. [245-247]

The DIPSS score was then modified, integrating the new risk factors and becoming DIPSS+. [71] This new dynamic score is calculated based on the following:

- 1) DIPSS low risk (0 points)
- 2) DIPSS intermediate risk-1 (1 point)
- 3) DIPSS intermediate risk-2 (2 points)
- 4) DIPSS high risk (3 points)
- 5) unfavorable karyotype (1 point)
- 6) need for transfusion (1 point)
- 7) platelet count less than 100,000/mL (1 point)

Based on the score obtained, the resulting risk categories are 0 points - low risk (median survival 15.4 years); 1 point - intermediate-1 risk (median survival 6.5 years); 2 or 3 points - intermediate-2 risk (median survival 2.9 years); above 3 points - high risk (median survival 1.3 years). It has also been observed that younger patients have a longer life expectancy with the same risk factors. Conversely, patients with a monosomal karyotype or with inv(3)/i(17q), or two alterations between circulating blasts greater than 9%, WBC count greater than 40,000/ml, or the presence of other unfavorable cytogenetic characteristics have a risk of mortality and leukemic transformation very high.

TABLE 5: Prognostic scoring systems for primary myelofibrosis			
Risk factor	IPSS	D-IPSS	D-IPSS-plus
Age > 65 years	1	1	1
Constitutional symptoms	1	1	1
Hemoglobin < 10 g/dL	1	2	1
Leukocytes > 25 x 10 ⁹ /L	1	1	1
Blood blasts ≥ 1%	1	1	1
Platelet count < 100 x 10 ⁹ /L			1
Transfusion dependence			1
Unfavorable karyotype			1
Risk stratification (median survival)			
Low	0 points (11.2 years)	0 points (not reached)	0 points (15.4 years)
Intermediate-1	1 point (7.9 years)	1–2 points (14.2 years)	1 point (6.5 years)
Intermediate-2	2 points (4 years)	3–4 points (4 years)	2–3 points (2.9 years)
High	≥ 3 points (2.3 years)	5–6 points (1.5 years)	≥ 4 points (1.3 years)
IPSS = International Prognostic Scoring System; D-IPSS = Dynamic International Prognostic Scoring System			

Table 6 - Summary diagram of the first 3 scoring systems (IPSS, DIPSS, DIPSS-plus)

Post DIPSS+ era

In the years following the advent of DIPSS+, thanks to the more extensive use of new technologies such as next-generation sequencing (NGS), the knowledge of the biological processes and molecular alterations underlying PMF has progressively refined. Since describing all these acquisitions is impossible, this thesis will highlight only some critical elements.

- a) First of all, the driver mutation CALR type 1 at the onset of the disease has shown a clear prognostic advantage compared to the other driver mutations. [46]
- b) Secondly, the role of the so-called "additional" mutations has progressively been defined. Although these mutations are not responsible for the clinical phenotype of the disease, they have a significant negative prognostic impact (mainly related to early leukemic evolution). The most characterized mutations associated to high molecular risk are IDH 1/2, EZH2, SRSF2, ASXL1, and U2AF1 Q157. [49-52] Multiple mutations have an additional impact on the survival compared to a single one, describing different levels of high molecular risk. [53]
- c) Thirdly, the cytogenetic criteria have been updated distinguishing the karyotype alterations at the onset of the disease into three categories: favorable, unfavorable, and very high risk (VHR). [48]
- d) Finally, some previous clinical risk predictors were re-analyzed and slightly modified or updated. In particular, the circulating blasts maintained a prognostic

relevance only if greater than 1% and the level of anemia was corrected according to gender (less than 10 g/dL for women and 11 g/dL for men).

Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis (MIPSS70)

Over the last few years, thanks to these new acquisitions, three new prognostic scores have been developed. The first was the MIPSS70, a prognostic system developed in patients aged 70 years or less to have a particularly effective tool in patients of transplant age. [248] The score initially included nine variables: 3 genetic (absence of CALR type 1 mutation; high molecular risk defined as the presence of only one mutation among ASXL1, SRSF2, EZH2, IDH1, or IDH2; the presence of 2 or more mutations among ASXL1, SRSF2, EZH2, IDH1 or IDH2) and six clinical (hemoglobin less than 10 g/dL; leukocytes greater than $25 \times 10^9/L$; lower plates $100 \times 10^9/L$; circulating blasts greater than 1%; marrow fibrosis more than grade 1; the presence of constitutional symptoms). Leukocytosis, thrombocytopenia, and the presence of 2 or more high-risk mutations were assigned a score of 2, while the other variables only received one point. The three risk categories thus identified were: 0 or 1 point – low risk (5-year survival 96%); 2 to 4 points - intermediate risk (5-year survival 67%); above 4 points - high risk (5-year survival 34%).

MIPSS70 plus (MIPSS70+) and MIPSS70 plus version 2 (MIPSS70+v2)

The MIPSS70+ and MIPSS70+ version 2.0 were born as an improved version of the previous scoring system by incorporating the innovations of the previously mentioned cytogenetic review, inserting the U2AF1 Q157 mutation among the high molecular risk lesions and, finally, integrating the notion of anemia corrected according to the sex. [48, 52, 249] In particular, the MIPSS70+v2 includes in its evaluation system nine variables evaluated at the onset of the disease, 5 of which are genetic (unfavorable karyotype = 3 points, high-risk karyotype = 4 points, presence of only one high molecular risk mutation = 2 points, presence of multiple high molecular risk mutations = 3 points, absence of CALR type 1 mutation = 2 points); and four clinical variables (constitutional symptoms = 2 points, moderate anemia intended as hemoglobin between 8 and 9.9 g/dL in women and 9 and 10.9 g/dL in men = 1 point, severe anemia intended as hemoglobin below 8 g/dL in women and 9 g/dL in men = 2 points and presence of circulating blasts more than 1% = 1 point). [250] The risk categories defined in this model and the respective scores

are: above 8 points - very high risk (10-year survival less than 3%); from 5 to 8 points - high risk (10-year survival 10%); from 3 to 4 points - intermediate risk (10-year survival 30%); 1 or 2 points - low risk (10-year survival 50%); 0 points - very low risk (10-year survival 86%).

Genetically Inspired Prognostic Scoring System (GIPSS)

Lastly, a scoring system exclusively based on genetic-molecular variables and defined as GIPSS has been elaborated. [251] The reference variables of this prognostic score system are:

- 1) Particularly unfavorable karyotype (2 points);
- 2) Unfavorable karyotype (1 point);
- 3) Absence of CALR type1 or type1-like mutations (1 point);
- 4) Mutations of ASXL1, SRSF2 or U2AF1Q157 (1 point).

The four risk categories covered by this scoring system included: 0 points - low risk (median survival of 26.4 years); 1 point - intermediate risk-1 (median survival of 8 years); 2 points - intermediate risk-2 (median survival of 4.2 years); over 2 points - high risk (median survival of 2 years).

Additional prognostic risk factors

In addition to what has already been reported in the previous discussion, additional risk factors associated with worse overall survival have emerged in recent years. However, they are not currently included in formally codified prognostic risk scores. Among these, those with the most significant impact on overall survival are the circulating cytokine levels and the onset's mutational status.

Cytokine levels are of particular interest because they directly describe PMF metabolic activity. A Mayo Clinic study demonstrated significant deregulation of these levels in patients with PMF and showed the impact on life expectancy. In particular, elevated IL-8 and IL-2R may help identify intermediate-risk DIPSS+ patients with lower life expectancy. [76]

Regarding the "driver" mutational status, in addition to the already mentioned protective effect associated with the type-1 CALR mutation, the prognostic role of the remaining conditions was also clarified. In particular, the median survival was 15.9 years in CALR-mutated patients, 9.9 years in MPL-mutated patients, 5.9 years in JAK2-mutated patients, and 2.3 years in patients without these mutations (triple negative).

[12] Triple-negative patients are, therefore, patients with significantly worse survival. [252]

Prognostic scores today

Thanks to these continuous improvements, today, in centers that have the possibility of using the new molecular biology techniques, it is possible to integrate GIPSS and MIPSS70+v2, reaching a very high sensitivity and specificity in the selection of patients to start allogeneic stem cell transplantation as shown in figures 14 and 15.

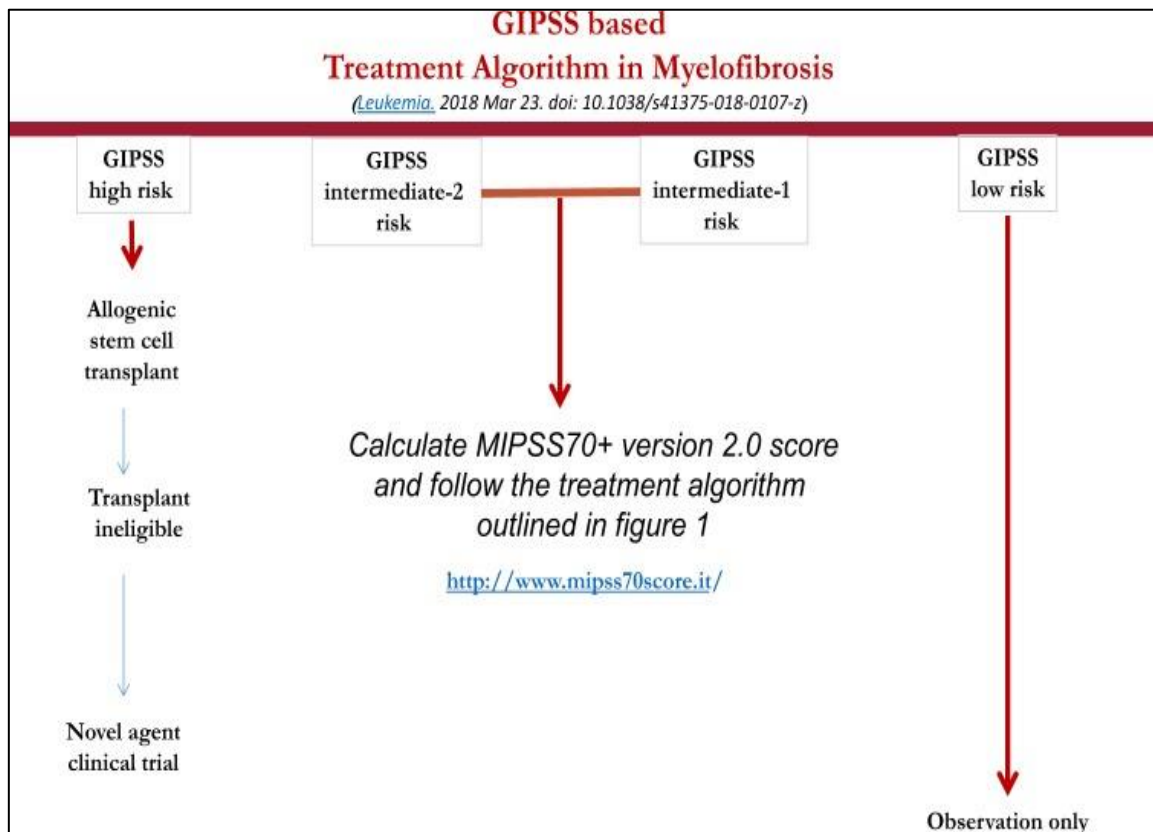


Figure 14 – Therapeutic algorithm 2018: GIPSS

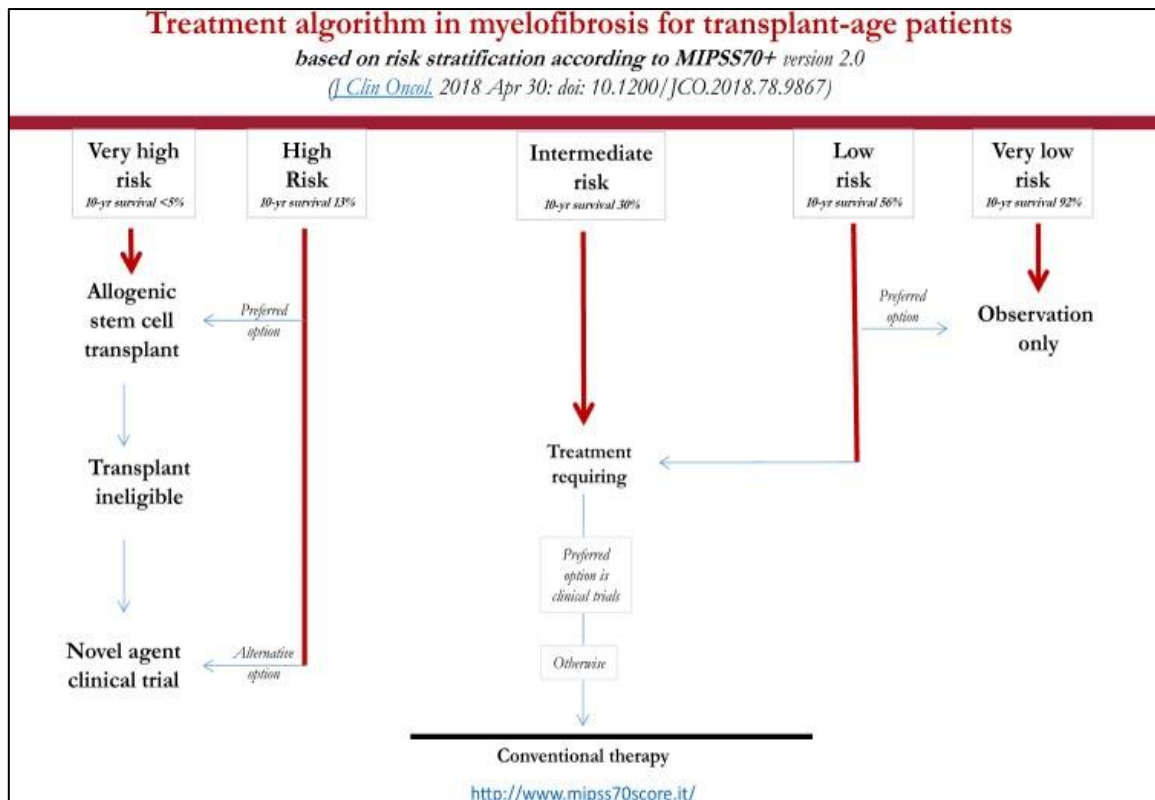


Figure 15 – Therapeutic algorithm 2018: MIPSS70+ version 2.0

However, in many centers, the possibility of performing advanced molecular biology (NGS) analyses is reserved for selected patients who are potential candidates for transplantation or treatment with new molecular target therapies. Therefore, for the correct clinical management and follow-up of patients with PMF, the integration between the information provided by traditional clinical risk scores and modern genetic risk scores remains essential.

