

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA SCUOLA
DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE
SCUOLA DI SPECIALIZZAZIONE IN EMATOLOGIA**



**Fattori predittivi di sopravvivenza dopo Trapianto
allogeneico di cellule staminali emopoietiche (HSCT) in
pazienti affetti da mielofibrosi.**

Relatore:

Prof. Roberto Massimo Lemoli

Correlatore:

Dott.ssa Annamaria Raiola

Candidato:

Dott.ssa Giulia Francia

Anno accademico 2022/2023

Sommario

1 Abstract	3
1.1 Introduzione e scopo dello studio	3
1.2 Materiali e metodi.....	3
1.3 Risultati.....	3
1.4 Conclusioni.....	4
2. Introduzione	5
2.1 Epidemiologia, clinica e laboratorio	6
2.2 Diagnosi e classificazione WHO/ICC	7
2.3 Patogenesi	9
2.3.1 JAK2-V617F	9
2.3.2 MPL.....	10
2.3.3 CALR	10
2.3.4 Metodi di analisi molecolare	11
2.3.5 NGS e mutazioni aggiuntive.....	12
2.4 Score prognostici e stratificazione del rischio: dal IPSS al MTSS.	12
2.5 Trattamento.....	15
2.5.1 Terapia medica e di supporto: approccio per problematiche.....	15
2.5.2 Trapianto allogenico di cellule staminali (HSCT).....	18
3 Metodi	27
3.1 Pazienti e scelta di donatore, condizionamento e profilassi GvHD.....	27
3.2 Obiettivi e scopi dello studio.	29
3.3 Analisi statistica e definizione di OS, PFS, GRFS.....	29
3.4 Definizione e criteri di attecchimento, GF, relapse, aGVHD e cGVHD.	30
4 Risultati.....	33
4.1 Pazienti e caratteristiche basali al trapianto.....	33
4.2 Graft function.....	36
4.3 GVHD	36
4.4 NRM e ricaduta.....	38
4.4 Overall Survival (OS), Relapse free survival (RFS) e Graft and relapse free survival (GRFS)	39
Bibliografia	46

Indice delle tabelle e delle figure

Tabella 1: Grado di fibrosi midollare	8
Tabella 2: Criteri diagnostici MF WHO 2022	8
Tabella 3: SCORE prognostici	14
Tabella 4: Score pesato su intensità per i comuni chemioterapici utilizzati nei regimi di induzione (Spyridonidis A. et al, Bone Marrow Transplant, 2019)	28
Tabella 5: Caratteristiche dei pazienti	34
Tabella 6: Caratteristiche trapiantologiche	35
Figura 1: IC attecchimento neutrofili +45 (A) e piastrine +45 (B).....	36
Figura 2: IC aGVHD II-IV grade (A) e III-IV grade (B).....	37
Figura 3: IC cGVHD globale (A) e moderata/severa (B).	37
Figura 4: IC cGVHD moderata severa stratificata per status CMV. ROSSO: CMV neg/pos; BLU: CMV neg/neg, pos/pos, pos/neg.	38
Figura 5: IC NRM (A) e RELAPSE (B) a 2 anni dal trapianto	38
Figura 6: NRM stratificata secondo compatibilità ABO	39
Figura 7: Curve di OS (a), PFS (b) e GRFS (c) a 2 anni da trapianto.	40
Tabella 7: Analisi univariata e multivariata delle variabili che impattano OS e PFS.	41

1 Abstract

1.1 Introduzione e scopo dello studio

Il trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (HSCT) ad oggi è l'unica opzione terapeutica per i pazienti affetti da Mielofibrosi, ma la mortalità dovuta alle complicanze (Non Relapse Mortality, NRM) della procedura trapiantologica costituisce ancora oggi un problema. Inoltre la mielofibrosi, per le sue caratteristiche biologiche, è una malattia che tende a recidivare. Negli anni sono stati validati numerosi score prognostici in grado di predire i risultati del trapianto per coadiuvare i medici non solo nella scelta dell'opzione trapiantologica, ma anche dei tempi e delle condizioni migliori. In questo studio abbiamo raccolto i dati ed analizzato i risultati di una coorte di pazienti, affetti da mielofibrosi, e sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche.

1.2 Materiali e metodi

Questo è uno studio retrospettivo unicentrico condotto presso il "Centro di trapianto di cellule staminali e terapie cellulari" dell'IRCCS Policlinico San Martino sui pazienti affetti da mielofibrosi (primitiva o secondaria) e sottoposti ad HSCT allogenico dal gennaio 2012 al febbraio 2024.

L'obiettivo primario è la ricerca di fattori associati ad una migliore sopravvivenza coorte di pazienti studiati. L'obiettivo secondario dello studio è la descrizione dei risultati del trapianto allogenico nei pazienti affetti da mielofibrosi, in termini di sopravvivenza globale (OS), sopravvivenza libera da recidiva di malattia (RFS), sopravvivenza libera da malattia e da GVHD (GRFS) a 2 anni dal trapianto, incidenza cumulativa (CI) di GVHD acuta (a +120 giorni) e di GVHD cronica (a 2 anni), IC della NRM e della recidiva a 2 anni dal trapianto. Sono stati inoltre studiati i tempi della ricostituzione ematologica (attecchimento di neutrofilii e piastrine), l'incidenza di graft failure (GF) e di poor graft function (PGF).

1.3 Risultati

I pazienti affetti da mielofibrosi compresi nello studio sono 99 (47 primarie e 52 secondarie) con età mediana al trapianto di 61 anni (range: 30 – 75 anni).

Il follow up mediano è 36 mesi dal trapianto (range: 0 -148). I donatori sono stati HLA identici per 32 (32%) pazienti (familiari: 13, non familiari: 19) non HLA identici per 67 pazienti (67%), di cui la maggior parte familiari aploidentici: 63 (63%). La fonte di cellule staminali è stata il midollo (BM) per 66 (66%) pazienti e le cellule staminali da sangue periferico (PB) per 33(33%).

La OS, la RFS e la GRFS a 2 anni sono rispettivamente: 65.4% (95% CI: 55.4 – 74.4), 57.9% (95% CI: 48.9 - 66.9) e 49.9% (95% CI: 39.9 – 59.9). Il tempo mediano di attecchimento dei neutrofili è +20 (range +10 - +39), in 24 (24%) pazienti si è verificata una graft failure (mancato attecchimento dei neutrofili e/o chimerismo donatore < al 95%). A 2 anni la CI di NRM e di relapse è risultata pari al 23% (95% CI: 14 – 31.3) e al 16 % (95% CI: 10.5 – 26.6) rispettivamente. A 120 giorni dal trapianto la CI di GVHD acuta di grado II – IV è 21.2% (95% CI: 14.5 – 31) mentre l'incidenza di GVHD cronica è 15% (95% CI: 9.5 e 25.1).

In analisi multivariata i fattori predittivi di sopravvivenza sono risultati essere: l'età del ricevente (HR= 2.9, 95% CI: 1.31 -6.39 p = 0.08) e la splenectomia prima del trapianto (HR= 2.19, 95% CI: 1.01 - 4.74 p= 0.04).

1.4 Conclusioni

Il trapianto allogenico in pazienti affetti da mielofibrosi è un'opzione terapeutica valida con buona sopravvivenza globale considerando l'età mediana dei pazienti e l'assenza di altre terapie eradicanti. La NRM rimane significativa probabilmente almeno in parte associata alle problematiche relate all' attecchimento.

2. Introduzione

La mielofibrosi è una neoplasia ematologica, Philadelphia negativa, inclusa nel gruppo delle sindromi mieloproliferative croniche. Può insorgere de novo (Mielofibrosi primitiva o idiopatica, MFI) o come evoluzione da un precedente quadro di policitemia vera o trombocitemia essenziale (MF secondaria).

Tale patologia classicamente si presenta con una triade di segni e sintomi clinici rappresentata dall'anemia, dalla splenomegalia e dall'astenia, dovute alla fibrosi midollare che si sviluppa in risposta a fattori di crescita e/o citochine rilasciate dalle cellule neoplastiche, con conseguente mobilizzazione costitutiva dei progenitori emopoietici e loro secondaria localizzazione in tessuti extra midollari (milza/fegato ed altri). Le cause di morte includono l'evoluzione leucemica (circa il 20% dei pazienti), gli eventi cardiovascolari, le infezioni e gli episodi emorragici **(8)**.

Dal punto di vista fisiopatologico, le conoscenze relative alle neoplasie mieloproliferative si sono arricchite negli ultimi 20 anni, quando è stato delineato il ruolo di mutazioni genetiche ricorrenti a carico di geni della via di JAK/STAT e che verranno discusse ampiamente nei capitoli successivi. Nonostante i progressi in ambito molecolare e terapeutico, specialmente grazie all'avvento dei JAK-inibitori che hanno permesso di migliorare la qualità di vita dei pazienti e, secondo studi recenti, anche la progression free survival, la mielofibrosi rimane ancora oggi una patologia curabile ed eradicabile unicamente con il trapianto allogenico di cellule staminali (HSCT) emopoietiche. Tale procedura, tuttavia, non è scevra da complicanze anche mortali, infatti la transplant-related mortality non è ad oggi un evento con un'incidenza trascurabile e deve essere presa in considerazione quando si affronta il percorso trapiantologico. Non tutti i pazienti possono quindi usufruire di questa opzione terapeutica per la presenza di comorbidità e della età avanzata.

2.1 Epidemiologia, clinica e laboratorio

Dal punto di vista epidemiologico, l'incidenza in Italia della mielofibrosi si attesta intorno a 0.5-1.5 casi ogni 100mila abitanti, con una prevalenza di 1.76-4.05 casi per 100 mila abitanti.

La mediana di età di insorgenza si aggira intorno ai 65 anni, rendendo la mielofibrosi una patologia che colpisce principalmente individui anziani, anche se casi in età giovanile non sono rari.

Dal punto di vista patogenetico, a livello dei progenitori multipotenti ematopoietici avvengono, nel 90% dei casi, delle mutazioni a carico di uno dei tre geni considerati "driver": JAK2, MPL e CALR, che rendono la cellula staminale emopoietica capace di proliferare in maniera non controllata a causa di una iperattivazione della via di signaling JAK/STAT con conseguente espansione della linea megacariocitaria, granulocitaria e diminuzione della eritropoiesi.

Clinicamente, i pazienti con mielofibrosi si presentano con epatosplenomegalia (dovuta alla comparsa di emopoiesi extramidollare) e sintomi sistemici tipici delle malattie ematologiche, come perdita di peso, sudorazioni notturne, calo ponderale e talvolta prurito. Oltre a questi sintomi, possono coesistere altri dovuti all'ingombro splenico, come ripienezza precoce, o dolore al fianco sinistro per complicità ischemico trombotiche a carico della milza. Una delle caratteristiche cliniche principali è la maggior frequenza di eventi trombotici arteriosi e venosi.

Laboratoristicamente, all'esame emocromocitometrico è possibile osservare leucocitosi con neutrofilia e/o monocitosi, anemia e piastrinosi, tuttavia possono essere presenti, al contrario, piastrinopenia e/o leucopenia. In particolare, l'anemia si osserva in circa il 60% dei pazienti ed è dovuta ad inefficiente produzione di globuli rossi o da ridotta sopravvivenza in circolo (emolisi periferica). Anomalie di laboratorio complementari piuttosto frequenti sono rappresentate da alti livelli di LDH, di bilirubina e degli enzimi di colestasi (ALP e GGT). È inoltre particolarmente aumentata l'incidenza di MGUS (gammopatia di significato incerto), presente in circa l'8-10% dei casi,

Lo striscio di sangue periferico è variabile e dipende dal livello di fibrosi midollare, essendo quasi normale negli stadi precoci (mielofibrosi pre-fibrotica) o presentare un quadro di vera

e propria leucoeritroblastosi periferica con poichilocitosi negli stadi avanzati e con splenomegalia importante (mielofibrosi “overt”).

Il gold standard per la diagnosi è rappresentato dalla biopsia osteomidollare, che può evidenziare una proliferazione megacariocitaria con atipie cellulari accompagnate da fibrosi reticolinica e/o collagena, oppure in assenza di fibrosi in casi di MF prebiotica, le atipie megacariocitarie devono essere associate ad incremento della cellularità midollare con proliferazione granulocitaria e riduzione della linea eritroide.

2.2 Diagnosi e classificazione WHO/ICC

Fino a pochi anni fa, le neoplasie mieloidi venivano classificate sulla base di criteri riconosciuti dalla WHO e che tenevano in considerazione aspetti clinici ed istopatologici.

A partire dal 2022, oltre a questo sistema tradizionale, recentemente, ne è stato codificato un altro grazie al lavoro di un panel di esperti in ambito di patologie mieloidi, denominato International Consensus Classification (ICC). Tale classificazione, per quanto riguarda le patologie mieloproliferative, risulta sostanzialmente sovrapponibile a quella redatta dalla WHO nel 2022 e verranno pertanto discusse insieme.

Affinché venga effettuata una corretta classificazione delle neoplasie mieloproliferative, è necessario che la biopsia osteomidollare e lo striscio di sangue midollare vengano effettuati al momento della diagnosi o comunque prima che venga intrapresa una terapia citoriduttiva, per due motivi fondamentali:

- 1) distinguere le forme di trombocitemia essenziale da quelle di mielofibrosi in fase pre-fibrotica;
- 2) Distinguere le forme di PMF da quelle evolute da altre patologie mieloproliferative.

Dall'altra parte, è necessario che il patologo segnali il grado di fibrosi e della cellularità midollare, secondo criteri prestabiliti (*Tabella 1*).

