

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E MORFOLOGICA DELLE NEOPLASIE MIELOPROLIFERATIVE: CONFRONTO FRA FORME CLASSICHE E FORME ASSOCIATE A TROMBOSI IN SITI INUSUALI.

Le neoplasie mieloproliferative (MPN) rappresentano un raro gruppo di patologie oncoematologiche caratterizzate dalla trasformazione su base neoplastica della cellula staminale emopoietica pluripotente e dall'espansione clonale di uno o più progenitori emopoietici nel midollo osseo o in sede extramidollare. L'insorgenza di complicanze trombotiche ed emorragiche rappresenta una delle principali cause di mortalità e di morbidità di questi pazienti. A differenza di quanto è accaduto per la leucemia mieloide cronica, nell'ambito di tali patologie non è ancora stato possibile identificare un singolo marcatore genetico o molecolare che sia capace di promuoverne da solo l'insorgenza. Nello specifico, la scoperta delle mutazioni somatiche a carico dei geni JAK2, MPL e più recentemente della calreticulina (CALR) ha permesso di compiere notevoli progressi nella comprensione dell'eziopatogenesi e della storia naturale delle MPN. E' necessario però sottolineare che persiste ancora una quota non trascurabile di pazienti affetti da Trombocitemia Essenziale (ET) e da Mielofibrosi Primaria (PMF) per i quali non è stato possibile identificare la presenza di un profilo mutazionale analogo. La mancanza di un'esaustiva caratterizzazione molecolare rende ragione del fatto che, ancora oggi, la diagnosi di queste entità clinico-nosologiche deve essere necessariamente basata su un'accurata e simultanea valutazione di un preciso profilo di caratteristiche cliniche e morfologiche, accanto a quelle molecolari note. Il presente studio si propone di valutare l'assetto molecolare di JAK2, MPL, CALR, TET2, ASXL1, IDH1 e IDH2 di una coorte consecutiva di 630 pazienti affetti da MPN BCR-ABL1-negative, così suddivisi: 180 casi di Policitemia Vera, 175 di PMF e 275 di ET. Nell'ambito dell'intera casistica in studio e per le singole categorie diagnostiche si valuterà l'impatto che il profilo mutazionale ha sul rischio di sviluppare eventi trombotici, sia arteriosi che venosi, oltre che emorragici. Particolare attenzione verrà posta all'eventuale correlazione esistente con il rischio di recidiva di complicanze trombo-emorragiche. Si procederà quindi ad un'attenta revisione delle biopsie ossee eseguite alla diagnosi, valutando dettagliatamente per ciascuna di esse le caratteristiche morfologiche già precedentemente riportate. Si ricercherà quindi la presenza di un'eventuale correlazione tra le caratteristiche morfologiche e il profilo mutazionale identificato e si ricercheranno eventuali differenze fra i casi che sono andati incontro ad un evento trombotico e quelli rimasti indenni, oltre che fra i casi di trombosi venose verificatisi in siti usuali, rispetto a quelli insorti in siti inusuali (trombosi venose cerebrali e splancniche). Si valuteranno infine le differenze in termini di progression-free survival e di overall survival fra i casi di MPN esorditi con un evento trombotico in un sito inusuale rispetto ai rimanenti casi di MPN associati o meno ad una pregressa complicanza trombotica.

CARATTERIZZAZIONE MOLECOLARE E MORFOLOGICA DELLE NEOPLASIE MIELOPROLIFERATIVE: CONFRONTO FRA FORME CLASSICHE E FORME ASSOCIATE A TROMBOSI IN SITI INUSUALI.