CHAPTER 2

The research

2.1 – Research hypotheses and objectives

As highlighted in previous chapters, the pathogenesis of PMF is a complex process characterized by different types of molecular lesions. In particular, over the last twenty years, progressively greater clarity has been shed on the role of the different driver mutations responsible for the clinical phenotype of the disease and on the role of additional cytogenetic-molecular lesions. [5, 14, 17, 48, 60] Clinically, PMF is characterized by anemia, hepatosplenomegaly, and constitutional symptoms. [91-95] These disorders can be very heterogeneous regarding symptom burden and time to disease progression, placing the need for customization of the clinical pathway and therapeutic approach. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is still the only curative modality, but assigning a patient to the procedure is the most challenging decision from a physician's perspective due to its treatment-related toxicity. [125, 253]

Prognostic models have been created to facilitate therapeutic choices. These tools can identify groups of patients with different life expectancies helping to choose treatment accordingly. Since 2009, various prognostic scoring systems have been developed using clinical variables and genetic data. Despite recent improvements, some poorly standardized variables, such as circulating blast counts or the presence of constitutional symptoms, are still included in most prognostic scores. In particular, these variables strongly influence the prognostic scores currently most used in clinical practice: IPSS, DIPSS, and DIPSS+.

Peripheral blood blast count is an indication of bone marrow dysfunction. Its determination is based on the morphological evaluation of peripheral blood smears and depends on the operator. Also, the quantity of circulating blasts necessary to increase the risk is only 1%. Furthermore, it must be considered that the identification of the blast cells can be challenging in the case of immature stages of the monocytic lineage, further reducing the reliability of this variable. Although not equivalent, previous studies have highlighted the association between the absolute number of CD34+ cells and the proportion of circulating blasts: in particular, a proportion of CD34+ cells $> 15 \times 10^9/L$

is strongly associated with the diagnosis of PMF. [79, 242]

Constitutional symptoms (weight loss > 10% of baseline in the year preceding diagnosis, unexplained excessive sweating, or persistent fever for at least one month) result from the aberrant release of inflammatory cytokines accompanying the active disease. [242, 254]

The importance of this datum, therefore, derives from being associated with the hypercatabolic/cachectic state of the disease itself, which can influence not only the quality of life but also survival. However, the detection of this variable may not be reliable, despite the use of the appropriate diagnostic tools, as it is not objectifiable. To overcome this problem, the Mayo Clinic group recently proposed to monitor this aspect through easily obtainable laboratory markers (total cholesterol and albumin): cachexia index. [255] This tool could also help to define prognostic risk more precisely.

Therefore, this research aimed to verify whether obtaining equally accurate clinical prognostic scores was possible using more objective parameters instead of less standardized variables.

2.2 - Materials and methods

1) Patients

This study analyzed patients diagnosed with PMF between 2004 and 2022 at the Reggio Emilia Hematology Department. To ensure correct analysis of the cases, in collaboration with the Cancer Center, a review of all the diagnoses of hematological cancer (7,578 patients) made in the province of Reggio Emilia was first performed, describing the data relating to incidence, mortality, and survival. This epidemiological work is currently under publication.

Patients with PMF were isolated from the database of this first study, proceeding with the construction of a specific pathology database containing 152 patients. For the study, the following patients were considered eligible: 1) over 18 years of age; 2) with a diagnosis of PMF revised according to the WHO criteria of 2016. The following exclusion criteria were instead considered: 1) the presence of cytoreductive treatment in progress at the time of diagnosis; 2) the presence of ongoing statin treatment at the time of diagnosis.

For each patient, the following data concerning diagnosis were collected: age, sex, presence of constitutional symptoms, presence of palpable splenomegaly, degree of bone marrow fibrosis, presence of JAK2, CALR or MPL mutation, presence of unfavorable cytogenetics (according to the provisions for the score DIPSS+), blood count values (in particular the presence of leukocytosis, anemia or thrombocytopenia), need for red blood cell transfusion support, levels of albumin, cholesterol, and circulating CD34+ cells. Finally, survival and follow-up data were entered.

The medical records were used both for the collection of laboratory data and for the extraction of clinical variables.

2) Statistical analysis

Continuous variables were summarized as median and range or mean and standard deviation depending on the statistical analysis performed, while categorical variables were summarized as count and frequency of each. Regarding the statistical analysis, the differences between the categories in the distribution of the continuous variables were analyzed through the Mann-Whitney test (for the comparison of two groups) or the Kruskal-Wallis test (for the comparison of three or more groups). Patient groups with nominal variables were compared using the χ^2 test. Standard statistical methods were used to determine the significance of between-group differences in the distribution of

continuous or nominal variables. Overall-survival analysis was conducted considering the period from diagnosis to the date of death (uncensored) or last follow-up visit (censored). Overall-survival analyses were prepared using the Kaplan-Meier method and compared using the Log-rank test. Cox proportional hazards regression model was applied for multivariate analysis. A P-value <0.05 was considered significant. Version 14.0.0 of JMP® Pro software manufactured by SAS Institute (Cary, NC, USA) was used for all calculations.

2.3 - Results

According to inclusion and exclusion criteria, of 152 patients with PMF referred to our center during the period under review, 77 were eligible for the study. The features of the study population are shown in Table 7.

The median age of patients at diagnosis was 66 years, of which 53% were over 65. Male patients were 62%. Clinically, 17% had constitutional symptoms, 29% had palpable splenomegaly, and 4% were transfusion dependent. A high degree of fibrosis (> or = 2) was present in only 23% of cases. The driver mutational pattern was determined in 91% of cases: JAK2V617F 72%, CALR type 1 or type 2 20%, MPLW515L/K 4%, triple negative 4%. Cytogenetics was available only in 61% of patients, of which 9% showed an unfavorable karyotype. As regards the blood count values, 5% of the patients had hemoglobin levels below 10 g/dl, 4% had platelets below 100 x 10⁹/L, 3% had white blood cells above 25 x 10⁹/L, and 10% had peripheral blasts. Circulating CD34+ cells were greater than 15 x 10⁹/L in 26% of patients. Finally, 73% of patients had albumin levels below 4.3 mg/dl, and 14% had cholesterol below 122 mg/dl.

Baseline Characteristics	All Patients (n=77)
Age in years; median (range)	66 (22-97)
Age >65 years; n (%)	41 (53)
sex (bad); n (%)	48 (62)
Presence of constitutional symptoms; n (%)	13 (17)
Presence of palpable splenomegaly; n (%)	22 (29)
Bone marrow fibrosis degree > or = 2; n (%)	18 (23)
Drivers mutation; n (%) "N" evaluable= 70 (91%)	
JAK2V617F; n (%)	50 (72)
CALR type-1 and type-2; n (%)	14 (20)
MPLW515K/L; n (%)	3 (4)
Triple negatives; n (%)	3 (4)
Unfavorable karyotype; n (%) "N" evaluable= 47 (61%)	4 (9)
Hemoglobin <10 g/dl; n (%)	4 (5)
Transfusion dependency; n (%)	3 (4)
Platelets <100x10 ⁹ /L; n (%)	3 (4)
Leukocytes >25x10 ⁹ /L; n (%)	2 (3)
Circulating blasts > or = 1%; n (%)	8 (10)
Albumin levels < 4.3 mg/dl	56 (73)
Cholesterol levels < 122 mg/dl; n (%)	11 (14)
Circulating CD34+ cells > 15x10 ⁹ /l; n (%)	20 (26)

Table 7: Clinical and laboratory characteristics of the 77 patients examined

We then verified whether the circulating CD34+ cells count could be as accurate a predictor of bone marrow dysfunction as the presence of peripheral blasts. To do this, we

first verified whether, in the population under analysis, the threshold of $15 \times 10^9/l$ CD34+ cells had not only a diagnostic value, as previously reported by Barosi's group but also a prognostic value. To this end, survival curves based on the amount of circulating CD34+ cells were created (figure 16). The survival of the two groups of patients was well distinguished. In particular, patients with circulating CD34+ cells above $15 \times 10^9/l$ (20 patients) had a lower overall survival (median survival reached 6 years after diagnosis).

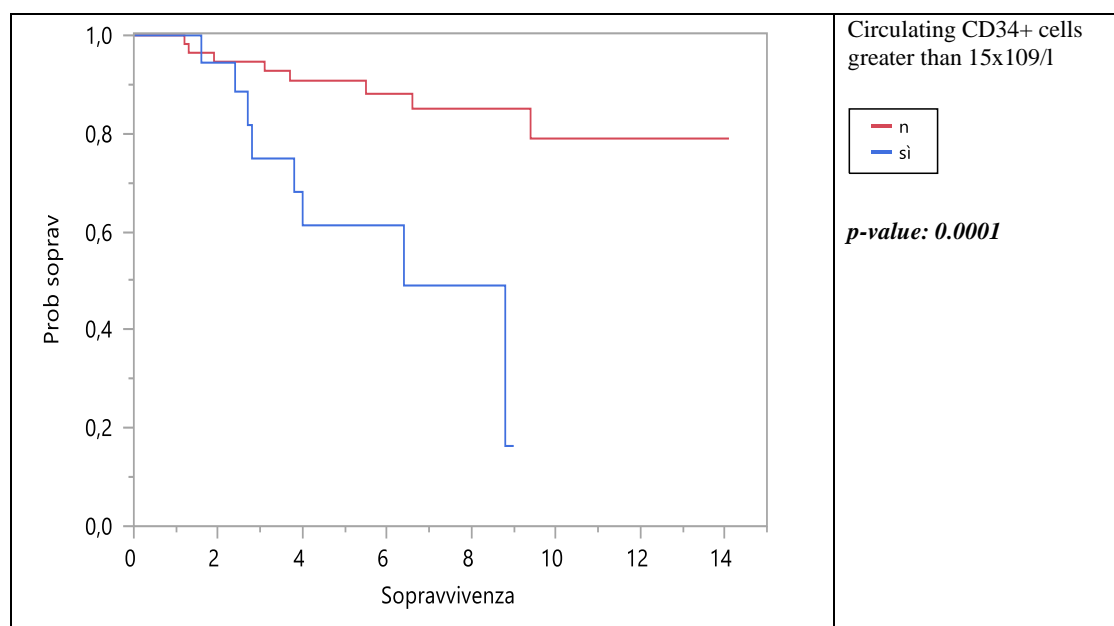


Figure 16 - Analysis of survival based on the amount of circulating CD34+ cells at disease onset

We then evaluated the peripheral blasts' predictive value in our population (figure 17). The survival curves based on the presence or absence of peripheral blasts showed good predictive power by dividing the population into two distinct groups. In particular, the group of patients without peripheral blasts at onset (69 patients) had a better overall survival (median survival not reached) than patients with blast rates greater than or equal to 1% (8 patients), in which mortality was high (median survival reached 6 years after diagnosis).

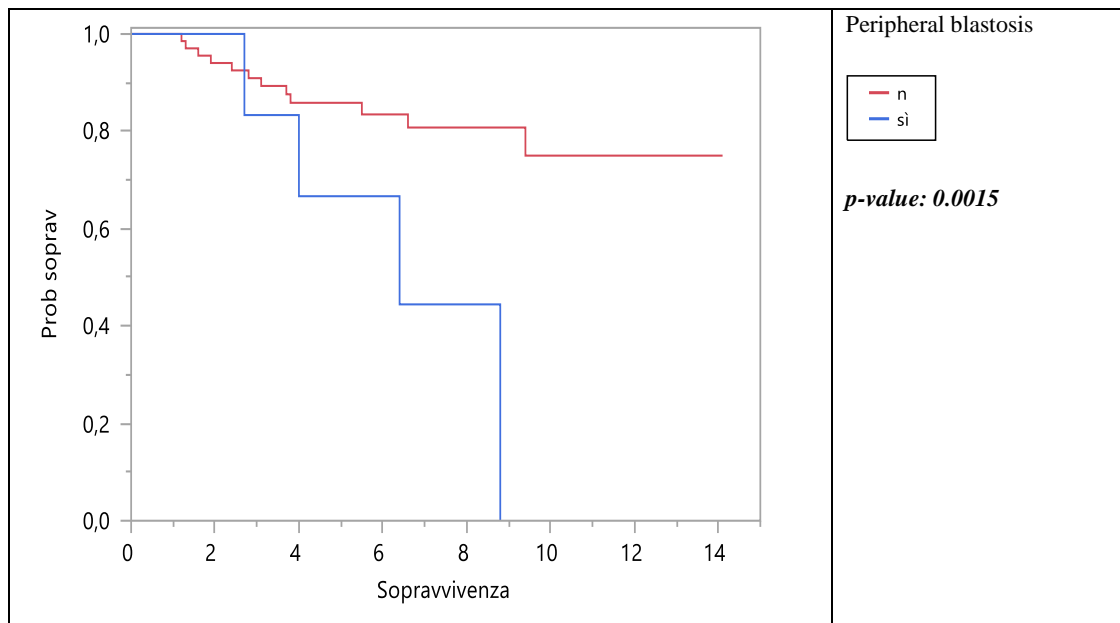


Figure 17 - Analysis of survival based on the presence of peripheral blastosis at disease onset

Both variables, therefore, showed predictive power regarding the overall survival of patients with PMF. However, as reported in table 8, if directly compared, only the circulating CD34+ cells remained significant ($p = 0.0269$).

Baseline Characteristics	Univariate analysis p value	Multivariate analysis p value
Circulating blasts $\geq 1\%$	0.0111	0.61
Circulating CD34+ cells $> 15 \times 10^9/l$	0.0009	0.0269

Table 8: Impact of blasts and circulating CD34+ cells at disease onset on overall survival

In our series, the prognostic value of circulating CD34+ cells is confirmed and higher than that of the blast rate.