TABLE 1 Semiquantitative grading of bone marrow (BM) fibrosis (adapted and slightly modified by Thiele et al.⁹ and Kvasnicka et al.¹⁰)

MF-0	Scattered linear reticulin with no intersections (cross-overs) corresponding to normal bone marrow
MF-1	Loose network of reticulin with many intersections, especially in perivascular areas
MF-2	Diffuse and dense increase in reticulin with extensive intersections, occasionally with focal bundles of thick fibers mostly consistent with collagen, and/or focal osteosclerosis
MF-3	Diffuse and dense increase in reticulin with extensive intersections and coarse bundles of thick fibers mostly consistent with collagen, usually associated with osteosclerosis

Note: Comment on staining and grading: If the fibrosis pattern is heterogeneous, the final score is determined by the highest grade present in at least 30% of the marrow area. Fiber density should be assessed only in hematopoietic areas. In grades MF-2 or MF-3 an additional trichrome stain is recommended and Gomori's or Gordon and Sweets' method for reticulin fibers with positive internal perivascular controls.

tabella 1 Grado di fibrosi midollare

Dal punto di vista istologico, nella mielofibrosi in fase prefibrotica, oltre proliferazione e al grado di atipia megacariocitaria, è necessario considerare la quota di cellularità emopoietica e delle fibre reticoliniche. È di fondamentale importanza saper distinguere la mielofibrosi pre-fibrotica dalla forma overt e dalla ET, in quanto ad ogni categoria corrispondono differenze significative in termini di sopravvivenza. Rispetto alla pre-PMF; la forma overt-PMF presenta delle differenze non solo in termini di quantità di fibre (grado 2-3), ma anche nella qualità (fibre reticoline vs collagene) e nella zona di deposizione delle stesse (depositi perivascolari e osteosclerosi).

Le caratteristiche anatomopatologiche sopradescritte rappresentano uno dei criteri diagnostici maggiori, insieme alla presenza delle mutazioni nei geni driver di JAK2, MPL e CALR e all'esclusione di altre patologie mieloproliferative. Esistono, inoltre, altri criteri minori di natura clinica che concorrono alla formulazione di una diagnosi (almeno uno deve presente). (Tabella 2). (1,2)

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

tabella 2 Criteri diagnostici MF WHO 2022

Per quanto riguarda le forme secondarie, i criteri sono sostanzialmente sovrapponibili, in aggiunta alla presenza di pregressa PV o ET documentate.

2.3 Patogenesi

L'origine clonale della mielofibrosi ed in generale delle patologie mieloproliferative croniche era stata già dimostrata negli anni '70, attraverso l'utilizzo di tecniche di citogenetica. In seguito, venne dimostrato su modelli murini che trapiantando una singola cellula staminale che esprimeva il gene JAK2-p.V617F mutato in un esemplare murino ricevente, quest'ultimo avrebbe sviluppato una patologia mieloproliferativa.

Ad oggi sappiamo che circa il 90 % dei casi di mielofibrosi mostra delle mutazioni a carico di JAK2, CALR ed MPL, con percentuali pari rispettivamente al 60%, 20-25% e 5-8%. Una quota di pazienti (10%) con mielofibrosi, i cosiddetti triplo-negativi, non presenta mutazioni in nessuno dei tre geni normalmente implicati nella patogenesi della malattia. In questi casi, è necessario ricercare la presenza di mutazioni non canoniche, che rappresentano comunque solo una piccola quota di casi in questi pazienti.

In ogni caso, tutti i pazienti che presentano mutazioni driver ed anche nei casi triplo-negativi, si assiste ad una attivazione diretta od indiretta della via di segnalazione JAK/STAT che comporta una espansione della serie megacariocitaria, eritrocitaria e granulocitaria.

Le alterazioni fibrotiche che compaiono successivamente non sono dovute dall'azione diretta del clone patologico, ma sono il risultato della produzione di citochine infiammatorie che sono anche alla base dei sintomi costituzionali. Una volta che il processo fibrotico si è instaurato, l'ematopoiesi midollare divenuta insufficiente comporta una attivazione dei siti extramidollari (in primis la milza) con conseguente presenza in circolo di progenitori mieloidi immaturi (leucoeritroblastosi).

2.3.1 JAK2-V617F

La mutazione del gene JAK2 è stata la prima ad essere stata identificata come causativa di patologie mieloproliferative croniche.

Fisiologicamente, JAK fa parte di una famiglia di tirosin chinasi che media il segnale di una serie di recettori citochinici e ormonali, tra i quali IFN, interleuchine, EPO, TPO ecc. Il legame del ligando specifico al recettore permette la fosforilazione di JAK e attiva la cascata di trasduzione del segnale alle proteine effettrici a valle (STAT, MAPK, PI3K).

Normalmente, l'alterazione genetica si va a localizzare a livello del gene V617F dell'esone14, determinando una perdita dell'attività inibitoria da parte del dominio pseudo chinasi JH2 sul dominio chinasi, che comporta un vantaggio proliferativo ed una attivazione costitutiva dei recettori al quale è associata la tirosin-chinasi JAK2, portando ad una espansione della linea eritroide, granulocitaria e megacariocitaria.

Dal punto di vista clinico, i pazienti portatori di questa mutazione si presentano con una età più avanzata, elevati livelli di globuli bianchi, piastrinosi meno spiccata e valori di emoglobina più bassi, con maggiore tendenza alla trasfusione dipendenza. **(3)**

2.3.2 MPL

IL recettore della trombopoietina (MPL) è una proteina che fa parte della famiglia dei recettori delle citochine omodimerici ed è formato da 3 domini, uno dei quali, quello intramembranario, è responsabile del legame con JAK e la conseguente attivazione del segnale intracellulare della via JAK/STAT. Le mutazioni che in genere coinvolgono questo recettore sono localizzate su esone 10 del cromosoma 1 e determinano la sostituzione di un triptofano con una leucina e in corrispondenza di una porzione transmembranaria. Questo comporta una attivazione costitutiva del recettore della trombopoietina e della via JAK/STAT. Il fenotipo clinico è simile a quello dei pazienti con mutazione di JAK2 e si associa più frequentemente a donne con età più avanzata, presenza di sintomi sistemici e bassi valori di emoglobina con trasfusione dipendenza. **(4)**

2.3.3 CALR

Calreticulina (CALR) è una proteina "Chaperon" presente nel reticolo endoplasmatico cellulare. Ha diverse funzioni, tra le quali la regolarizzazione dell'omeostasi del calcio intra ed extracellulare e il trasporto di varie proteine (tra cui anche MCH tipo II) dal reticolo endoplasmatico alla membrana cellulare. A livello ematopoietico, si è visto che i livelli di CALR sono molto elevati nei progenitori mieloidi e diminuiscono man mano che il processo

di differenziazione progredisce da cellule CD34+ a eritroblasti e granulociti, mentre al contrario incrementa nei megacariociti.

IL meccanismo di trasformazione mieloproliferativa portato dalla mutazione di CALR risiede nella interazione di tale proteina mutata con MPL. Il complesso CALRmutata-MPL viene trasportato in membrana citoplasmatica e porta all'attivazione costitutiva della via JAK-STAT.

A livello genetico, sono note circa 50 varianti mutate di CALR, tutte le mutazioni inoltre comportano una piccola inserzione o delezione all'interno dell'esone 9 e tutte comportano una attivazione costitutiva (mutazioni "gain of function").

Le due mutazioni più frequenti riconosciute sono:

- L367fs*46 (tipo 1): determinato dalla delezione di 52 paia di basi,
- K385fs*47 (tipo 2): inserzione di 5 paia di basi.

Queste mutazioni sono riconosciute, rispettivamente, nel 53% e 32% dei pazienti. Tutte le altre mutazioni vengono chiamate tipo 1-like o tipo2-like sulla base della conformazione ad elica della proteina che le rende più simili ad un tipo rispetto che all'altro. Tendenzialmente, la frequenza della mutazione di tipo 1 è maggiore rispetto alla tipo 2 e conferisce una prognosi migliore, in quanto associato a score DIPSS più basso e blasti circolanti in percentuale inferiore.

In genere le mutazioni di CALR, rispetto a JAK2, avvengono in pazienti più giovani e mostrano livelli di piastrine più elevate a fronte di un ridotto numero di globuli bianchi circolanti. Il tasso di OS dei pazienti con MF CALR mutati è migliore rispetto ai pazienti con mutazione di JAK2, anche quando aggiustato per età ed altri fattori prognostici: la mediana di sopravvivenza infatti è rispettivamente di 17 anni vs 9 anni e questa differenza in termini prognostici si applica anche nei pazienti che vengono sottoposti a trapianto allogenico. **(5-6)**

2.3.4 Metodi di analisi molecolare

Le analisi di primo livello di biologia molecolare sono volte ad identificare la presenza delle mutazioni a carico dei geni driver. Per quanto riguarda l'analisi di JAK2, vengono utilizzati

diversi metodi di sequenziamento mediante PCR, generalmente vengono preferite analisi quantitative piuttosto che qualitative per la loro miglior riproducibilità, accuratezza e sensibilità (alcuni metodi possono contare su livelli di sensibilità dallo 0.01% e specificità 100%).

IN merito all'analisi delle mutazioni di CALR e MPL, vengono utilizzati approcci diversi: nel primo caso, viene preferito l'utilizzo del sequenziamento di Sanger vista la grande eterogeneità delle inserzioni e delezioni finora riscontrate, mentre nel secondo caso si preferisce utilizzare tecniche di high-resolution melting (HRM) curve analysis. (7)

2.3.5 NGS e mutazioni aggiuntive

Negli ultimi 20 anni, studi mutazionali basati su tecnologie di NGS hanno dimostrato che , oltre alle 3 mutazioni classiche, più del 50% dei pazienti presenza mutazioni somatiche aggiuntive , in alcuni casi con rilevanza in termini prognostici e terapeutici. Queste mutazioni non sono specifiche delle patologie mieloproliferative, ma sono tipiche in generale delle altre patologie oncologiche della linea mieloide come AML; MDS e MDS/MPN e avvengono in geni coinvolti nella metilazione del DNA (TET2, DNMT3A, IDH1 e2), nella modificazione degli istoni (ASXL1, EZH2), splicing mRNA (SFRB1, SFRB2, U2A1, ZRSR2), signaling (CBL, NRAS, KRAS, PTPN11) e fattori di trascrizione (RUNX1, NFE2, TP53, PPM1D). (9)

Alcune di queste mutazioni sono state inserite in score prognostici, tuttavia ad oggi il loro significato clinico deve essere ancora completamente accertato, anche in considerazione delle recenti acquisizioni in termini di ematopoiesi clonale e della presenza di tali alterazioni genetiche in subcloni midollari che possono non essere necessariamente coinvolti nella patogenesi della mielofibrosi.

2.4 Score prognostici e stratificazione del rischio: dal IPSS al MTSS.

Gli score prognostici della mielofibrosi sono un valido aiuto non solo per definire il burden di malattia, ma anche e soprattutto per poter effettuare un'accurata selezione dei pazienti che possono beneficiare di un trattamento curativo con trapianto di cellule staminali emopoietiche. Nell'ultima decade, si è assistito comunque ad un miglioramento significativo della sopravvivenza globale, con una OS di 63mesi nel decennio 2011-2020 rispetto a 49

mesi dal 2000 al 2010, anche grazie all'uso ormai consolidato degli inibitori di JAK e una più accurata selezione dei donatori nei pazienti candidati a trapianto allogenico.

Convenzionalmente, la valutazione della prognosi si avvale della presenza di sintomi e di dati demografici (i.e. l'età) e clinici, come il grado di anemia. Ad ogni modo, la sempre maggiore conoscenza del substrato molecolare ha portato alla integrazione di tali dati all'interno degli score prognostici.

L'international prognostic scoring System 2009 (IPSS) (10) rappresenta ancora oggi il più usato score prognostico alla diagnosi di mielofibrosi primitiva. Le variabili incluse sono rappresentate dall'età, l'emoglobina <10 g/dl, leucocitosi >25000/mmc, blasti circolanti >1% e sintomi costituzionali. Ogni parametro conta 1 punto, sulla base della presenza o meno di tali parametri è stato possibile suddividere i pazienti in 4 categorie, a cui corrispondono OS diverse (low, intermediate-1, intermediate-2, high).

Nel 2011, lo stesso score è stato aggiornato in modo da poter essere applicato nel corso del follow up (*dynamic IPSS*), dando un peso diverso ad ogni categoria, in particolare conferendo al grado di anemia un peso superiore (2 punti) rispetto ai restanti parametri.

(11)

In seguito, altri score come mostrati nella *Tabella 3* sono stati sviluppati che tenevano presente di altre variabili sia cliniche che molecolari, come dimostrato dal MIPSS-70 e MIPSS-70 plus, **(12)** dove sono state aggiunte variabili come la presenza di alterazioni di CALR e ASXL1 e del cariotipo. Tali score prognostici sono stati particolarmente utili dei pazienti con meno di 70 anni candidati ad alloHSCT.

	DIPSS	DIPSS+	MIPSS-70	MIPSS-70+ version 2.0	MYSEC-PM
<i>Patients' characteristics (score)</i>	Age > 65 y (1) Constitutional symptoms (1)	Age > 65 y (1) Constitutional symptoms (1) RBC transfusions need (1)	Constitutional symptoms (1)	Constitutional symptoms (2)	Age (0.15 × y) Constitutional symptoms (1)
<i>Laboratory values (score)</i>	Hb < 10 g/dl (2) WBC > 25 × 10 ⁹ /l (1) Blasts ≥ 1% (1)	Hb < 10 g/dl (1) WBC > 25 × 10 ⁹ /l (1) Blasts ≥ 1% (1) PLT < 100 × 10 ⁹ /l (1)	Hb < 10 g/dl (1) WBC > 25 × 10 ⁹ /l (2) Blasts ≥ 2% (1) PLT < 100 × 10 ⁹ /l (2)	Severe anemia ² (2) Moderate anemia ³ (1) Blasts ≥ 2% (1)	Hb < 11 g/dl (2) Blasts ≥ 3% (2) PLT < 150 × 10 ⁹ /l (1)
<i>Driver mutation (score)</i>			Absence of type 1/like CALR (1)	Absence of type 1/like CALR (2)	Absence of CALR (2)
<i>Myeloid-gene variants (score)</i>			1 HMR (1) ≥ 2 HMR (2)	1 HMR included U2AF1Q157 (2) ≥ 2 HMR included U2AF1Q157 (3)	
<i>Karyotype (score)</i>		Unfavourable ¹ (1)		Unfavourable ⁴ (3) Very high-risk ⁵ (4)	
<i>Bone marrow (score)</i>			BMF grade ≥ 2 (1)		
<i>Risk (score), median survival</i>	Low (0), NR Int-1 (1-2), 14.2 y Int-2 (3-4), 4 y High (5-6), 1.5 y	Low (0), 15.4 y Int-1 (1), 6.5 y Int-2 (2-3), 2.9 y High (≥ 4), 1.3 y	Low (0-1), NR Int (2-4), 6.3 y High (≥ 5), 3.1 y	Very low (0), NR Low (1-2), 16.4 y Int (3-4), 7.7 y High (5-8), 4.1 y Very high (≥ 9), 1.8 y	Low (< 11), NR Int-1 (11-13), 9.3 y Int-2 (14-15), 4.4 y High (≥ 16), 2 y

tabella 3 SCORE prognostici

Il Genetically Inspired prognostic score system (GIPSS) ha mostrato un potere predittivo comparabile al MIPSS-70+, nonostante prendesse in considerazione solamente informazioni citogenetiche e molecolari, come l'assenza della mutazione di CALR, la presenza di ASXL1, SRSF2 o U2AF1Q157. **(13)**

È evidente, dunque, quanto sia vasta la gamma di modelli prognostici che il clinico ha a disposizione, le linee guida NCCN suggeriscono di utilizzare tutti quelli di cui si hanno a disposizione le variabili: DIPSS se non si conoscono le informazioni di citogenetica e biologia molecolare (evento frequente a casa della punctio sicca dovuta alla fibrosi midollare), MIPSS-70+ 2.0 se al contrario si possiedono tali dati.