BACKGROUND

Le neoplasie mieloproliferative (MPN) rappresentano un raro gruppo di patologie oncoematologiche caratterizzate dalla trasformazione su base neoplastica della cellula staminale emopoietica pluripotente e dall'espansione clonale di uno o più progenitori emopoietici nel midollo osseo o in sede extramidollare, a cui si può associare un quadro di alterazioni stromali progressive su base reattiva e un non trascurabile rischio di evoluzione in leucemia mieloide acuta [1,2]. A differenza della leucemia mieloide cronica, caratterizzata dalla patognomonica presenza del trascritto di fusione BCR-ABL1, per la policitemia vera (PV), la mielofibrosi primaria (PMF) e la trombocitemia essenziale (ET), globalmente identificate come MPN BCR-ABL1-negative, non è stato ancora possibile identificare un singolo marcatore genetico o molecolare che sia capace di promuoverne da solo l'insorgenza. La scoperta delle mutazioni somatiche a carico dei geni JAK2 [3-5], MPL [6,7] e più recentemente della calreticulina (CALR) [8,9] ha tuttavia permesso di compiere notevoli progressi nella comprensione sia dell'eziopatogenesi e della storia naturale delle MPN, sia delle cause di insorgenza di alcune delle più comuni complicanze che ad esse si accompagnano. Allo stato attuale delle conoscenze, è stato ormai ben documentato il ruolo della mutazione V617F di JAK2 quale fattore di rischio trombotico nella ET [10]; per quanto concerne invece il ruolo delle mutazioni di CALR, esso è ancora oggetto di dibattito: più precisamente, la loro presenza nella ET sarebbe associata ad un minore rischio di trombosi, senza che però a ciò corrisponda alcuna differenza statisticamente significativa in termini di overall-survival (OS) e di leukemia-free survival (LFS) [11-13]. Per quanto concerne invece la PMF, le forme CALR-mutate sarebbero associate ad una prognosi significativamente più favorevole; tuttavia, se per alcuni autori tale dato sarebbe generalizzabile a tutti i casi di PMF CALR-mutate [14], a parere di altri sarebbe invece da limitarsi solamente alle forme associate a una specifica mutazione di CALR (cosiddetta di tipo 1 o del52bp) [15]. E' necessario però sottolineare che ancora oggi rimane una quota non trascurabile di pazienti affetti da ET e da PMF per i quali non è stato possibile identificare la presenza di un profilo mutazionale analogo, e ai quali ci si riferisce come forme "triple-negative" e che sarebbero caratterizzate da un outcome significativamente diverso rispetto alle forme associate a mutazioni di JAK2, MPL o CALR. In particolare, le forme di PMF "triple-negative" dovrebbero essere considerate patologie ad alto rischio molecolare, come già accade per i casi associati a cariotipo sfavorevole [15]. La mancanza di un'esaustiva caratterizzazione molecolare rende ragione del fatto che, ancora oggi, la diagnosi di queste entità clinico-nosologiche deve essere

necessariamente basata su un'accurata e simultanea valutazione di un preciso profilo di caratteristiche cliniche e morfologiche, accanto a quelle molecolari note, come definito nella classificazione WHO (2008) delle neoplasie della linea mieloide [1,2].

L'insorgenza di complicanze trombotiche ed emorragiche rappresenta una delle principali cause di mortalità e di morbidità di questi pazienti [16-18]. Gli eventi trombotici possono coinvolgere il distretto arterioso (infarto miocardico, ischemia cerebrale, arteriopatie periferiche) oppure, in circa un terzo dei casi, il versante venoso (trombosi venose profonde, embolie polmonari). Nell'ambito delle trombosi venose, possono essere coinvolti oltre ai siti comuni, come il circolo venoso profondo degli arti inferiori, anche sedi inusuali, quali i vasi splancnici o cerebrali [19-20].

SCOPO DELLO STUDIO

Il presente studio si propone di valutare l'assetto molecolare di JAK2, MPL, CALR, TET2, ASXL1, IDH1 e IDH2 in una coorte consecutiva di pazienti affetti da MPN BCR-ABL1-negative. Nell'ambito dell'intera casistica in studio e per le singole categorie diagnostiche si valuterà l'impatto che il profilo mutazionale ha sul rischio di sviluppare eventi trombotici, sia arteriosi che venosi, oltre che eventi emorragici. Particolare attenzione verrà posta all'eventuale correlazione esistente con il rischio di recidiva di complicanze trombo-emorragiche. Si procederà quindi ad un'attenta revisione delle biopsie ossee eseguite alla diagnosi, valutando dettagliatamente per ciascuna di esse le caratteristiche morfologiche già precedentemente riportate [21]. Si ricercheranno quindi: a) la presenza di un'eventuale correlazione tra le caratteristiche morfologiche suddette ed il profilo mutazionale identificato; b) eventuali differenze fra i casi che sono andati incontro ad un evento trombotico e quelli rimasti indenni, e fra i casi di trombosi venose verificatisi in siti usuali, rispetto a quelli insorti in siti inusuali (trombosi venose cerebrali e splancniche). Si valuteranno infine c) differenze in termini di progression-free survival (PFS), LFS e OS fra i casi di MPN esorditi con un evento trombotico in un sito inusuale, rispetto ai rimanenti casi di MPN associati o meno ad una pregressa complicanza trombotica.