Baseline Characteristics	Circulating CD34+ cells $\leq 15 \times 10^9/l$ (n=57)	Circulating CD34+ cells $> 15 \times 10^9/l$ (n=20)	p value
Age > 65 years; n (%)	27 (47)	14 (70)	0.11
Presence of constitutional symptoms; n (%)	12 (21)	1 (5)	0.16
Presence of palpable splenomegaly; n (%)	9 (13)	13 (65)	< 0.0001
Bone marrow fibrosis degree ≥ 2 ; n (%)	5 (9)	13 (65)	< 0.0001
Unfavorable karyotype; n (%) "N" evaluable= 47 (61%)	2 (6)	2 (14)	0.57
Hemoglobin < 10 g/dl; n (%)	2 (4)	2 (10)	0.27
Transfusion dependency; n (%)	1 (2)	2 (10)	0.16
Platelets $< 100 \times 10^9/L$; n (%)	1 (2)	2 (10)	0.16
Leukocytes $> 25 \times 10^9/L$; n (%)	1 (2)	1 (5)	0.45
Circulating blasts $\geq 1\%$; n (%)	0	8 (100)	< 0.0001

Table 9: Patient phenotype with elevated circulating CD34+ cells at disease onset

To better understand the role of this marker, we then moved on to the analysis of the

phenotypic associations (Table 9). In our series, increased levels of circulating CD34+ cells were associated not only with peripheral blasts ($p<0.0001$) but also with higher levels of marrow fibrosis ($p<0.0001$) and more frequent detection of splenomegaly ($p<0.0001$).

The analysis, therefore, focused on identifying the best marker of metabolic dysfunction induced by the state of hypercatabolism and cytokine deregulation typical of the patient with PMF. In particular, the role of the cachexia index and constitutional symptomatology and their impact on overall survival were analyzed. We began by verifying whether the cachexia index, recently proposed by Tefferi's group, maintained its predictive role also in our cohort of patients. By what was proposed by the American group, the patients were divided into groups based on the presence of 1, 2 or no risk factors among 1) cholesterol levels lower than 122 mg/dl; 2) albumin levels below 4.3 mg/dl. Three distinct survival curves resulted (19 patients with 0 risk factors, 49 patients with 1 risk factor, and 9 patients with 2 risk factors), confirming the predictive value of this tool on an outer court for the first time. In particular, the survival curves of non-high-risk patients (0 or only 1 risk factor present) did not reach the median survival. In contrast, patients with both risk factors present at disease onset had a poor prognosis characterized by survival of 50% five years after diagnosis (figure 18).

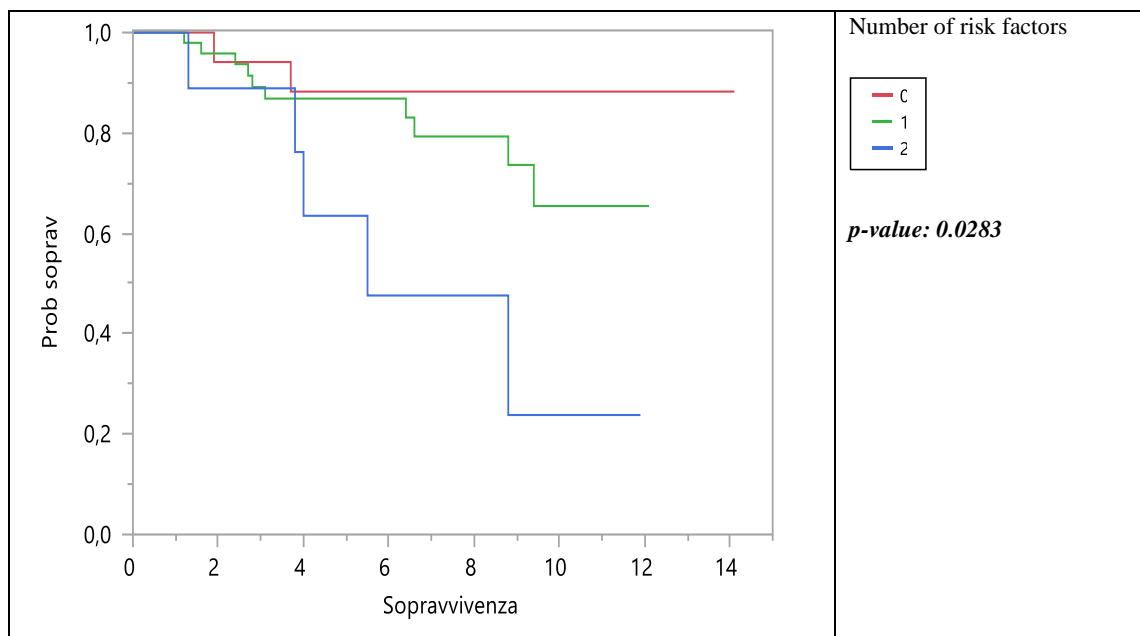


Figure 18: Survival analysis based on the number of risk factors according to Cachexia Index

Based on what was observed, it was decided to perform the survival analysis again based on the presence or absence of a prognostic impact (figure 19). The patients were therefore

divided into two groups based on the presence of high risk according to the cachexia index (9 patients with 2 of the above risk factors present) and non-high risk according to the cachexia index (68 patients with only one or no present risk). The two curves underline how a relevant alteration of the metabolism (detectable by the cachexia index) represents an effective predictor of mortality.

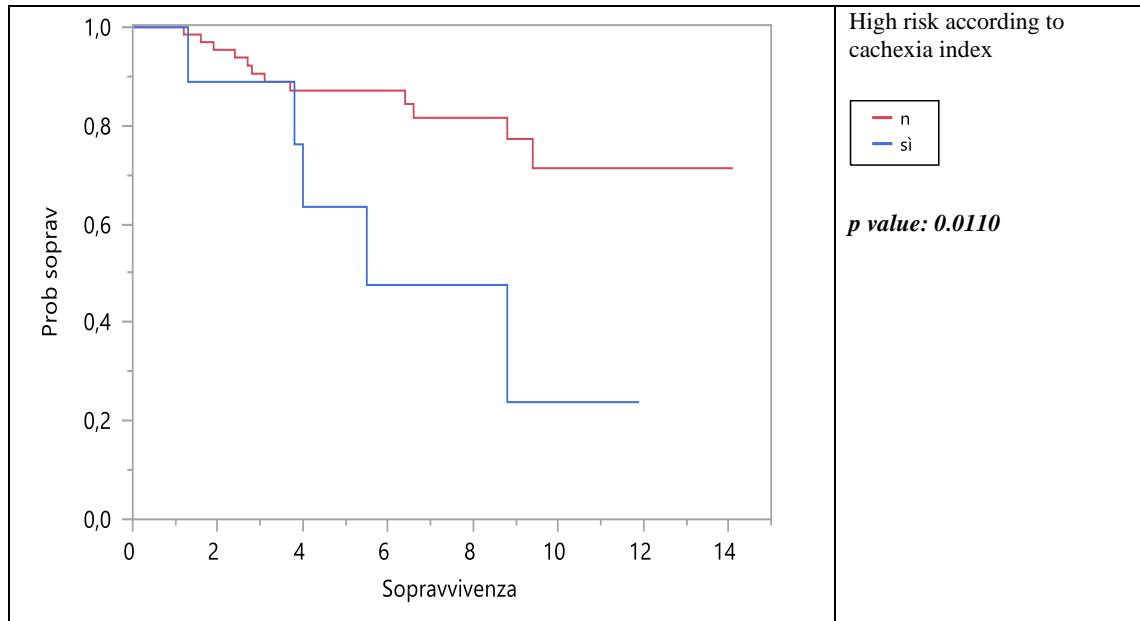


Figure 19: Survival analysis based on risk class according to Cachexia Index

We then analyzed the prognostic impact linked to constitutional symptoms in our population. Two curves were constructed using the Kaplan and Meier method. However, as shown in Figure 20, the two curves have similar trends, and neither reaches the median survival. Therefore, constitutional symptoms at the onset of the disease in our series (13 patients) do not translate into a prognostic factor predictive of poor survival compared to the absence of such symptoms (64 patients).

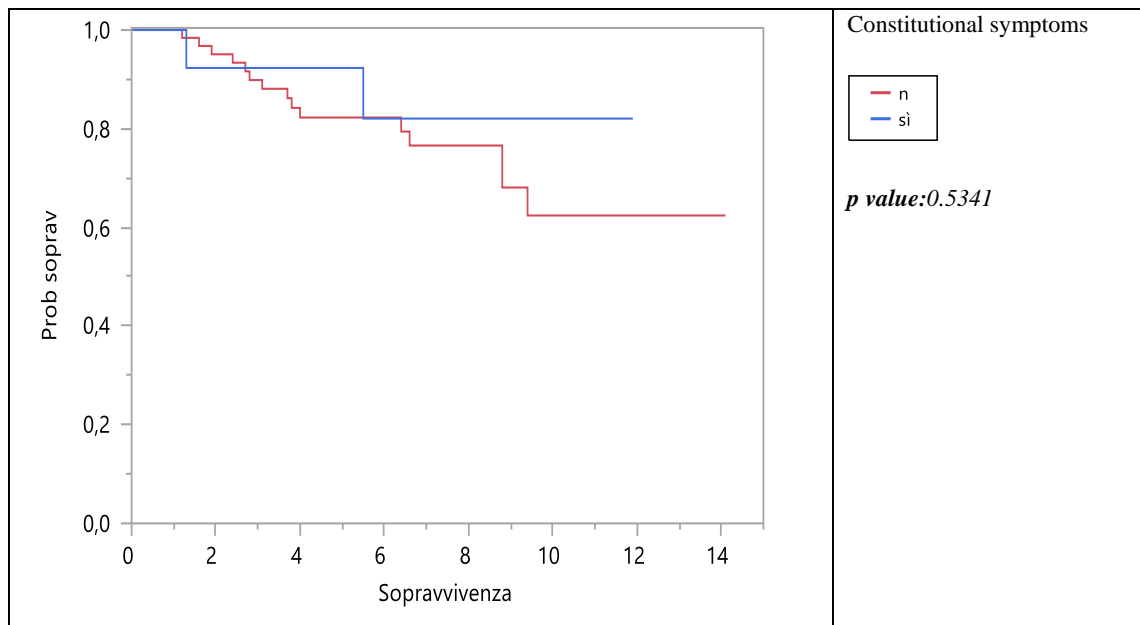


Figure 20: Survival analysis based on the presence of constitutional symptoms

The different predictive strength of constitutional symptoms and high cachexia index within our study becomes even more evident if the variables are directly compared.

Baseline Characteristics	Univariate analysis p value	Multivariate analysis p value
Presence of constitutional symptoms	0.5147	0.19
Cachexia index high	0.0322	0.0157

Table 10: Impact of constitutional symptoms and high cachexia index at disease onset on overall survival

As shown in Table 10, a high cachexia index is a much more powerful indicator of mortality than constitutional symptoms ($p=0.0157$).

Baseline Characteristics	Cachexia index low or intermediate (n=68)	Cachexia index high (n=9)	p value
Age >65 years; n (%)	33 (49)	8 (89)	0.0318
Presence of constitutional symptoms; n (%)	9 (13)	4 (44)	0.0393
Presence of palpable splenomegaly; n (%)	17 (25)	5 (56)	0.10
Bone marrow fibrosis degree > or = 2; n (%)	13 (19)	5 (56)	0.0283
Unfavorable karyotype; n (%) "N" evaluable= 47 (61%)	3 (7)	1 (17)	0.43
Hemoglobin <10 g/dl; n (%)	0	4 (44)	<0.0001
Transfusion dependency; n (%)	0	3 (33)	0.0011
Platelets <100x10 ⁹ /L; n (%)	2 (3)	1 (11)	0.31
Leukocytes >25x10 ⁹ /L; n (%)	2 (3)	0	1
Circulating blasts > or = 1%; n (%)	5 (7)	3 (33)	0.0468

Table 11: Phenotype of patient with high cachexia index at disease onset

To fully understand the role of this prognostic risk marker, it is necessary to study its phenotypic associations. Table 11 shows how a high cachexia index at diagnosis is

associated with constitutional symptoms ($p=0.393$), significantly older age ($p=0.0318$), a greater degree of bone marrow fibrosis ($p=0.0157$), lower hemoglobin levels ($p<0.0001$), need for transfusion dependence ($p=0.0011$), and peripheral blasts ($p=0.0468$).

Based on these preliminary data, it was decided to investigate further to verify whether the circulating CD34+ cell count and cachexia index could represent an alternative to the traditional variables within the prognostic scoring systems. We then proceeded to incorporate the data relating to the levels of circulating CD34+ cells and the cachexia index within the classic risk scores instead of constitutional symptoms and the blast rate. The modified-IPSS, modified-DIPSS, and modified-DIPSS+ scores were generated from the IPSS, DIPSS, and DIPSS+ scores. It was decided to divide patients at higher risk (including patients at high and intermediate-2 risk) from those at lower risk (including patients at intermediate-1 and low) according to the respective stratification systems to highlight the prognostic differences between the classic scores and the modified ones. The following groups were found: higher risk IPSS (17 patients), lower risk IPSS (60 patients), higher risk DIPSS (5 patients), lower risk DIPSS (72 patients), higher risk DIPSS+ (19 patients), lower risk DIPSS+ (32 patients), higher risk modified-IPSS (18 patients), lower risk modified-IPSS (59 patients), higher risk modified-DIPSS (8 patients), lower risk modified-DIPSS (69 patients), higher risk modified-DIPSS+ (19 patients), lower risk modified-DIPSS+ (32 patients). Finally, classical and modified risk scores were compared.