Per quanto riguarda le forme secondarie, il modello prognostico di riferimento è il MYSEC-PM.

Come già precedentemente discusso, l'importanza degli score prognostici risiede nella loro capacità di aiutare nella scelta dell'iter terapeutico più adeguato, in particolare nella scelta del paziente candidabile ad HSCT. In questo setting, è di fondamentale importanza non solo analizzare le caratteristiche biologiche della malattia, ma anche e soprattutto valutare i rischi e le complicanze legate alla procedura.

Ad oggi, il trapianto allogenico di cellule staminali deve essere preso in considerazione nei pazienti con una aspettativa di vita inferiore ai 5 anni, quindi in tutti i pazienti che rientrano nella categoria intermediate-2/High secondo il DIPSS/MYSECPM e nell'high risk MIPSS-70+. Nei pazienti intermedio 1 o intermedio, i pazienti non sono drasticamente esclusi da questa scelta terapeutica, ma vanno attentamente valutati altri parametri, come mutazioni multi-HIT di TP53 (associate ad un maggior rischio di evoluzione a fase blastica), pazienti giovani e non responsivi a ruxolitinib e/o con trasfusione dipendenza

Una volta individuato il paziente potenzialmente eleggibile, è possibile applicare due ulteriori score prognostici volti ad analizzare l'outcome trapiantologico tramite variabili legate alla scelta del donatore, performance status e altre legate alla biologia della malattia: l'MTSS e il CIBMTR/EBMT. Ad ogni categoria, corrispondono percentuali di TRM e OS diversi. In particolare, è ben riconosciuto l'impatto della scelta del donatore nella sopravvivenza a 5 anni dal trapianto: 56% per i HLA-id, 48% per i MUD e 34% per gli MMUD/aploidentico. **(14)**

2.5 Trattamento

Il trattamento della mielofibrosi dipende dall'obiettivo terapeutico che abbiamo nei confronti del paziente: se l'intento è guaritivo e il paziente ha uno score prognostico tale per cui il rischio di morte a 5 anni è superiore alla mortalità legata al trapianto, l'unica possibilità è rappresentata dal trapianto allogenico di cellule staminali. Se, al contrario, il paziente, per comorbidità o età, non è eleggibile a tale procedura, si dovranno utilizzare delle terapie che agiscano sui sintomi principali della patologia, in particolare quelli costituzionali, l'anemia (specie se trasfusione dipendente) e la splenomegalia.

2.5.1 Terapia medica e di supporto: approccio per problematiche.

L'approccio alla terapia medica non può ovviamente prescindere dalla sintomatologia che ciascun paziente sperimenta alla diagnosi e poi nel corso della malattia.

L'**anemia** è presente alla diagnosi nel 38% dei pazienti, ma già dopo un anno aumenta fino a coinvolgere circa il 58% dei pazienti e il 64% nel periodo ancora successivo. Purtroppo, le risorse terapeutiche che ad oggi esistono per la gestione dell'anemia non sono molte ed hanno una limitata efficacia. Tra le varie opzioni disponibili vengono annoverate:

- il supporto trasfusionale, con la conseguente problematica del sovraccarico marziale,
- l'eritropoietina, poco utile nei pazienti con elevati livelli endogeni di EPO,
- androgeni come il Danazolo, con attività pro-eritroide, non somministrabile in pazienti con tumori androgeno-dipendenti e nei pazienti con elevato rischio trombotico;
- immunomodulanti come la talidomide e la pomalidomide, poco utilizzati, in quanto possiedono una attività pro-eritroide

La **piastrinopenia** è una problematica piuttosto rilevante, con una percentuale all'esordio pari al 25% dei pazienti ed aumenta fino al 66% nel corso della malattia. In caso di piastrinopenia severo-moderata, quindi plt <50'000/mmc, è possibile anche in questo caso ricorrere agli androgeni, associati o meno a steroide. È necessario prestare particolare attenzione nei casi in cui la piastrinopenia sia associata o addirittura secondaria alla splenomegalia, in quanto alcuni dei JAK-inibitori vanno interrotti (se già in corso) o comunque non iniziati con conte piastriniche di questo tipo. Per tale motivazione, si sta cercando di sviluppare farmaci di questa classe che possano essere utilizzabili anche in presenza di conte piastriniche molto ridotte, come Pacritinib e Fedratinib di cui verrà discusso più avanti.

Accanto alle citopenie, **la splenomegalia e i sintomi sistemici** rappresentano due grandi problemi clinici. In questo contesto, la principale risorsa terapeutica disponibile è rappresentata dai JAK-inibitors, di cui Ruxolitinib ne è il capostipite. Il loro meccanismo di azione è vario e risiede nella soppressione del clone maligno JAK2 positivo, ma anche nella down-regolazione della produzione delle citochine che contribuiscono allo stato iperinflammatorio ed ipermetabolico della patologia. Inoltre, i JAK inibitori non sono selettivi per la mutazione V617F e nemmeno per la Janus kinasi 2, ma agiscono anche su altre kinasi. Infatti, questa scarsa selettività è utile, in quanto permette di utilizzare questi farmaci anche nei pazienti JAK2 non mutati, ma allo stesso tempo è responsabile di alcuni eventi avversi dovuti alla inibizione del meccanismo di JAK/STAT, quindi ridotta eritropoiesi, trombocitopoiesi e scarsa immunomodulazione dovuta alla diminuzione della produzione di citochine infiammatorie che regolano la risposta immunitaria.

Ruxolitinib

Il ruxolitinib è stato il primo JAK-inibitors utilizzato **(15;16)**. Nello studio CONFORT 1, i pazienti sono stati randomizzati in due bracci, in uno veniva utilizzato Ruxolitinib e nell'altro

placebo: i risultati nella riduzione delle dimensioni della milza sono stati nettamente a favore di RUxo, tuttavia solo il 50% dei pazienti ha raggiunto e mantenuto la risposta, come solo una parte dei pazienti riesce a raggiungere e mantenere un controllo dei sintomi. Ad ogni modo, è stato visto e poi confermato negli anni successivi che i pazienti trattati con Ruxolitinib mostravano anche migliori tassi di sopravvivenza.

Uno studio italiano di Real life è andato ad indagare retrospettivamente le caratteristiche associate alla risposta al ruxolitinib in 408 pazienti trattati. Dallo studio si è evinto che la presenza di splenomegalia massiva, piastrinopenia, anemia trasfusione dipendente e inizio della terapia oltre 2 anni rispetto alla diagnosi sono fattori di rischio sfavorevoli di risposta alla terapia. Inoltre, si è anche dimostrato quanto sia importante iniziare un trattamento in fase precoce, in quanto si traduce in una più marcata risposta in termini di riduzione delle dimensioni della milza e, di conseguenza, in un vantaggio di sopravvivenza. **(17)**

Inoltre, non solo un tardivo inizio di terapia si è dimostrato impattare negativamente sulla prognosi del paziente, ma anche l'interruzione del farmaco, che sia per intolleranza o per progressione, è correlato con una prognosi infausta. **(18)**

Sulla scorta di tali dati, per identificare quei pazienti che possono beneficiare di una modifica di trattamento per scarsa risposta/intolleranza o progressione, sono stati raccolti tutti i possibili predittori di sopravvivenza nei primi 6 mesi di trattamento con Ruxolitinib per costruire un modello prognostico che prende il nome di Response to ruxolitinib after 6 months of therapy (RR6). Questo score distingue tre gruppi a cui corrispondono diverse OS: laddove la sopravvivenza sia ridotta, è necessario avviare il paziente ad una seconda linea (HSCT/JAK-inhibitor II linea). **(19)**

Le tossicità correlate al meccanismo di azione di Ruxolitinib sono rappresentate da anemia, leucopenia, piastrinopenia ed aumentata incidenza di tumori cutanei e infezioni ed il dosaggio va modulato per livelli di $plt < 100'000$.

Fedratinib e altri JAK-Inibitori

Ad oggi abbiamo a disposizione in Italia un altro inibitore di JAK2, il fedratinib, che è stato approvato grazie agli studi JAKARTA1 (pazienti treatment naive) e JAKARTA2 (pazienti già trattati con Ruxolitinib), entrambi condotti con fedratinib versus placebo. Il dato più interessante che è emerso è che circa il 30% dei pazienti già trattati con Ruxolitinib

ottenevano una risposta clinica, senza necessità di modulare il dosaggio nei pazienti con plt comprese tra le 50'000 e le 100'000 e quelli con plt>100'000. **(20-21)**

Esistono ulteriori farmaci di questa classe in via di approvazione, tra questi i principali sono rappresentati da momelotinib, che rispetto agli altri ha una migliore attività sulla anemia, e il pacritinib, che al contrario degli altri può essere utilizzato anche nei pazienti con piastrinopenia severa. **(22;23)**

2.5.2 Trapianto allogenico di cellule staminali (HSCT)

L'unica opzione terapeutica ed eradicante è rappresentata dal trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche (HSCT). Negli ultimi anni, l'incremento delle opzioni in ambito della terapia medica, da un lato ha portato un miglioramento della qualità della vita e verosimilmente un allungamento della stessa; tuttavia, ha reso più complessa la scelta dei pazienti da indirizzare a trapianto allogenico. Inoltre, l'utilizzo dei JAKinibitori, in ambito pretrapiantologico, si è dimostrato utile specialmente nella gestione della splenomegalia e sembra avere, secondo piccole recenti casistiche, un'azione favorente l'attecchimento delle cellule staminali allogeniche.

Timing trapiantologico

In assenza di trial prospettici, stabilire il momento ottimale per avviare ad allotrapianto i pazienti candidati risulta difficoltoso e la scelta si basa sulle caratteristiche del singolo caso.

Come già discusso sopra, i pazienti che alla diagnosi si presentano con un rischio elevato o intermedio 2, vista la aspettativa di vita relativamente breve, dovrebbero essere subito avviati a trapianto. **(24)** Un altro parametro da tenere in considerazione è inoltre rappresentato dalla risposta a ruxolitinib a 6 mesi, secondo cui tutti i pazienti che non rispondono a JAK inhibitors entro 6 mesi in termini di riduzione della milza e riduzione del carico trasfusionale, andrebbero attentamente valutati per procedere con il trapianto allogenico. **(19)**

Management pre ed in corso di trapianto

Gestione della milza

È noto che le dimensioni della milza hanno un significato prognostico in termini di ricaduta post trapianto e in termini di mancato attecchimento. In particolare, dimensioni superiori a 15 cm dal margine costale o comunque > 22 cm di lunghezza valutati con ecografia, è correlata con ritardato attecchimento, rischio di GF e Poor graft function ed aumentata TRM, non relapse mortality e ridotta OS. Nonostante tali dati siano stati accertati **(25)**, ad oggi non esistono indicazioni precise circa la gestione della splenomegalia pretrapianto, tuttavia è fortemente raccomandato utilizzare strategie che ne riducano le dimensioni, specialmente nei casi in cui eccedano i 15 cm oltre il margine costale.

La prima opzione nella gestione della splenomegalia è rappresentata dall'utilizzo dei JAK inibitori. Si è infatti dimostrato che l'EFS e l'incidenza di ricaduta sono decisamente più basse nei pazienti che rispondono a ruxolitinib. **(26)** Circa il 30-37% dei pazienti che utilizzano ruxolitinib frontline hanno una risposta oggettiva sulla splenomegalia (riduzione >35% del volume in 6 mesi), mentre la maggior parte sperimentano una scarsa se non assente risposta.

La tempistica ottimale per interrompere il farmaco non è ancora stata definita completamente, ad ogni modo per evitare sindrome da rebound citochinico il ruxolitinib viene normalmente interrotto all'inizio o al termine del condizionamento.

Anche se la maggioranza dei pazienti che ricevono come trattamento i JAKinibitori hanno un certo grado di risposta sulle dimensioni della milza, il 70% dei pazienti in risposta la perdono nel corso del trattamento. In questo contesto, le opzioni di seconda linea sono rappresentate dall'irradiazione splenica e dalla splenectomia.

Quest'ultima procedura ha dimostrato dei risultati ambivalenti, in quanto, secondo uno studio condotto dall'EBMT, i pazienti splenectomizzati mostravano un miglior attecchimento, una ridotta non relapse mortality ma un aumentato rischio di recidiva e un effetto sulla OS non significativo. **(27)** Tuttavia, se i risultati vengono stratificati per dimensioni spleniche, si è visto che la splenectomia ha un vantaggio anche in termini di OS rispetto ai pazienti che vengono sottoposti a trapianto con valori di diametro splenico longitudinale superiore a 22 cm.

L'irradiazione splenica è stata solo recentemente indagata in sostituzione alla splenectomia, specialmente nei pazienti con alto rischio operatorio o livelli di piastrinopenia grave. Ad ogni modo, visto il rischio di tossicità ematologica con citopenie prolungate legato

alla radioterapia, andrebbe effettuata a ridosso del condizionamento, possibilmente entro i 30 giorni dalla irradiazione. **(28)**.

Percentuale di blasti al trapianto

La percentuale di blasti al trapianto è un altro fattore prognostico negativo indipendente. Oltre ai pazienti che si presentano con fase accelerata e/o francamente blastica, anche quelli in fase cronica con una percentuale di blasti in periferia superiore od uguale al 4% hanno una prognosi peggiore.

Ad ogni modo, strategie volte a ridurre il numero di blasti sono indicate solo nei pazienti con fase accelerata o blastica visto l'aumentato rischio di recidiva post trapiantologica, anche se le evidenze sono insufficienti per poter formulare delle raccomandazioni. I pazienti con blastosi periferica e/o midollare <10% non necessitano ulteriori trattamenti pre trapianto. La scelta della terapia citoriduttrice (regimi intensivi vs non intensivi) dovrebbe essere attentamente valutata paziente per paziente, considerando anche l'opzione con agenti ipometilanti associati a venetoclax e/o l'inclusione in studi clinici.

