

SOMMARIO:

1. INTRODUZIONE

1.1 Criteri diagnostici...

1.2 Basi molecolari delle Neoplasie
Mieloproliferative Philadelphia negative

1.3 Caratteristiche cliniche delle malattie
mieloproliferative

2. PAZIENTI E METODI

2.1 Popolazione in studio e criteri di inclusione

2.2 Procedure di laboratorio

2.3 Analisi Statistica

3. RISULTATI

3.1 Caratteristiche della popolazione generale

3.2 Caratteristiche dei pazienti con la mutazione V617F
del gene *JAK2*

3.3 Confronto tra le caratteristiche cliniche all'esordio
dei pazienti *JAK2* V617 mutati e wild-type

3.4 Dati di outcome sulla intera popolazione

INTRODUZIONE

1.1 Criteri diagnostici

Le neoplasie mieloproliferative (MPN) sono un gruppo di patologie del midollo osseo che originano dalla trasformazione neoplastica della cellula staminale pluripotente. Sono caratterizzate dalla proliferazione clonale di uno o più tipi di progenitori ematopoietici nel midollo osseo e in sedi extramidollari. La crescita incontrollata e sregolata delle cellule staminali midollari può portare perifericamente a un aumento dei globuli rossi, globuli bianchi e piastrine nell'esame emocromocitometrico.

Queste costituivano uno dei cinque gruppi in cui si dividevano le Neoplasie Mieloidi secondo la classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità del 2008 (WHO, 2008).¹

Di questo gruppo facevano parte diverse entità clinico-patologiche: Leucemia Mieloide Cronica, BCR-ABL1-positiva (LMC); Policitemia Vera (PV); Trombocitemia Essenziale (TE); Mielofibrosi Primaria (PMF); Leucemia Neutrofila Cronica (LNC); Leucemia Eosinofila Cronica, non ulteriormente specificata (LEC); Mastocitosi; Neoplasie Mieloproliferative non classificabili.

La classificazione WHO è stata recentemente revisionata (WHO 2016) e in questa revisione sono stati incorporati dati di tipo clinico, prognostico, morfologico, ma soprattutto anche immunofenotipico e genetico. In particolare, ci sono stati importanti aggiornamenti e sviluppi per quanto concerne i criteri diagnostici e i fattori prognostici a seguito dell'identificazione di alcuni biomarcatori che vengono

esaminati tramite l'analisi del gene expression profile e l'utilizzo del next generation sequencing.²

Nei mesi scorsi, inoltre sia la WHO che un gruppo di esperti indipendenti (ICC) hanno prodotto due nuove classificazioni, sovrapponibili tra loro e sostanzialmente non discordanti dai precedenti criteri diagnostici.^{3,4}

Dal punto di vista clinico le Neoplasie Mieloproliferative sono un gruppo eterogeneo di patologie ad andamento cronico caratterizzato da un'aumentata produzione di elementi maturi della linea granulopoietica, megacariopoietica, ed eritropoietica. E' proprio per questo motivo che possiamo classificare questi disordini come neoplasie, per la trasformazione clonale della cellula staminale emopoietica.⁵

A differenza della Leucemia Mieloide Cronica, patologia mieloproliferativa cronica caratterizzata da un marcatore molecolare specifico, BCR/ABL, gene di fusione e prodotto dalla traslocazione reciproca del cromosoma 9 e il cromosoma 22 t(9;22), alle MPN Philadelphia-negative manca un marcatore genetico comune e patognomonico. Ad oggi però sono state individuate tre mutazioni chiamate driver founding mutations: la mutazione V617F del gene *JAK2* (e in rari casi mutazioni dell'esone 12 del gene *JAK2*), mutazioni dei geni *MPL* e *CALR*.⁶

Le malattie mieloproliferative croniche Ph- sono patologie rare, che possono colpire ogni fascia di età, ma con incidenza crescente.

L'incidenza mondiale è stimata pari da 0,44 a 5,87/100.000 persone-anno, le incidenze più basse sono riportate in Giappone ed in Israele. Ovviamente le caratteristiche sono differenti a seconda della patologia, ad esempio i pazienti affetti da policitemia vera anno un'età media di 60 anni, ed è

rara sotto i 30 anni e nei bambini ed ha una maggiore incidenza nel sesso maschile. La Trombocitemia essenziale invece si riscontra spesso in pazienti di età superiore ai 50 anni, ma presenta un picco di incidenza fra le giovani donne, intorno ai 30 anni mentre i pazienti con Mielofibrosi Primaria hanno una età media di 70 anni, la frequenza cresce con l'avanzare dell'età, senza apparenti differenze di sesso.⁷

Una nota importante merita la categoria nosologica della Mielofibrosi Prefibrotica introdotta dalla WHO 2001, contraddistinta a livello midollare da un quadro istopatologico peculiare: presenza di anomalie citologiche a carico della linea megacariocitaria e di alterazioni quantitative della cellularità midollare con iperplasia della linea granulopoietica, in assenza di significativa fibrosi.

La Mielofibrosi Prefibrotica continua ad essere, come entità nosologica, oggetto di studio in quanto presenta sia dal punto di vista clinico sia dal punto di vista terapeutico-gestionale tratti che la accomunano, tra le diverse Neoplasie Mieloproliferative, soprattutto alla Trombocitemia essenziale; mentre dal punto di vista prognostico alcuni studi sembrano concludere con l'esistenza di una differenza in termini prognostici tra queste due categorie.⁸ Uno studio internazionale ha dimostrato l'importanza della distinzione fra le due entità; la Mielofibrosi Prefibrotica mostra tassi di sopravvivenza nettamente ridotti rispetto alla TE, in particolare la sopravvivenza a 10 anni si attesta rispettivamente nel 76% e nell'89% dei pazienti e la sopravvivenza a 15 anni rispettivamente al 59% e all'80%.⁹

Di seguito sono elencati i criteri diagnostici secondo la revisione della classificazione WHO 2022/ICC.

Criteri WHO 2022/ICC per la diagnosi di Policitemia Vera

Criteri maggiori:

- Hb >16,5 g/dl (uomo), >16 g/dl (donna) o Hct >49% (uomo), >48% (donna), altra evidenza di aumentata massa eritrocitaria;
- Aumentata cellularità midollare con iperplasia trilineare con megacariociti pleomorfici, maturi*;
- Presenza della mutazione V617F del gene *JAK2* o altre mutazioni analoghe, quali quelle a carico dell'esone 12.

Criteri minori:

- Livelli sierici di eritropoietina inferiori al limite inferiore di norma.

**La Biopsia osteomidollare non è richiesta nei casi di eritrocitosi assoluta persistente: Hb>18,5 g/dl negli uomini in (Hct = 55,5%) o Hb>16,5 g/dl nelle donne (Hct =49,5%) e in presenza dei tre criteri maggiori e di quello minore. Nonostante ciò, la presenza di una iniziale mielofibrosi (presente in più del 20% dei pazienti) può essere determinata esclusivamente con la procedura di biopsia osteomidollare nonchè dato predittivo di aumento del rischio di progressione di malattia in Mielofibrosi (MF post-PV)*

Per porre diagnosi di PV è necessario che siano soddisfatti i tre criteri maggiori o i primi due criteri maggiori ed il criterio minore.

Criteri WHO 2022/ICC per la diagnosi di Trombocitemia

Essenziale

Criteri maggiori:

- Conta piastrinica superiore o uguale a 450.000/µl;

- Proliferazione prominente della linea megacariocitaria allo studio bioptico midollare, con megacariociti di grandi dimensioni e morfologia matura con nuclei iperlobulati. Non significativo aumento di granulopoiesi neutrofila o di eritropoiesi e, molto raramente, minima fibrosi midollare (grado 1);
- Assenza dei criteri diagnostici per Policitemia Vera, Mielofibrosi Primaria, Leucemia Mieloide Cronica *BCR-ABL1+*, Sindrome Mielodisplastica o altra neoplasia mieloide;
- Presenza di mutazione di *JAK2*, *CALR* o *MPL*

Criteri minori:

- Presenza di un marker clonale o assenza di piastrinosi reattiva
- Per porre diagnosi di Trombocitemia Essenziale è necessario che siano soddisfatti tutti e quattro i criteri maggiori o i primi tre criteri maggiori ed il criterio minore.*

Criteri WHO 2022/ICC per la diagnosi di Mielofibrosi prefibrotica (prePMF)

Criteri maggiori:

- Biopsia midollare mostrante proliferazione megacariocitaria e atipia senza fibrosi > grado 1, con incremento della cellularità midollare, proliferazione granulocitaria e, spesso, riduzione dell'eritropoiesi;
- Assenza dei criteri diagnostici per Policitemia Vera, Trombocitemia Essenziale, Leucemia Mieloide Cronica *BCR-ABL1+*, Sindrome Mielodisplastica o altra neoplasia mieloide;
- Presenza di mutazione di *JAK2*, *CALR* o *MPL*, in loro assenza, presenza di altro marker clonale o esclusione delle forme di fibrosi midollare reattiva.

Criteri minori (presenza di almeno uno dei seguenti criteri, confermato in due determinazioni consecutive):

- Anemia non attribuibile a comorbidità;
- Leucocitosi superiore o pari a 11.000/mmc;
- Splenomegalia palpabile;
- Incremento del livello di LDH sierico.

Per la diagnosi è necessaria la presenza dei tre criteri maggiori e di almeno un criterio minore.

Criteri WHO 2022/ICC per la diagnosi di Mielofibrosi Primaria

Criteri maggiori:

- Proliferazione megacariocitaria con atipie, accompagnata da fibrosi reticolinica e/o collagene di grado 2 o 3;
- Assenza dei criteri diagnostici per Policitemia Vera, Trombocitemia Essenziale, Leucemia Mieloide Cronica *BCR-ABL1+*, Sindrome Mielodisplastica o altra neoplasia mieloide;
- Presenza di mutazione di *JAK2*, *CALR* o *MPL* o, in assenza di questi, di altro marcatore clonale; se assenti, esclusione delle forme di fibrosi midollare reattiva.

Criteri minori (presenza di almeno uno dei criteri seguenti, confermato in due determinazioni consecutive):

- Anemia non attribuibile a comorbidità;
- Leucocitosi superiore o pari a 11.000/mmc;
- Splenomegalia palpabile;
- Incremento del livello di LDH sierico;
- Leucoeritroblastosi.

Per la diagnosi è necessaria la presenza dei tre criteri maggiori e di almeno un criterio minore.

Le Neoplasie Mieloproliferative Philadelphia negative presentano nella loro storia naturale due principali tipi di rischio:

- il primo è il rischio vascolare sia in senso trombotico venoso e arterioso, sia in termini di eventi emorragici;
- il secondo è il rischio evolutivo sia in senso fibrotico sia in senso leucemico, in particolare dopo anni di storia di malattia.

Studi su ampie casistiche hanno riportato tassi di prevalenza per eventi trombotici maggiori alla diagnosi variabili fra il 34 e il 39% per i pazienti con PV e variabili fra il 10 e il 29% per i pazienti con TE; la prevalenza di eventi trombotici durante il follow-up, invece, si è attestata fra l'8 e il 19% per i casi di PV e fra l'8 e il 31% per i casi di TE.¹⁰

L'evoluzione leucemica stimata a venti anni è, invece, inferiore al 10% per i pazienti con PV e pari al 5% per i pazienti con TE; tassi più elevati caratterizzano, invece, i casi di mielofibrosi.⁷

I criteri per una diagnosi corretta e riproducibile di Mielofibrosi post-PV o post-TE sono stati stilati dall'International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment nel 2008, e constano di parametri clinici e laboratoristici, che affiancano il dato istopatologico di aumentata fibrosi midollare.¹¹

Criteri WHO 2008 per la diagnosi di Mielofibrosi Post-Policitemia Vera

Criteri maggiori:

- Documentazione di precedente diagnosi di Policitemia Vera, definita secondo i criteri WHO 2008;
- Fibrosi a livello midollare di grado 2 o 3 (con scala 0-3) o di grado 3-4 (con scala 0-4);

Criteri minori (presenza di almeno due dei criteri seguenti):

- Anemia o perdita della necessità di salasso terapia per il controllo dell'ematocrito in assenza di terapia citoriduttiva;
- Leucoeritroblastosi nel sangue periferico;
- Aumento della splenomegalia inteso come splenomegalia palpabile ≥ 5 cm dal margine inferiore dell'arcata costale o nuovo riscontro di splenomegalia palpabile;
- Sviluppo di ≥ 1 sintomi sistemici (calo ponderale $\geq 10\%$ del peso corporeo in 6 mesi, sudorazioni notturne, febbre non altrimenti spiegabile $\geq 37,5$ °C)

Per la diagnosi è necessaria la presenza dei due criteri maggiori e di almeno due criteri minori.

Criteri WHO 2008 per la diagnosi di Mielofibrosi Post-Trombocitemia essenziale

Criteri maggiori:

- Documentazione di precedente diagnosi di Trombocitemia essenziale, definita secondo i criteri WHO 2008;

- Fibrosi a livello midollare di grado 2 o 3 (con scala 0-3) o di grado 3-4 (con scala 0-4);

Criteri minori (presenza di almeno due dei criteri seguenti):

- Anemia e perdita di Hb ≥ 2 g/dl rispetto al livello basale di Hb;

- Leucoeritroblastosi nel sangue periferico;

- Aumento della splenomegalia inteso come splenomegalia palpabile ≥ 5 cm dal margine inferiore dell'arcata costale o nuovo riscontro di splenomegalia palpabile;

- Sviluppo di ≥ 1 sintomi sistemici (calo ponderale $\geq 10\%$ del peso corporeo in 6 mesi, sudorazioni notturne, febbre non altrimenti spiegabile $\geq 37,5$ °C)

- Aumento del livello di LDH sierico.

Per la diagnosi è necessaria la presenza dei due criteri maggiori e di almeno due criteri minori.

Non disponendo attualmente di interventi terapeutici capaci di garantire la guarigione di queste patologie, ad eccezione del trapianto allogenico di cellule staminali, non applicabile nella maggior parte di questi pazienti, la gestione dei pazienti con Neoplasie Mieloproliferative Philadelphia negative è mirata a ridurre il rischio vascolare. A tale scopo, la terapia in queste patologie è sempre adattata al rischio.