METODI

Il presente studio prevede la valutazione dei record clinici ed istopatologici di 630 pazienti consecutivi con una diagnosi clinica ed istologica di MPN BCR-ABL1-negativa, formulata in accordo con i criteri WHO del 2008, e regolarmente seguiti presso l'UOC Oncoematologia della Fondazione IRCCS Ca' Granda – Ospedale Maggiore Policlinico di Milano. In particolare, la casistica sarà così composta: 180 casi di PV, 175 di PMF e 275 casi di ET. Di tutti i pazienti saranno raccolti i dati clinici "classici", oltre a quelli istologici e molecolari qui di seguito definiti.

Le biopsie ossee ottenute alla diagnosi fissate in formalina ed incluse in paraffina, colorate con Ematossilina-eosina, Giemsa e impregnazione argentea secondo Gomori, verranno rivalutate in

dettaglio da due emopatologi esperti mediante revisione collegiale al microscopio multitestata, come precedentemente descritto [21].

Mutazioni di JAK2, MPL, CALR, TET2, ASXL1, IDH1 e IDH2 saranno ricercate su DNA estratto da granulociti provenienti dal sangue periferico. La mutazione V617F del gene JAK2 verrà ricercata tramite PCR allele-specifica, eseguita secondo la metodica descritta da Baxter et al. [5], e quindi confermata tramite sequenziamento diretto (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Warrington, UK) impiegando il Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Warrington, UK). Per l'analisi quantitativa dell'allele burden di JAK2 V617F verrà utilizzato il Kit JAK2 MutaQuant™ (Ipsogen Inc., New Haven, CT), basato sul principio delle sonde oligonucleotidiche idrolitiche a doppio fluorocromo RQ-PCR. Mutazioni di MPL, in particolare W515L, W515K, W515A, S505N e G509C, saranno ricercate tramite sequenziamento diretto dell'esone 10 del gene. A questo fine i primer impiegati saranno: MPL10F 5' TAGCCTGGATCTCCTTGGTG 3' e MPL10R 5' CCTGTTTACAGGCCTTCGGC 3'. Allo scopo di identificare la presenza di delezioni o di inserzioni a carico dell'esone 9 del gene CALR, saranno impiegati primer disegnati sulla base del protocollo recentemente descritto da Klampfl et al. [8]. Mutazioni di IDH1 (R132H) e IDH2 (R172K) saranno ricercate in base alla metodica riportata da Cykowski et al [22].

Per ogni paziente verrà altresì ricercata la presenza di fattori di rischio trombotico addizionali (trombofilia ereditaria e acquisita): a questo fine si valuterà la presenza di un eventuale deficit di antitrombina III, proteina C e proteina S, anticorpi anti-cardiolipina, Lupus-anticoagulant, anticorpi anti-beta 2 glicoproteina 1, Fattore V Leiden, mutazione G20210A del gene del Fattore II, iperomocisteinemia e livelli serici di fattore VIII.