Selezione del donatore

La scelta del donatore è uno degli aspetti fondamentali da considerare in ambito trapiantologico. Fino a poco tempo fa, le informazioni che avevamo a disposizione erano estrapolate da studi con popolazioni eterogenee, in particolare pochi erano i pazienti affetti da mielofibrosi, vista la rarità della patologia. In passato, sono stati riportati dal CIBMTR gli outcome trapiantologici dei pazienti affetti da mielofibrosi sulla base della scelta del donatore. La sopravvivenza a cinque anni (5-y OS) si attesta intorno a 56% e 48% nei pazienti con un donatore HLA identico e MUD, rispettivamente. Parallelamente, anche la TRM è 4 volte più elevata in chi ha un donatore HLA identico rispetto ai donatori sibling. **(29)**

In merito alla possibilità di utilizzare donatori alternativi, vari sforzi sono stati effettuati per indagare gli outcomes di donatori aploidentici o MMUD, anche in considerazione del sempre maggior utilizzo di schemi profilattici per la gvhd a base di ciclofosfamide post trapianto o T-depleti e della maggiore facilità di reperire donatori aploidentici rispetto a matched donor da registro. Uno studio retrospettivo di pazienti sottoposti a trapianto aploidentico con somministrazione di ciclofosfamide post-HSCT come profilassi GVHD ha

mostrato buoni tassi di risposta, con una OS a 2 anni del 62% e relapse free survival del 52% **(30)**. LA TRM in questa coorte di pazienti era calcolata essere pari al 29%.

Più recentemente, è stato condotto uno studio retrospettivo utilizzando i dati del CIBMTR di una coorte di pazienti trattati tra il 2013 e il 2019 **(31)**. Analizzando l'OS in multivariata per tipo di donatore, si è visto che la sopravvivenza era migliore nei pazienti con donatore familiare HLA identico rispetto agli altri tipi di donatori, specialmente nei primi 3 mesi post trapianto, dopodichè le curve di sopravvivenza divenivano più simili tra i vari tipi di donatori. Inoltre, non vi era differenza tra donatori MUD; MMUD e aploidentici. Sono stati invece confermati i maggior tassi di NRM e GF nei pazienti che venivano sottoposti a trapianto aploidentico, mismatched MUD e MUD. Un altro dato interessante che è stato messo in luce è l'importanza della tempistica tra la diagnosi di mielofibrosi e il trapianto di midollo: pazienti che effettuavano la procedura trapiantologica entro i due anni dalla diagnosi avevano prognosi migliore, indipendentemente dal tipo di donatore. Questo aspetto dovrà essere ulteriormente analizzato in quanto potrebbe essere alla base di bias nell'analisi degli outcome relativi al tipo di donatore utilizzato: è evidente che pazienti sottoposti ad HSCT che non hanno donatori familiari disponibili possono perdere la finestra temporale adeguata per essere avviati a procedura trapiantologica in attesa di un donatore da registro, mentre coloro che hanno donatori familiari HLA identici elegibili possono procedere molto più rapidamente.

IN conclusione, in assenza di studi randomizzati e alla luce dei risultati ad oggi disponibili, le raccomandazioni fornite dall'EBMT considerano i donatori HLA identici ancora la prima scelta, seguiti da MUD. Outcome simili sono stati visti nei pazienti con donatore aploidentico o 7/8 MMUD.

Sorgente cellulare di staminali emopoietiche e dose ideale di cellule infuse

Nonostante non esistano studi comparativi relativi all'utilizzo di cellule staminali periferiche e midollari, la fonte cellulare preferita è rappresentata dal sangue periferico dopo stimolazione con fattore di crescita. Tale procedura, infatti, garantisce una mobilitazione maggiore dei progenitori emopoietici e, di conseguenza, un maggior numero di cellule staminali raccolte, con un effetto positivo sull'attecchimento. **(32)**. Il numero ideale di cellule staminali cd34+ da infondere nei pazienti con donatore HLA identico o MUD dovrebbe essere superiore od uguale alle 7.0×10^6 pro/kg di peso, in quanto è associato ad OS e PFS migliori, a fronte di una ridotta TRM. **(33)**.

Regimi di condizionamento

Dal momento che sono pochi i dati diretti provenienti da studi prospettici, risulta difficile determinare l'intensità ottimale del condizionamento e la scelta del trattamento. Uno studio retrospettivo ha confrontato gli esiti tra condizionamento mieloablativo e condizionamento a bassa intensità per il trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche (HSCT) in pazienti con mielofibrosi tra il 2000 e il 2014. **(34)**

Non sono state evidenziate differenze in termini di sopravvivenza a 5 anni tra i due tipi di condizionamento (53% vs 51% di OS nei pazienti sottoposti a MAC rispetto a RIC), tuttavia è importante sottolineare che, per quanto riguarda le stime non aggiustate della sopravvivenza libera da GVHD o libera da recidiva a 5 anni, questo studio ha suggerito un beneficio del condizionamento mieloablativo rispetto a quello a bassa intensità, aspetto da considerare per pazienti giovani, in buona salute, idonei al condizionamento mieloablativo.

Visto che negli ultimi anni la percentuale di pazienti anziani e/o con ridotta fitness sono stati candidati a trapianto, si è reso necessario indagare l'efficacia di regimi di condizionamento a minore intensità. Non esistono evidenze dirette per raccomandare un regime preferenziale, ma un'ampia gamma di regimi di condizionamento Low intensity ha mostrato una mortalità accettabile legata al trapianto e una sopravvivenza globale soddisfacente.

Il primo studio di prospettico in questa coorte di pazienti ha analizzato gli outcome relativi ai regimi di condizionamento che utilizzavano schemi con fludarabina e busulfano **(35)**, la TRM ad un 1 anno è stata del 16%, con una sopravvivenza globale stimata a 5 anni del 67%. Inoltre, dati da registro suggeriscono che la associazione busulfano fludarabina abbia risultati migliori nel condizionamento a bassa intensità **(37)**. Recenti studi retrospettivi hanno analizzato l'impatto di altre combinazioni con fludarabina più busulfano e fludarabina/melphalan, tuttavia da queste analisi non si è evinto un beneficio clinico accertato e altre analisi prospettiche andranno effettuate per dettare indicazioni più precise. **(36,37)**.

Profilassi GvHD

Come per le altre patologie, la scelta della profilassi per la GvHD è strettamente legata al tipo di donatore scelto.

Nel contesto del condizionamento mieloablativo con donatore HLA-identico, la profilassi per GVHD abituale è una combinazione di inibitori della calcineurina e un breve ciclo di metotrexato. In caso di condizionamento mieloablativo e donatori MUD 8/8, il siero antilinfocitario di coniglio è risultato efficace nella riduzione di GVHD acuta e cronica in due studi, con conseguente sopravvivenza globale significativamente più lunga. Tuttavia, questi studi randomizzati non erano focalizzati sulla mielofibrosi e nella maggior parte dei casi non includevano pazienti con questa patologia. Uno studio retrospettivo del registro EBMT ha analizzato il ruolo del ATG in pazienti con mielofibrosi che hanno ricevuto un trapianto da donatore HLA identico, riportando un vantaggio in termini di incidenza di GVHD acuta quando il siero antilinfocitario veniva aggiunto, mentre l'incidenza di GVHD cronica era simile. **(38)**.

Nei pazienti con mielofibrosi, il trapianto aploidentico con ciclofosfamide post è stato riportato in studi retrospettivi con risultati incoraggianti. Un approccio di condizionamento a bassa intensità con ciclofosfamide, fludarabina, irradiazione corporea totale con ciclofosfamide post-trapianto, tacrolimus e sirolimus come profilassi GVHD in pazienti con mielofibrosi trapiantati da donatori MUD e MMUD ha mostrato una bassa incidenza di GVHD cronica ma un tasso elevato di recidive a 3 anni. L'esperienza del nostro centro **(30)**, seppur con un discreto numero di fonti di cellule staminali da BM, ha mostrato la fattibilità e l'efficacia della ciclofosfamide post-trapianto in termini di profilassi contro aGVHD.

Management post-trapianto

Il decorso post trapianto può essere molto complesso nei pazienti con mielofibrosi, in quanto tale patologia come già visto è caratterizzata da un microambiente midollare ostile (fibrosi midollare, citochine proinfiammatorie, sovraccarico marziale per il pregresso supporto trasfusionale elevato e cronico), oltre ad una elevata frequenza di Graft failure/poor graft function, a volte legate ad una splenomegalia bulky molto rilevante.

Graft failure, poor graft function e ricaduta: definizioni e outcome

Recentemente, l'EBMT ha stilato le definizioni di attecchimento, PGF, GF e ricaduta per migliorare la gestione di tali evenienze e renderla il più possibile uniforme, non essendoci ad oggi una pratica che faccia da linea guida. **(39)**

L'attecchimento è definito come la presenza per almeno 3 giorni consecutivi di una conta di neutrofili $> 0.5 \times 10^9 /L$, senza utilizzare fattori di crescita granulocitari. Per quanto concerne la serie piastrinica, il limite è di una conta $> 20 \times 10^9 /L$ per 7 giorni senza trasfusioni.

Nel momento in cui compaiono delle citopenie, dunque, è necessario inquadrarle per escludere un quadro di poor graft function e/o graft failure, che generalmente non sono transitorie, come invece possono essere le citopenie che insorgono come conseguenza di farmaci, gvhd, carenze vitaminiche e farmaci mielotossici.

Per graft failure si intende la presenza di $ANC < 0,5 \times 10^9 /L$, $plt < 20 \times 10^9$ ed infine $Hb < 80$ g/L dopo il giorno +28. Può essere primaria se non è mai avvenuto un vero e proprio attecchimento o secondaria, quando si sviluppa dopo un iniziale attecchimento.

Tale evenienza ha un forte impatto sulla sopravvivenza e sulla morbilità del trapianto, in quanto la OS a 5 anni, secondo alcuni studi, non supera il 15%; è perciò fondamentale identificare già prima della procedura trapiantologica tutti quei fattori di rischio che possono impattare sull'attecchimento, come una splenomegalia bulky, la scelta del donatore e la dose di $cd34+$ infuse. Altri dati stanno emergendo come possibili fattori di rischio per la GF, come un alto titolo di anticorpi anti HLA, che andrebbero effettuati routinariamente nei pazienti con donatori mismatched o aploidentici.

La graft failure va tempestivamente diagnosticata e trattata, ad oggi l'unica terapia possibile è sottoporre il paziente ad un secondo trapianto allogenico.

Per Poor graft function non esistono delle vere e proprie definizioni riconosciute universalmente. Quella utilizzata dall'EBMT correntemente è la presenza di 2 o 3 citopenie che durano più di 2 settimane, dopo il giorno 28 e in presenza di un chimerismo completo del donatore ($>95\%$).

Ad oggi non esistono strategie ad hoc per prevenire l'insorgenza di PGF, il management attuale prevede l'utilizzo di fattori TPO-mimetici per la serie piastrinica, oltre ai fattori di crescita per il miglioramento dell'anemia e dei neutrofili (rispettivamente eritropoietina e G-CSF), tuttavia queste strategie sono maggiormente indicate come ponte prima di altri trattamenti definitivi, rappresentati dall'infusione di un boost di cellule $cd34+$, senza precedente condizionamento e in assenza di gvhd. In alcuni studi, tassi di risposta si sono

verificati fino al 81% dei pazienti e , a differenza della GF, la PGF sembra non intaccare la sopravvivenza globale.

Nel setting non trapiantologico, la valutazione della remissione completa dipende da dati clinici e anatomopatologici ed è definita da cellularità midollare normale, blasti midollari < 5%, Hb >100 g/L, plt >100mila/mmc, ANC 1000/mmc ed infine < 2% precursori mieloidi in circolo. Clinicamente, sono inoltre da valutare l'assenza dei sintomi, la riduzione della splenomegalia (che non deve essere più palpabile) e infine l'assenza di ematopoiesi extramidollare.

In ambito trapiantologico, la questione diventa ulteriormente complicata dal fatto che le ricadute molecolari e morfologiche andrebbero distinte in quanto suscettibili di trattamenti diversi.

Per quanto riguarda la ricaduta morfologica, la sola persistenza nei primi 12 mesi dopo il trapianto, specialmente se stabile, di fibrosi midollare non è considerabile come una franca ricaduta. Gli scenari possibili sono rappresentati dalla ricomparsa (dopo precedente normalizzazione) delle caratteristiche tipiche della mielofibrosi (ipercellularità midollare, fibrosi ecc) oppure dal peggioramento o accelerazione della malattia con comparsa di monocitosi e/o mielodisplasia.

In merito alla definizione di ricaduta molecolare/persistenza di MRD, questa è complicata dalla non lineare cinetica della clearance del trascritto post trapianto. È comunemente accettato che una MRD detectabile dopo 3-6 mesi sia un fattore di rischio alto per comparsa di ricaduta clinica.

Infine, è ormai assodato che la comparsa di chimerismo misto (MC), in qualsiasi patologia mieloida, è correlato con la ricaduta. Analizzando dati di pazienti con mielofibrosi e con perdita del chimerismo del donatore, la quasi totalità sviluppava nei mesi successivi una ricaduta , con una DFS nei 4 anni successivi del 4%.

Il trattamento della ricaduta dipende fondamentalmente dal tipo di relapse cui il paziente è andato incontro. Di fronte ad una ricomparsa del trascritto molecolare o ad una sua persistenza, è ormai assodato che l'infusione di linfociti del donatore (DLi) siano una strada percorribile con lo scopo di ottenere una RC molecolare, target che diventa estremamente più complicato quando si sia in presenza di una ricaduta clinica. In tale evenienza, l'utilizzo

di DLI è sconsigliato in virtù del suo rischio di aGVHD a fronte di uno scarso beneficio in termini di risposta.

3 Metodi

3.1 Pazienti e scelta di donatore, condizionamento e profilassi GvHD

Lo studio, retrospettivo ed unicentrico, è stato condotto su una popolazione di 99 pazienti consecutivi affetti da mielofibrosi e sottoposti a trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche presso il “Centro di trapianto di cellule staminali e terapie cellulari” dell’IRCCS Policlinico San Martino dal gennaio 2012 al febbraio 2024.