1.2 Basi molecolari delle Neoplasie Mieloproliferative Philadelphia negative

Il primo grande passo verso la comprensione della patogenesi molecolare delle MPN Ph negative è avvenuto nel 2005 tramite l'identificazione della mutazione V617F del gene *JAK2* da parte di quattro gruppi di ricercatori indipendenti.¹²⁻¹⁵

Si tratta di una mutazione puntiforme a livello dell'esone 14 del gene *JAK2* e in particolare di una singola sostituzione nucleotidica G>T in posizione 1849, con conseguente sostituzione dell'aminoacido valina con l'aminoacido fenilalanina al residuo 617. Il gene *JAK2* codifica per una proteina tirosinchinasi non recettoriale (Janus Kinase 2), centrale nella via di trasduzione del segnale mediato dai recettori delle citochine, che non possiede un'attività catalitica intrinseca ma utilizza effettori proteici intracellulari. In condizioni fisiologiche, il legame del ligando al recettore ne determina una modifica conformazionale e ciò porta all'attivazione dell'attività tirosin-chinasica delle molecole di *JAK2* associate con la porzione intracellulare del recettore stesso.

Tramite studi di cristallografia è stato determinato che la mutazione V617F determini un impedimento sterico alla fisiologica interazione fra la porzione JH1, che corrisponde al dominio ad attività tirosinchinasica e la porzione JH2, che rappresenta il dominio pseudochinasico, ad attività inibitoria sull'attività catalitica della proteina; l'effetto complessivo è, pertanto, quello di un'accentuata attività enzimatica e ciò fornisce un fondamento biochimico per il fenomeno di ipersensibilità allo stimolo citochinico, che è stato teorizzato come possibile base patogenetica delle neoplasie mieloproliferative fin dai tempi di William Dameshek.^{16,17}

La mutazione V617F del gene *JAK2* è la driver founding mutation con incidenza maggiore nelle Neoplasie Mieloproliferative, andandosi a presentare in più del 95% dei pazienti con PV e nel 50-60% dei pazienti affetti da TE e PMF.

Sempre a carico del gene *JAK2* sono state, in seguito, riportate ulteriori mutazioni, sia inserzioni che delezioni, principalmente nell'esone 12 di questo gene, con analogo significato funzionale attivatorio. Tali alterazioni forniscono la base genetica per la piccola porzione di pazienti con Policitemia Vera (circa il 5%) che non presentano la classica mutazione V617F.¹⁸

Nel 2006 è stato compiuto un ulteriore passo in avanti nella conoscenza delle basi molecolari delle Neoplasie Mieloproliferative Philadelphia negative grazie all'individuazione di mutazioni a carico dell'esone 10 del gene *MPL* in una piccola quota di pazienti con TE (3-5%) e con MF (8-11%). Il gene *MPL* codifica per il recettore della trombopoietina.^{19,20} Le mutazioni riscontrate più frequentemente sono la W515L e la W515K ma occasionalmente altri codoni possono essere interessati, come accade ad esempio nel caso della mutazione S505N, che si riscontra sia in casi sporadici di neoplasia mieloproliferativa, come mutazione acquisita, sia in casi di Trombocitosi Ereditaria, come mutazione germline.²¹ È stata riscontrata una associazione fra lo stato omozigote per la mutazione di *MPL* (in seguito a fenomeni di copy neutral loss of heterozygosity, CN-LOH) ed un incremento della fibrosi midollare.²² Anche le mutazioni di *MPL*, così come quelle di *JAK2*, comportano un gain of function ed esplicano la loro azione mediante un'attivazione della via di segnalazione intracellulare JAK-STAT.

Nonostante tali avanzamenti scientifici e gli sforzi compiuti negli anni successivi, una quota non trascurabile di pazienti,

circa il 40% dei casi di TE e PMF, è rimasta priva di un marcatore genetico noto, fino al dicembre 2013, quando due gruppi di ricercatori hanno evidenziato in modo indipendente, grazie a tecniche di whole-exome sequencing, la presenza di mutazioni somatiche ricorrenti nel gene *CALR* in gran parte dei pazienti con TE e PMF che non presentavano mutazioni a carico di *JAK2* o *MPL*.^{23,24}

Fin dalle prime osservazioni è risultato evidente come le mutazioni di *CALR* fossero altamente specifiche per questa categoria di pazienti, coprendone proporzioni variabili fra il 60 e l'88%; in tal modo il gene *CALR* è risultato il secondo per frequenza di mutazione nel campo delle Neoplasie Mieloproliferative Philadelphia negative, dopo il gene *JAK2*.

Dal punto di vista molecolare il gene *CALR* si trova sul braccio corto del cromosoma 19 ed è costituito da nove esoni; la Calreticulina, suo prodotto proteico, è una molecola dal punto di vista evolutivo altamente conservata, strutturalmente articolata in tre domini: un dominio amino-terminale (N-terminale) costituito dai primi 180 residui aminoacidici; un dominio centrale o dominio P, ricco in prolina che copre la porzione compresa fra il residuo 181 e il 290 ed è capace di legare il calcio ad alta affinità, ma con bassa capacità; ed un dominio carbossi-terminale (C-terminale) esteso dal residuo aminoacidico 291 al 400, che rappresenta il sito di legame per il calcio. Il dominio C-terminale presenta una carica elettrica negativa che permette di formare un legame a bassa affinità, ma ad alta capacità con il calcio e contiene la sequenza KDEL (lisina- aspartato- glutammato- leucina) che agisce da segnale per la localizzazione a livello del reticolo endoplasmatico.²⁵

Da più studi si evince che i casi di Trombocitemia Essenziale *CALR* mutati presentano un fenotipo clinico caratterizzato dalla

prevalenza del sesso maschile, da una conta piastrinica più alta, una conta leucocitaria più bassa, livelli inferiori di emoglobina ed età meno avanzata rispetto ai casi di TE *JAK2* mutata. Nota saliente della clinica delle MPN *CALR* mutate è il minor tasso di trombosi, che rimane significativo anche dopo correzione per l'età, a dispetto di conte piastriniche significativamente più alte; questo effetto protettivo delle mutazioni di *CALR* sul rischio di trombosi sembra, grazie a un recente report, essere confinato ai pazienti con età inferiore ai 60 anni. Non sembra esistere una differenza in termini di sopravvivenza fra i diversi sottotipi molecolari di TE.^{26,27}

I pazienti con Mielofibrosi *CALR* mutati, clinicamente più giovani e con una conta piastrinica più elevata, sembrano avere una minore tendenza all'anemia e alla dipendenza trasfusionale, una ridotta incidenza di leucocitosi, score di prognosi secondo il DIPSS plus più bassi e minore incidenza di ulteriori mutazioni, a significato sfavorevole, quali quelle dei geni coinvolti nei processi di splicing. A differenza di quello che accade nella Trombocitemia Essenziale, nella Mielofibrosi sussiste una differenza in termini di sopravvivenza tra i pazienti affetti da Mielofibrosi *CALR* mutata rispetto a coloro i quali presentano mutazione di *JAK2* o *MPL* e rispetto al gruppo dei pazienti triple negative.²⁸

Pur essendo state evidenziati ad oggi più di 50 sottotipi di mutazione di *CALR*, circa l'85% dei pazienti presenta uno dei due sottotipi più frequenti:

- Mutazione di tipo 1: una delezione di 52 paia di basi (c.1099_1150del; L367fs*46; responsabile del 44%–53% dei casi);

- Mutazione di tipo 2: un'inserzione di 5 paia di basi (c.1154_1155insTTGTC; K385fs*47; responsabile del 32%–42% dei casi).

Il rimanente 15% dei casi è rappresentato da altre inserzioni e delezioni o da una combinazione dei due eventi genetici, presenti spesso in un numero particolarmente esiguo di pazienti.²⁹

Le mutazioni di *CALR* riportate nei casi di Neoplasie Mieloproliferative si caratterizzano dal punto di vista genetico per essere esclusivamente inserzioni o delezioni localizzate nel contesto dell'esone terminale; la peculiarità di queste mutazioni è la mancata correlazione diretta tra le diverse mutazioni e le diverse proteine tradotte: indipendentemente dal tipo di mutazione, l'effetto è sempre un medesimo slittamento di un nucleotide del modulo di lettura (alternative reading frame 1). L'alternative reading frame cambia la traduzione di tutta la rimanente porzione della proteina, portando alla formazione di una nuova sequenza C-terminale (neomorphic tail), costituita da una porzione comune a tutte le forme di proteina mutata e da una piccola porzione, di lunghezza variabile, specifica per ognuno dei singoli sottotipi.

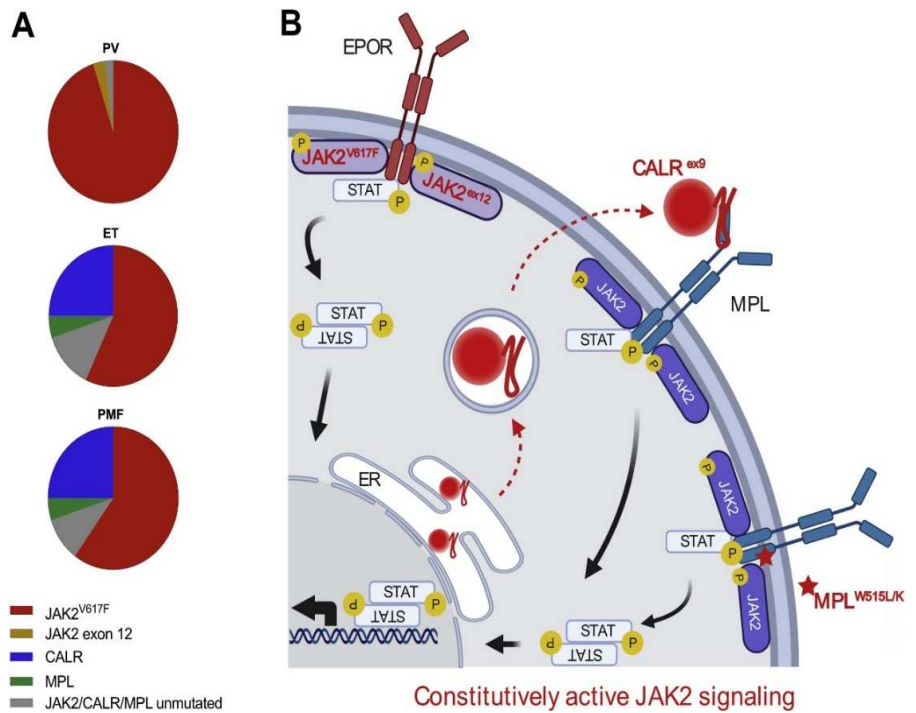
Il nuovo dominio C-terminale non esprime più la sequenza KDEL e al posto degli originari residui carichi negativamente, presenta una prevalenza di residui aminoacidici neutri o a carica positiva, perdendo la capacità di legare i cationi di calcio.

Le mutazioni somatiche di *JAK2*, *MPL* e *CALR* si presentano come eventi genetici mutualmente esclusivi nella quasi totalità dei casi e si comportano come driver founding mutations, in quanto determinano un vantaggio selettivo sia in termini di sopravvivenza che di capacità replicative ad una cellula,

conferendole capacità di autorinnovamento e portando così alla formazione di un clone mutato.

Questo non implica che le tre suddette mutazioni costituiscano il primo evento genetico somatico nella patogenesi delle MPN, come testimoniato da alcuni studi che hanno mostrato anche mutazioni a carico di altri geni, quali ad esempio TET2. Queste mutazioni possono pertanto precedere l'acquisizione della mutazione di *JAK2* e l'ordine di acquisizione delle diverse mutazioni sembrerebbe influenzare il fenotipo clinico dei pazienti, andando a determinare la spiccata eterogeneità tipica di queste entità nosologiche, anche a fronte della medesima founding mutation.³⁰ (Figura 1)

Figura 1. Mutazioni somatiche driver nelle MPN che attivano il segnale JAK-STAT. (A) Frequenza delle mutazioni driver founding nelle patologie MPN, PV, TE, e PMF. (B) la mutazione V617F del gene *JAK2* si associa a EPOR e MPL in tutti i sottotipi di MPN. Le mutazioni nell'esone 12 del gene *JAK2* si associa esclusivamente a EPOR nelle PV. Le mutazioni *CALR* si trovano nell'esone 9 e si presentano in TE e PMF. Mutazioni di *MPL* sono a carico dell'esone 10 come mutazioni missense soprattutto del residuo W515 e si trovano in pazienti con TE e PMF. Le tre mutazioni driver somatiche (*JAK2*, *CALR* e *MPL*) convergono nella attivazione costitutiva del pathway di signaling JAK2-STAT. (Szybinski, 2021)



Lo scenario patogenetico delle Neoplasie Mieloproliferative è ulteriormente complicato dalla presenza di eventi mutazionali aggiuntivi, che possono affiancare le sopracitate driver mutations, talvolta precedendole, come già evidenziato; i geni interessati sono quelli coinvolti nella regolazione epigenetica della trascrizione o nei processi di splicing (SF3B1, U2AF1, SRSF2).³¹

Nella Tabella 1 sono riportate le principali mutazioni aggiuntive e la loro prevalenza rispetto alle varie diagnosi di MPN.