RISULTATI ATTESI

- Caratterizzazione morfologica e molecolare delle MPN BCR-ABL1-negative, ripartendo la casistica in studio in tre gruppi di confronto, così definiti: forme non associate a trombosi, forme con trombosi in siti comuni e forme associate a trombosi in siti inusuali
- Determinazione della prevalenza delle mutazioni di ASXL1, TET2, IDH1 e IDH2 nei tre gruppi di confronto prima definiti
- Correlazione fra il profilo morfologico e mutazionale di ciascun paziente e il rischio di insorgenza di complicanze trombotiche
- Correlazione fra il profilo morfologico e mutazionale e il rischio di recidiva di eventi trombotici
- Correlazione fra il profilo morfologico e mutazionale e il rischio di insorgenza di complicanze emorragiche

- Correlazione fra il profilo morfologico e mutazionale dei casi associati a trombosi in siti inusuali rispetto alle forme associate a trombosi in siti comuni
- Definizione del significato prognostico (in termini di PFS, LFS e OS) degli eventi trombotici insorti in siti inusuali

Il presente studio è eminentemente finalizzato a valutare le eventuali differenze statisticamente significative in termini di caratteristiche morfologiche e molecolari dei casi di MPN associati a trombosi in siti inusuali (trombosi venose splancniche e cerebrali) rispetto alle forme canoniche. Particolare attenzione verrà altresì posta sulla ricerca di eventuali correlazioni fra il profilo morfologico e molecolare di questi pazienti ed il rischio di recidiva di trombosi, oltre che di insorgenza di complicanze emorragiche.

Una più efficace e puntuale caratterizzazione di tale tipologia di pazienti permetterà al clinico di definire in maniera precisa l'outcome atteso in ciascun caso e in funzione di tale dato decidere qual è il trattamento più opportuno da doversi adottare.

BIBLIOGRAFIA

1. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: The 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia* 2008;22:14–22.
2. Tefferi A. Myeloproliferative neoplasms 2012: the John M. Bennett 80th birthday anniversary lecture. *Leuk Res* 2012;36:1481-9.
3. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med* 2005;352:1779–90.
4. 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;7:387–97.
5. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054–61.
6. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med* 2006;3:e270.
7. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 2006;108:3472–6.
8. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Eng J Med* 2013;369:2379-90.
9. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Eng J Med* 2013;369:2391-405.

10. Barbui T, Finazzi G, Carobbio A, et al. Development and validation of an International Prognostic Score of thrombosis in World Health Organization-essential thrombocythemia (IPSET-thrombosis). *Blood* 2012;120:5128-33.
11. Rumi E, Pietra D, Ferretti V, et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* 2014;123:1544-51.
12. Rotunno G, Mannarelli C, Guglielmelli P, et al. Impact of calreticulin mutations on clinical and hematological phenotype and outcome in essential thrombocythemia. *Blood* 2014;123:1552-5.
13. Gangat N, Wasse E, Lasho T, et al. Mutations and thrombosis in essential thrombocythemia: prognostic interaction with age and thrombosis history. *Eur J Hematol* 2014 [pub ahead of print].
14. Guglielmelli P, Lasho T, Rotunno G et al. The number of prognostically detrimental mutations and prognosis in primary myelofibrosis: an international study of 797 patients. *Leukemia* 2014;28:1804-10.
15. 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;28:1472-7.
16. Patrono C, Rocca B, De Stefano V. Platelet activation and inhibition in polycythemia vera and essential thrombocythemia. *Blood* 2013;121:1701–11.
17. Barbui T, Finazzi G, Falanga A. Myeloproliferative neoplasms and thrombosis. *Blood* 2013;122:2176–84.
18. Casini A, Fontana P, Lecompte TP. Thrombotic complications of myeloproliferative neoplasms: Risk assessment and risk-guided management. *J Thromb Haemost* 2013;11:1215–27.
19. Martinelli I, De Stefano V, Carobbio A, et al. Cerebral vein thrombosis in patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms An European Leukemia Net study. *Am J Hematol* 2014;89(11):E200-5.
20. Smalberg JH, Arends LR, Valla DC, et al. Myeloproliferative neoplasms in Budd-Chiari syndrome and portal vein thrombosis: a meta-analysis. *Blood* 2012;120:4921-8.
21. Gianelli U, Bossi A, Cortinovis I, et al. Reproducibility of the WHO histological criteria for the diagnosis of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Mod Pathol* 2014;27:814-22.
22. Cykowski MD, Allen RA, Fung KM, et al. Pyrosequencing of IDH1 and IDH2 mutations in brain tumors and non-neoplastic conditions. *Diagn Mol Pathol* 2012;21:214-20.