I pazienti inclusi nello studio avevano una diagnosi di mielofibrosi, primitiva o secondaria a policitemia vera o trombocitemia essenziale ed erano eleggibili a trapianto allogenico sulla base del rischio (DIPSS intermedio 2-alto) o, nei casi di rischio evolutivo più basso, se presenti altri parametri clinici come trasfusione dipendenza, scarsa o assente risposta a ruxolitinib, presenza di blasti in periferia e presenza di mutazioni ad alto rischio (ASXL1, IDH1, IDH2, EZH2, U2AF1 e SRSF2 secondo MIPSS 70+ 2.0)

Sono stati inclusi tutti i tipi di donatori: HLA identici, familiari e da registro, e non HLA identici, familiari aploidentici e non familiari diversi per 1 locus dell’HLA (7/8 mismatched unrelated) le fonti cellulari utilizzate sono state le cellule staminali da sangue periferiche (fresche o criopreservate) e midollo osseo.

Per quanto riguarda il condizionamento, sono stati utilizzati regimi mieloablativi (MAC) o nei pazienti con età superiore a 60 anni o quelli con comorbidità (HCT-SCI superiore o uguale a 3), regimi a intensità ridotta (RIC) **(40)**. L’intensità del condizionamento è stata valutata, con più precisione, con la classificazione proposta da Spyridonidis **(41)**, che individua tre classi ad intensità di condizionamento differenti con una precisione maggiore rispetto alla storica differenza tra condizionamenti MAC e RIC. Infatti, per calcolare l’intensità di un regime di condizionamento, ad ogni singolo farmaco ed alla dose utilizzata viene assegnato un punteggio, la somma dei punteggi dei singoli farmaci e delle singole dosi consente di classificare il condizionamento come a bassa (1 – 2), intermedia (2,5 – 3,5) o alta (4 – 5) intensità.

Component	Dose level			Added points for each dose level
	Low	Intermediate	High	
TBI fractionated (Gray)	≤5	6–8	≥9	1
Busulphan (mg/kg)	≤6.4 iv & ≤8 po	9.6 iv & 12 po	12.8 iv & 16 po	1
Treosulfan (g/m ²)	30	36	42	1
Melphalan (mg/m ²)	<140	≥140	≥200	1
Thiotepa (mg/kg)	<10	≥10	≥20	0.5
Fludarabine (mg/m ²)	≤160	>160		0.5
Clofarabine (mg/m ²)	≤150	>150		0.5
Cyclophosphamide (mg/kg)	<90	≥90		0.5
Carmustine (mg/m ²)	≤250	280–310	≥350	0.5
Cytarabine (g/m ²)	<6	≥6		0.5
Etoposide (mg/kg)	<50	≥50		0.5

iv intravenously, *po* per os, *TBI* total body irradiation.

Tabella 4 Score pesato su intensità per i comuni chemioterapici utilizzati nei regimi di induzione (Spyridonidis A. et al, Bone Marrow Transplant, 2019)

Gli schemi utilizzati generalmente erano comprensivi di doppio alchilante (generalmente busulfano 9.6 mg/kg associato a thiotepa 10 mg/kg) più fludarabina (TBF3). Per ridurre l'intensità, quando necessario, una dose di busulfano è stata omessa, per un dosaggio totale pari a 6.4 mg/kg ev (TBF 2; TBF 2 ridotto). Per alcuni pazienti è stato utilizzato un regime di condizionamento con un solo alchilante (tiotepa, melfalan o busulfano) + fludarabina. **(42,43,44)**

La scelta della profilassi per la Gvhd dipende dal tipo di donatore selezionato:

- Trapianto da donatore HLA identico da PB o da donatore HLA identico non familiare (MUD): combinazioni di ciclosporina ev in infusione continua (1,5 mg/kg, mantenendo una concentrazione ematica compresa tra 200 e 300 mcg/L) + metotrexate short course (15 mg/m² + 1, 10 mg/m² +3,+6, +11)+ siero antilinfocitario (Thymoglobulin alla dose di 4 – 5 mg/kg da -3 a-1);

- Trapianto da donatore familiare HLA identico BM: combinazioni di ciclosporina ev in infusione continua (1,5 mg/kg, mantenendo una concentrazione ematica compresa tra 200 e 300 mcg/L) + metotrexate short course (15 mg/m² + 1, 10 mg/m² +3, +6, +11);

-Trapianto da donatore aploidentico BM: ciclofosfamide post trapianto (PTCy) ai giorni + 3 e +5 dall'infusione, per un dosaggio totale di 100 mg/kg + micofenolato mofetile dal giorno 0 al giorno +28 al dosaggio di 15 mg/kg ogni 12 ore + ciclosporina dal giorno 0 ev in infusione continua (1,5 mg/kg, mantenendo una concentrazione ematica compresa tra 200 e 300 mcg/L);

-Trapianto da donatore aploidentico PB: ciclofosfamide post trapianto (PTCy) ai giorni + 3 e + 4 dall'infusione, per un dosaggio totale di 100 mg/kg + micofenolato mofetile dal giorno +5 al giorno +28 al dosaggio di 15 mg/kg ogni 12 ore +ciclosporina dal giorno +5 (1,5 mg/kg, mantenendo una concentrazione ematica compresa tra 200 e 300 mcg/L).

3.2 Obiettivi e scopi dello studio.

L'**obiettivo primario** dello studio è stato la ricerca di fattori associati ad una migliore sopravvivenza nella coorte di pazienti studiati.

Gli obiettivi secondari dello studio sono stati: la sopravvivenza globale (OS) +2 anni dal trapianto, sopravvivenza libera da recidiva di malattia (RFS) (+2anni), sopravvivenza libera da GVHD e/o recidiva (GRFS) (+2 anni), incidenza cumulativa (CI) di GVHD acuta a +120 giorni e di GVHD cronica a 2 anni, IC della NRM e della recidiva a+2anni. Sono stati, inoltre, studiati i tempi della ricostituzione ematologica (attecchimento di neutrofili e piastrine), l'incidenza di graft failure (GF) e di poor graft function (PGF) (+2 anni).

3.3 Analisi statistica e definizione di OS, PFS, GRFS.

Nella comparazione di variabili continue sono stati utilizzati i test U di Mann-Whitney o in alternativa il test di Kruskal-Wallis, per le variabili discrete invece è stato utilizzato il test del χ^2 o il test di Fisher.

L'**overall survival (OS)** è stata calcolata dal giorno del trapianto al giorno della morte, mentre la **progression free survival** dalla data del trapianto alla data di recidiva o dalla data di decesso.

Per quanto riguarda **la GRFS** (graft and relapse free survival) si intende la sopravvivenza libera da recidiva e da GvHd e sono state calcolate dalla data del trapianto alla data della prima recidiva o dalla comparsa di GvHd acuta di grado III o IV o cGvHD severa o dalla morte.

Le probabilità di OS, PFS e GRFS sono state calcolate usando il metodo Kaplan-Meyer e i dati sono stati raccolti a 24 mesi (2 anni). I pazienti ancora in FUP al momento dell'analisi sono stati censorizzati.

La probabilità di NRM, ricaduta, aGvHD e cGhVd sono state calcolate in termini di stima di incidenza cumulativa per tenere conto dei rischi competitivi, con la progressione di malattia e la morte senza progressione come rischi competitivi per NRM e ricaduta, rispettivamente, e la morte come rischio competitivo per GVHD. In particolare, l'IC di aGVHD e di cGVHD sono state calcolate rispettivamente a 120 giorni e a 2 anni dal trapianto.

L'analisi univariata è stata effettuata utilizzando la regressione di Cox per OS e PFS, mentre per NRM e ricaduta con il modello a rischi competitivi di Fine-Gray. Un livello di p considerato significativo (pari a 0.15) ha permesso di proseguire con l'analisi multivariata. Tutti i risultati sono stati espressi in termini di hazard ratio (HR), con il corrispettivo intervallo di confidenza al 95%.

L'analisi univariata per OS e PFS ha tenuto conto delle seguenti variabili: Età al trapianto (<65 vs >o uguale a 65 anni), presenza di mutazione di CALR, Ruxolitinib al trapianto, pregressa splenectomia, dimensioni della milza >22 cm, Indice di comorbidità di "SORROR" (uguale o> a 3 verso < a 3), CMV (Ig G positività del ricevente), ABO incompatibilità maggiore, fonte cellulare (BM vs PB), CD34+ contenute nel graft (> 7x 10⁶/kg), PTCy verso thymoglobulin, donatore (matched vs mismatched), età del donatore (<35 vs >o uguale a 35 anni) e intensità del condizionamento (< 3,5 vs > o uguale).

3.4 Definizione e criteri di attecchimento, GF, relapse, aGVHD e cGVHD.

L'attecchimento post trapianto allogenico è definito dalla conta dei neutrofili > 0.5 x 10⁶/L per almeno 3 giorni consecutivi senza l'utilizzo di fattori di crescita.

L'attecchimento delle piastrine è definito dalla conta piastrinica > alle 20 x 10⁹/L senza supporto trasfusionale per 7 giorni. **(39)**

In presenza di una conta neutrofilica inferiore a 0.5 x 10⁶, una volta escluse altre cause (GvHd, tossicità da farmaci, infezioni e altro) sono state definite le seguenti condizioni:

- GRAFT FAILURE (GF): non è mai stata raggiunta una soglia sufficiente per stabilire l'attecchimento e/o l'assenza di un chimerismo >95% nei primi 45 giorni dal trapianto (GF

primaria), la GF può anche essere secondaria in caso di ricomparsa di neutropenia $< 0.5 \times 10^6/L$ e/o una perdita del chimerismo dopo un precedente engraftment;

- POOR GRAFT FUNCTION, intesa come presenza di due o tre linee citopeniche persistenti in presenza di un chimerismo del donatore completo, in assenza di cause riconosciute di citopenia (infezioni attive, GVHD o relapse). Anche in questo caso possiamo suddividere il quadro in primitiva e secondaria, quando non si abbia raggiunto una ripresa ematologica stabile nel primo caso, o si sia persa dopo iniziale ricostituzione nel secondo. ¹

Per definire la ricaduta post trapianto sono state utilizzate le raccomandazioni fornite dall'EBMT (39). Sono disponibili criteri morfologici, molecolari e ottenuti dallo studio del chimerismo. In particolare:

- I criteri morfologici di ricaduta comprendono un aumento della cellularità midollare correlata all'età e un anormale rapporto tra serie mieloide ed eritroide, anomalie megacariocitarie tipiche di MF ed aumento della quota di fibrosi collagene e reticolinica². Inoltre, è necessario aver accertato precedentemente la regressione a livello midollare delle caratteristiche tipiche della mielofibrosi. La progressione di malattia o una sua accelerazione dopo trapianto è definita come l'evidenza di mielodisplasia (escluse alterazioni post chemioterapia), monocitosi persistente non attribuibile ad altre cause, incremento della quota blastica e/o insorgenza di leucemia mieloide acuta;
- La persistenza/recidiva molecolare è più difficilmente definibile, in quanto la cinetica di clearance dell'MRD è variabile e non univocamente definita. È ragionevole considerare una persistenza di malattia quando il trascritto molecolare è presente a distanza di 3-6 mesi dal trapianto. La recidiva molecolare deve essere considerata quando ricompare il trascritto dopo precedente negativizzazione; tale dato deve essere confermato su due campioni consecutivi, raccolti da PB a distanza di 28 giorni l'unico dall'altro;
- Comparsa di chimerismo misto definito come riduzione del chimerismo del donatore $<95\%$ dopo il giorno +30 dal trapianto.

¹ Si segnala che per quanto riguarda la PGF, le citopenie possono essere meno profonde (ANC <1500 a/o PLT <30.000 a/o Hb $<85g/L$).

² Questo parametro deve essere attentamente valutato, in quanto la fibrosi midollare potrebbe non regredire nei mesi successivi il trapianto.

La non relapse mortality è stata definita come la morte non dovuta a ricaduta o progressione di malattia.

In merito alle definizioni cliniche e del grading di aGVHD e cGVHD, sono stati utilizzati i criteri standardizzati dal consorzio internazionale di “Mount Sinai acute GVHD” e dal “National Institutes of Health”. **(45-46)**

4 Risultati

4.1 Pazienti e caratteristiche basali al trapianto

In totale, sono stati analizzati i dati relativi a 99 pazienti affetti da mielofibrosi, di cui 47 affetti da una forma primitiva e 52 da una forma secondaria (34 post PV e 18 post TE). L'età mediana al trapianto è di 61 anni (range 30 - 75 anni), il 56% dei pazienti è stato sottoposto a trapianto entro i due anni dalla diagnosi. Il profilo mutazionale era disponibile in 89 pazienti, suddiviso come segue: il 67 % presentava la mutazione JAK2, il 16,8% CALR, il 3.3% di MPL, mentre il 10% dei pazienti aveva una malattia tripla negativa.

I pazienti con rischio DIPSS intermedio 2-alto sono risultati essere pari a l'81%, inoltre riguardo alle altre caratteristiche cliniche sfavorevoli ed espressive di alto carico di malattia sono stati analizzati i seguenti parametri: blasti periferici > o uguali all'1% (71,2%); citogenetica sfavorevole (13% dei pazienti su 76 di cui il dato è disponibile); profilo mutazionale ad alto rischio secondo GPSS e MIPSS 70+ (12 su 21 pazienti analizzati). Il dato relativo alle comorbidità calcolato con l'HCT-SCI (indice di "Sorrow") disponibile in 88/99 pazienti è risultato essere alto (e quindi predittivo di mortalità da complicanze del trapianto) in 20 pazienti (22.7%). Per quanto riguarda la gestione terapeutica pre-trapiant, 56 pazienti sono stati esposti a ruxolitinib prima della procedura per un tempo mediano di 8.5 mesi (range 1-150 mesi) ed erano in risposta al trapianto 28 pazienti, mentre la splenectomia è stata praticata in 20 (20%) dei pazienti. Dei 78 pazienti che non sono stati splenectomizzati, 11 pazienti (14%) sono arrivati al trapianto con un diametro longitudinale della milza >22 cm.