Tabella 1. Frequenza delle mutazioni aggiuntive nella MPN

| Classe | Gene Mutato | TE | PV | MFP | |
|----------------------------------|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | blast | | | |
| | | phase | | | |
| <u>Regolatori epigenetici</u> | <i>DNMT3A</i> | 0-9 | 0-7 | 3-15 | 2-14 |
| | <i>TET2</i> | 7-16 | 19-22 | 10-18 | 19-28 |
| | <i>IDH1/IDH2</i> | 1 | 2 | 0-6 | 19-31 |
| | <i>ASXL1</i> | 1-11 | 3-12 | 18-37 | 17-47 |
| | <i>EZH2</i> | 1-3 | 0-3 | 0-9 | 13-15 |
| <u>Splicing</u> | <i>SRSF2</i> | 2 | 3 | 8-18 | 13-22 |
| | <i>U2AF1</i> | 1 | <1 | 16 | 5-6 |
| | <i>SF3B1</i> | 5 | 3 | 9-10 | 4-7 |
| | <i>ZRSR2</i> | 3 | 5 | 10 | 2 |
| <u>Regolatori trascrizionali</u> | <i>NFE2</i> | <1 | 2-3 | 0-3 | <1 |
| | <i>RUNX1</i> | 0-2 | 0-2 | 3-4 | 4-13 |
| <u>Segnale intracellulare</u> | <i>NRAS/KRAS</i> | <1 | 0-1 | 3-4 | 7-15 |
| | <i>PTPN11</i> | 0-2 | <1 | 0-2 | 6-8 |
| | <i>CBL</i> | 0-1 | 0-2 | 0-6 | 4 |
| | <i>LNK (SH2B3)</i> | 1-3 | 0-9 | 0-6 | 11 |
| <u>Riparatori del DNA</u> | <i>TP53</i> | 2-6 | 1 | 1-3 | 11-36 |
| | <i>PPM1D</i> | 2 | 1 | 1 | NA |

Referenze: Dunbar et al. 2008; Makishima et al. 2009; Grand et al. 2009; Ding et al. 2009; Muramatsu et al. 2010; Abdel-Wahab et al. 2010; Pardanani et al. 2010; Tefferi et al. 2010; Harutyunyan et al. 2011; Abdel-Wahab et al. 2011; Lin et al. 2011; Stegelmann et al. 2011; Malcovati et al. 2011; Papaemmanuil et al. 2011; Yoshida et al. 2011; Zhang et al. 2012; Jutzi et al. 2013; Vannucchi et al. 2013; Lundberg et al. 2014; Guglielmelli et al. 2014; Rampal et al. 2014; Wang et al. 2014; Tefferi et al. 2016; Lasho et al. 2018; Venton et al. 2018; Grinfeld et al. 2018.

1.3 Caratteristiche cliniche delle malattie mieloproliferative

Le Neoplasie Mieloproliferative Philadelphia-negative si caratterizzano sul piano clinico essenzialmente per il rischio vascolare, inteso come complicanze trombotiche e/o emorragiche, e per il rischio evolutivo verso una forma mielofibrotica o leucemica.

Attualmente l'unico intervento terapeutico in grado di garantire la guarigione della malattia è il trapianto di cellule staminali emopoietiche che permette di eradicare il clone emopoietico. Come noto questa procedura ha un peculiare profilo di tossicità, nonché una mortalità trapianto-relata. Inoltre i criteri di eleggibilità al trapianto allogenico spesso escludono questa possibilità ai pazienti, vista ad esempio l'età mediana di presentazione della patologia mieloproliferativa cronica. Proprio per questo attualmente gli interventi terapeutici in pazienti affetti da MPN hanno come obiettivo primario quello di ridurre il rischio di sviluppare un evento vascolare, cercando allo stesso tempo di minimizzare l'intrinseco rischio evolutivo.

Sempre centrale nel management dei pazienti affetti da MPN è il controllo dei sintomi sistemici, principalmente nei pazienti con Mielofibrosi, e la gestione dei sintomi legati ai disturbi microvascolari, soprattutto nei pazienti con TE o PV. I sintomi sistemici si presentano come calo ponderale $\geq 10\%$ del peso corporeo in 6 mesi, sudorazioni notturne e febbre non altrimenti spiegabile $\geq 37,5$ °C come da WHO 2022. I disturbi microvascolari sono invece una gamma di sintomi che talvolta possono diventare particolarmente invalidanti. Tra i principali troviamo cefalea, acufeni, disturbi oculari transitori, parestesie e/o eritromelalgia. Queste manifestazioni sono state

interpretate quali conseguenze delle anomale interazioni fra piastrine ed endotelio vascolare a livello del microcircolo.

È ormai accertato che i principali fattori predittivi di complicanze vascolari nei pazienti con TE e PV siano l'età superiore ai 60 anni e la presenza di un precedente trombotico in anamnesi; nei pazienti affetti da Trombocitemia Essenziale si aggiunge tra fattori di rischio vascolare anche una conta piastrinica superiore a 1.500.000/mmc.

Sulla base dei suddetti fattori di rischio, i pazienti con TE o con PV vengono considerati a basso rischio, quando non presentano nessuna delle caratteristiche sopracitate, e ad alto rischio, in presenza di almeno una delle variabili. Nel primo caso la gestione clinica si fonda sull'utilizzo della terapia antiaggregante con acido acetilsalicilico e, nel caso della PV, sull'impiego dei salassi venosi per mantenere l'ematocrito al di sotto del target del 45%, mentre nel secondo caso vi è indicazione ad impostare una terapia citoriduttiva.³²

Il management terapeutico dei pazienti con mielofibrosi è sempre adattato al rischio ma richiede l'intervento di approcci più stratificati e l'impiego di diversi farmaci, compresi JAK-inibitori.³³

PAZIENTI E METODI

2.1 Popolazione in studio e criteri di inclusione

Questo studio ha preso in esame i campioni biologici dell'esordio e i dati clinici dei pazienti con la diagnosi di neoplasia Mieloproliferativa secondo i criteri WHO eseguita presso la Clinica di Ematologia dell'Azienda Ospedaliera universitaria delle Marche dal 01/01/2010 al 31/12/2021. Questo studio è stato approvato dal Comitato Etico Regionale delle Marche (CERM), ed è stato condotto in accordo con la Dichiarazione di Helsinki del 1975, nella sua versione aggiornata redatta nel 2000. Tutti i campioni sono stati raccolti previa acquisizione del consenso informato scritto dei pazienti.

L'inclusione nel presente studio ha pertanto richiesto la diagnosi di Policitemia Vera, Trombocitemia Essenziale, Mielofibrosi Primaria o Neoplasia Mieloproliferativa inclassificabile secondo i criteri WHO 2022/ICC, la disponibilità dei campioni di DNA per valutare il tipo di mutazione driver alla diagnosi, il burden allelico della mutazione genetica driver, i dati clinici alla diagnosi e durante il follow up.

La popolazione oggetto del nostro studio comprende 229 pazienti consecutivi affetti da Neoplasia Mieloproliferativa (54 pazienti affetti da Trombocitemia Essenziale, 108 con Mielofibrosi Primaria, 60 con Policitemia Vera e 7 con Neoplasia Mieloproliferativa inclassificabile), diagnosticata dal 2000 al 2019 presso la Clinica di Ematologia degli Ospedali Riuniti di Ancona.

Le caratteristiche prese in considerazione come variabili qualitative o continue alla diagnosi, sono età; sesso; tipo di MPN; stato mutazionale del gene *JAK2* e delle driver mutations;

cariotipo da sangue midollare; presenza di sintomi costituzionali; splenomegalia; presenza di altri fattori di rischio trombotico; livello di emoglobina; livello di ematocrito; livello di globuli bianchi; livello di polimorfonucleati; livello di piastrine all'esame emocromocitometrico, markers infiammatori derivanti dall'emocromo. Abbiamo valutato altre caratteristiche come la comparsa di trombosi nel follow-up e terapia intrapresa.

Sono state confrontate le caratteristiche della popolazione stratificando i pazienti in base alla presenza della mutazione V617F del *JAK2*.

Sono stati poi studiati i fattori impattanti sulla sopravvivenza nella intera coorte di pazienti e nelle seguenti sottopopolazioni con mutazioni driver diverse.

2.2 Procedure di laboratorio

I campioni derivanti dai pazienti affetti da MPN che arrivano al laboratorio possono essere di sangue periferico e midollo osseo.

Il campione ha un'etichetta recante la data del prelievo, il cognome e il nome del paziente, la data di nascita e l'eventuale codice interno della struttura ospedaliera.

Il campione è accompagnato sempre da una richiesta cartacea in cui il medico richiedente deve indicare nome e cognome del paziente, data di nascita, sesso, data del prelievo, tipo di campione prelevato, sospetto diagnostico, tipo di esame richiesto, nome e recapito del clinico referente.

Si procede nel minor tempo possibile alla manipolazione del campione sotto cappa a flusso laminare per garantire un ambiente sterile e una protezione per l'operatore.

Per tutti i campioni si procede con:

- Separazione su gradiente di cellule mononucleate da sangue periferico (SP) e midollo (MO)
- Estrazione dell'acido nucleico (DNA o RNA)
- PCR-RT

A. Separazione su gradiente di cellule mononucleate da sangue periferico (sp) e midollo (mo)

Il metodo di separazione dei linfociti sfrutta l'uso di una soluzione a bassa viscosità Lymphocyte separation medium (soluzione filtrata sterile di polimero di saccarosio e diatrizoati), che permette la separazione delle diverse cellule del sangue in base alla loro differente densità che durante la centrifugazione permette la formazione di diversi strati contenenti tipi cellulari differenti.

Separazione da sangue periferico:

- Si parte da un volume iniziale di sangue di 15-20 ml;
- Unire le provette del paziente in un'unica Falcon da 50 ml identificata con cognome del paziente + SP;
- Diluire il sangue 1:3 con PBS (da 20 a 35 ml);
- Preparare un'altra Falcon da 50 ml identificandola con cognome + SP e aggiungere 15 ml di Lymphocyte separation medium;

- Utilizzare il pipettatore automatico con una pipetta sterile da 25 ml, facendo attenzione a mantenere la sterilità nell'apertura delle pipette monouso;
- Inclinare la Falcon contenente il mezzo di separazione e stratificare gradualmente il sangue sopra di esso evitando il mescolamento che farebbe precipitare in basso il sangue;
- Piano piano diminuire l'inclinazione fino a far tornare la provetta in posizione verticale, evitando movimenti bruschi;
- Centrifugare a 1500 rpm per 30 minuti.

Separazione da midollo osseo:

- Si parte da un volume di partenza di 5 ml;
- Diluire nella stessa Falcon il MO 1:5 con PBS (da 5 ml a 20 ml);
- Preparare 2 Falcon da 15 ml identificate con cognome + MO e aggiungere 4 ml di Lymphocyte separation medium in ognuna;
- Prendere il pipettatore automatico e la pipetta da 10 ml. Stratificare 10 ml di MO diluito in ognuna delle Falcon. Eseguire il tutto sempre con la provetta inclinata stratificando il campione sul mezzo di separazione;
- Centrifugare a 1500 rpm per 30 minuti.

Alla fine della centrifugazione otterremo:

1. Plasma
2. Anello di PBMC: Linfociti e monociti
3. Ficoll
4. Granulociti e globuli rossi

Si va a raccogliere l'anello di cellule (bianco torbido) ruotando lentamente la pipetta rimanendo al bordo della provetta. Le

cellule raccolte poi vengono messe in una nuova Falcon da 50 ml identificata sempre con il nome e cognome del paziente.

Si va sempre poi a diluire 1:3 con BBS, e andare ad effettuare un lavaggio, centrifugando a 2000 rpm per 10 minuti.

Dopo la centrifugazione si va a scartare il surnatante e risospendere il pellet con una quantità variabile di PBS (1.5-2 ml) in base alla quantità di pellet formatosi. Con la pipetta da 2 ml dopo aver risospeso il pellet, misurare il volume della sospensione e annotarlo.

Prelevare 20 μ l di sospensione e metterli in una provetta di conta Eppendorf identificata con cognome e SP/MO nella quale sono stati aggiunti precedentemente 80 μ l di PBS (quindi le cellule sono diluite 1:5) e vortexare.

Fare la conta al contaglobuli Coulter. Si va a leggere il valore dei WBC che è dato in $n^\circ \times 10^3/\mu$ l che corrispondono a $n^\circ \times 10^6/\text{ml}$. Il valore deve essere moltiplicato per il fattore di diluizione quindi per 5.

Per l'estrazione del DNA servono 10×10^6 cellule. Se andiamo a misurare quindi il numero di cellule ottenuto per il volume totale misurato otteniamo il numero di cellule totali nel campione.

Se il valore contato è maggiore di 12/10 milioni andremo a fare una semplice divisione e otteniamo il volume di campione da dispensare nelle cryovial che corrisponde a 12/10 milioni di cellule.

Le cryovial vengono preparate scrivendo nome e cognome, data della manipolazione del campione, se è SP o MO e il contenuto, e indicate come Pellet per il DNA. e conservate a -20°C.

B. Estrazione DNA

In laboratorio abbiamo utilizzato una procedura manuale con “QIAamp Blood Mini Kit”:

- Risospendere il pellet (conservato a -20°C) in 200 µl di PBS;
- Aggiungere 200 µl di buffer AL + 20 µl di proteinase K (in frigo a 4°C) che andranno a lisare le cellule;
- Vortexare per 15 secondi: al termine che la soluzione è omogenea incubare nel bagnetto per 10 minuti a 56°C;
- Aggiungere 200 µl di etanolo assoluto e risospendere in modo da rendere il campione omogeneo;
- Preparare la colonnina e scrivere il codice del campione corrispondente sul tappo; mettere la colonnina nel collection tube (2 ml);
- Caricare il campione nella colonnina;
- Centrifugare a 12000 rpm per 1 minuto;
- Eliminare la provetta di scarto e mettere la colonnina in un nuovo collection tube da 2 ml. Aprire con cautela la colonnina ed aggiungere 500 µl di buffer AW1;
- Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto;
- Eliminare la provetta di lavaggio e mettere la colonnina in una nuova provetta di lavaggio. Aprire con cautela la colonnina ed aggiungere 500 µl di buffer AW2;
- Centrifugare a 8000 rpm per 3 minuti;
- Eliminare la provetta di lavaggio e mettere la colonnina in una nuova provetta;
- Centrifugare a vuoto a 12000 rpm per 1 minuto per assicurarsi di asciugare bene la membrana;

- Con cautela sistemare la colonnina in una nuova Eppendorf precedentemente nominata con il codice del campione;
- Aprire con cautela la colonnina, aggiungere 100 µl di buffer di eluizione (AE) ed incubare per 1 minuto a temperatura ambiente; il buffer andrà a rompere i legami tra le membrane ed il DNA facendo sì che nel passaggio successive possa essere raccolto. Se il campione presenta un numero di cellule molto basso quindi $< 5 \times 10^6$ eluire in 50-70 µl.
- Centrifugare a 8000 rpm per 1 minuto.

C. PCR-RT

Le indagini molecolari sono state condotte sul DNA genomico estratto dai granulociti circolanti.

1. Mutazione V617F del gene *JAK2*

Lo studio della mutazione V617F del gene *JAK2* è stata condotta sia con un dosaggio qualitativo che in alcuni casi quantitativo.

Nel caso di test qualitativo della mutazione V617F del gene *JAK2* abbiamo utilizzato il kit ipsogen *JAK2* MutaScreen PCR. Le reazioni di PCR sono state condotte sullo strumento RotorGene 6000 o RotorGeneQ (Qiagen) dotati di rotore a 72 provette.