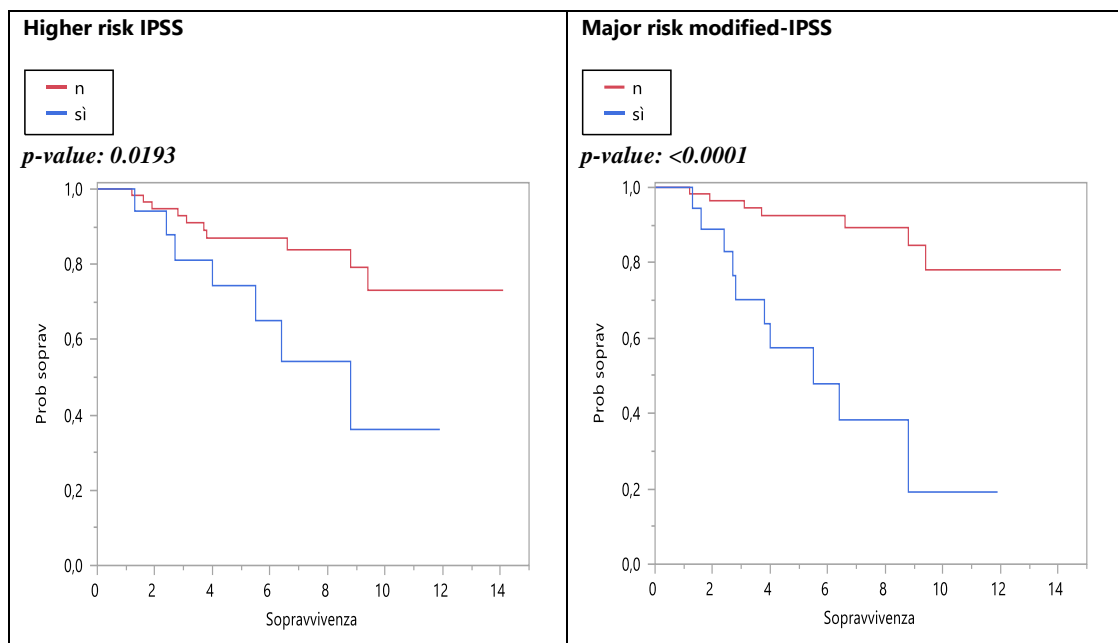


Figure 21 - Analysis of survival based on the presence or absence of IPSS and modified-IPSS major risk

	<i>p value</i>
Higher risk IPSS	0.0346
Major risk modified-IPSS	0.0001

Table 12: Impact on overall survival of greater risk IPSS and modified-IPSS

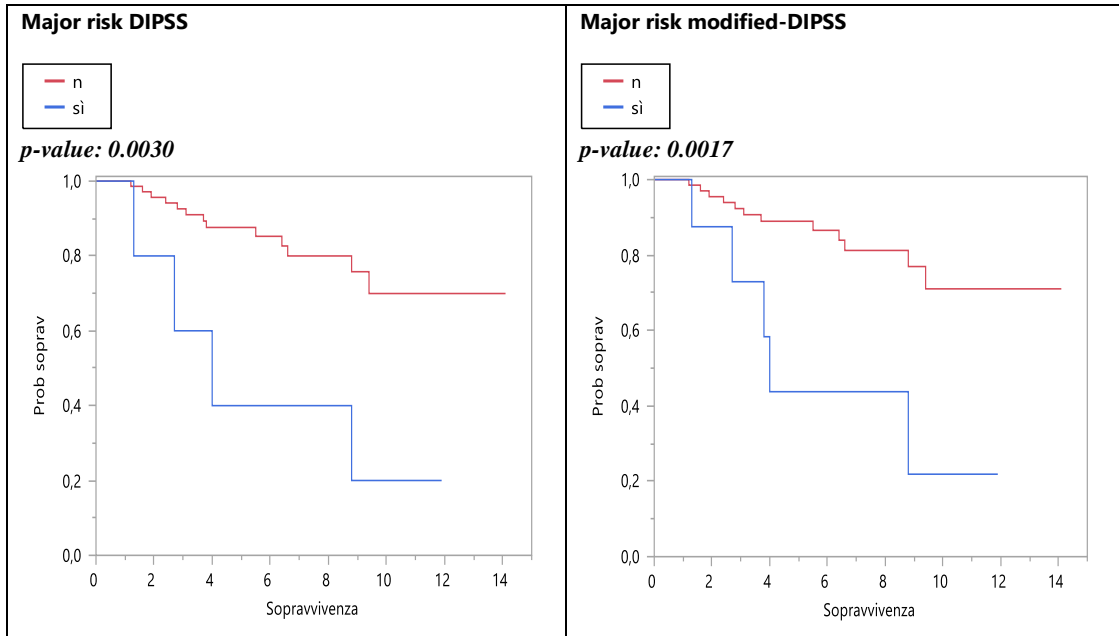


Figure 22 - Analysis of survival based on the presence or absence of major risk DIPSS and modified-DIPSS

	<i>p value</i>
Major risk DIPSS	0.0206
Major risk modified-DIPSS	0.0119

Table 13: Impact on overall survival of greater risk DIPSS and modified-DIPSS

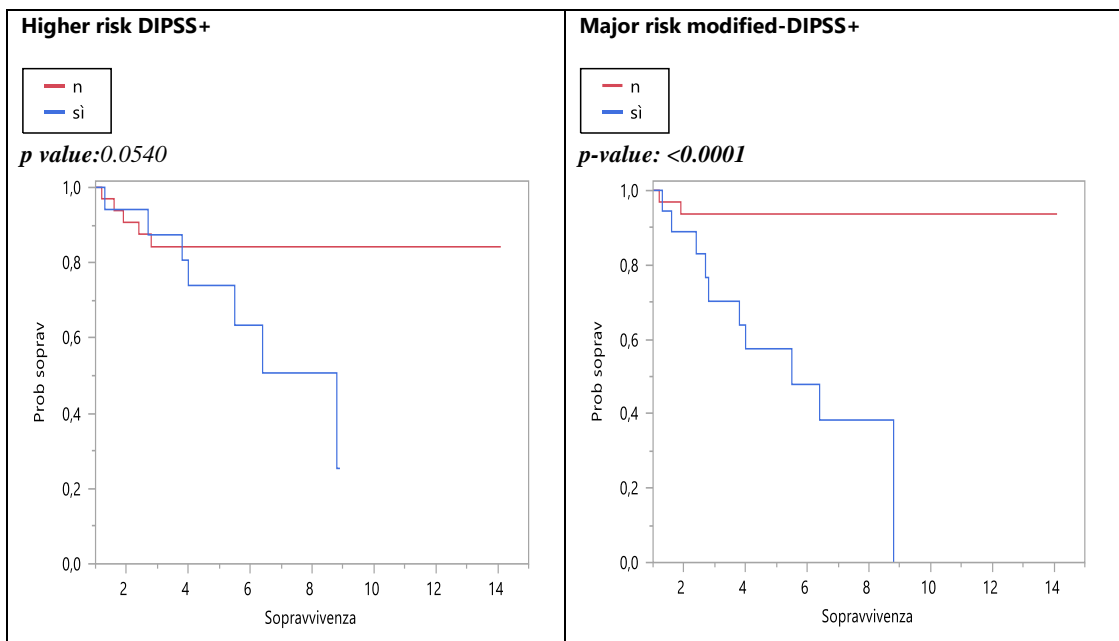


Figure 23 - Analysis of survival based on the presence or absence of major risk DIPSS+ and modified-DIPSS+

	<i>p value</i>
Higher risk DIPSS+	0.06
Major risk modified-DIPSS+	0.0001

Table 14: Impact on overall survival of greater risk DIPSS+ and modified-DIPSS+

As emerges from figures 21, 22, 23, and the related tables (12, 13, and 14) shown above, all the classic clinical risk scores not only have not lost predictive power but have benefited in terms of the prognostic accuracy of the integration of the new clinical variables. Therefore, according to the modified scores, an attempt was made to understand the five-year survival rates in patients with higher risk.

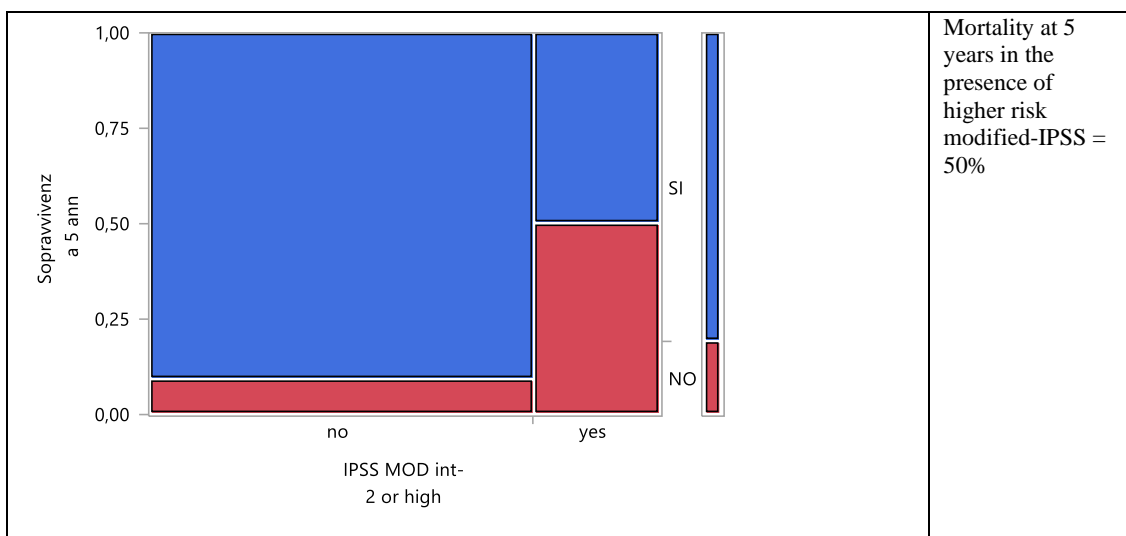


Figure 24 - Survival rates at 5 years in the presence of higher risk modified-IPSS

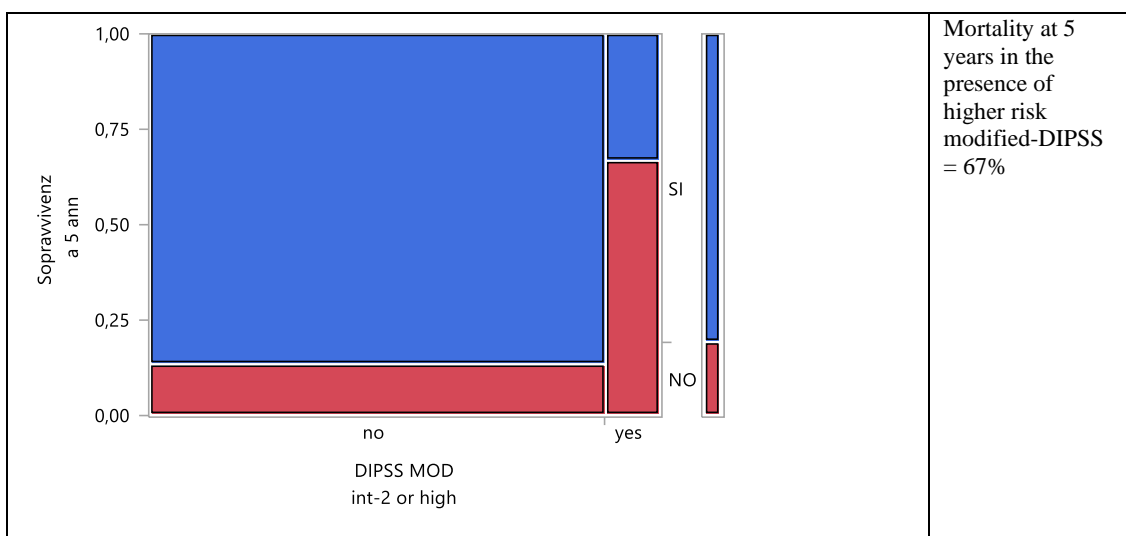


Figure 25 - Survival rates at 5 years in the presence of higher risk modified-DIPSS

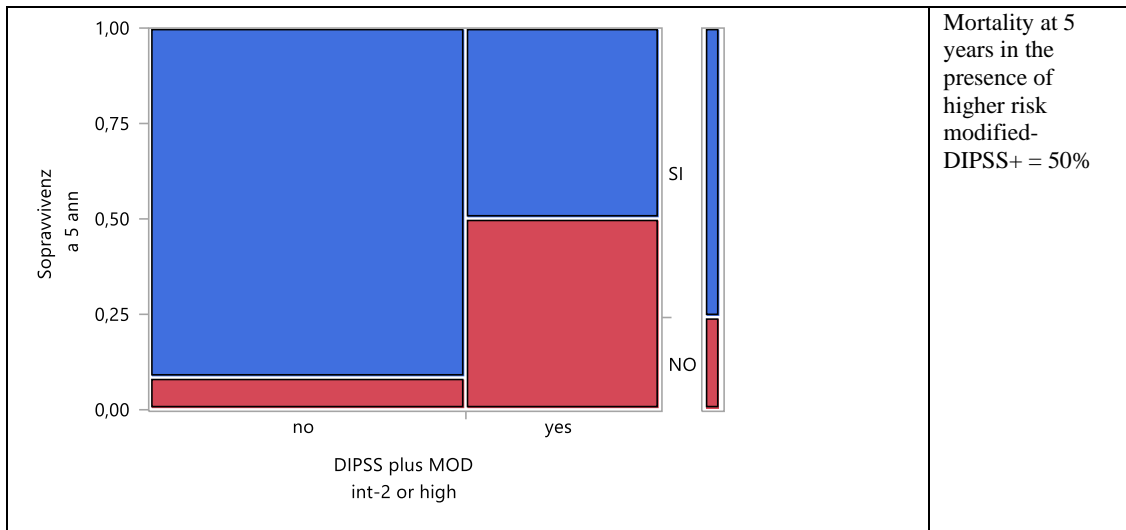


Figure 26 - Survival rates at 5 years in the presence of higher risk modified-DIPSS+

In our population, the 5-year mortality (figures 24, 25, and 26) in higher risk according to modified-IPSS, modified DIPSS, and modified DIPSS+ was 50%, 67%, and 50%. Through these scores, it is possible to identify patients with poor clinical outcomes and candidates for more intensive treatments.

2.4 – Discussion

Over the past 15 years, progressive molecular biology discoveries have helped us better characterize PMF. It is evident today that a heterogeneous course characterizes this disease in terms of disease burden and time to progression. The variability is the result of a highly complex multifactorial process. In particular, as far as the prognosis is concerned, not only the process of clonal proliferation certainly plays a role of primary importance, but also the progressive bone marrow dysfunction and the hypermetabolic/cachectic state secondary to the chronic inflammation that accompanies the pathology.

Since life expectancy is highly variable, there is, therefore, the need to personalize the therapeutic approach based on the patient's specific characteristics. If up until a few years ago, the therapeutic options in this setting were limited, today, the treatment horizon has expanded enormously and confronts the clinician with complex challenges. On the one hand, allogeneic transplantation of hematopoietic stem cells still represents the only curative modality, although characterized by a high mortality and morbidity rate. On the other hand, over the last ten years, numerous new drugs with molecular targets have emerged that can change the natural history of the disease but require careful monitoring and patient selection.

Several prognostic models have been created since 2009 to identify patients with the worst life expectancy who could benefit from an early intensification of the therapeutic strategy. In particular, with Next Generation Sequencing, new scores have been produced which integrate molecular biology information allowing a more accurate selection of the patient at risk of disease evolution. The main limitation of using these risk stratification tools is the limited availability of the NGS analysis (analysis characterized by high costs), usually performed only on selected patients with active disease or high risk of leukemic progression.