Caratteristiche	Risultati
Età mediana al trapianto, anni (range)	61 (30-75)
Sesso	
maschi n, (%)	58 (58%)
femmine n, (%)	41 (41%)
Mediana di giorni trascorsi tra diagnosi e trapianto (range)	580,5 (51-5640)
Mesi da diagnosi a trapianto	
> 2 anni da diagnosi	43 (43,4%)
< o uguale a 2 anni da diagnosi	56 (56,6%)
Patologia	
PMF	47 (47,4%)
post-ET	34 (34,3%)
post-PV	18 (18,2%)
DIPSS, n (%) 95 pazienti noti	
low-int1	18 (19%)
int2-high	77(81%)
Mutazioni driver n(%) (89 pazienti noti)	
JAK2	60 (67%)
CALR	15 (16,8%)
MPL	3 (3,3%)
Triple negative	11 (12,3%)
HRM, (21 pazienti)	12 (21)
Blasti periferia (94 pazienti)	
> o = 1%	67 (71,2%)
<1%	27 (28,8%)
Citogenetica sfavorevole, n(%) 76 pazienti	10 (13%)
Splenectomia, n(%)	20 (20%)
Diametro milza , cm (range); 78 pazienti	
milza > 22 cm, n(%)	11 (14%)
milza < o uguale 22 cm , n(%)	67 (85%)
Mediana diametro milza al trapianto (cm)	19, 5 cm
Progressa esposizione a ruxolitinib , n(%)	56 (56%)

Tabella 5: Caratteristiche dei pazienti

In merito al tipo di donatore selezionato, 32 pazienti sono stati trapiantati da un donatore HLA identico: familiare in 13 casi e non familiare in 19; mentre 67 pazienti sono stati trapiantati da un donatore non HLA-identico: familiare aploidentico in 63 pazienti e non familiare (mismatched-MUD 7/8) in 4 pazienti. L'età mediana del donatore è stata di 34 anni (range 17 - 66 anni). Per 66 pazienti (66%), la fonte di cellule staminali utilizzata è stata il midollo osseo, in tutti gli altri pazienti (33) è stato utilizzato il sangue periferico, in nessun caso sono state trapiantate cellule staminali da cordone ombelicale. In 13 donatori (13%) le cellule staminali raccolte (solo periferiche) sono state criopreservate, pratica che si è andata a consolidare principalmente durante il periodo della pandemia da Sars-COV 2.

La quasi totalità dei pazienti (89/99) è stata sottoposta a regimi di condizionamento contenenti schemi di chemioterapia con un doppio alchilante (tiotepa e/o busulfano e/o alkeran). L'intensità dei regimi di condizionamento è risultata bassa, intermedia o alta rispettivamente nel 12, 66 e 21 pazienti. In particolare, il regime di condizionamento più

utilizzato è stata la tripletta con TBF: tiotepa, fludarabina, busulfano con dosaggi diversi a seconda dell'età dei pazienti e delle comorbidità al trapianto (TBF3 in 27 casi, TBF2 in 60).

La dose mediana di cellule cd34+ infusa è di 6.1×10^6 /kg (range 3.04-12.9) nel caso di aferesi da sangue periferico, mentre quella di nucleate totali, nel caso del midollo osseo è di 3.29×10^9 /kg (range 1.58-7.65). La maggior parte dei pazienti (65/99) era gruppo sanguigno compatibile con il donatore (sistema ABO), mentre gli altri mostravano una incompatibilità di gruppo (maggiore 15/99, minore 15/99, bidirezionale 4/99).

Caratteristiche	Risultati
SORROR, 88 pazienti	
> o uguale a 3	20 (22,7%)
< 3	68 (77,3%)
Tipo di donatore	
Familiare HLA-id	13 (13,1%)
MUD	19(19,2%)
MMUD	4 (4,0%)
Aploidentico	63 (63,7%)
Sorgente	
BM	66 (66,7%)
PB	33 (33,3%)
Fresco vs congelato	
Fresh	86 (86%)
Crio	13 (13%)
Età del donatore, aa, mediana (range)	34 (range 17-66 anni)
Profilassi GvHD	
CSA+MMF+PT-CY	44 (44%)
CSA+PT-CY	22 (22%)
CSA+MTX	9 (9%)
CSA+MTX+ATG	23 (23%)
ABO	
compatibile	65 (65,7%)
incompatibilità maggiore	15 (15,1%)
incompatibilità minore	15 (15,1%)
Incompatibilità bidirezionale	4 (4,1%)
CMV don/ric (97 pazienti disponibili)	
+/+	45 (46,3%)
+/-	6 (6,2%)
-/+	33 (34,1%)
-/-	13 (13,4%)
Condizionamento (BMT 2019)	
Low intensity	12
intermediate intensity	66
High intensity	21
Condizionamento (senza CY)	
Low intensity	22
intermediate intensity	76
High intensity	1
CD34+ x 10^6/kg infuse, mediana (range)	4,34 (1,04-9,05)
TNC dose x 10^8 infuse, mediana (range)	3,94 (1,58-16,4)
CD3+ x 10^6/kg infuse, mediana (range)	38,795 (2,3-398)

Tabella 6: Caratteristiche trapiantologiche

4.2 Graft function

LO studio dell'attecchimento è stato possibile in 95/99 pazienti, 4 sono deceduti prima del giorno +30 in aplasia per complicazioni legate al trapianto (infezioni fungine, emorragia SNC). Settacinque pazienti (75/95) hanno raggiunto il chimerismo completo con attecchimento dei neutrofili. Il tempo mediano dell'attecchimento dei neutrofili è stato di +20 giorni dal trapianto (range +10-+62), il tempo mediano di attecchimento piastrinico è di +29 (range +13-202). L'IC di attecchimento dei neutrofili a +45 giorni è stata del 79.8% (CI 95%: 71.8-86.8), mentre l'IC di attecchimento delle piastrine a +45 giorni è del 55.6% (CI 95%: 46.6-64.6).

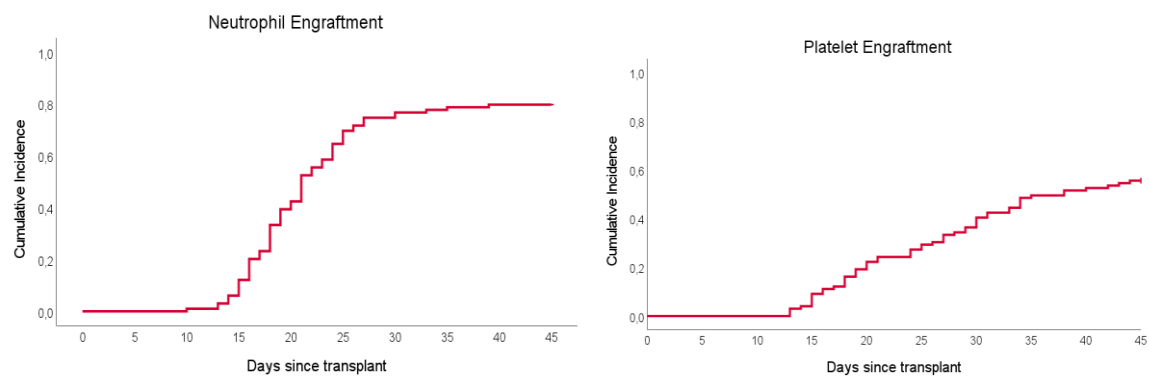


Figura 1: IC attecchimento neutrofili +45 (A) e piastrine +45 (B).

Un mancato attecchimento o graft failure si è verificato in 24 pazienti (25%). Tra questi, 12 sono deceduti (7 per tossicità e 5 per relapse), 6 sono stati sottoposti a II° trapianto allogenico e quindi sono stati censurizzati all'inizio del secondo condizionamento, 2 pazienti hanno ricevuto un boost di cd34+ senza ulteriore condizionamento, ed una paziente è stata persa al FUP.

4.3 GVHD

A 120 giorni dal trapianto, l'incidenza cumulativa (IC) di GvHD acuta di grado II-IV è stata del 21.2% (CI 95%: 14-31 e di aGVHD di grado III e IV è stata del 7% (CI 95% 3-14).

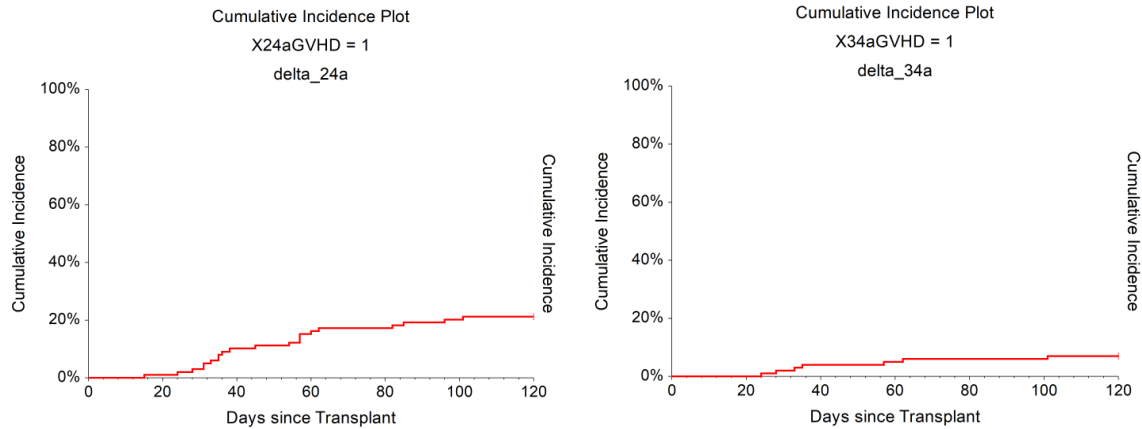


Figura 2: IC aGVHD II-IV grade (A) e III-IV grade (B)

L'IC di GVHD cronica di ogni grado a 2 anni è stata del 15% (CI 95%: 9-25), mentre l'IC di GVHD cronica moderata/severa a 2 anni dal trapianto è del 12% (CI 95% 6-21).

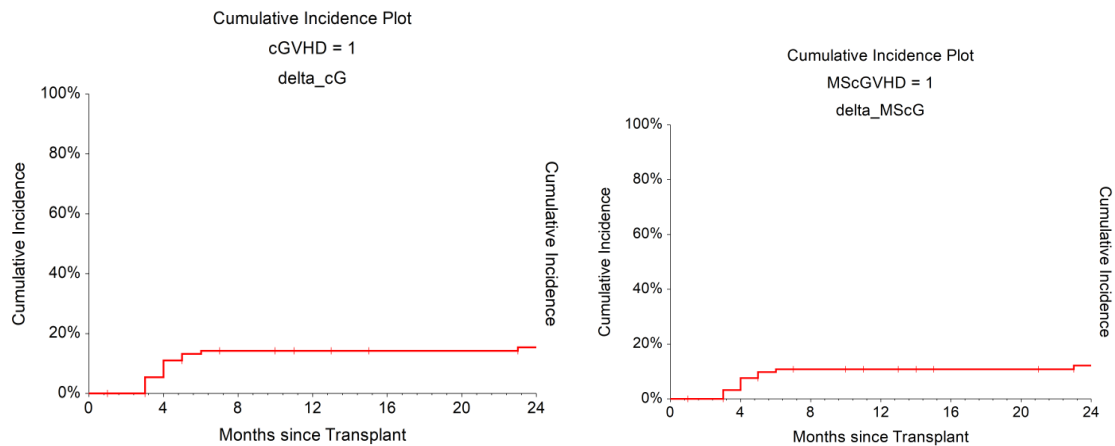


Figura 3: IC cGVHD globale (A) e moderata/severa (B).

La presenza di una sierologia donatore/ricevente del CMV negativo/positivo è associato ad una maggiore incidenza di GVHD cronica globale (IC a 2 anni di GVHD cronica pari a 25%, CI 95%: 13-45) rispetto allo status CMV donatore/ricevente pos/pos; neg/neg e pos/neg (IC a 2 anni di GVHD cronica pari a 10% (95% CI: 4-21) (RR 2.5, p=0.018).

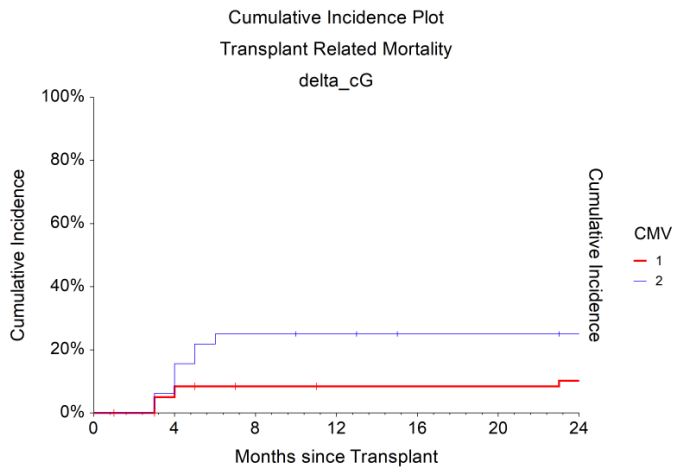


Figura 4: IC cGVHD moderata severa stratificata per status CMV. ROSSO: CMV neg/pos; BLU: CMV neg/neg, pos/pos, pos/neg.

4.4 NRM e ricaduta

L'incidenza cumulativa di NRM e di ricaduta a 2 anni è stata rispettivamente del 21% (CI 95% 14-31) e del 16 % (CI 95%: 11-28) (Figura 5)

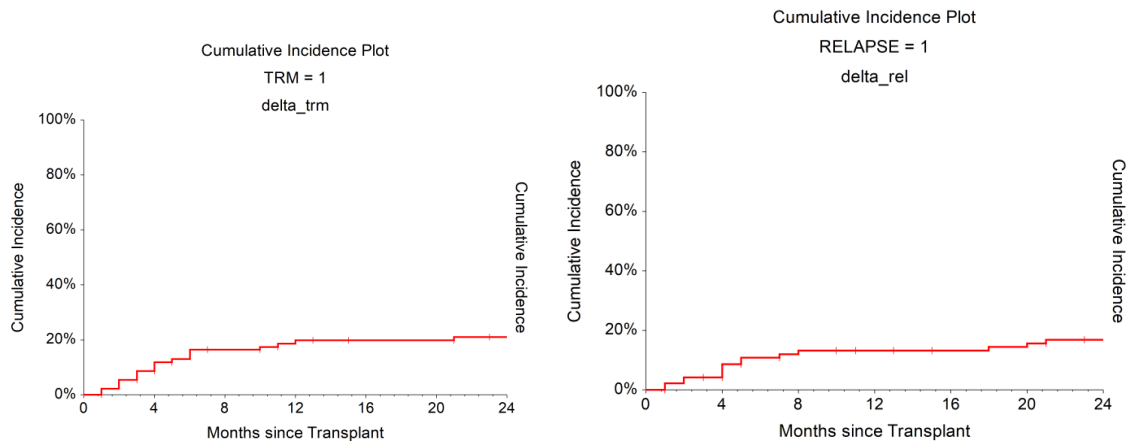


Figura 5: IC NRM (A) e RELAPSE (B) a 2 anni dal trapianto

In analisi univariata l'unico fattore associato ad un maggiore rischio di NRM a 24 mesi è risultato essere l'incompatibilità maggiore di gruppo sanguigno ABO (NRM 43%; 95 CI%: 25-79 vs 16%; 95% CI: 9-27; RR 2.6; p= 0.017 Gray's test), come mostrato dalla curva in Figura 6.