In un saggio di discriminazione allelica vengono impiegate due sonde TaqMan® (saggio multiplo). Una sonda fornisce un appaiamento specifico per la sequenza dell'allele 2 (ad esempio, l'allele wild type), l'altra sonda fornisce un appaiamento specifico per l'allele 1 (ad esempio, l'allele con una mutazione). Ogni sonda è marcata con un fluorocromo distintivo alla rispettiva estremità 5', denominato reporter (ad esempio, FAM™ o VIC®), inoltre contiene un quencher non

fluorescente all'estremità 3'. Le sonde contengono anche un legante del solco minore (minor groove binder, MGB™) che consente l'uso di sonde più corte con maggiore stabilità e dunque assicura una discriminazione allelica più accurata.

Durante la fase di estensione della PCR, la sonda che si appaia in maniera specifica viene scissa dall'attività dell'esonucleasi 5'→3' della Taq DNA polimerasi, pertanto il fluorocromo reporter si separa dal quencher rilasciando segnali fluorescenti rilevabili. La sonda che non si appaia in maniera specifica viene spostata, e non scissa, dalla Taq DNA polimerasi, senza rilasciare alcun fluorocromo reporter. Il segnale fluorescente (VIC o FAM) generato viene rilevato al termine della PCR (end-point, o punto finale) e indica immediatamente la presenza della sequenza o delle sequenze ricercate (allele wild-type, allele mutato o entrambi), senza la necessità di passaggi post-PCR lunghi e laboriosi che potrebbero aumentare anche il rischio di contaminazione. La quantità della sequenza target non viene effettivamente determinata.

Il kit ipsogen JAK2 MutaScreen utilizza questa tecnologia nel modo illustrato nella Figura 2.

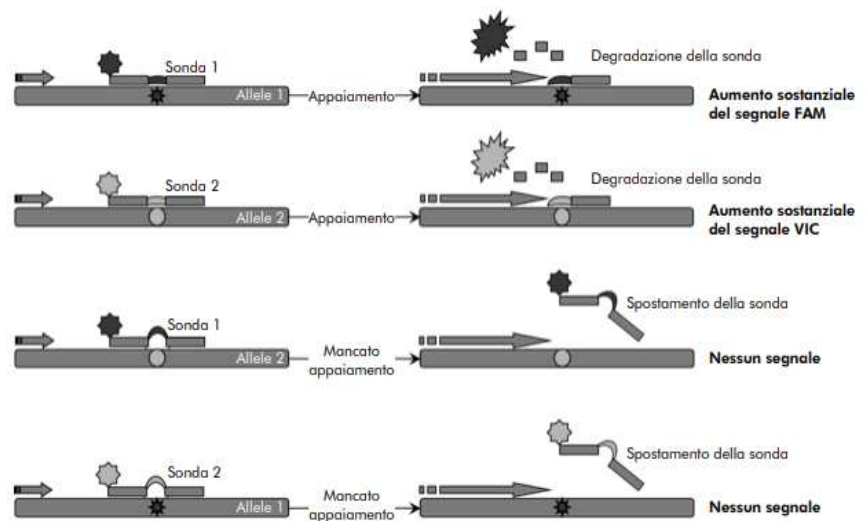


Figura 1. Saggio multiplo con sonde TaqMan. Il kit *ipsogen JAK2 MutaScreen* utilizza questa tecnologia per la discriminazione allelica.

La procedura prevede:

- Scongellare tutti i componenti necessari e collocarli sul ghiaccio;
- Agitare in vortex e centrifugare brevemente tutte le provette (circa 10 s a 10.000 rpm), in modo da raccogliere il liquido sul fondo della provetta;
- Preparare la seguente miscela qPCR in base al numero di campioni da trattare. In Figura 3 è riportato lo schema di pipettamento per la preparazione di una miscela di reagente, calcolata in modo tale da ottenere un volume finale di 25 μ l.

Figura 3. Preparazione della miscela qPCR

| Componente | N° di reazioni (μ l) | | | | Concentrazione finale |
|---|---------------------------|---------|---------|---------|-----------------------|
| | 1 | 56+1* | 28+1† | 18+1‡ | |
| TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x | 12,5 | 712,5 | 362,5 | 237,5 | 1x |
| Miscela di primer e sonde, 10x | 2,5 | 142,5 | 72,5 | 47,5 | 1x |
| Acqua priva di nucleasi di grado PCR | 5 | 285 | 145 | 95 | – |
| Campione (da aggiungere al passaggio 5) | 5 | 5 cad. | 5 cad. | 5 cad. | – |
| Volume totale | 25 | 25 cad. | 25 cad. | 25 cad. | – |

* 24 campioni; 1 esperimento/kit.

† 10 campioni; 2 esperimenti/kit.

‡ 5 campioni; 3 esperimenti/kit.

- Agitare in vortex e centrifugare brevemente la miscela qPCR (circa 10 s a 10.000 rpm), in modo da raccogliere il liquido sul fondo della provetta,
- Aliquotare 20 μ l di pre-miscela qPCR in ogni provetta;
- Aggiungere 5 μ l di materiale DNA campione o di controlli nella provetta corrispondente (volume totale 25 μ l);
- Miscelare delicatamente pipettando verso l'alto e verso il basso;
- Chiudere le provette per PCR. Inserire le provette nel rotore a 72 posizioni seguendo le istruzioni del produttore;
- Avviare il software Rotor-Gene per l'analisi.

Nel caso di test quantitativo della mutazione V617F del gene *JAK2* abbiamo utilizzato il kit ipsogen *JAK2* MutaQuant. Le reazioni di PCR sono state condotte sullo strumento Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM .

Per determinare quantitativamente la percentuale di polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) nei campioni di DNA sono state proposte diverse tecniche. Tra queste, si preferiscono i metodi basati sulla reazione quantitativa a catena della polimerasi (qPCR) real-time grazie alla loro maggiore sensibilità nel monitoraggio del carico allelico nell'intero processo. Molte di queste tecniche presentano una moderata sensibilità, ovvero tra l'1 e il 10%, ad esempio la discriminazione allelica TaqMan[®], la tecnologia di pirosequenziamento Pyrosequencing[®], l'analisi della curva di melting e il sequenziamento diretto.

Alcune, ad esempio la curva di melting e il sequenziamento, sono unicamente semiquantitative, mentre altre, quale il pirosequenziamento, necessitano del processamento post-PCR o di apparecchiature non sempre disponibili, oppure presentano costi di installazione proibitivi per i test di laboratorio di routine. Un approccio ad elevata sensibilità (sensibilità <0,1%) prevede l'utilizzo di un primer SNP specifico, che consente l'amplificazione selettiva dell'allele mutante o wild-type, facilmente rilevabile da uno strumento di analisi della qPCR realtime. Il kit ipsogen JAK2 MutaQuant si basa su questa tecnica.

L'uso di qPCR consente l'accurata quantificazione dei prodotti della PCR durante la fase esponenziale del processo di amplificazione della PCR. I dati della PCR quantitativa possono essere ottenuti rapidamente, senza ricorrere a trattamento post-PCR, rilevando in tempo reale i segnali di fluorescenza durante e/o dopo i cicli della PCR, riducendo così drasticamente il rischio di contaminazione del prodotto della PCR. Le tecniche della qPCR attualmente disponibili appartengono a 3 tipi principali: analisi qPCR tramite fluorocromo SYBR[®] Green I,

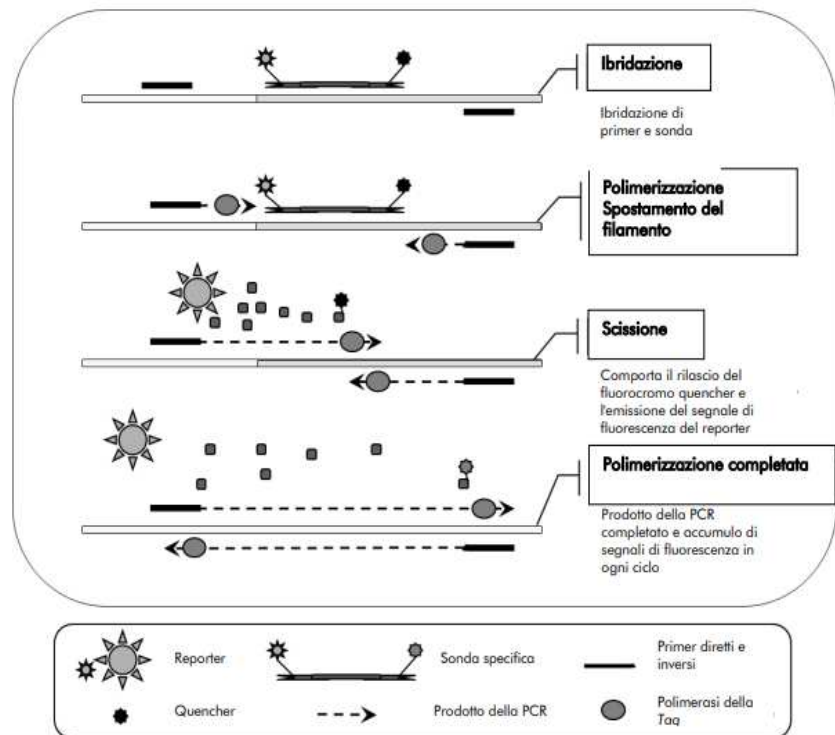
analisi qPCR tramite sonde idrolitiche e analisi qPCR tramite sonde di ibridazione.

Il presente test si basa sul principio dell'idrolisi dell'oligonucleotide a doppio fluorocromo qPCR. Durante la PCR, i primer diretti e inversi ibridizzano secondo una sequenza specifica. La stessa miscela contiene un oligonucleotide a doppio fluorocromo. Questa sonda, costituita da un oligonucleotide le cui estremità sono marcate da due fluorocromi, un reporter all'estremità 5' e un quencher all'estremità 3', ibridizza sulla sequenza bersaglio nel prodotto della PCR.

L'analisi in qPCR con sonde idrolitiche sfrutta l'attività di esonucleasi 5'→3' della DNA polimerasi del batterio *Thermus aquaticus* (Taq). Quando la sonda è intatta, il reporter e il quencher sono posizionati a una distanza tale da permettere al quencher di sopprimere la fluorescenza del reporter, fondamentalmente ad opera di un trasferimento di energia di tipo Förster.

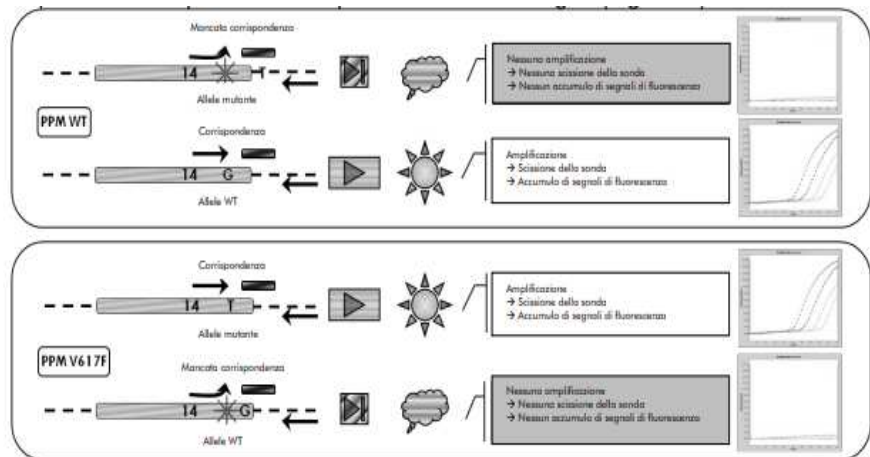
Durante la PCR, se il bersaglio di interesse è presente, la sonda ibridizza specificamente i siti dei primer inversi e diretti. L'attività di esonucleasi 5'→3' della DNA polimerasi scinde la sonda tra il reporter e il quencher solo se la sonda ibridizza sul bersaglio. I frammenti della sonda vengono poi allontanati dal bersaglio, mentre la polimerizzazione del filamento continua. L'estremità 3' della sonda è bloccata al fine di prevenirne l'estensione durante la PCR (Figura 4). Questo processo si verifica a ogni ciclo e non interferisce con l'accumulo esponenziale di prodotto.

Figura 4. Principio di reazione



L'aumento del segnale di fluorescenza è rilevato solo se la sequenza bersaglio è complementare alla sonda e quindi amplificata durante la PCR. A causa di questi requisiti, l'amplificazione aspecifica non è rilevata. Pertanto l'aumento della fluorescenza è direttamente proporzionale all'amplificazione bersaglio durante la PCR. La tecnologia quantitativa PCR allele-specifica utilizzata in questo kit del test consente una rilevazione sensibile ed accurata oltre che un'elevata riproducibilità nell'analisi dei polimorfismi a singolo nucleotide (SNP). Questa tecnica si basa sull'uso di specifici primer diretti, per il wild-type e per l'allele V617F. Nella PCR, l'estensione e l'amplificazione avvengono solo in caso di perfetta corrispondenza tra primer e DNA bersaglio (Figura 5).

Figura 5. PCR allele-specifica. L'utilizzo della miscela di primer wild-type o V617F e sonda consente la rilevazione specifica dell'allele wild-type o mutato in due reazioni separate condotte utilizzando lo stesso campione. I risultati sono espressi come percentuale di copie VF tra tutte le copie JAK2.



La procedura prevede:

- Scongelare tutti i componenti necessari e collocarli su ghiaccio,
- Preparare la seguente miscela qPCR a seconda del numero di campioni da sottoporre a test, seguendo lo schema di pipettatura per raggiungere un volume di reazione finale di 25 μ l (Figura 6).