Most prognostic scores, however, include poorly standardized clinical variables and risk underestimating patients with reduced life expectancy.

In particular, the circulating blasts count predicts mortality reflecting both bone marrow dysfunction secondary to the fibrotic process and leukemic disease progression. The prognostic role of peripheral blasts has been confirmed in numerous studies. However, its predictive power remains limited by being operator-dependent, the difficulty of detecting this variable in specific conditions, and the low threshold of circulating blasts necessary to make this a variable risk factor (blasts \geq 1%).

Similar considerations can be made for the presence or absence of constitutional symptoms. This condition mirrors the dysmetabolism associated with the chronic inflammatory process accompanying PMF. The prognostic role of this survival predictor has been confirmed in numerous studies. However, the correct detection of these symptoms is complex. Although there are numerous questionnaires for detecting the constitutional symptoms of PMF patients, their use in daily clinical practice can be challenging. Furthermore, data collection involves both the operator and the patient, and it is, therefore, difficult to objectify.

As anticipated, this study aimed to verify whether improving the performance of the current prognostic scores using more objective parameters was possible. The variable chosen as a potential index for bone marrow dysfunction was the CD34+ cell count on peripheral blood. The hypermetabolic/inflammatory state indicator was the cachexia index recently proposed by the Mayo Clinic group. Research has attempted to elucidate the role of these predictors of survivability and delineate their role in the context of PMF. As regards the levels of circulating CD34+ cells at the onset of the disease in our cohort of patients, it emerged, first of all, that the cut-off value of $15 \times 10^9/L$ circulating CD34+ cells, identified in previous works as a predictor of PMF diagnosis, it is also a prognostic marker associated with reduced life expectancy. Considering the phenotypic associations (peripheral blasts, high degree of bone marrow fibrosis, and splenomegaly), it is probable that the prognostic role of this marker is related to a high level of bone marrow dysfunction rather than to possible pictures of leukemic evolution.

The circulating CD34+ also demonstrated a greater predictive power in discriminating patients with low life expectancy than peripheral blasts. The greater predictive power of CD34+ cells could either lie in the technique used to detect the two variables (fluorimetry for CD34+ cells, manual count for blast cells) or reflect a greater sensitivity of CD34+ cells in detecting earlier bone marrow dysfunction. It must be remembered that both of these variables can reflect not only the marrow subversion but also the evolution of the disease. Peripheral blasts are likely more specific in predicting leukemic evolution (and therefore are more altered in advanced stages). In contrast, the increase in circulating CD34+ cells is a more sensitive marker of bone marrow dysfunction (and therefore is associated with earlier stages of the disease). The role of peripheral blasts would not lose its importance. However, as it is associated with more advanced stages of the disease, the cut-off should be re-evaluated.

However, for the first time, an evaluation was carried out on an external cohort for the

cachexia index. The prognostic risk tool of Tefferi's group confirmed its predictive power. However, the analysis showed that a significant alteration of metabolism is necessary to impact overall survival. According to the cachexia index, the high-risk class is associated with a low life expectancy and is a good predictor of mortality. The elevated cachexia index would seem to be a marker capable of detecting the prognostic impact of various conditions: advanced age, chronic inflammation (constitutional symptoms), advanced disease (advanced fibrosis and peripheral blasts), anemia (hemoglobin levels below 10 g/dl and transfusion dependence). Cellular senescence phenomena and comorbidities typical of elderly patients with an advanced-stage disease in which metabolic dysfunction can represent a significant problem may also influence this prognostic indicator. Therefore, a more accurate variable detection and a different sensitivity could account for the different prognostic power. It must therefore be emphasized that the role of constitutional symptoms as a predictor of mortality, already confirmed in numerous studies, would not be questioned but could be integrated by an indicator of conditions not exclusively linked to the inflammatory state of the disease, which can affect on the patient's life expectancy (co-pathologies, advanced age,

We then integrated the two new variables, replacing them with the previous ones, in the classic risk scores. A comparison was then made between the classic risk scores and those modified based on the presence or absence of higher risk (intended as the presence of intermediate-2 risk or high risk according to the various scores). The three modified risk scores showed a higher predictive power than the traditional ones. The integration of these variables was, therefore, able to identify a proportion of patients who would typically have been considered intermediate-1 or low-risk according to IPSS, DIPSS, or DIPSS+ but characterized by low life expectancy.

The 5-year life expectancy for patients with higher risk at diagnosis was, in fact, equal to or less than 50%. Therefore, the group of patients at higher risk would have been worthy of intensifying the treatment (transplantation; evaluation of therapeutic alternatives) or the follow-up.

The data emerging from this study, therefore, not only confirm that the evaluation of the levels of circulating CD34+ cells and the cachexia index could be helpful variables to standardize the risk scores but that the incorporation of the information relating to these two variables in the of these scores could also increase their predictive power. Naturally, this pilot study is characterized by intrinsic limitations related to the small number of samples and the absence of validation on external populations. However, for the

importance of the implications described above, a confirmatory study on an enlarged population will soon be conducted. In particular, we will try to evaluate: 1) the utility of CD34+ cell levels as a dynamic marker and the possible interference of cytoreductive therapies; 2) the role of the cachexia index in the elderly patient with comorbidities; 3) the utility of cachexia index and circulating CD34+ levels as predictors of early response to treatment with JAK2 inhibitors.

BIBLIOGRAFIA/BIBLIOGRAPHY

1. Dameshek, W., Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*, 1951. 6(4): p. 372-5.
2. Campo, E., et al., The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood*, 2011. 117(19): p. 5019-32.
3. Arber, D.A., et al., The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 2016. 127(20): p. 2391-405.
4. Nowell, P.C., Discovery of the Philadelphia chromosome: a personal perspective. *J Clin Invest*, 2007. 117(8): p. 2033-5.
5. Ugo, V., C. James, and W. Vainchenker, [A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera]. *Med Sci (Paris)*, 2005. 21(6-7): p. 669-70.
6. Kralovics, R., et al., A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*, 2005. 352(17): p. 1779-90.
7. Levine, R.L., et al., Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*, 2005. 7(4): p. 387-97.
8. Baxter, E.J., et al., Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*, 2005. 365(9464): p. 1054-61.
9. Barbui, T., et al., The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer J*, 2018. 8(2): p. 15.
10. Moulard, O., et al., Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. *Eur J Haematol*, 2014. 92(4): p. 289-97.
11. Srour, S.A., et al., Incidence and patient survival of myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms in the United States, 2001-12. *Br J Haematol*, 2016. 174(3): p. 382-96.
12. Tefferi, A., et al., Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood*, 2014. 124(16): p. 2507-13; quiz 2615.

13. Hultcrantz, M., et al., Patterns of survival among patients with myeloproliferative neoplasms diagnosed in Sweden from 1973 to 2008: a population-based study. *J Clin Oncol*, 2012. 30(24): p. 2995-3001.
14. Pikman, Y., et al., MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*, 2006. 3(7): p. e270.
15. Scott, L.M., et al., JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*, 2007. 356(5): p. 459-68.
16. Klampfl, T., et al., Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*, 2013. 369(25): p. 2379-90.
17. Nangalia, J., et al., Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*, 2013. 369(25): p. 2391-2405.
18. Passamonti, F. and M. Maffioli, Update from the latest WHO classification of MPNs: a user's manual. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2016. 2016(1): p. 534-542.
19. Rumi, E. and M. Cazzola, Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2017. 129(6): p. 680-692.
20. Heuck G. Two cases of leukemia with peculiar blood and bone marrow findings, respectively. *Arch Pathol Anat* 1879;78:475-96.
21. Tefferi, A., Primary myelofibrosis: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*, 2018. 93(12): p. 1551-1560.
22. Titmarsh GJ, Duncombe AS, McMullin MF, et al. How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. *Am J Hematol* 2014;89:581-7.
23. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, Wollan PC, Tefferi A. Population-based incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol*. 1999;61(1):10-15.
24. Chaiter Y, Brenner B, Aghai E, Tatarsky I. High incidence of myeloproliferative disorders in Ashkenazi Jews in northern Israel. *Leuk Lymphoma* 1992;7:251-5.
25. Bonduel M, Sciuccati G, Torres AF, Pierini A, Gallo G. Familial idiopathic myelofibrosis and multiple hemangiomas. *Am J Hematol* 1998;59:175-7.
26. Jones AV, Chase A, Silver RT, et al. JAK2 haplotype is a major risk factor for the development of myeloproliferative neoplasms. *Nature genetics* 2009;41:446-9.
27. Smith RE, Chelmowski MK, Szabo EJ. Myelofibrosis: a review of clinical and

- pathologic features and treatment. *Critical reviews in oncology/hematology* 1990;10:305-14.
28. Bosch X, Campistol JM, Montoliu J, Cervantes F, Revert L. Toluene-associated myelofibrosis. *Blut* 1989;58:219-20.
 29. Bosch X, Campistol JM, Montoliu J, Revert L. Myelofibrosis and focal segmental glomerulosclerosis associated with toluene poisoning. *Human toxicology* 1988;7:357-61.
 30. Veletic, I., et al., Myelofibrosis osteoclasts are clonal and functionally impaired. *myelofibrosis in mice*. *Blood*, 2019
 31. Chagraoui, H., et al., Prominent role of TGF-beta 1 in thrombopoietin-induced myelofibrosis in mice. *Blood*, 2002. 100(10): p. 3495-503.
 32. Vannucchi, A.M., et al., A pathobiologic pathway linking thrombopoietin, GATA-1, and TGF-beta1 in the development of myelofibrosis. *Blood*, 2005. 105(9): p. 3493-501.
 33. Rampal, R., et al., Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood*, 2014. 123(22): p. e123-33.
 34. James C, Ugo V, Casadevall N, Constantinescu SN, Vainchenker W. A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends in molecular medicine* 2005;11:546-54.
 35. Staerk J, Constantinescu SN. The JAK-STAT pathway and hematopoietic stem cells from the JAK2 V617F perspective. *Jak-Stat* 2012;1:184-90.
 36. Ungureanu D, Wu J, Pekkala T, et al. The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nature structural & molecular biology* 2011;18:971-6.
 37. Silvennoinen O, Ungureanu D, Niranjana Y, Hammaren H, Bandaranayake R, Hubbard SR. New insights into the structure and function of the pseudokinase domain in JAK2. *Biochemical Society transactions* 2013;41:1002-7.
 38. Lasho TL, Pardanani A, McClure RF, et al. Concurrent MPL515 and JAK2V617F mutations in myelofibrosis: chronology of clonal emergence and changes in mutant allele burden over time. *British journal of haematology* 2006;135:683-7.
 39. Araki M, Yang Y, Masubuchi N, et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2016;127(10):1307-1316.

- 40 Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood*. 2016;127(10):1325-1335.
- 41 Elf S, Abdelfattah NS, Chen E, et al. Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation. *Cancer Discov*. 2016;6(4):368-381.
- 42 Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, et al. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood*. 2016;127(10):1317-1324.
43. Nangalia, J. and A.R. Green, Myeloproliferative neoplasms: from origins to outcomes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2017. 2017(1): p. 470-479.
44. Tefferi, A., et al., CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple-negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*, 2014. 28(7): p. 1472-7.
45. Szuber, N. and A. Tefferi, Driver mutations in primary myelofibrosis and their implications. *Curr Opin Hematol*, 2018. 25(2): p. 129-135.
46. Tefferi, A., et al., The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 or type 1-like CALR variants. *Blood*, 2014. 124(15): p. 2465-6.
47. Vainchenker, W. and R. Kralovics, Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2017. 129(6): p. 667-679.
48. Tefferi, A., et al., Revised cytogenetic risk stratification in primary myelofibrosis: analysis based on 1002 informative patients. *Leukemia*, 2018. 32(5): p. 1189-1199.
49. Vannucchi AM, Lasho TL, Guglielmelli P, et al. Mutations and prognosis in primary myelofibrosis. *Leukemia* 2013;27:1861-9.
50. Guglielmelli, P., et al., EZH2 mutational status predicts poor survival in myelofibrosis. *Blood*, 2011. 118(19): p. 5227-34.
51. Lasho, T.L., et al., SRSF2 mutations in primary myelofibrosis: significant clustering with IDH mutations and independent association with inferior overall and leukemia-free survival. *Blood*, 2012. 120(20): p. 4168-71.
52. Tefferi, A., et al., U2AF1 mutation types in primary myelofibrosis: phenotypic and prognostic distinctions. *Leukemia*, 2018. 32(10): p. 2274-2278.

53. Tefferi, A., et al., Targeted deep sequencing in primary myelofibrosis. *Blood Adv*, 2016. 1(2): p. 105-111.
54. Chen E, Schneider RK, Breyfogle LJ, et al. Distinct effects of concomitant Jak2V617F expression and Tet2 loss in mice promote disease progression in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2015;125:327-35.
55. Malara, A., et al., Megakaryocyte Contribution to Bone Marrow Fibrosis: many Arrows in the Quiver. *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 2018. 10(1): p. e2018068.
56. Skov V, Riley CH, Thomassen M, et al. Whole blood transcriptional profiling reveals significant down-regulation of human leukocyte antigen class I and II genes in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. *Leuk Lymphoma* 2013;54:2269-73.
57. Song, M.K., B.B. Park, and J.E. Uhm, Understanding Splenomegaly in Myelofibrosis: Association with Molecular Pathogenesis. *Int J Mol Sci*, 2018. 19(3).
58. Mughal, T.I., et al., Myelofibrosis-associated complications: pathogenesis, clinical manifestations, and effects on outcomes. *Int J Gen Med*, 2014. 7: p. 89-101.
59. Desterke, C., et al., Inflammation as a Keystone of Bone Marrow Stroma Alterations in Primary Myelofibrosis. *Mediators of Inflammation*, 2015.
60. Tefferi, A., Novel mutations and their functional and clinical relevance in myeloproliferative neoplasms: JAK2, MPL, TET2, ASXL1, CBL, IDH and IKZF1. *Leukemia*, 2010. 24(6): p. 1128-38.
61. Mantovani, A., et al., Cancer-related inflammation. *Nature*, 2008. 454(7203): p. 436-44.
62. Marty, C., et al., A role for reactive oxygen species in JAK2 V617F myeloproliferative neoplasm progression. *Leukemia*, 2013. 27(11): p. 2187-95.
63. Falanga, A., et al., V617F JAK-2 mutation in patients with essential thrombocythemia: relation to platelet, granulocyte, and plasma hemostatic and inflammatory molecules. *Exp Hematol*, 2007. 35(5): p. 702-11.
64. Vannucchi, A.M. and P. Guglielmelli, JAK2 mutation-related disease and thrombosis. *Semin Thromb Hemost*, 2013. 39(5): p. 496-506.
65. Campbell, P.J., et al., Definition of subtypes of essential thrombocythaemia and relation to polycythaemia vera based on JAK2 V617F mutation status: a prospective study. *Lancet*, 2005. 366(9501): p. 1945-53.