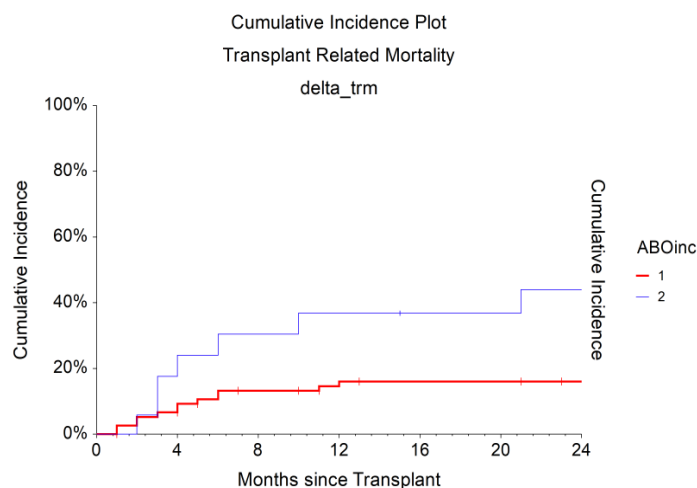


Figura 6: NRM stratificata secondo compatibilità ABO

Nessun fattore ha dimostrato una associazione con il rischio di recidiva.

4.4 Overall Survival (OS), Relapse free survival (RFS) e Graft and relapse free survival (GRFS)

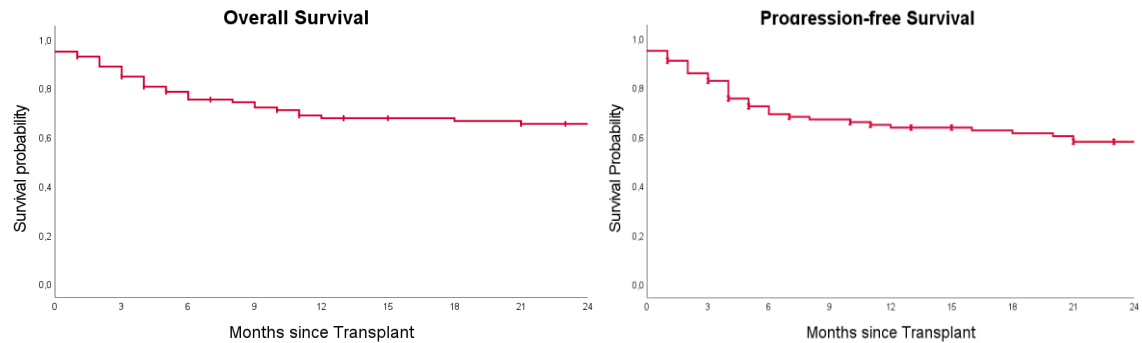
Il follow up mediano è stato di 36 mesi (range 0-148 mesi, CI 95%). L'OS globale a 2 anni dal trapianto è stata del 65.4% (IC 95%: 55,4 – 74.4%).

I fattori associati ad una peggiore OS sono stati in analisi univariata: l'età maggiore di 65 anni (HR 1,91; 95% CI 0,98-3,68; p= 0.06), l'indice di SORROR ≥ 3 (HR 1.92 CI 95%; 0.8-4.25; p=0.11), la presenza di ABO incompatibilità (HR 1.93, CI 95%: 0.96-3.87; p=0.07) e la pregressa splenectomia (HR 2.04, CI 95%: 1.04-4; p=0.04). (Tabella 7)

In analisi multivariata solo l'età del ricevente al trapianto oltre i 65 anni (HR =2.9, 95% CI: 1.31-6.39, p=0.08) e la pregressa splenectomia (HR=2.19, 95% CI: 1.01-4.74; p=0.04) sono risultate associate ad una peggiore sopravvivenza.

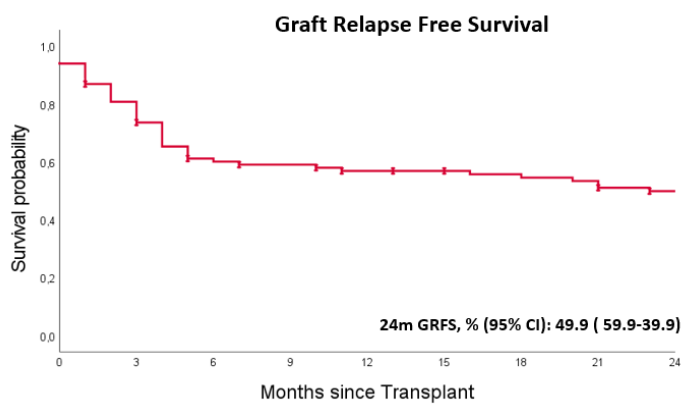
La RFS a 2 anni è del 57.9% (95% CI 48.9-66.9). Le variabili correlate con una RFS peggiore all'analisi univariata sono risultate: elevata età al trapianto (HR 1,74, CI 95%: 0,93-3,246; p=0.08), pregressa splenectomia (HR 1,95, CI 95%:1,03-3,68; p=0.04) e SORROR ≥ 3 (HR 2,13, CI 95%: 1,03-4,41; p=0.04).

In analisi multivariata, l'età al trapianto (HR 2,13, CI 95%:1,04-4,36; p=0.038) e la progressa splenectomia (HR 2,17, CI 95% 1,08-4,37; p=0.03) sono risultati fattori associati in maniera significativa ad una peggiore RFS.



A

B



C

Figura 7: Curve di OS (a), PFS (b) e GRFS (c) a 2 anni da trapianto.

Per quanto riguarda l'endpoint composito della GRFS, questa è risultata essere pari a 49.9 % (95 CI% 39.9-59.9). (Figura 7 C).

variabili	OS				PFS			
	Univariata HR (CI 95%)	p	Multivariata HR (CI 95%)	p	Univariata HR (CI 95%)	p	Multivariata HR (CI 95%)	p
età 65 anni ≥ o <	1,91 (0,98-3,68)	0,06	2,90 (1,32-6,4)	0,008	1,74 (0,93-3,246)	0,08	2,13 (1,04-4,36)	0,038
CALR vs non CALR	1,17 (0,45-3,01)	0,74			1,15 (0,47-2,64)	0,8		
Ruxo a trapianto vs no	0,74 (0,38-1,43)	0,37			0,67 (0,36-1,24)	0,2		
splenectomia VS no	2,04 (1,04-4,0)	0,04	2,19 (1,02-4,74)	0,05	1,95 (1,03-3,68)	0,04	2,17 (1,08-4,37)	0,03
milza > 22 cm vs <	1,01 (0,45-2,26)	0,97			1,22 (0,58-2,50)	0,58		
SORROR ≥ 3 vs <3	1,92 (0,8-4,25)	0,11	1,31 (0,55-3,10)	0,54	2,13 (1,03-4,41)	0,04	1,52 (0,70-3,33)	0,29
CMV IgG PAZ pos vs neg	0,90 (0,46-1,75)	0,75			0,92 (0,50-1,72)	0,5		
ABO inc maggiore vs comp	1,93 (0,96-3,87)	0,07	1,87 (0,83-4,20)	0,13	1,65 (0,84-3,27)	0,15		
BM vs PB	1,28 (0,62-2,62)	0,51			1,29 (0,65-2,55)	0,46		
CD34+ ≥7,0 vs <7,0 x 10 ⁶	1,32 (0,46-3,77)	0,6			1,08 (0,38-3,04)	0,89		
PTCY vs ATG	1,28 (0,63-2,58)	0,49			1,21 (0,64-2,31)	0,56		
donatore, mism vs matched	1,41 (0,68-2,90)	0,37			1,30 (0,67-2,52)	0,49		
età DON 35 anni ≥ vs <	1,68 (0,80-3,56)	0,17			1,22 (0,68-2,19)	0,51		
IC 3,5 ≥ vs <	0,71 (0,35-1,42)	0,33			0,74 (0,39-1,40)	0,35		

Tabella 7: Analisi univariata e multivariata delle variabili che impattano OS e PFS.

5. Discussione

Lo studio su questa coorte di pazienti affetti da mielofibrosi conferma che il trapianto di cellule staminali allogeniche è un'opzione valida e con intento guaritivo in una buona percentuale di pazienti. Infatti, in un gruppo di pazienti con età avanzata (età mediana al trapianto di 61 anni) e con una malattia per le sue caratteristiche biologiche difficilmente eradicabile, la OS (65,4%) e la EFS (57.9 %) a 2 anni dal trapianto sono risultate incoraggianti.

Tra i fattori associati alla sopravvivenza, l'analisi multivariata ha dimostrato che l'età superiore ai 65 anni e la splenectomia prima del trapianto sono le uniche variabili che hanno un impatto negativo su OS e PFS. In questa casistica e nella letteratura ingenerale, rimane un problema la mortalità secondaria a complicanze ed il mancato attecchimento.

Per quanto riguarda l'età al trapianto, diciassette dei 32 pazienti con più di 65 anni sono deceduti (53%), in linea con i dati presenti in letteratura: è noto, infatti, che i pazienti con età più avanzata abbiano un outcome trapiantologico peggiore per aumentata tossicità legata al trapianto **(47)** e per le maggiori comorbidità legate all'invecchiamento. Visto che la maggior parte dei pazienti affetti da mielofibrosi ha una età avanzata, per ridurre la mortalità per complicanze è necessario da un lato selezionare al meglio i pazienti candidabili al trapianto grazie all'aiuto degli score prognostici, dall'altro è necessario cercare di ridurre al minimo la tossicità legata alla procedura anche con l'utilizzo di regimi di condizionamento a tossicità ridotta.

Anche la splenectomia si è dimostrata avere un impatto negativo sulla OS (HR 2,19 CI 95%:1,02-4,74, p 0.05) e sulla PFS nella nostra coorte di pazienti. Questo risultato potrebbe essere dovuto a due motivazioni, non esclusive tra loro. IN primo luogo, i pazienti splenectomizzati avevano un carico di malattia più elevato rispetto a quelli in cui non è stata praticata la splenectomia e quindi possiamo aspettarci che maggiore sia la taglia di malattia, peggiore sia la prognosi. Inoltre, i pazienti sottoposti a questa procedura hanno tendenzialmente un rischio infettivo più alto e possono aver avuto complicanze post-operatorie (ad esempio trombosi venose del circolo mesenterico) che possono aumentare le comorbidità e, di conseguenza, peggiorare l'outcome del trapianto. In secondo luogo, la splenectomia viene generalmente effettuata in pazienti che avevano avuto una scarsa (se non assente) risposta al ruxolitinib prima del HSCT, dato che è associato ad una EFS peggiore rispetto ai pazienti trapiantati in risposta splenica **(26)**.

Un'altra riflessione è necessaria rispetto alla splenectomia: è stato descritto che i pazienti con splenomegalia hanno una difficoltà maggiore di attecchire con chimerismo completo e

crasi ematica trasfusione-indipendente. I pazienti che vengono splenectomizzati riescono ad attecchire meglio ed in maggiore quantità rispetto a quelli splenomegalici non splenectomizzati; quindi probabilmente sopravvivono più a lungo ed hanno tempo di ricadere. Infatti, il mancato attecchimento e/o una funzione midollare non completa, generalmente si associa ad un aumento di mortalità per complicanze, come avviene anche nella nostra casistica.

Nel corso degli anni sono stati effettuati vari studi per analizzare ulteriori variabili correlate con l'outcome trapiantologico. Uno studio retrospettivo dell'EBMT **(29)** ha dimostrato come il tipo di donatore selezionato sia un fattore di rischio indipendente per TRM (maggiore nei pazienti con donatori non familiari rispetto ai familiari), con una OS a 5 anni del 56% per HLA-identici familiari, 48% per MUD e 34% per MMUD. Più recentemente, grazie all'utilizzo della PT-CY si sono iniziati ad utilizzare anche donatori familiari aploidentici, tuttavia i dati a disposizione derivano da studi dove la percentuale di donatori aploidentici era molto bassa per poter trarre conclusioni significative. Per valutare la fattibilità di questo tipo di trapianto, il nostro centro aveva condotto una indagine retrospettiva con una coorte composta solamente da pazienti sottoposti a trapianto da donatori aploidentici **(30)**, mostrando un tasso di sopravvivenza accettabile e paragonabile ai risultati riportati in letteratura con studi effettuati con donatori diversi da quelli aploidentici.

Il nostro studio non ha evidenziato differenze statisticamente significative tra la scelta di donatori non HLA identici e quelli HLA identici (familiari e MUD), sia per quanto riguarda l'OS (HR 1.41, p= 0.37), che la PFS, la NRM e l'incidenza di GvHD, mostrando come questo tipo di scelta del donatore sia valida.

Anche la fonte di cellule staminali non ha mostrato avere un impatto sulla sopravvivenza dei pazienti, al contrario di quanto precedentemente dimostrato. Le raccomandazioni fornite dall'EBMT **(24)**, considerate le maggiori difficoltà di attecchimento nella mielofibrosi, consigliavano di utilizzare il sangue periferico come fonte di cellule staminali emopoietiche previa stimolazione con fattori di crescita. Infatti, sebbene non esistano studi prospettici che comparino l'utilizzo di BM e PB, quest'ultima fonte sembrerebbe garantire una maggiore cellularità in termini di CD34+ ed un maggior numero di linfociti nel graft, il che garantirebbe un migliore attecchimento e quindi una migliore sopravvivenza **(33)**. Nel nostro studio abbiamo utilizzato nel 66% dei casi il BM come fonte cellulare per ridurre la GvHD, in quanto la nostra coorte di pazienti era stata sottoposta principalmente a trapianti aploidentici e storicamente la prima fonte cellulare utilizzata con donatori aploidentici, dal 2012, era il midollo. Sulla base dei risultati ottenuti, abbiamo dedotto che non vi erano differenze statisticamente significative tra le OS dei pazienti in cui è stata utilizzato il BM rispetto al

PB. Anche la PFS, l'IC di GVHD, NRM e ricaduta non sono state influenzate dalla scelta della fonte cellulare. Inoltre, potrebbe non esserci differenza nell' attecchimento e nella NRM tra PB e BM perché sono stati utilizzati regimi di condizionamento mieloablativi nella maggior parte dei pazienti (61/63) sottoposti a trapianto da BM.