Figura 6. Preparazione della miscela qPCR

| Componente | 1 reazione (μ l) | Premiscela V617F 30 + 1 reazioni (μ l) | Concentrazione finale |
|---------------------------------------|-----------------------|---|-----------------------|
| TaqMan Universal PCR Master Mix, 2x | 12,5 | 387,5 | 1x |
| Miscela di primer e sonda, PPM-VF 25x | 1,0 | 31 | 1x |
| Acqua per PCR priva di nucleasi | 6,5 | 201,5 | - |
| Campione (da aggiungere alla fase 4) | 5,0 | 5 ognuno | - |
| Volume totale | 25,0 | 25 ognuno | - |

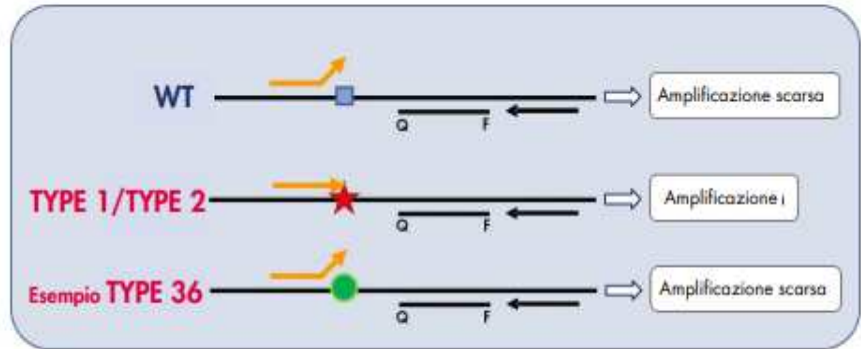
- Dispensare 20 μ l della premiscela qPCR (VF o WT) in ogni provetta;

- Aggiungere 5 µl di materiale da quantificare (25 ng di DNA genomico campione o controllo) nella provetta corrispondente (volume totale 25 µl);
- Miscelare delicatamente aspirando e rilasciando con una pipetta;
- Posizionare le provette nel termociclatore secondo le istruzioni del produttore;
- Programmare lo strumento Rotor-Gene Q con il programma di ciclizzazione termica;
- Eseguire l'analisi su strumento Rotor-Gene Q con correzione dello slope.

2. Mutazioni del gene *CALR*

Per identificare le mutazioni *CALR* di Tipo 1 e di Tipo 2, viene eseguita un'amplificazione allele-specifica con la tecnologia ARMS (Amplification Refractory Mutation System, sistema di mutazioni refrattarie all'amplificazione), che sfrutta l'ibridazione specifica dei primer su una sequenza complementare e la capacità della DNA polimerasi di distinguere tra un appaiamento corretto e un appaiamento errato all'estremità 3' di un primer per PCR. Quando il primer per PCR è perfettamente appaiato, l'amplificazione procede con la massima efficienza. Quando la base all'estremità 3' non è appaiata correttamente, l'amplificazione avverrà soltanto sul fondo e sarà di basso livello (Figura 7).

Figura 7. Identificazione delle mutazioni *CALR* di Tipo 1 e di Tipo 2 mediante PCR basata su ARMS. WT: wild-type; Q — F: sonda a doppio fluorocromo BHQ[®] — FAM[™]; → primer forward (arancione) e primer inverso (nero).

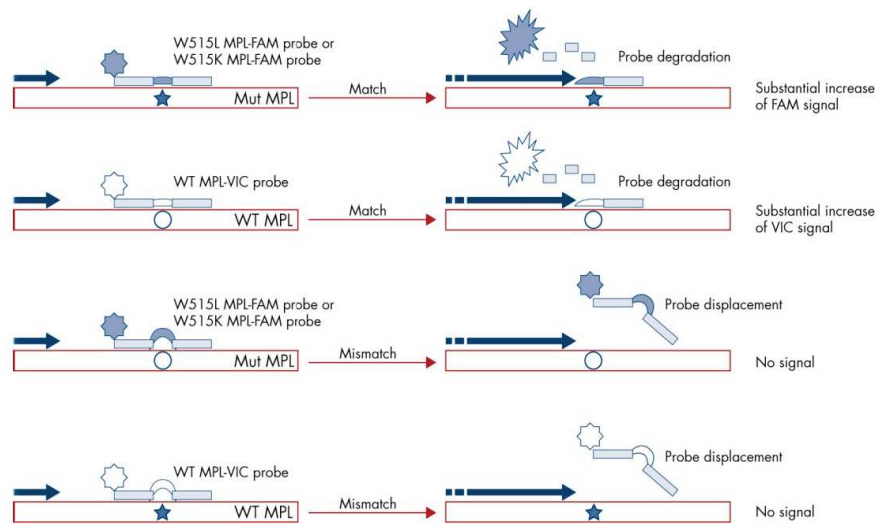


Per ogni campione, il DNA genomico viene estratto dal sangue periferico tramite l'uso di QIAamp DSP Blood Mini Kit e poi amplificato tramite real-time PCR. I risultati vengono formulate automaticamente tramite l'uso del software Rotor Gene AssayManager v2.1 software.

3. Mutazioni del gene *MPL*

Le mutazioni del gene *MPL* sono detectate tramite l'uso del kit ipsogen *MPL* W515L/K Muta screen PCR, che utilizzano due probes (wild-type allele e allele con la mutation). Ogni sonda è distinta tramite l'uso di fluorescenza 5' e un quencher non fluorescente al 3', aumentando il segnale di FAM o di VIC in base alla presenza o no della mutazione. (Figura 8) I risultati vengono formulate automaticamente tramite l'uso del software Rotor Gene AssayManager v2.1 software.

Figura 8. Principi di reazione.



2.3 Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata condotta tramite il programma JMP Pro 13.0 (SAS Institute, Cary, NC), considerando $P < 0.05$ come statisticamente significativo.

Le variabili qualitative sono state descritte mediante frequenze assolute e relative percentuali, mentre le variabili quantitative in termini di mediana e range.

I dati sono stati analizzati tramite statistiche descrittive e comparati usando Chi-square test or Fisher's test per dati categorici e il Student's t-test per dati non categorici.

La sopravvivenza generale (OS) è stata calcolata dalla data della diagnosi alla data di morte o di ultimo follow up. Le curve di sopravvivenza sono state ottenute usando il metodo Kaplan-Meier e le differenze tra gruppi sono state ottenute usando il log-rank test. Le variabili che sono state trovate statisticamente correlate alla sopravvivenza in analisi univariata, sono state conseguentemente testate in analisi multivariata usando il modello Cox.

RISULTATI

3.1 Caratteristiche della popolazione generale

L'intera coorte presa in esame è costituita da 229 pazienti con età mediana alla diagnosi di 63 anni (range, 14-89), e con una lieve prevalenza del sesso femminile (52%).

Tra questi pazienti, 108 (47,2%) sono affetti da trombocitemia essenziale, 60 (26,1%) da mielofibrosi primaria, 54 (23,6%) da policitemia vera, e infine 7 pazienti risultano con diagnosi di Neoplasia Mieloproliferativa inclassificabile.

Clinicamente, al momento della diagnosi 79 pazienti (34,5%) presentano splenomegalia e 42 (18,3%) presentano sintomi costituzionali.

Durante il follow up invece gli eventi trombotici si sono registrati in circa la metà della popolazione in studio, infatti 114 pazienti hanno avuto una trombosi.

Per quanto riguarda il trattamento, scelto dal clinico in base alla diagnosi e adattato al rischio, il farmaco più utilizzato è stata idrossiurea (62%), seguita da ruxolitinib (18,3%), interferone/interferone peghilato (5,7%), anagrelide (2,2%), e a seguire ancora con trapianto allogenico di cellule staminali (1,3%), danazolo (1,3%) e busulfano (0,4%). Inoltre 20 pazienti (8,7%) sono stati solo monitorati nel tempo senza intraprendere terapia citoriduttiva specifica. Tutti i dati sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2. Caratteristiche cliniche dei pazienti della intera coorte dei pazienti alla diagnosi.

| Caratteristiche | N=229 |
|--|--------------|
| Sesso n.% | |
| Maschile | 110 (48,0) |
| Femminile | 119 (52,0) |
| Età mediana alla diagnosi, anni (range) | 63 (14-89) |
| Tipo di MPN n.% | |
| Policitemia Vera | 54 (23,6) |
| Trombocitemia essenziale | 108 (47,2) |
| Mielofibrosi primaria | 60 (26,1) |
| Neoplasia Mieloproliferativa inclassificabile | 7 (3,1) |
| Splenomegalia n.% | 79 (34,5) |
| Sintomi costituzionali n.% | 42 (18,3) |
| Trombosi n.% | 114 (49,8) |
| Terapia n.% | |
| Idrossiurea | 142 (62) |
| Ruxolitinib | 42 (18,3) |
| Interferone/ Interferone peghilato | 13 (5,7) |
| Anagrelide | 5 (2,2) |
| Trapianto allogenico di cellule staminali | 3 (1,3) |
| Danazolo | 3 (1,3) |
| Busulfano | 1 (0,4) |
| Nessuna terapia | 20 (8,7) |

Dal punto di vista molecolare, la maggior parte dei pazienti presenta come driver mutation la mutazione V617F del gene *JAK2* (n= 147 pari al 64,2%). Le altre mutazioni considerate driver per le MPN, *CALR* e *MPL*, si presentano rispettivamente nel 10,0% e nel 0,8% del totale dei pazienti presi in esame. Da sottolineare come in 49 pazienti *JAK2* wild-type non è disponibile lo stato mutazionale delle altre driver mutations, mentre il 3,9% dei pazienti è risultato triplo-negativo (TN), come si vede nella Tabella 3. I valori mediani dei parametri dell'esame emocromocitometrico alla diagnosi e i derivanti markers infiammatori sono riportati in Tabella 3.

Tabella 3. Caratteristiche laboratoristiche e molecolari alla diagnosi della intera coorte dei pazienti.

| Caratteristiche | N totale=229 |
|---|---------------------|
| Stato di mutazione di JAK2 V617F n. % | |
| Mutato | 147 (64,2) |
| Wild-type | 82 (35,8) |
| Allelic burden mediano della mutazione V617F di JAK2 (range) | 16,3 (0,4-88,8) |
| Driver mutation n. % | |
| JAK2 V617F | 147 (64,2%) |
| CALR tipo 1 e tipo 2 | 23 (10,0%) |
| MPL | 1 (0,8%) |
| TN | 9 (3,9%) |
| Non valutabile | 49 (21,4%) |
| Cariotipo anomalo n.% (n=142) | 13 (9,2%) |
| Esame emocromocitometrico alla diagnosi mediana, range | |
| Emoglobina g/dl | 13,9 (6,8-21,2%) |
| Ematocrito % | 42,8 (12,1-62,2%) |
| Globuli bianchi totali x 10 ³ /mmc | 8230 (1600- |
| Polimorfonucleati x 10 ³ /mmc | 123000) |
| Linfociti x 10 ³ /mmc | 5450 (460- 97030) |
| Monociti x 10 ³ /mmc | 1650 (100-14630) |
| Piastrine x 10 ⁶ /mmc | 530 (70-20880) |
| | 478 (21-2877) |
| Markers infiammatori derivanti dall'emocromo mediana, range | |
| NLR | 3,32 (0,51-118,40) |
| PLR | 0,28 (0,02-3,18) |

In un follow-up mediano di 118,4 mesi (range, 69,8-416,3) 43 pazienti sono evoluti in senso fibrotico (15,7%) e leucemico (3,1%). La sopravvivenza mediana della popolazione è di 213,8 mesi con il 74,7% vivi all'ultimo follow-up. I dati di sopravvivenza sono riportati in Tabella 4.

Tabella 4. Dati di sopravvivenza della intera coorte dei pazienti

| Caratteristiche | N totale=229 |
|---|---------------------|
| Follow up mediano mesi (range) | 118,4 (69,8-416,3) |
| Evoluzione n.% | |
| Mielofibrosi post Policitemia Vera/ Trombocitemia Essenziale | 36 (15,7) |
| Leucemia acuta mieloide | 7 (3,1) |
| Tempo mediano dalla diagnosi alla evoluzione, mesi (range) | 84,0 (7,7-321,5) |
| Recidiva di trombosi n.% (n tot=114) | 24 (21,1) |
| Vivi all'ultimo f.u. n.% | 171 (74,7) |
| Overall survival mediana mesi (C.I. 95%) | 213,8 (119,9-300,8) |

Eseguendo una sub-analisi dei dati in base alla diagnosi istologica, le caratteristiche dei pazienti affetti da trombocitemia essenziale sono riportati in Tabella 5.

La maggior parte dei pazienti con TE sono di sesso femminile (62,1%), con una età mediana di 61 anni (17-89). Nei pazienti affetti da questa patologia 58 (53,7%) presentano la mutazione *JAK2 V617F*, 17(15,7%) presentano la mutazione *CARL* di tipo 1 e 2, nessuno di questi presenta la mutazione *MPL*, 4 (3,7%) presentano la mutazione *TN*, e infine 29 (26,8%) sono stati classificati come non valutabili. Nel follow-up il 50% dei pazienti ha presentato un evento trombotico.

Tabella 5. Caratteristiche dei pazienti affetti da Trombocitemia Essenziale

| Caratteristiche | N totale=108 |
|---|---------------------|
| Sesso n, % | |
| Maschile | 41 (37,9%) |
| Femminile | 67 (62,1%) |
| Età mediana alla diagnosi, anni (range) | 61 (17-89) |
| Driver mutation n. % | |
| JAK2 V617F | 58 (53,7%) |
| CALR di tipo 1 e tipo 2 | 17 (15,7%) |
| MPL | 0 |
| TN | 4 (3,7%) |
| Non valutabile | 29 (26,8%) |
| Allelic burden mediano della mutazione V617F di JAK2 (range) | 11,6 (0,4-54,9%) |
| Esame emocromocitometrico alla diagnosi mediana,range | |
| Emoglobina g/dl | 13,7 (8,7-17,8%) |
| Ematocrito% | 42,1 (21,0-51,0) |
| Globuli bianchi totali x 10 ³ /mmc | 7840 (3900-20070) |
| Piastrine x 10 ⁶ /mmc | 576(113-2877) |
| Trombosi n. % | 54 (50,0) |
| Evoluzione n. % | |
| Mielofibrosi post Trombocitemia Essenziale | 23 (21,3%) |
| Leucemia acuta mieloide | 4 (3,7 %) |

I pazienti affetti da mielofibrosi primaria sono 60 pazienti, di questi 35 sono maschi (58,3%). L'età mediana dei pazienti è di 66,5 anni e tra questi 34 (56,7%) presentano la mutazione *JAK2* V617F, 6 (10%) presentano la mutazione *CALR* di tipo 1 e 2, 1 (1,7%) presenta la mutazione *MPL*, 5 (8,3%) presentano la mutazione *TN*. Di questi 60 pazienti, 3 pazienti hanno avuto evoluzione della malattia in leucemia acuta mieloide. Tutti i dati sono riportati nella Tabella 6.