66. Barbui, T., G. Finazzi, and A. Falanga, Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood*, 2013. 122(13): p. 2176-84.
67. Hasselbalch, H.C., Perspectives on chronic inflammation in essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis: is chronic inflammation a trigger and driver of clonal evolution and development of accelerated atherosclerosis and second cancer? *Blood*, 2012. 119(14): p. 3219-25.
68. Hasselbalch, H.C., Chronic inflammation as a promotor of mutagenesis in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. A human inflammation model for cancer development? *Leuk Res*, 2013. 37(2): p. 214-20.
69. Susini, M.C., et al., Risk of second cancers in chronic myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2012. 119(16): p. 3861-2; author reply 3862-3.
70. Akram, A.M., et al., Detection of Exon 12 and 14 Mutations in Janus Kinase 2 Gene Including a Novel Mutant in V617F Negative Polycythemia Vera Patients from Pakistan. *J Cancer*, 2018. 9(23): p. 4341-4345.
71. Rumi, E., et al., Identification of genomic aberrations associated with disease transformation by means of high-resolution SNP array analysis in patients with myeloproliferative neoplasm. *Am J Hematol*, 2011. 86(12): p. 974-9.
72. Hasselbalch, H.C., The role of cytokines in the initiation and progression of myelofibrosis. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013. 24(2): p. 133-45.
73. Landolfi, R. and L. Di Gennaro, Pathophysiology of thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*, 2011. 96(2): p. 183-6.
74. Lussana, F. and A. Rambaldi, Inflammation and myeloproliferative neoplasms. *J Autoimmun*, 2017. 85: p. 58-63.
75. Panteli, K.E., et al., Serum interleukin (IL)-1, IL-2, sIL-2Ra, IL-6 and thrombopoietin levels in patients with chronic myeloproliferative diseases. *Br J Haematol*, 2005. 130(5): p. 709-15.
76. Tefferi, A., et al., Circulating interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 levels are independently prognostic in primary myelofibrosis: a comprehensive cytokine profiling study. *J Clin Oncol*, 2011. 29(10): p. 1356-63.
77. Tefferi, A., Primary myelofibrosis: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 2014. 89(9): p. 915-25.
78. Andreasson, B., B. Swolin, and J. Kutti, Patients with idiopathic myelofibrosis show increased CD34(+) cell concentrations in peripheral blood compared to patients with polycythaemia vera and essential thrombocythaemia. *European*

- Journal of Haematology, 2002. 68(4): p. 189-193.
79. Barosi, G., et al., Diagnostic and clinical relevance of the number of circulating CD34(+) cells in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*, 2001. 98(12): p. 3249-3255.
 80. Tefferi, A., 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. *Blood*, 2007. 110(4): p. 1092-7.
 81. Barbui, T., et al., Disease characteristics and clinical outcome in young adults with essential thrombocythemia versus early/prefibrotic primary myelofibrosis. *Blood*, 2012. 120(3): p. 569-71.
 82. Barosi, G., et al., Evidence that Prefibrotic Myelofibrosis Is Aligned along a Clinical and Biological Continuum Featuring Primary Myelofibrosis. *Plos One*, 2012. 7(4).
 83. Thiele, J. and H.M. Kvasnicka, Diagnostic differentiation of essential thrombocythaemia from thrombocythaemias associated with chronic idiopathic myelofibrosis by discriminate analysis of bone marrow features--a clinicopathological study on 272 patients. *Histol Histopathol*, 2003. 18(1): p. 93-102.
 84. Thiele, J. and H.M. Kvasnicka, Clinicopathological criteria for differential diagnosis of thrombocythemias in various myeloproliferative disorders. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2006. 32(3): p. 219-230.
 85. Thiele, J., et al., Essential thrombocythemia versus early primary myelofibrosis: a multicenter study to validate the WHO classification. *Blood*, 2011. 117(21): p. 5710-5718.
 86. Varki A, Lottenberg R, Griffith R, Reinhard E. The syndrome of idiopathic myelofibrosis. A clinicopathologic review with emphasis on the prognostic variables predicting survival. *Medicine* 1983;62:353-71.
 87. Cervantes, F. and G. Barosi, Myelofibrosis with myeloid metaplasia: Diagnosis, prognostic factors, and staging. *Seminars in Oncology*, 2005. 32(4): p. 395-402.
 88. Barbui, T., et al., Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol*, 2011. 29(23): p. 3179-84.
 89. Mesa, R.A., et al., Evaluating the serial use of the Myelofibrosis Symptom

- Assessment Form for measuring symptomatic improvement: performance in 87 myelofibrosis patients on a JAK1 and JAK2 inhibitor (INCB018424) clinical trial. *Cancer*, 2011. 117(21): p. 4869-4877.
90. Tefferi, A., Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *J Clin Oncol*, 2005. 23(33): p. 8520-30.
 91. Mesa RA, Silverstein MN, Jacobsen SJ, Wollan PC, Tefferi A. Populationbased incidence and survival figures in essential thrombocythemia and agnogenic myeloid metaplasia: an Olmsted County Study, 1976-1995. *Am J Hematol* 1999;61:10-5.
 92. Visani G, Finelli C, Castelli U, et al. Myelofibrosis with myeloid metaplasia: clinical and haematological parameters predicting survival in a series of 133 patients. *British journal of haematology* 1990;75:4-9.
 93. Cervantes F, Pereira A, Esteve J, et al. Identification of 'short-lived' and 'longlived' patients at presentation of idiopathic myelofibrosis. *British journal of haematology* 1997;97:635-40.
 94. Vaa BE, Wolanskyj AP, Roeker L, et al. Pruritus in primary myelofibrosis: clinical and laboratory correlates. *Am J Hematol* 2012;87:136-8.
 95. Silverstein MN, Gomes MR, ReMine WH, Elveback LR. Agnogenic myeloid metaplasia. Natural history and treatment.
 96. Mesa, R.A., et al., The burden of fatigue and quality of life in myeloproliferative disorders (MPDs): an international Internet-based survey of 1179 MPD patients. *Cancer*, 2007. 109(1): p. 68-76.
 97. Emanuel RM, Dueck AC, Geyer HL, et al. Myeloproliferative neoplasm (MPN) symptom assessment form total symptom score: prospective international assessment of an abbreviated symptom burden scoring system among patients with MPNs. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012;30:4098-103.
 98. O'Reilly RA. Splenomegaly in 2,505 patients in a large university medical center from 1913 to 1995. 1913 to 1962: 2,056 patients. *The Western journal of medicine* 1998;169:78-87.
 99. Liote F, Yeni P, Teillet-Thiebaud F, et al. Ascites revealing peritoneal and hepatic extramedullary hematopoiesis with peliosis in agnogenic myeloid metaplasia: case report and review of the literature. *The American journal of medicine* 1991;90:111-7.

100. Fedeli G, Certo M, Cannizzaro O, et al. Extramedullary hematopoiesis involving the esophagus in myelofibrosis. *The American journal of gastroenterology* 1990;85:1512-4.
101. Schreiber D, Brenner B, Jacobs R, Ben-Arieh Y, Tatarsky I, Alroy G. Small intestinal myeloid metaplasia. *Jama* 1988;259:2580-2.
102. Lopez-Guillermo A, Cervantes F, Bruguera M, Pereira A, Feliu E, Rozman C. Liver dysfunction following splenectomy in idiopathic myelofibrosis: a study of 10 patients. *Acta haematologica* 1991;85:184-8.
103. Wanless IR, Peterson P, Das A, Boitnott JK, Moore GW, Bernier V. Hepatic vascular disease and portal hypertension in polycythemia vera and agnogenic myeloid metaplasia: a clinicopathological study of 145 patients examined at autopsy. *Hepatology* 1990;12:1166-74.
104. Georgiades CS, Neyman EG, Francis IR, Sneider MB, Fishman EK. Typical and atypical presentations of extramedullary hemopoiesis. *AJR American journal of roentgenology* 2002;179:1239-43.
105. Koch CA, Li CY, Mesa RA, Tefferi A. Nonhepatosplenic extramedullary hematopoiesis: associated diseases, pathology, clinical course, and treatment. *Mayo Clinic proceedings* 2003;78:1223-33.
106. Bartlett RP, Greipp PR, Tefferi A, Cupps RE, Mullan BP, Trastek VF. Extramedullary hematopoiesis manifesting as a symptomatic pleural effusion. *Mayo Clinic proceedings* 1995;70:1161-4.
107. Knobel B, Melamud E, Virag I, Meytes D. Ectopic medullary hematopoiesis as a cause of ascites in agnogenic myeloid metaplasia. Case report and review of the literature. *Acta haematologica* 1993;89:104-7.
108. Yusen RD, Kollef MH. Acute respiratory failure due to extramedullary hematopoiesis. *Chest* 1995;108:1170-2.
109. Richters ML. Myelofibrosis, diffuse alveolar hemorrhage and radiation treatment. *Am J Hematol* 2013;88:922.
110. Lundh B, Brandt L, Cronqvist S, Eyrich R. Intracranial myeloid metaplasia in myelofibrosis. *Scandinavian journal of haematology* 1982;28:91-4.
111. Koch BL, Bisset GS, 3rd, Bisset RR, Zimmer MB. Intracranial extramedullary hematopoiesis: MR findings with pathologic correlation. *AJR American journal of roentgenology* 1994;162:1419-20.
112. Valla D, Casadevall N, Huisse MG, et al. Etiology of portal vein thrombosis in

- adults. A prospective evaluation of primary myeloproliferative disorders. *Gastroenterology* 1988;94:1063-9.
113. Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. *Blood* 2010;115:778-82.
 114. Guglielmelli P, Carobbio A, Rumi E, et al. Validation of the IPSET score for thrombosis in patients with prefibrotic myelofibrosis. *Blood Cancer J*. 2020;10(2):21. Published 2020 Feb 25.
 115. Kvasnicka, H.M., et al., Problems and pitfalls in grading of bone marrow fibrosis, collagen deposition and osteosclerosis - a consensus-based study. *Histopathology*, 2016. 68(6): p. 905-15.
 116. Cervantes, F., et al., Myelofibrosis with myeloid metaplasia in young individuals: disease characteristics, prognostic factors and identification of risk groups. *Br J Haematol*, 1998. 102(3): p. 684-90.
 117. Barosi, G., Myelofibrosis with myeloid metaplasia: diagnostic definition and prognostic classification for clinical studies and treatment guidelines. *J Clin Oncol*, 1999. 17(9): p. 2954-70.
 118. Dupriez, B., et al., Prognostic factors in agnogenic myeloid metaplasia: a report on 195 cases with a new scoring system. *Blood*, 1996. 88(3): p. 1013-8.
 119. Kvasnicka, H.M. and J. Thiele, The impact of clinicopathological studies on staging and survival in essential thrombocythemia, chronic idiopathic myelofibrosis, and polycythemia rubra vera. *Semin Thromb Hemost*, 2006. 32(4 Pt 2): p. 362-71.
 120. Kvasnicka, H.M., et al., Prognostic factors in idiopathic (primary) osteomyelofibrosis. *Cancer*, 1997. 80(4): p. 708-19.
 121. Tefferi, A., Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *N Engl J Med*, 2000. 342(17): p. 1255-65.
 122. Tefferi, A., et al., Blast phase myeloproliferative neoplasm: Mayo-AGIMM study of 410 patients from two separate cohorts. *Leukemia*, 2018. 32(5): p. 1200-1210.
 123. Mesa RA, Li CY, Ketterling RP, Schroeder GS, Knudson RA, Tefferi A. Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a single-institution experience with 91 cases. *Blood* 2005;105:973-7.
 124. Penna, D., et al., Genetic predictors of response to specific drugs in primary myelofibrosis. *Blood Cancer J*, 2018. 8(12): p. 120.
 125. Tefferi, A., et al., Allogeneic hematopoietic stem cell transplant overcomes the

- adverse survival effect of very high risk and unfavorable karyotype in myelofibrosis. *Am J Hematol*, 2018. 93(5): p. 649-654.
126. Samuelson Bannow, B.T., et al., Hematopoietic Cell Transplantation for Myelofibrosis: the Dynamic International Prognostic Scoring System Plus Risk Predicts Post-Transplant Outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2018. 24(2): p. 386-392.
 127. Tefferi, A., Primary myelofibrosis: 2013 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*, 2013. 88(2): p. 141-50.
 128. Vannucchi, A.M. and C.N. Harrison, Emerging treatments for classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*, 2017. 129(6): p. 693-703.
 129. Tefferi, A., et al., Myelofibrosis Treatment Algorithm 2018. *Blood Cancer J*, 2018. 8(8): p. 72.
 130. Cooper, J.P. and B.L. Scott, Allogeneic transplantation for myelofibrosis with adverse risk karyotype: Attack on the clones? *Am J Hematol*, 2018. 93(5): p. 603-604.
 131. Barbui T, Barosi G, Birgegard G, et al. Philadelphia-negative classical myeloproliferative neoplasms: critical concepts and management recommendations from European LeukemiaNet. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2011;29:761-70.
 132. Arana-Yi C, Quintas-Cardama A, Giles F, et al. Advances in the therapy of chronic idiopathic myelofibrosis. *The oncologist* 2006;11:929-43.
 133. Maziarz RT, Mesa RA, Tefferi A. Allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes: the question is "when?". *Mayo Clinic proceedings* 2003;78:941-3.
 133. Babushok D, Hexner E. Allogeneic transplantation for myelofibrosis: for whom, when, and what are the true benefits? *Current opinion in hematology* 2014;21:114-22.
 134. Merup M, Lazarevic V, Nahi H, et al. Different outcome of allogeneic transplantation in myelofibrosis using conventional or reduced-intensity conditioning regimens. *British journal of haematology* 2006;135:367-73.
 135. Hessling J, Kroger N, Werner M, et al. Dose-reduced conditioning regimen followed by allogeneic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *British journal of haematology* 2002;119:769-72.
 136. Kroger N, Zabelina T, Schieder H, et al. Pilot study of reduced-intensity