Tabella 6. Caratteristiche dei pazienti affetti da Mielofibrosi Primaria.

| Caratteristiche | N totale=60 |
|---|---------------------|
| Sesso n, % | |
| Maschile | 35 (58,3%) |
| Femminile | 25 (41,7%) |
| Età mediana alla diagnosi, anni (range) | 66,5 (28-89) |
| Driver mutation n. % | |
| JAK2 V617F | 34 (56,7%) |
| CALR di tipo 1 e tipo 2 | 6 (10%) |
| MPL | 1 (1,7%) |
| TN | 5 (8,3%) |
| Non valutabile | 14 (23,3%) |
| Allelic burden mediano della mutazione V617F di JAK2 (range) | 24,6 (6,2- 75,6) |
| Esame emocromocitometrico alla diagnosi mediana,range | |
| Emoglobina g/dl | 11,1 (6,8- 18,6) |
| Ematocrito% | 35,3 (22,9- 65,7) |
| Globuli bianchi totali x 10 ³ /mmc | 8075 (1600- 123000) |
| Piastrine x 10 ⁶ /mmc | 349 (28-913) |
| Trombosi n. % | 28 (46,7) |
| Evoluzione n. % | |
| Leucemia acuta mieloide | 3 (5) |

Infine i pazienti con Policitemia Vera, che per definizione presentano come unica mutazione driver la mutazione del gene *JAK2*, sono 54, e di la maggior parte sono di sesso maschile (53,7%) e con una età mediana alla diagnosi di 64 anni. I dati clinici e di outcome sono riportato in Tabella 7.

Tabella 7. Caratteristiche dei pazienti affetti da Policitemia Vera

| Caratteristiche | N=54 |
|---|--------------------|
| Sesso n. % | |
| Maschile | 29 (53,7) |
| Femminile | 25 (46,3) |
| Età mediana alla diagnosi, anni (range) | 64 (14-87) |
| Allelic burden mediano della mutazione V617F di JAK2 (range) | 23,0 (2,4-88,9) |
| Esame emocromocitometrico alla diagnosi mediana, range | |
| Emoglobina g/dl | 16,4 (12,9-21,2) |
| Ematocrito % | 50,9 (45.0-64.0) |
| Globuli bianchi totali x 10 ³ /mmc | 9715 (3000- 35760) |
| Piastrine x 10 ⁶ /mmc | 432 (210-957) |
| Trombosi n. % | 27 (50) |
| Evoluzione n. % | |
| Mielofibrosi post Policitemia Vera | 13 (24,1) |

3.2 Caratteristiche dei pazienti con la mutazione V617F del gene JAK2.

I pazienti che presentano la mutazione V617F del gene *JAK2* sono 147, di cui 73 maschi e 74 femmine, con una età mediana di 63 anni (range, 14-89).

Dal punto di vista istopatologico e clinico la diagnosi di MPN di questi pazienti è stata di:

- Policitemia Vera nel 32,7% dei casi;
- Trombocitemia Essenziale nel 39,4% dei casi;
- Mielofibrosi Primaria nel 23,8% dei casi
- Neoplasia Mieloproliferativa Inclassificabile nel 4,1% dei casi.

Dal punto di vista clinico, all'esordio alcuni pazienti aventi la mutazione V617F di *JAK2* hanno presentato:

- Splenomegalia, in 55 casi (37,4%)
- Sintomi costituzionali, in 30 casi (17,2%)

Inoltre durante il follow up più della metà di questi pazienti (n= 77 pari a 52,4%) hanno presentato un evento vascolare, come riportato in Tabella 8.

Tabella 8. Caratteristiche cliniche dei pazienti con la mutazione V617F del gene *JAK2*.

| Caratteristiche | N totale=147 |
|--|---------------------|
| Sesso n.% | |
| Maschile | 73 (49.6) |
| Femminile | 74 (50.4) |
| Età mediana alla diagnosi, anni (range) | 63 (14-89) |
| Tipo di MPN n.% | |
| Policitemia Vera | 48 (32,7%) |
| Trombocitemia Essenziale | 58 (39,4%) |
| Mielofibrosi Primaria | 35 (23,8%) |
| Neoplasia Mieloproliferativa inclassificabile | 6 (4,1%) |
| Splenomegalia n. % | 55 (37,4) |
| Sintomi costituzionali n. % | 30 (17,2%) |
| Trombosi n. % | 77 (52,4%) |

Dal punto di vista laboratoristico, il burden allelico mediano della mutazione è di 16.3% (range, 0.4-88.8) e una quota di popolazione pari al 8,2% presentano anomalie citogenetiche definite ad alto rischio. Le restanti caratteristiche di laboratorio sono riportate in Tabella 9.

Tabella 9. Caratteristiche laboratoristiche e molecolari alla diagnosi dei pazienti con la mutazione V617F del gene *JAK2*.

| Caratteristiche | N totale= 147 |
|---|----------------------|
| Allelic burden mediano della mutazione V617F di JAK2 (range) | 16.3 (0.4-88.8) |
| Cariotipo anomalo n. % (n=85) | 7 (8,2%) |
| Esame emocromocitometrico alla diagnosi mediana, range | 14,4 (7,5-21,2) |
| Emoglobina g/dl | 45,1 (23-65,7) |
| Ematocrito % | 8450 (1600- 63890) |
| Globuli bianchi totali x 10 ⁶ /mmc | 5715 (1580- 46320) |
| Polimorfonucleati x 10 ³ /mmc | 1650 (100-9080) |
| Linfociti x 10 ³ /mmc | 550 (70-5110) |
| Monociti x 10 ³ /mmc | 456 (21-957) |
| Piastrine x 10 ⁶ /mmc | |
| Markers infiammatori derivanti dall'emocromo mediana, range | |
| NLR | 3,91 (0,52- 118,40) |
| PLR | 0,28 (0,02- 3,18) |

I pazienti che presentano la mutazione V617F del gene *JAK2* hanno un tasso di evoluzione fibrotica del 15,6% e leucemica del 3,4%, con un tempo mediano di evoluzione dalla diagnosi di 90,5 mesi. Inoltre il tasso di recidiva di trombosi è del 26.3%. I dati di outcome sono riportati in Tabella 10.

Tabella 10. Dati di sopravvivenza con la mutazione V617F del gene *JAK2*.

| Caratteristiche | N totale= 147 |
|---|----------------------|
| Evoluzione n. % | |
| Mielofibrosi post Policitemia Vera/ Trombocitemia Essenziale | 23 (15,6) |
| Leucemia acuta mieloide | 5 (3,4) |
| Tempo mediano dalla diagnosi alla evoluzione, mesi (range) | 90,5 (7,7- 213,5) |
| Recidiva di trombosi n. % (n tot=76) | 20 (26,3) |
| Vivi all'ultimo f.u. n. % | 114 (77,5) |
| Overall survival mediana mesi (C.I. 95%) | 208,6 (170,0-336,3) |

3.3 Confronto tra le caratteristiche cliniche all'esordio dei pazienti *JAK2* V617 mutati e wild-type

Dopo aver analizzato le caratteristiche cliniche, laboratoristiche, molecolari e di outcome dei pazienti con MPN in generale e stratificati per diagnosi, abbiamo confrontato le suddette caratteristiche in base alla espressione della mutazione del gene *JAK2*: positiva per presenza di V617F vs wild-type. I dati statisticamente rilevanti sono riportati in Tabella 11.

Tabella 11. Differenze statisticamente significative tra pazienti con Neoplasia Mieloproliferativa V617F *JAK2* mutata e wild-type.

| Caratteristiche | <i>JAK2</i> mutato | <i>JAK2</i> wild type | <i>p</i>Value |
|---|---------------------------|------------------------------|----------------------|
| Livello di Hb mediano alla diagnosi, range | 14,4 (7,5-21,2) | 12,8 (6,8-20,3) | 0,0041 |
| Livello di Hct mediano alla diagnosi, range | 45,1 (23-65,7) | 38,8 (21,1-60,8) | 0,0028 |
| Rapporto NLR mediano alla diagnosi, range | 3,9 (0,5-118) | 2,6 (0,5-33,6) | 0,0121 |
| Livello di PLT mediano alla diagnosi, range | 456 (21-957) | 553 (28-2877) | < 0,0001 |
| Ricorrenza di trombosi, % | 20 (13,6) | 4 (4,9) | 0,0479 |

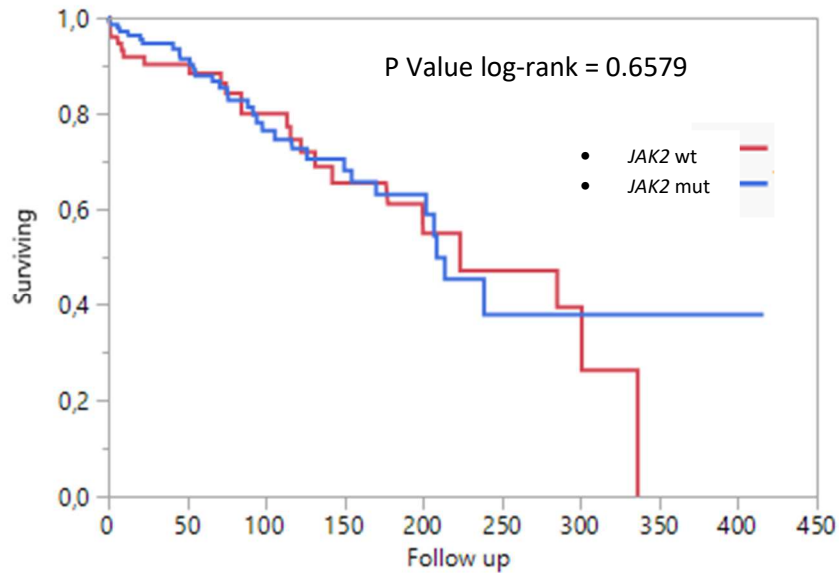
I pazienti con la mutazione V617F del gene *JAK2* affetti da MPN presentano un livello più alto di Hb e di Hct e un livello più basso di PLT, rispetto ai pazienti senza la mutazione *JAK2*, come aspettato data la penetranza diversa delle mutazioni nei vari sottotipi di MPN.

Molto interessante risulta la tendenza dei pazienti con mutazione V617F del gene *JAK2* e con un precedente evento trombotico, ad avere un tasso di recidiva di trombosi più elevato rispetto ai pazienti V617F *JAK2* wild-type.

Questo si associa anche alla presenza nei pazienti con mutazione *JAK2* di un livello all'esordio più alto di NLR, un marker di infiammazione.

Dal punto di vista di outcome, i pazienti con la mutazione V617F del gene *JAK2* confrontati con i wild-type non hanno differenze statisticamente significative per quanto riguarda la sopravvivenza mediana, come mostrato in Figura 9.

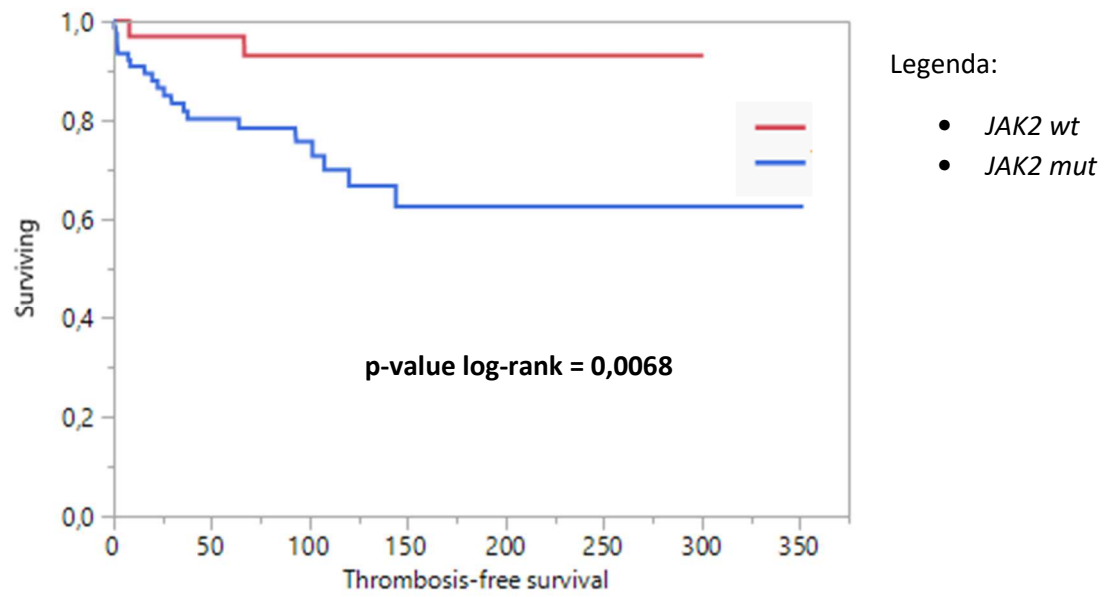
Figura 9. Sopravvivenza dei pazienti stratificati per presenza o no della mutazione V617F del gene *JAK2*



| | JAK2 mutati | JAK2 wild-type | P-value |
|---|------------------|----------------------|---------|
| Overall survival mediana, mesi (95% I.C.) | 208,6 (170,1-NR) | 223,54 (142,4-336,4) | 0,6579 |

Benchè i tassi di trombosi siano sovrapponibili tra i pazienti V617F del gene *JAK2* mutati e wild-type (52,4% vs 45,1%, rispettivamente), ciò che alla analisi statistica compare come significativamente differente è la tendenza alla recidiva di trombosi (13,6% vs 4,9%, p Value= 0,0479) e la sopravvivenza libera da recidiva di trombosi, come si vede in Figura 10.

Figura 10. Recurrent thrombosis-free survival nella intera coorte dei pazienti stratificati per mutazione V617F del gene *JAK2* (Kaplan-Meier)



Andando poi ad analizzare tra le caratteristiche all'esordio e durante il follow-up nei pazienti con mutazione V617F del gene *JAK2* vs mutazioni del gene *CALR*, i risultati statisticamente significativi sono riportati in Tabella 12.

Tabella 12. Differenze statisticamente significative tra pazienti con MPN V617F *JAK2* mutata e *CALR* mutata.

| Caratteristiche | <i>JAK2</i> mutato | <i>CALR</i> mutato | pValue |
|------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------|
| Trombofilia , % | 35 (23.8) | 4 (17.3) | 0.0209 |
| Trombosi, % | 78 (53.1) | 7 (30.4) | 0.0403 |

I pazienti con la mutazione del gene *JAK2* in confronto a quelli con le mutazioni del gene *CALR*, spesso hanno più frequentemente associata una positività allo screening trombofilico (inteso come dosaggio della antitrombina III, proteina S, proteina C, mutazione fattore II e V della coagulazione, aumento della omocisteina sierica, presenza di lupus anticoagulant, anticorpi anti-cardiolipina e anticorpi anti-beta2glicoproteina) e a un evento trombotico (53,1% vs 36,4%, pV=0.0403).

3.4 Dati di outcome sulla intera popolazione

In un follow-up mediano di 118,4 mesi (range, 69,8-416,3) la sopravvivenza globale mediana (OS) è risultata essere di 213,8 mesi (119,9-300,8) con un 74,7% di pazienti vivi all'ultimo follow-up.

Andando ad analizzare i fattori di rischio prognostico che impattano quindi sulla sopravvivenza dei 229 pazienti con

diagnosi di MPN presi in esame abbiamo trovato i dati riportati in Tabella 13.

Tabella 13. Fattori di rischio che impattano statisticamente sulla sopravvivenza della intera coorte dei pazienti.

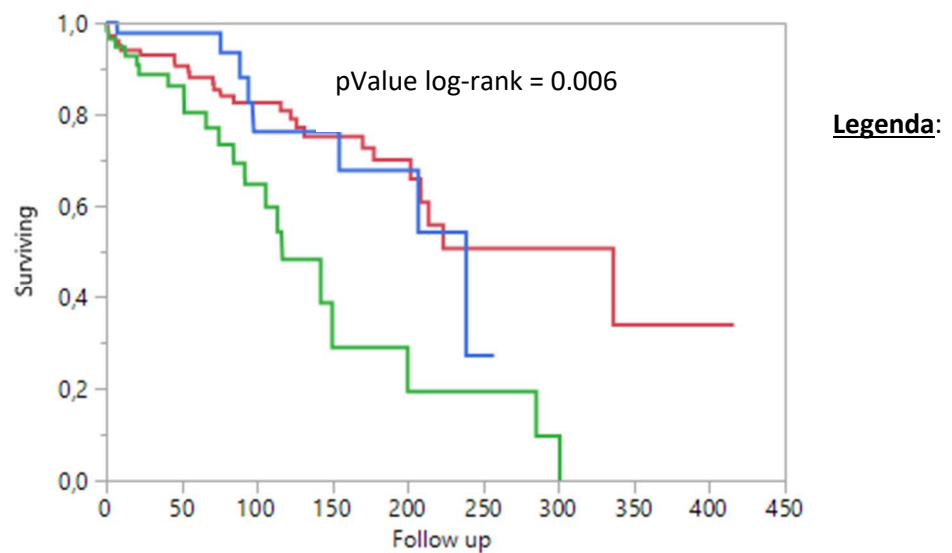
| Caratteristica | Univariata | | Multivariata |
|-------------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| | pValue | HR (95%C.I.) | pValue |
| Età alla diagnosi | < 0,0001 | | < 0,0001 |
| Tipo di MPN | 0,0031 | | |
| Sintomi costituzionali | 0,0445 | 1,9 (1,3-3,5) | |
| Comorbilità | 0,0175 | 2,0 (1,3-3,4) | |
| Hb alla diagnosi | 0,0008 | | |
| Hct alla diagnosi | 0,0012 | | |
| GB alla diagnosi | 0,0202 | | |
| Mon alla diagnosi | 0,0096 | | |

In analisi multivariata, oltre alla età del paziente, confermato come fattore di rischio prognostico anche in analisi multivariata, sono stati individuati come fattori di rischio impattanti sulla sopravvivenza della intera coorte il tipo di MPN (pValue = 0.0031), la presenza di sintomi costituzionali alla diagnosi (pValue=0.0445), la presenza di comorbilità alla

diagnosi (pValue=0.0175), e i livelli all'esame emocromocitometrico dell'esordio di Hb (pV=0.0008), Hct (pV=0.0012), GB (pValue=0.0202) e monociti (pV=0.0096).

In figura 11 è rappresentata la OS differenziata per diagnosi di MPN, mostrando una ridotta sopravvivenza nei pazienti affetti da Mielofibrosi Primaria rispetto a Trombocitemia Essenziale (HR=2,9) e Policitemia Vera (HR=2,8).

Figura 11. Sopravvivenza dei pazienti stratificati per diagnosi.



| Caratteristiche | MF | ET | PV | pValue |
|------------------------------------|----------------------|------------------|------------------|---------------|
| Overall survival, median (95%C.I.) | 116,9 (91,99-199,95) | 336,4 (208,7-NR) | 238,7 (154,5-NR) | 0,006 |

| Caratteristiche | HR | 95% C.I. |
|------------------------|-----------|-----------------|
| MF vs ET | 2,9 | 1,6-5,3 |
| MF vs PV | 2,8 | 1,3-6,8 |

La presenza di sintomi costituzionali e la presenza di comorbidità (ipertensione arteriosa, dislipidemia, BPCO e fumo, diabete) impattano sulla sopravvivenza (HR= 1,9 e HR=2, rispettivamente) come si può vedere nella Figura 12.

Figura 12 a. Sopravvivenza dei pazienti con e senza sintomi sistemici

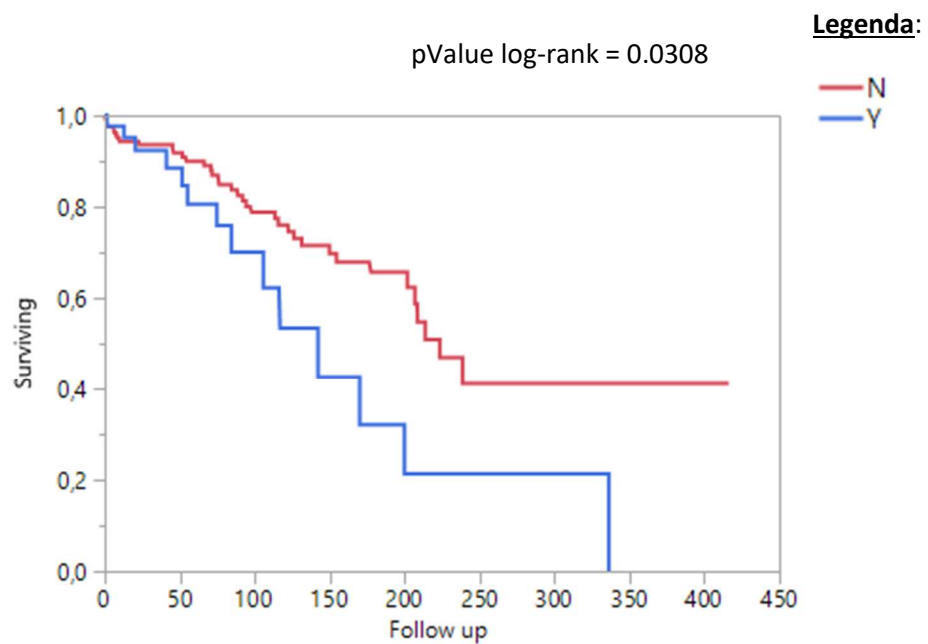
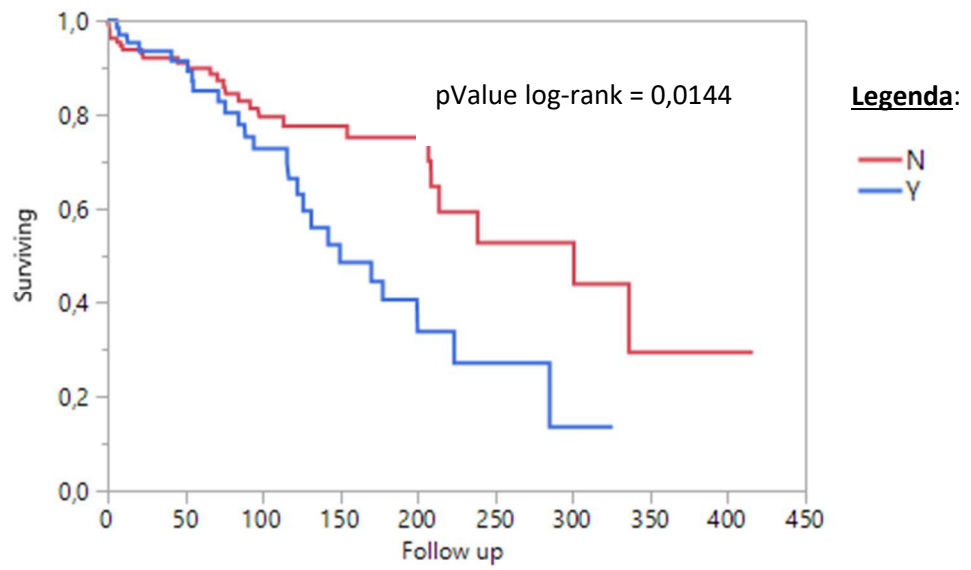


Figura 12 b. Sopravvivenza dei pazienti con e senza comorbidità



| <i>Caratteristiche</i> | <i>Comorbidità</i> | <i>No comorbidità</i> | <i>pValue</i> |
|------------------------------------|---------------------------|------------------------------|----------------------|
| Overall survival, median (95%C.I.) | 149,9 (116,9-223,5) | 300,8 (208,7-NR) | 0,0144 |

| <i>Caratteristiche</i> | <i>Sintomi sistemici</i> | <i>No sintomi sistemici</i> | <i>pValue</i> |
|------------------------------------|---------------------------------|------------------------------------|----------------------|
| Overall survival, median (95%C.I.) | 142,4 (84,5-199,9) | 223,5 (201,9- NR) | 0,0308 |

DISCUSSIONE

Negli ultimi 20 anni per quanto riguarda la ricerca nel campo delle MPN, è stato di cruciale importanza l'individuazione di markers molecolari patognomonic della malattia, come già accaduto nella LMC. Le tre mutazioni che sono state individuate essere driver founding mutations in queste patologie sono le seguenti: la mutazione V617F del gene *JAK2* (e in rari casi mutazioni dell'esone 12 del gene *JAK2*), mutazioni dei geni *MPL* e *CALR*.

Tra queste tre, sicuramente nella pratica clinica la principale rilevanza è data dalla mutazione V617F del gene *JAK2* che ha l'incidenza maggiore nelle Neoplasie Mieloproliferative, andandosi a presentare in più del 95% dei pazienti con PV e nel 50-60% dei pazienti affetti da TE e PMF. Nella nostra casistica, la mutazione V617F del gene *JAK2* si presenta nel 64% della popolazione totale di MPN e in particolare nel 92% delle PV, nel 54% delle TE e nel 42% delle PMF, confermando i dati di letteratura riportati.

Dal punto di vista biologico, la mutazione puntiforme determina una sostituzione G>T al nucleotide 1894 dell'esone 14, con una sostituzione aminoacidica che rende inefficace il meccanismo inibitorio intra-molecolare rendendo costitutivamente attivo l'enzima *JAK2*.³⁴ Dal punto di vista clinico, la mutazione V617F del gene *JAK2* è considerata il marcatore molecolare e soprattutto un bersaglio terapeutico per trattamenti mirati, anche se il suo ruolo come unico evento patogenetico è dibattuto e attualmente oggetto di studio.

La sua centralità sul piano clinico è però chiara. Spesso infatti la ricerca della mutazione V617F del gene *JAK2* ha un ruolo di

“screening” quando si ha il sospetto di MPN. Questo ruolo si è affermato non solo per la già discussa alta incidenza ma anche per la metodica molecolare di individuazione, che è relativamente semplice e capillarmente diffusa.

Di solito la richiesta al laboratorio di questo test è per alterazioni all’esame emocromocitometrico (emoglobina, ematocrito, globuli rossi, piastrine, globuli bianchi), ritrovate il più delle volte durante gli esami di routine. Infatti spesso queste persone sono asintomatiche o con lievi sintomi che possono già essere presenti da anni come splenomegalia, epatomegalia, storia clinica di eventi trombotici o emorragici, cefalea, vertigini, alterazioni visive, intorpidimento estremità degli arti, prurito, astenia, perdita di peso senza causa apparente e febbricola.

La presenza di una positività al test agli esami da sangue periferico giustifica l’esecuzione di esami di approfondimento di II livello con esami midollari per una corretta definizione diagnostica. D’altra parte, in caso in cui il test per la ricerca della mutazione V617F del gene *JAK2* fornisca un risultato negativo, ma il sospetto clinico rimanga, può essere richiesta la ricerca delle altre driver founding mutations delle MPN.

Il suo utilizzo come esame di “screening” è avvalorato dal fatto che si esegua spesso su campioni di sangue periferico in EDTA, con un utilizzo di una metodica diffusa come la real time PCR e con tempi medi di risposta intorno ai 10-15 giorni.

La mutazione *JAK2* non ha solo una centralità diagnostica nei pazienti con MPN, ma nell’ambito delle TE e delle PMF ha dimostrato avere anche un ruolo clinico e un ruolo prognostico.

A esempio, dal punto di vista di presentazione clinica è molto interessante introdurre il concetto della TE *JAK2* mutata come

patologia a più alto rischio trombotico rispetto alla TE *CALR* mutata, associata spesso ad un ematocrito più elevato e a quadri clinici di overlapp con la PV, che chiedono anche un management differente (come l'utilizzo della ASA in profilassi primaria).³⁵

Nella casistica oggetto di questa tesi, su un totale di pazienti presi in esame di 229 casi, 147 pazienti pari a 64,2% presentano la mutazione del gene *JAK2*. Dopo aver analizzato le caratteristiche cliniche, laboratoristiche, molecolari e di outcome dei pazienti con MPN in generale e stratificati per diagnosi, abbiamo confrontato le suddette caratteristiche in base alla espressione della mutazione del gene *JAK2*: positiva per presenza di V617F vs wild-type.

Ciò che è risultato significativamente differente confrontando le caratteristiche dell'emocromo alla diagnosi delle due popolazioni è che la popolazione mutata presenta un livello mediano di Hb più elevato (14,4 g/dl vs 12,8 d/dl) associato ad un livello mediano di Hct più elevato (45.1 % vs 38.8 %) e a un livello mediano di PLT più basso (456000/mmc vs 553/mmc).