- conditioning followed by allogeneic stem cell transplantation from related and unrelated donors in patients with myelofibrosis. *British journal of haematology* 2005;128:690-7.
137. Rondelli D, Barosi G, Bacigalupo A, et al. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation with reduced-intensity conditioning in intermediate- or high-risk patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2005;105:4115-9.
 138. Kroger N, Holler E, Kobbe G, et al. Allogeneic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning in patients with myelofibrosis: a prospective, multicenter study of the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 2009;114:5264-70.
 139. Bacigalupo A, Soraru M, Dominietto A, et al. Allogeneic hemopoietic SCT for patients with primary myelofibrosis: a predictive transplant score based on transfusion requirement, spleen size and donor type. *Bone marrow transplantation* 2010;45:458-63.
 140. Alchalby H, Badbaran A, Zabelina T, et al. Impact of JAK2V617F mutation status, allele burden, and clearance after allogeneic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood* 2010;116:3572-81.
 141. Abellsson J, Merup M, Birgegard G, et al. The outcome of allo-HSCT for 92 patients with myelofibrosis in the Nordic countries. *Bone marrow transplantation* 2012;47:380-6.
 142. Alchalby H, Yunus DR, Zabelina T, et al. Risk models predicting survival after reduced-intensity transplantation for myelofibrosis. *British journal of haematology* 2012;157:75-85.
 143. Rondelli D, Goldberg JD, Isola L, et al. MPD-RC 101 prospective study of reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with myelofibrosis. *Blood* 2014;124:1183-91.
 144. Ruiz-Arguelles GJ, Garces-Eisele J, Reyes-Nunez V, Ruiz-Delgado GJ, Rosillo C, Camoriano JK. Clearance of the Janus kinase 2 (JAK2) V617F mutation after allogeneic stem cell transplantation in a patient with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Am J Hematol* 2007;82:400-2.
 145. Benjamini O, Koren-Michowitz M, Amariglio N, Kroger N, Nagler A, Shimoni A. Relapse of postpolycythemia myelofibrosis after allogeneic stem cell transplantation in a polycythemic phase: successful treatment with donor lymphocyte infusion directed by quantitative PCR test for V617F-JAK2 mutation.

- Leukemia 2008;22:1961-3.
146. Soll E, Massumoto C, Clift RA, et al. Relevance of marrow fibrosis in bone marrow transplantation: a retrospective analysis of engraftment. *Blood* 1995;86:4667-73.
 147. Guardiola P, Anderson JE, Bandini G, et al. Allogeneic stem cell transplantation for agnogenic myeloid metaplasia: a European Group for Blood and Marrow Transplantation, Societe Francaise de Greffe de Moelle, Gruppo Italiano per il Trapianto del Midollo Osseo, and Fred Hutchinson Cancer Research Center Collaborative Study. *Blood* 1999;93:2831-8.
 148. Guardiola P, Anderson JE, Gluckman E. Myelofibrosis with myeloid metaplasia. *The New England journal of medicine* 2000;343:659; author reply -60.
 149. Deeg HJ, Appelbaum FR. Stem-cell transplantation for myelofibrosis. *The New England journal of medicine* 2001;344:775-6.
 150. Lussana F, Rambaldi A, Finazzi MC, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia transformed to myelofibrosis or acute myeloid leukemia: a report from the MPN Subcommittee of the Chronic Malignancies Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica* 2014;99:916-21.
 151. Li Z, Gooley T, Applebaum FR, Deeg HJ. Splenectomy and hemopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood* 2001;97:2180-1.
 152. Ciurea SO, Sadegi B, Wilbur A, et al. Effects of extensive splenomegaly in patients with myelofibrosis undergoing a reduced intensity allogeneic stem cell transplantation. *British journal of haematology* 2008;141:80-3.
 153. Mesa RA, Nagorney DS, Schwager S, Allred J, Tefferi A. Palliative goals, patient selection, and perioperative platelet management: outcomes and lessons from 3 decades of splenectomy for myelofibrosis with myeloid metaplasia at the Mayo Clinic. *Cancer* 2006;107:361-70.
 154. Benbassat J, Penchas S, Ligumski M. Splenectomy in patients with agnogenic myeloid metaplasia: an analysis of 321 published cases. *British journal of haematology* 1979;42:207-14. *Mayo Clinic. Cancer* 2006;107:361-70.
 155. Barosi G, Ambrosetti A, Buratti A, et al. Splenectomy for patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia: pretreatment variables and outcome prediction. *Leukemia* 1993;7:200-6.
 156. Lafaye F, Rain JD, Clot P, Najean Y. Risks and benefits of splenectomy in

- myelofibrosis: an analysis of 39 cases. *Nouvelle revue francaise d'hematologie* 1994;36:359-62.
157. Benbassat J, Penchas S, Ligumski M. Splenectomy in patients with agnogenic myeloid metaplasia: an analysis of 321 published cases. *British journal of haematology* 1979;42:207-14.
 158. Lofvenberg E, Wahlin A. Management of polycythaemia vera, essential thrombocythaemia and myelofibrosis with hydroxyurea. *European journal of haematology* 1988;41:375-81.
 159. Lofvenberg E, Wahlin A, Roos G, Ost A. Reversal of myelofibrosis by hydroxyurea. *European journal of haematology* 1990;44:33-8.
 160. Manoharan A. Management of myelofibrosis with intermittent hydroxyurea. *British journal of haematology* 1991;77:252-4.
 161. Wagner H, Jr., McKeough PG, Desforges J, Madoc-Jones H. Splenic irradiation in the treatment of patients with chronic myelogenous leukemia or myelofibrosis with myeloid metaplasia. Results of daily and intermittent fractionation with and without concomitant hydroxyurea. *Cancer* 1986;58:1204-7.
 162. Martinez-Trillos A, Gaya A, Maffioli M, et al. Efficacy and tolerability of hydroxyurea in the treatment of the hyperproliferative manifestations of myelofibrosis: results in 40 patients. *Annals of hematology* 2010;89:1233-7.
 163. Sirhan S, Lasho TL, Hanson CA, Mesa RA, Pardanani A, Tefferi A. The presence of JAK2V617F in primary myelofibrosis or its allele burden in polycythemia vera predicts chemosensitivity to hydroxyurea. *Am J Hematol* 2008;83:363-5.
 164. Petti MC, Latagliata R, Spadea T, et al. Melphalan treatment in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *British journal of haematology* 2002;116:576-81.
 165. Gilbert HS. Long term treatment of myeloproliferative disease with interferonalpha-2b: feasibility and efficacy. *Cancer* 1998;83:1205-13.
 166. Radin AI, Kim HT, Grant BW, et al. Phase II study of alpha2 interferon in the treatment of the chronic myeloproliferative disorders (E5487): a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Cancer* 2003;98:100-9.
 167. Kiladjian JJ, Chomienne C, Fenaux P. Interferon-alpha therapy in bcr-ablnegative myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2008;22:1990-8.
 168. Tefferi A, Elliot MA, Yoon SY, et al. Clinical and bone marrow effects of interferon alfa therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood*

- 2001;97:1896.
169. Ianotto JC, Kiladjian JJ, Demory JL, et al. PEG-IFN-alpha-2a therapy in patients with myelofibrosis: a study of the French Groupe d'Etudes des Myelofibroses (GEM) and France Intergroupe des syndromes Myeloproliferatifs (FIM). *British journal of haematology* 2009;146:223-5.
 170. Kiladjian JJ, Mesa RA, Hoffman R. The renaissance of interferon therapy for the treatment of myeloid malignancies. *Blood* 2011;117:4706-15.
 171. Silver RT, Vandris K, Goldman JJ. Recombinant interferon-alpha may retard progression of early primary myelofibrosis: a preliminary report. *Blood* 2011;117:6669-72.
 172. Ianotto JC, Boyer-Perrard F, Gyan E, et al. Efficacy and safety of pegylatedinterferon alpha-2a in myelofibrosis: a study by the FIM and GEM French cooperative groups. *British journal of haematology* 2013;162:783-91.
 173. Barosi G, Elliott M, Canepa L, et al. Thalidomide in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a pooled-analysis of individual patient data from five studies. *Leuk Lymphoma* 2002;43:2301-7.
 174. Canepa L, Ballerini F, Varaldo R, et al. Thalidomide in agnogenic and secondary myelofibrosis. *British journal of haematology* 2001;115:313-5.
 175. Marchetti M, Barosi G, Balestri F, et al. Low-dose thalidomide ameliorates cytopenias and splenomegaly in myelofibrosis with myeloid metaplasia: a phase II trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2004;22:424-31.
 176. Elliott MA, Mesa RA, Li CY, et al. Thalidomide treatment in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *British journal of haematology* 2002;117:288-96.
 177. Thomas DA, Giles FJ, Albitar M, et al. Thalidomide therapy for myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Cancer* 2006;106:1974-84.
 178. Merup M, Kutti J, Birgergard G, et al. Negligible clinical effects of thalidomide in patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Medical oncology* 2002;19:79-86.
 179. Mesa RA, Elliott MA, Schroeder G, Tefferi A. Durable responses to thalidomide-based drug therapy for myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Mayo Clinic proceedings* 2004;79:883-9.
 180. Berrebi A, Feldberg E, Spivak I, Shvidel L. Mini-dose of thalidomide for treatment of primary myelofibrosis. Report of a case with complete reversal of

- bone marrow fibrosis and splenomegaly. *Haematologica* 2007;92:e15-6.
181. Mesa RA, Steensma DP, Pardanani A, et al. A phase 2 trial of combination lowdose thalidomide and prednisone for the treatment of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2003;101:2534-41.
 182. Tefferi A, Cortes J, Verstovsek S, et al. Lenalidomide therapy in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Blood* 2006;108:1158-64.
 183. Tefferi A, Lasho TL, Mesa RA, Pardanani A, Ketterling RP, Hanson CA. Lenalidomide therapy in del(5)(q31)-associated myelofibrosis: cytogenetic and JAK2V617F molecular remissions. *Leukemia* 2007;21:1827-8.
 184. Quintas-Cardama A, Kantarjian HM, Manshour T, et al. Lenalidomide plus prednisone results in durable clinical, histopathologic, and molecular responses in patients with myelofibrosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009;27:4760-6.
 185. Mesa RA, Yao X, Cripe LD, et al. Lenalidomide and prednisone for myelofibrosis: Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) phase 2 trial E4903. *Blood* 2010;116:4436-8.
 186. Tefferi A, Verstovsek S, Barosi G, et al. Pomalidomide is active in the treatment of anemia associated with myelofibrosis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009;27:4563-9.
 187. Lacy MQ, Tefferi A. Pomalidomide therapy for multiple myeloma and myelofibrosis: an update. *Leuk Lymphoma* 2011;52:560-6.
 188. Brubaker LH, Briere J, Laszlo J, et al. Treatment of anemia in myeloproliferative disorders: a randomized study of fluoxymesterone v transfusions only. *Archives of internal medicine* 1982;142:1533-7.
 189. Besa EC, Nowell PC, Geller NL, Gardner FH. Analysis of the androgen response of 23 patients with agnogenic myeloid metaplasia: the value of chromosomal studies in predicting response and survival. *Cancer* 1982;49:308-13.
 190. Levy V, Bourgarit A, Delmer A, et al. Treatment of agnogenic myeloid metaplasia with danazol: a report of four cases. *Am J Hematol* 1996;53:239-41.
 191. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Domingo A, Arellano-Rodrigo E, Montserrat E. Efficacy and tolerability of danazol as a treatment for the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: long-term results in 30 patients. *British journal of haematology* 2005;129:771-5.
 192. Tefferi A, Silverstein MN. Recombinant human erythropoietin therapy in patients

- with myelofibrosis with myeloid metaplasia. *British journal of haematology* 1994;86:893.
193. Rodriguez JN, Martino ML, Dieguez JC, Prados D. rHuEpo for the treatment of anemia in myelofibrosis with myeloid metaplasia. Experience in 6 patients and metaanalytical approach. *Haematologica* 1998;83:616-21.
 194. Aloe Spiriti M, Latagliata R, Avvisati G, et al. Erythropoietin treatment of idiopathic myelofibrosis. *Haematologica* 1993;78:371-3.
 195. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Hernandez-Boluda JC, Sureda A, Torrebadell M, Montserrat E. Erythropoietin treatment of the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia: results in 20 patients and review of the literature. *British journal of haematology* 2004;127:399-403.
 196. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Hernandez-Boluda JC, et al. Darbepoetin-alpha for the anaemia of myelofibrosis with myeloid metaplasia. *British journal of haematology* 2006;134:184-6.
 197. Harrison C, Kiladjian JJ, Al-Ali HK, et al. JAK inhibition with ruxolitinib versus best available therapy for myelofibrosis. *The New England journal of medicine* 2012;366:787-98.
 198. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al. A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis. *The New England journal of medicine* 2012;366:799-807.
 199. Passamonti F, Caramazza D, Maffioli M. JAK inhibitor in CALR-mutant myelofibrosis. *The New England journal of medicine* 2014;370:1168-9.
 200. Guglielmelli P, Biamonte F, Rotunno G, et al. Impact of mutational status on outcomes in myelofibrosis patients treated with ruxolitinib in the COMFORT-II study. *Blood* 2014;123:2157-60.
 201. Mesa RA, Gotlib J, Gupta V, et al. Effect of ruxolitinib therapy on myelofibrosis-related symptoms and other patient-reported outcomes in COMFORT-I: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of clinical oncology :official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2013;31:1285-92.
 202. Cervantes F, Vannucchi AM, Kiladjian JJ, et al. Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis. *Blood* 2013;122:4047-53.
 203. Verstovsek S, Kantarjian HM, Estrov Z, et al. Long-term outcomes of 107 patients with myelofibrosis receiving JAK1/JAK2 inhibitor ruxolitinib: survival advantage