Questi dati si possono giustificare grazie alla diversa prevalenza delle mutazioni nelle varie MPN. Infatti come prima riportato i pazienti *JAK2* mutati contengono la maggior parte dei pazienti con diagnosi di PV (che presentano la mutazione V617F del gene *JAK2* nel 92% nella nostra casistica). Seguendo i criteri diagnostici di PV, risulta chiaro come l'emoglobina elevata e l'ematocrito elevato siano i criteri clinici di diagnosi di PV e per cui i loro valori mediani risultino più alti nella nostra sottopopolazione di MPN con la mutazione V617F del gene *JAK2*.

Per quanto riguarda il dato della presenza di un più elevato livello di PLT nei pazienti *JAK2* wild-type, questo rispecchia le caratteristiche cliniche già descritte in letteratura nelle TE e PMF *CALR* mutate.

Infatti, la mutazione type 1-like risulta maggiormente rappresentata nella PMF rispetto che nella TE (75% vs 48%) ed è associata ad un rischio significativamente più elevato di trasformazione in Mielofibrosi nei casi che esordiscono come TE. La mutazione type 2-like, invece, risulta associata preferenzialmente a forme di TE a decorso clinico indolente e a basso rischio trombotico, nonostante la spiccata piastrinosi.³⁶

Un altro dato da discutere è come attualmente la mutazione V617F del gene *JAK2* venga in letteratura indicato come un marcatore fondamentale di trombosi nelle MPN. Il ruolo di tale mutazione nella patogenesi della trombosi, sia di vasi venosi che di vasi arteriosi, sembra essere determinato dalla capacità della mutazione V617F del gene *JAK2* di indurre un fenotipo protrombotico nelle cellule. In particolare l'effetto procoagulante sembra sia dovuto all'attivazione del sistema emostatico sia cellulare (piastrine, leucociti e cellule endoteliali) che plasmatico. Recenti studi mostrano che nei casi MPN *JAK2* mutate le piastrine presentino un fenotipo attivato (dovuto anche a una maggiore generazione di trombina) ed iperesprimano proteine di membrana come la P-selectina e il TF (Tissue Factor). Sono state dimostrate anche una maggiore aggregazione in vitro e una riduzione di tempo di sanguinamento in vivo su topi *JAK2* V617F knock-in, a dimostrazione di una maggiore capacità migratoria e di formazione di piastrine da parte dei megacariociti *JAK2* V617F mutati. Per quanto riguarda i leucociti si è dimostrata nei pazienti *JAK2* V617 mutati una alterazione dei marcatori di

attivazione neutrofila (Fosfatasi alcalina leucocitaria, espressione di CD11b di superficie). A livello plasmatico si evince uno stato di ipercoagulabilità dettato da un aumento dei livelli di trombomodulina e di P-selectina solubile, estremamente elevati nei pazienti *JAK2* V617F mutati rispetto a quelli non mutati, e una condizione di acquisita di resistenza alla proteina C attivata.³⁷ Si stanno accumulando evidenze del ruolo della mutazione V617F del gene *JAK2* come nuovo fattore di rischio per trombosi, ma ancora non sono disponibili studi di validazione prospettica.

Nella nostra casistica non abbiamo riportato una maggiore incidenza di eventi trombotici, considerando sia eventi arteriosi che venosi, tra pazienti con MPN *JAK2* mutata vs *JAK2* wild-type, ma abbiamo dimostrato che ci siano differenze in termini di valore mediano di NLR e rate di ricorrenza di trombosi.

L’NLR (rapporto neutrofili-linfociti) è considerato un nuovo marker di infiammazione che ha un valore prognostico sulla sopravvivenza nei pazienti affetti da patologie cardiovascolari e da alcuni tumori solidi. Nelle MPN il suo ruolo è stato indagato recentemente nella popolazione dello studio ECLAP, dimostrandosi come un fattore predittivo indipendente di trombosi venose nei pazienti con PV.

Nella nostra popolazione *JAK2* V617F mutata il livello mediano alla diagnosi di NLR era statisticamente più elevato rispetto alla popolazione senza la suddetta mutazione (3,9 vs 2,6), sottolineando come il livello di infiammazione nei pazienti con *JAK2* sia più elevato rispetto a quelli con MPN e una differente mutazione driver. In aggiunta a ciò, sempre confrontando le sottopopolazioni in base alla espressione della mutazione *JAK2*, è risultato che circa il 13,6% dei pazienti sperimenta una recidiva di trombosi, mentre solo il 4,9% della popolazione *JAK2*

negativa presenta una seconda trombosi. Alla luce di questi due dati, la suggestione che ci ha scaturito è che i pazienti MPN con la mutazione V617F del gene *JAK2* presentino un livello di infiammazione differente, con verosimile attivazione del complesso dell'"inflammosoma" e che clinicamente si manifesti come una tendenza ad avere un maggior numero di ricorrenze di eventi trombotici.³⁸

Dal punto di vista della sopravvivenza, non abbiamo trovato nella nostra casistica una differenza statisticamente significativa tra le popolazioni se stratificate in base alla presenza o alla assenza della mutazione. Infatti la sopravvivenza mediana globale è risultata essere di 208,6 mesi e 223,5 mesi, rispettivamente nei pazienti con e senza mutazione *JAK2* ($pV=0,66$).

Come ci si poteva attendere, i fattori prognostici per la sopravvivenza sono risultati essere: età diagnosi, tipo di MPN alla diagnosi, la presenza di sintomi costituzionali e di comorbilità ed alcuni valori dell'esame emocromocitometrico alla diagnosi includendo livello di Hb, livello di Hct, livello di globuli bianchi e di monociti.

L'età risulta essere il fattore prognostico principale, in linea con i dati della letteratura, in quanto parametro incluso in tutte le classificazioni di rischio per ogni tipo di MPN. Legato a questo dato è anche quello della presenza di comorbilità, che possono andare ad aggravare le condizioni di salute soprattutto del paziente anziano.

Per quanto riguarda il tipo di MPN, nel nostro follow up, la sopravvivenza globale mediana è risultata essere per i pazienti con TE di 336,4 mesi, per quelli affetti da PV di 238,7 mesi, mentre molto più ridotta per i pazienti con diagnosi di PMF,

pari a 116,9 mesi (pV=0,006, Hazard Ratio di 2,9 se confrontato con ET e di 2,8 se confrontato con PV).

I sintomi costituzionali e i diversi livelli di Hb, Hct e globuli bianchi alla diagnosi, non sono che la rappresentazione clinica e laboratoristica di diagnosi di diverso tipo di MPN e quindi collegati ai dati di sopravvivenza sopra riportati.

Interessante rimane il valore dei monociti alla diagnosi, che anche se non incluso nei modelli prognostici utilizzati per calcolare il rischio nelle MPN, è noto essere se aumentato un valore associato a una peggiore prognosi nei pazienti con PV e PMF.³⁹

Per concludere, l'analisi dei pazienti affetti da MPN e studiati presso il nostro laboratorio di biologia molecolare ha dimostrato quanto sia centrale il ruolo dello "screening" con la ricerca della mutazione V617F del gene *JAK2*, che rimane a 17 anni dalla sua scoperta ancora la pietra miliare delle basi molecolari delle MPN.

Lo studio della mutazione e la eventuale ricerca delle altre mutazioni driver *MPL* e *CALR* non devono prescindere dagli esami di laboratorio di secondo livello, includenti la valutazione midollare per un corretto inquadramento diagnostico. La diagnosi di tipo di MPN (ET, PV o PMF) è fondamentale per due sostanziali motivi: per una differente sopravvivenza tra le varie malattie, riportata in letteratura e dimostrata anche nella nostra casistica, e un management terapeutico diverso.

Inoltre abbiamo dimostrato che la popolazione con MPN *JAK2* mutata e che ha avuto un evento trombotico dopo la diagnosi ha un rischio rilevantemente maggiore di una recidiva di trombosi (13,6% vs 4,9%). Considerando che le trombosi sono

la principale causa di mortalità e morbidità nei pazienti con MPN, questo dato è estremamente importante e può richiedere un diverso approccio nella terapia antitrombotica, non che un più stringente di follow-up di questi pazienti.

Bibliografia:

1. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-951. doi:10.1182/blood-2009-03-209262
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127(20):2391-2405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544
3. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, et al. Special Report International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. 2022;140(11):1200-1228.
4. Berti E, Busque L, Chan JKC, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic / Dendritic Neoplasms. 2022;(June). doi:10.1038/s41375-022-01613-1
5. Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances. *Am J Hematol*. 2016;91(1):50-58. doi:10.1002/ajh.24221
6. Nangalia J, Green TR. The evolving genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2014;2014(1):287-296. doi:10.1182/asheducation-2014.1.287
7. Vannucchi AM, Barbui T, Cervantes F, et al. Philadelphia

chromosome-negative chronic myeloproliferative neoplasms: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol.* 2015;26 Suppl 5:v85-99. doi:10.1093/annonc/mdv203

8. Barosi G. Essential thrombocythemia vs. early/prefibrotic myelofibrosis: why does it matter. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2014;27(2):129-140. doi:10.1016/j.beha.2014.07.004
9. Barbui T, Thiele J, Passamonti F et al. Survival and disease progression in essential thrombocythemia are significantly influenced by accurate morphologic diagnosis: an international study. *J Clin Oncol.* Published online 2011.
10. Tefferi A, Elliott M. Thrombosis in myeloproliferative disorders: prevalence, prognostic factors, and the role of leukocytes and JAK2V617F. *Semin Thromb Hemost.* 2007;33(4):313-320. doi:10.1055/s-2007-976165
11. Barosi G, Mesa RA, Thiele J et al. Proposed criteria for the diagnosis of post polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Leukemia.* 2008;Feb(22(2)):437-438.
12. James C, Ugo V, Vainchenker W. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Medecine/Sciences.* 2005;21(6-7):669-670. doi:10.1051/medsci/2005216-7669
13. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera,

essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005;7(4):387-397. doi:10.1016/j.ccr.2005.03.023

14. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005;365(9464):1054-1061. doi:10.1016/S0140-6736(05)74230-6
15. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005;352(17):1779-1790. doi:10.1056/NEJMoa051113
16. Bandaranayake RM, Ungureanu D, Shan Y, Shaw DE, Silvennoinen O, Hubbard SR. Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. *Nat Struct Mol Biol*. 2012;19(8):754-759. doi:10.1038/nsmb.2348
17. Dameshek W. Some speculations on the myeloproliferative syndromes. *Blood*. 1951;Apr(6(4)):372-375.
18. Scott LM, Tong W, Levine RL, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007;356(5):459-468. doi:10.1056/NEJMoa065202
19. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006;3(7):e270. doi:10.1371/journal.pmed.0030270
20. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515

mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006;108(10):3472-3476. doi:10.1182/blood-2006-04-018879

21. Chaligné R, Tonetti C, Besancenot R, et al. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia*. 2008;22(8):1557-1566. doi:10.1038/leu.2008.137
22. Rumi E, Pietra D, Guglielmelli P, et al. Acquired copy-neutral loss of heterozygosity of chromosome 1p as a molecular event associated with marrow fibrosis in MPL-mutated myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2013;121(21):4388-4395. doi:10.1182/blood-2013-02-486050
23. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2379-2390. doi:10.1056/NEJMoa1311347
24. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013;369(25):2391-2405. doi:10.1056/NEJMoa1312542
25. Michalak M, Groenendyk J, Szabo E, Gold LI, Opas M. Calreticulin, a multi-process calcium-buffering chaperone of the endoplasmic reticulum. *Biochem J*. 2009;417(3):651-666. doi:10.1042/BJ20081847
26. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia.

Blood. 2014;April 3(123(14)):2157-2160.

27. Finazzi G, Carobbio A, Guglielmelli P et al. Calreticulin mutation does not modify the IPSET score for predicting the risk of thrombosis among 1150 patients with essential thrombocythemia. *Blood*. 2014;Oct 16(124(16)):2611-2612.
28. Tefferi A, Lasho TL, Finke CM et al. CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons. *Leukemia*. 2014;Jul(28(7)):1472-1477.
29. Guglielmelli P, Nangalia J, Green AR, Vannucchi AM. CALR mutations in myeloproliferative neoplasms: hidden behind the reticulum. *Am J Hematol*. 2014;89(5):453-456. doi:10.1002/ajh.23678
30. Ortmann CA, Kent DG, Nangalia J et al. Effect of mutation order on myeloproliferative neoplasms. *N Eng J Med*. 2015;Feb 12(372(7)):601-612.
31. Morsia E, Torre E, Poloni A, Olivieri A, Rupoli S. Molecular Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms: From Molecular Landscape to Therapeutic Implications. *Int J Mol Sci*. 2022;23(9). doi:10.3390/ijms23094573
32. Marchioli R, Finazzi G, Specchia G, Masciulli A, Mennitto MR, Barbui T. The CYTO-PV: A Large-Scale Trial Testing the Intensity of CYTOreductive Therapy to Prevent Cardiovascular Events in Patients with Polycythemia Vera. *Thrombosis*. 2011;2011:794240. doi:10.1155/2011/794240
33. Morsia E, Gangat N. Myelofibrosis: challenges for preclinical models and emerging therapeutic targets.

Expert Opin Ther Targets. 2021;25(3):211-222.
doi:10.1080/14728222.2021.1915992

34. Levine RL, Gilliland DG. Myeloproliferative disorders. *Blood.* 2008;112(6):2190-2198. doi:10.1182/blood-2008-03-077966
35. Alvarez-Larrán A, Bellosillo B, Pereira A, et al. JAK2V617F monitoring in polycythemia vera and essential thrombocythemia: clinical usefulness for predicting myelofibrotic transformation and thrombotic events. *Am J Hematol.* 2014;89(5):517-523. doi:10.1002/ajh.23676
36. Tefferi A, Wassie EA, Guglielmelli P, et al. Type 1 versus Type 2 calreticulin mutations in essential thrombocythemia: a collaborative study of 1027 patients. *Am J Hematol.* 2014;89(8):E121-4. doi:10.1002/ajh.23743
37. Lussana F, Rambaldi A. Inflammation and myeloproliferative neoplasms. *J Autoimmun.* 2017;85:58-63. doi:10.1016/j.jaut.2017.06.010
38. Koschmieder S, Mughal TI, Hasselbalch HC, et al. Myeloproliferative neoplasms and inflammation: Whether to target the malignant clone or the inflammatory process or both. *Leukemia.* 2016;30(5):1018-1024. doi:10.1038/leu.2016.12
39. Morsia E, Gangat N. Myeloproliferative Neoplasms with Monocytosis. *Curr Hematol Malig Rep.* 2022;17(1):46-51. doi:10.1007/s11899-021-00660-2