- in comparison to matched historical controls. *Blood* 2012;120:1202-9.
204. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, et al. Efficacy, safety and survival with ruxolitinib in patients with myelofibrosis: results of a median 2-year follow-up of COMFORT-I. *Haematologica* 2013;98:1865-71.
 205. Passamonti F, Maffioli M, Cervantes F, et al. Impact of ruxolitinib on the natural history of primary myelofibrosis: a comparison of the DIPSS and the COMFORT-2 cohorts. *Blood* 2014;123:1833-5.
 206. Mascarenhas J, Hoffman R. A comprehensive review and analysis of the effect of ruxolitinib therapy on the survival of patients with myelofibrosis. *Blood* 2013;121:4832-7.
 207. Heine A, Brossart P, Wolf D. Ruxolitinib is a potent immunosuppressive compound: is it time for anti-infective prophylaxis? *Blood* 2013;122:3843-4.
 208. Heine A, Held SA, Daecke SN, et al. The JAK-inhibitor ruxolitinib impairs dendritic cell function in vitro and in vivo. *Blood* 2013;122:1192-202.
 209. Wysham NG, Sullivan DR, Allada G. An opportunistic infection associated with ruxolitinib, a novel janus kinase 1,2 inhibitor. *Chest* 2013;143:1478-9.
 210. Lee SC, Feenstra J, Georghiou PR. Pneumocystis jiroveci pneumonitis complicating ruxolitinib therapy. *BMJ case reports* 2014;2014.
 211. Caocci G, Murgia F, Podda L, Solinas A, Atzeni S, La Nasa G. Reactivation of hepatitis B virus infection following ruxolitinib treatment in a patient with myelofibrosis. *Leukemia* 2014;28:225-7.
 212. Colomba C, Rubino R, Siracusa L, et al. Disseminated tuberculosis in a patient treated with a JAK2 selective inhibitor: a case report. *BMC research notes* 2012;5:552.
 213. Goldberg RA, Reichel E, Oshry LJ. Bilateral toxoplasmosis retinitis associated with ruxolitinib. *The New England journal of medicine* 2013;369:681-3.
 214. Wathes R, Moule S, Milojkovic D. Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with ruxolitinib. *The New England journal of medicine* 2013;369:197-8.
 215. Palandri F, Polverelli N, Catani L, Vianelli N. Ruxolitinib-associated tuberculosis: a case of successful ruxolitinib rechallenge. *Annals of hematology* 2015;94:519-20.
 216. Harrison, C.N.; Schaap, N.; Vannucchi, A.M.; Kiladjian, J.J.; Tiu, R.V.; Zachee, P.; Jourdan, E.; Winton, E.; Silver, R.T.; Schouten, H.C.; et al. Janus kinase-2

- inhibitor fedratinib in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib (JAKARTA-2): A single-arm, open-label, non-randomised, phase 2, multicentre study. *Lancet Haematol.* 2017, 4, 317–324.
217. Pardanani, A.; Tefferi, A.; Jamieson, C.; Gabrail, N.Y.; Lebedinsky, C.; Gao, G.; Liu, F.; Xu, C.; Cao, H.; Talpaz, M. A phase 2 randomized dose-ranging study of the JAK2-selective inhibitor fedratinib (SAR302503) in patients with myelofibrosis. *Blood Cancer J.* 2015, 5, e335.
218. Pardanani, A.; Harrison, C.; Cortes, J.E.; Cervantes, F.; Mesa, R.A.; Milligan, D.; Masszi, T.; Mishchenko, E.; Jourdan, E.; Vannucchi, A.M.; et al. Safety and efficacy of fedratinib in patients with primary or secondary myelofibrosis: A randomized clinical trial. *JAMA Oncol.* 2015, 1, 643–651.
219. Pardanani, A.; Gotlib, J.R.; Jamieson, C.; Cortes, J.E.; Talpaz, M.; Stone, R.M.; Silverman, M.H.; Gilliland, D.G.; Shorr, J.; Tefferi, A. Safety and efficacy of TG101348, a selective JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* 2011, 29, 789–796.
220. Asshoff, M.; Petzer, V.; Warr, M.R.; Haschka, D.; Tymoszuk, P.; Demetz, E.; Seifert, M.; Posch, W.; Nairz, M.; Maciejewski, P.; et al. Momelotinib inhibits ACVR1/ALK2, decreases hepcidin production, and ameliorates anemia of chronic disease in rodents. *Blood* 2017, 129, 1823–1830.
221. Mesa, R.A.; Kiladjian, J.J.; Catalano, J.V.; Devos, T.; Egyed, M.; Hellmann, A.; McLornan, D.; Shimoda, K.; Winton, E.F.; Deng, W.; et al. SIMPLIFY-1: A phase III randomized trial of momelotinib versus ruxolitinib in Janus kinase inhibitor-Naive patients with myelofibrosis. *J. Clin. Oncol.* 2017, 35, 3844–3850.
222. Harrison, C.N.; Vannucchi, A.M.; Platzbecker, U.; Cervantes, F.; Gupta, V.; Lavie, D.; Passamonti, F.; Winton, E.F.; Dong, H.; Kawashima, J.; et al. Momelotinib versus best available therapy in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib (SIMPLIFY 2): A randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet Haematol.* 2018, 5, e73–e81.
223. Mesa, R.A.; Vannucchi, A.M.; Mead, A.; Egyed, M.; Szoke, A.; Suvorov, A.; Jakucs, J.; Perkins, A.; Prasad, R.; Mayer, J.; et al. Pacritinib versus best available therapy for the treatment of myelofibrosis irrespective of baseline cytopenias (PERSIST-1): An international, randomised, phase 3 trial. *Lancet Haematol.* 2017, 4, e225–e236.
224. Gerds, A.T.; Savona, M.R.; Scott, B.L.; Talpaz, M.; Egyed, M.; Harrison, C.N.;

- Yacoub, A.; Vannucchi, A.; Mead, A.J.; Kiladjian, J.J.; et al. Results of PAC203: A randomized phase 2 dose-finding study and determination of the recommended dose of pacritinib in patients with myelofibrosis. *Blood* 2019, 136, 667–1667.
225. Harrison, C.N.; Gerds, A.T.; Kiladjian, J.J.; Döhner, K.; Buckley, S.A.; Smith, J.A.; Craig, A.R.; Mascarenhas, J.; Verstovsek, S. Pacifica: A randomized, controlled phase 3 study of pacritinib vs. Physician’s choice in patients with primary myelofibrosis, post polycythemia vera myelofibrosis, or post essential thrombocytopenia myelofibrosis with severe thrombocytopenia (platelet count <50,000/mL). *Blood* 2019, 134, 4175.
226. Carrancio, S.; Markovics, J.; Wong, P.; Leisten, J.; Castiglioni, P.; Groza, M.C.; Raymon, H.K.; Heise, C.; Daniel, T.; Chopra, R.; et al. An activin receptor II A ligand trap promotes erythropoiesis resulting in a rapid induction of red blood cells and haemoglobin. *Br. J. Haematol.* 2014, 165, 870–882.
227. Fenaux, P.; Platzbecker, U.; Mufti, G.J.; Manero, G.G.; Buckstein, R.; Santini, V.; Campelo, M.D.; Finelli, C.; Cazzola, M.; Ilhan, O.; et al. Luspatercept in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. *N. Engl. J. Med.* 2020, 382, 140–151.
228. Gerds, A.T.; Vannucchi, A.M.; Passamonti, F.; Kremyanskaya, M.; Gotlib, J.; Palmer, J.M.; McCaul, K.; Ribrag, V.; Mead, A.J.; Harrison, C.; et al. A phase 2 study of luspatercept in patients with myelofibrosis-associated anemia. *Blood* 2019, 136, 557–1557
229. Daver, N.G.; Kremyanskaya, M.; O’Connell, C.; Dao, K.; Oh, S.T.; Gerds, A.T.; Verstovsek, S.; Erickson-Viitanen, S.; Zhou, F.; Assad, A.; et al. A phase 2 study of the safety and efficacy of INCB050465, a selective PI3K_α inhibitor, in combination with ruxolitinib in patients with myelofibrosis. *Blood* 2018, 132, 353.
230. Yacoub, A.; Wang, E.S.; Rampal, R.K.; Borate, U.; Kremyanskaya, M.; Ali, H.; Hobbs, G.; O’Connell, C.; Assad, A.; Erickson-Viitanen, S.; et al. Addition of Parsaclisib, a PI3KDELTA Inhibitor, in Patients (PTS) with Suboptimal Response to Ruxolitinib (RUX): A Phase 2 Study in PTS with Myelofibrosis (MF); EHA Library: The Hague, The Netherlands, 2020; A 295036; S216.
231. Harrison, C.N.; Garcia, J.S.; Mesa, R.A.; Somervaille, T.; Komrokji, R.S.; Pemmaraju, N.; Jamieson, C.; Papadantonakis, N.; Foran, J.M.; O’Connell, C.L.; et al. Results from a phase 2 study of navitoclax in combination with ruxolitinib in patients with primary or secondary myelofibrosis. *Blood* 2019, 134, 671.
232. Saenz, D.T.; Fiskus, W.; Qian, Y.; Manshour, T.; Rajapakshe, K.; Raina, K.;

- Coleman, K.G.; Crew, A.P.; Shen, A.; Mill, C.P.; et al. Novel BET protein proteolysis-targeting chimera exerts superior lethal activity than bromodomain inhibitor (BETi) against post-myeloproliferative neoplasm secondary (s) AML cells. *Leukemia* 2017, 31, 1951–1961.
233. Mascarenhas, J.; Kremyanskaya, M.; Hoffman, R.; Bose, P.; Talpaz, M.; Harrison, C.N.; Gupta, V.; Leber, B.; Sirhan, S.; Kabir, S.; et al. MANIFEST, a phase 2 study of CPI-0610, a Bromodomain and Extraterminal Domain Inhibitor (BETi), as monotherapy or “add-on” to ruxolitinib, in patients with refractory or intolerant advanced myelofibrosis. *Blood* 2019, 134, 670.
234. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutation research* 1991;256:271-82.
235. Tefferi, A.; Lasho, T.L.; Begna, K.H.; Patnaik, M.M.; Zblewski, D.L.; Finke, C.M.; Laborde, R.R.; Wassie, E.; Schimek, L.; Hanson, C.A.; et al. A pilot study of the telomerase inhibitor imetelstat for myelofibrosis. *N. Engl. J. Med.* 2015, 373, 908–919.
236. Mascarenhas, J.; Komrokji, R.S.; Cavo, M.; Martino, B.; Niederwieser, D.; Reiter, A.; Scott, B.L.; Baer, M.R.; Hoffman, R.; Odenike, O.; et al. Imetelstat is effective treatment for patients with intermediate-2 or high-risk myelofibrosis who have relapsed on or are refractory to Janus Kinase inhibitor therapy: Results of a phase 2 randomized study of two dose levels. *Blood* 2018, 132, 685.
237. Tefferi A, Begna, K., Laborde, R. Imetelstat, a telomerase inhibitor, induces morphologica and molecular remissions in myelofibrosis and recersal of bone marrow fibrosis. *Blood* 2012;120:662.
238. Nakatake, M.; Monte-Mor, B.; Debili, N.; Casadevall, N.; Ribrag, V.; Solary, E.; Vainchenker, W.; Plo, I. JAK2(V617F) negatively regulates p53 stabilization by enhancing MDM2 via la expression in myeloproliferative neoplasms. *Oncogene* 2012, 31, 1323–1333.
239. Al-Ali, H.K.; Delgado, R.G.; Lange, A.; Pluta, A.; McLornan, D.P.; Vachhani, P.; Laurent Damaj, G.; Jost, P.J.; Rejto, L.; Hus, M.; et al. KRT-232, A first-in-class, murine double minute 2 inhibitor, for myelofibrosis relapsed or refractory to janus-associated kinase inhibitor treatment. *Hemasphere* 2020, 4, 215.
240. Niebel, D.; Kirfel, J.; Janzen, V.; Höller, T.; Majores, M.; Gütgemann, I. Lysinespecific demethylase 1 (LSD1) in hematopoietic and lymphoid neoplasms. *Blood* 2014, 124, 151–152.

241. Pettit, K.; Yacoub, A.; Gerds, A.; Bradley, T.; Tatarczuch, M.; Curtin, N.; Shortt, J.; Rossetti, J.; Burbury, K.; Ewing, J.; et al. A phase 2 study of bomedemstat (IMG-7289), a lysine-specific demethylase-1 (LSD1) inhibitor, for the treatment of myelofibrosis (MF). *Hemasphere* 2020, 4, 1080.
242. Cervantes, F., et al., New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*, 2009. 113(13): p. 2895-901.
243. Passamonti, F., et al., A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*, 2010. 115(9): p. 1703-8.
244. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, et al. Dynamic International Prognostic Scoring System (DIPSS) predicts progression to acute myeloid leukemia in primary myelofibrosis. *Blood* 2010;116:2857-8.
245. Caramazza, D., et al., Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients. *Leukemia*, 2011. 25(1): p. 82-8.
246. Elena, C., et al., Red blood cell transfusion-dependency implies a poor survival in primary myelofibrosis irrespective of IPSS and DIPSS. *Haematologica*, 2011. 96(1): p. 167-70.
247. Patnaik, M.M., et al., Age and platelet count are IPSS-independent prognostic factors in young patients with primary myelofibrosis and complement IPSS in predicting very long or very short survival. *Eur J Haematol*, 2010. 84(2): p. 105-8.
248. Guglielmelli, P., et al., MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol*, 2018. 36(4): p. 310-318.
249. Nicolosi, M., et al., Sex and degree of severity influence the prognostic impact of anemia in primary myelofibrosis: analysis based on 1109 consecutive patients. *Leukemia*, 2018. 32(5): p. 1254-1258.
250. Tefferi, A., et al., MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis. *J Clin Oncol*, 2018. 36(17): p. 1769-1770.
251. Tefferi, A., et al., GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for

- primary myelofibrosis. *Leukemia*, 2018. 32(7): p. 1631-1642.
252. Rumi E, Harutyunyan AS, Pietra D, et al. CALR exon 9 mutations are somatically acquired events in familial cases of essential thrombocythemia or primary myelofibrosis. *Blood* 2014;123:2416-9.
- 253 Tefferi A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2021; 96(1): 145- 162.
254. Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, et al.. Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis. *N Engl J Med*. 2010;363(12):1117-1127.
255. Tefferi A, Nicolosi M, Penna D, Mudireddy M, Szuber N, Lasho TL, Hanson CA, Ketterling RP, Gangat N, Pardanani AD. Development of a prognostically relevant cachexia index in primary myelofibrosis using serum albumin and cholesterol levels. *Blood Adv*. 2018 Aug 14;2(15):1980-1984.