In merito agli obiettivi secondari che siamo andati ad analizzare, è importante sottolineare la bassa incidenza di GVHD acuta di grado III- IV e cronica moderata severa (rispettivamente 7% e 12%) rispetto ai dati presenti in letteratura **(48,49)**, nonostante i trapianti da donatore aploidentico siano la maggioranza, ma probabilmente, come suddetto, l'utilizzo di BM come fonte cellulare è stato protettivo in questo senso.

Bisogna sottolineare anche che i pazienti HLA identici familiari PB o non familiari hanno sempre utilizzato negli schemi di profilassi della GVHD il siero antilinfocitario (Thymoglobulin), utilizzato soprattutto in Europa, ma non previsto negli schemi di profilassi della GVHD utilizzati negli Stati Uniti.

Come abbiamo già detto l'attecchimento è una variabile cruciale per definire gli outcomes dei pazienti sottoposti a trapianto allogenico nella mielofibrosi: la GF si è verificata nel 25% dei casi, una percentuale superiore rispetto ad altre casistiche **(48)**, dove però erano state utilizzate principalmente cellule staminali da sangue periferico. Quindi se l'utilizzo di cellule midollari è protettivo sulla GVHD, forse è dannoso per l'attecchimento, ma nella nostra casistica manca il dato di significatività statistica. Un aspetto che non abbiamo esplorato nei pazienti analizzati è la presenza di anticorpi rivolti contro l'HLA del donatore (DSA= donor-specific antibody), che se presenti ad alto titolo impattano notevolmente sulla possibilità di attecchimento. **(50)** Considerato che tra i pazienti con GF la sopravvivenza (dato crudo) è del 38%, risulta indispensabile trovare delle strategie che possano aumentare l'incidenza di engraftment e migliorare la funzione midollare, riducendo anche l'incidenza di poor graft function (PGF): considerare l'utilizzo delle cellule staminali da sangue periferico come prima scelta, ridurre al massimo la splenomegalia prima del trapianto (ottimizzando la gestione dei JAK inibitori e nei casi estremi ricorrendo alla splenectomia), lo studio dei DSA con eventuali programmi di desensibilizzazione in presenza di differenze HLA tra donatore e ricevente, l'utilizzo dei TPO mimetici nel post trapianto. Cominciano, inoltre, ad emergere delle evidenze sull'utilizzo del ruxolitinib nel periodo peritrapianto come profilassi della GVHD e favorente l'attecchimento **(26)**.

Nonostante il nostro studio dimostri dei limiti, come la casistica unicentrica, la sua natura retrospettiva e lo sbilanciamento del campione per quanto riguarda alcuni fattori di rischio (donatore aploidentico e fonte staminale BM), si tratta comunque di un'analisi su un gruppo

di pazienti affetti da una malattia ematologica relativamente rara, per cui il rapporto costo/benefici del trapianto allogenico non è sempre evidente e dove gli score di rischio non sono conclusivi. I risultati incoraggianti possono essere un ulteriore aiuto nella decisione del corretto iter terapeutico di alcuni pazienti più fragili, soprattutto per i tempi e le modalità dell'utilizzo del trapianto di cellule staminali allogeniche.

Bibliografia

1. Thiele J, Kvasnicka HM, Orazi A, et al. *The international consensus classification of myeloid neoplasms and acute Leukemias: myeloproliferative neoplasms*. *Am J Hematol*. 2023;98(1):166-179
2. Asaulenko ZP, Spiridonov IN, Baram DV, Krivolapov YA. *Klassifikatsiya VOZ opukholei gemopoeticheskoi i limfoidnoi tkanei 2022 g. (5-e izdanie): mieloidnye i gistiotsitarnye novoobrazovaniya [WHO Classification of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues, 2022 (5th edition): Myeloid and Histiocytic Tumors]*. *Arkh Patol*. 2023;85(5):36-44. Russian. doi: 10.17116/patol20238505136. PMID: 37814848.
3. Merchant S. *The JAK2 mutation*. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2021;365:117-162. doi: 10.1016/bs.ircmb.2021.09.002. Epub 2021 Oct 5. PMID: 34756242.
4. Guglielmelli P, Calabresi L. *The MPL mutation*. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2021;365:163-178. doi: 10.1016/bs.ircmb.2021.09.003. Epub 2021 Oct 2. PMID: 34756243.
5. Tefferi et al. *CALR vs JAK2 vs MPL-mutated or triple negative myelofibrosis: clinical, cytogenetic and molecular comparisons*. *Leukemia*, 28 (2014), pp. 1472-1477.
6. Kroger N. et al. *Impact of molecular genetics on outcome in myelofibrosis patients after allogeneic stem cell transplantation*. *Biol. Blood Marrow Transplant*. 23 (2017), pp 1095-1101.
7. Mancada a. et al. *Chater Six-Labe tests for MPN*. *International Review of Cell and Molecular Biology* (2022), Vol 366, pp 187-220.
8. Dores GM, Curtis RE, Linet MS, Morton LM. *Cause-specific mortality following polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis in the US population, 2001-2017*. *Am J Hematol*. 2021)
9. Tefferi A, Guglielmelli P, Lasho TL, Gangat N, Ketterling RP, Pardanani A, Vannucchi AM. *MIPSS70+ Version 2.0: Mutation and Karyotype-Enhanced International Prognostic Scoring System for Primary Myelofibrosis*. *J Clin Oncol*. 2018 Jun 10;36(17):1769-1770. doi: 10.1200/JCO.2018.78.9867. Epub 2018 Apr 30. PMID: 29708808.
10. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, Vannucchi AM, Mesa RA, Demory JL, Barosi G, Rumi E, Tefferi A. *New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment*. *Blood*. 2009 Mar 26;113(13):2895-901. doi: 10.1182/blood-2008-07-170449. Epub 2008 Nov 6. PMID: 18988864.
11. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et al. *A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment)*. *Blood*. 2010;115(9):1703-8.
12. Guglielmelli P, Lasho TL, Rotunno G, Mudireddy M, Mannarelli C, Nicolosi M, et al. *MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis*. *J Clin Oncol*. 2018;36(4):310-8.
13. Tefferi A, Guglielmelli P, Nicolosi M, Mannelli F, Mudireddy M, Bartalucci N, et al. *GIPSS: genetically inspired prognostic scoring system for primary myelofibrosis*. *Leukemia*. 2018;32(7):1631-42.
14. Mora B, Bucelli C, Cattaneo D, Bellani V, Versino F, Barbullushi K, Fracchiolla N, Iurlo A, Passamonti F. *Prognostic and Predictive Models in Myelofibrosis*. *Curr Hematol Malig Rep*. 2024 Oct;19(5):223-235. doi: 10.1007/s11899-024-00739-6. Epub 2024 Aug 24. PMID: 39179882; PMCID: PMC11416430.
15. Verstovsek S, Mesa RA, Gotlib J, Gupta V, DiPersio JF, Catalano JV, Deininger MW, Miller CB, Silver RT, Talpaz M, Winton EF, Harvey JH Jr, Arcasoy MO, Hexner EO, Lyons

RM, Paquette R, Raza A, Jones M, Kornacki D, Sun K, Kantarjian H; COMFORT-I investigators. Long-term treatment with ruxolitinib for patients with myelofibrosis: 5-year update from the randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 COMFORT-I trial. *J Hematol Oncol.* 2017 Feb 22;10(1):55. doi: 10.1186/s13045-017-0417-z. PMID: 28228106; PMCID: PMC5322633.

16. Harrison CN, Vannucchi AM, Kiladjan JJ, Al-Ali HK, Gisslinger H, Knoops L, Cervantes F, Jones MM, Sun K, McQuitty M, Stalbovskaya V, Gopalakrishna P, Barbui T. Long-term findings from COMFORT-II, a phase 3 study of ruxolitinib vs best available therapy for myelofibrosis. *Leukemia.* 2016 Aug;30(8):1701-7. doi: 10.1038/leu.2016.148. Epub 2016 May 23. Erratum in: *Leukemia.* 2017 Mar;31(3):775. doi: 10.1038/leu.2016.323. PMID: 27211272; PMCID: PMC5399157.

17. Palandri F, Palumbo GA, Bonifacio M, Tiribelli M, Benevolo G, Martino B, Abruzzese E, D'Adda M, Polverelli N, Bergamaschi M, Tieghi A, Cavazzini F, Ibatci A, Crugnola M, Bosi C, Latagliata R, Di Veroli A, Scaffidi L, de Marchi F, Cerqui E, Anaclerico B, De Matteis G, Spinsanti M, Sabattini E, Catani L, Aversa F, Di Raimondo F, Vitolo U, Lemoli RM, Fanin R, Merli F, Russo D, Cuneo A, Bacchi Reggiani ML, Cavo M, Vianelli N, Breccia M. Baseline factors associated with response to ruxolitinib: an independent study on 408 patients with myelofibrosis. *Oncotarget.* 2017 Jun 27;8(45):79073-79086. doi: 10.18632/oncotarget.18674. PMID: 29108288; PMCID: PMC5668021.

18. Palandri F, Breccia M, Bonifacio M, Polverelli N, Elli EM, Benevolo G, Tiribelli M, Abruzzese E, Iurlo A, Heidel FH, Bergamaschi M, Tieghi A, Crugnola M, Cavazzini F, Binotto G, Isidori A, Sgherza N, Bosi C, Martino B, Latagliata R, Auteri G, Scaffidi L, Griguolo D, Trawinska M, Cattaneo D, Catani L, Krampera M, Lemoli RM, Cuneo A, Semenzato G, Foà R, Di Raimondo F, Bartoletti D, Cavo M, Palumbo GA, Vianelli N. Life after ruxolitinib: Reasons for discontinuation, impact of disease phase, and outcomes in 218 patients with myelofibrosis. *Cancer.* 2020 Mar 15;126(6):1243-1252. doi: 10.1002/cncr.32664. Epub 2019 Dec 20. PMID: 31860137.

19. Maffioli M, Mora B, Ball S, Iurlo A, Elli EM, Finazzi MC, Polverelli N, Rumi E, Caramella M, Carraro MC, D'Adda M, Molteni A, Sissa C, Lunghi F, Vismara A, Ubezio M, Guidetti A, Caberlon S, Anghileri M, Komrokji R, Cattaneo D, Della Porta MG, Giorgino T, Bertù L, Brociner M, Kuykendall A, Passamonti F. A prognostic model to predict survival after 6 months of ruxolitinib in patients with myelofibrosis. *Blood Adv.* 2022 Mar 22;6(6):1855-1864. doi: 10.1182/bloodadvances.2021006889. PMID: 35130339; PMCID: PMC8941454.

20. Pardanani A, Harrison C, Cortes JE, Cervantes F, Mesa RA, Milligan D, Masszi T, Mishchenko E, Jourdan E, Vannucchi AM, Drummond MW, Jurgutis M, Kuliczowski K, Gheorghita E, Passamonti F, Neumann F, Patki A, Gao G, Tefferi A. Safety and Efficacy of Fedratinib in Patients With Primary or Secondary Myelofibrosis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2015 Aug;1(5):643-51. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.1590. PMID: 26181658.

21. Harrison CN, Schaap N, Vannucchi AM, Kiladjan JJ, Tiu RV, Zachee P, Jourdan E, Winton E, Silver RT, Schouten HC, Passamonti F, Zweegman S, Talpaz M, Lager J, Shun Z, Mesa RA. Janus kinase-2 inhibitor fedratinib in patients with myelofibrosis previously treated with ruxolitinib (JAKARTA-2): a single-arm, open-label, non-randomised, phase 2, multicentre study. *Lancet Haematol.* 2017 Jul;4(7):e317-e324. doi: 10.1016/S2352-3026(17)30088-1. Epub 2017 Jun 8. PMID: 28602585; PMCID: PMC8207822.

22. Harrison CN, Vannucchi AM, Recher C, Passamonti F, Gerds AT, Hernandez-Boluda JC, Yacoub A, Sirhan S, Ellis C, Patel B, Strouse B, Platzbecker U. Momelotinib versus Continued Ruxolitinib or Best Available Therapy in JAK Inhibitor-Experienced Patients with Myelofibrosis and Anemia: Subgroup Analysis of SIMPLIFY-2. *Adv Ther.* 2024 Sep;41(9):3722-3735. doi: 10.1007/s12325-024-02928-4. Epub 2024 Jul 11. PMID: 38990433; PMCID: PMC11349857.

23. Mesa RA, Vannucchi AM, Mead A, Egyed M, Szoke A, Suvorov A, Jakucs J, Perkins A, Prasad R, Mayer J, Demeter J, Ganly P, Singer JW, Zhou H, Dean JP, Te Boekhorst PA, Nangalia J, Kiladjan JJ, Harrison CN. Pacritinib versus best available therapy for the

treatment of myelofibrosis irrespective of baseline cytopenias (PERSIST-1): an international, randomised, phase 3 trial. *Lancet Haematol.* 2017 May;4(5):e225-e236. doi: 10.1016/S2352-3026(17)30027-3. Epub 2017 Mar 20. PMID: 28336242; PMCID: PMC8209752.

24. Kröger N, Bacigalupo A, Barbui T, Ditschkowski M, Gagelmann N, Griesshammer M, Gupta V, Hamad N, Harrison C, Hernandez-Boluda JC, Koschmieder S, Jain T, Mascarenhas J, Mesa R, Popat UR, Passamonti F, Polverelli N, Rambaldi A, Robin M, Salit RB, Schroeder T, Scott BL, Tamari R, Tefferi A, Vannucchi AM, McLornan DP, Barosi G. Indication and management of allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation in myelofibrosis: updated recommendations by the EBMT/ELN International Working Group. *Lancet Haematol.* 2024 Jan;11(1):e62-e74. doi: 10.1016/S2352-3026(23)00305-8. Epub 2023 Dec 4. PMID: 38061384.

25. Polverelli N, Mauff K, Kröger N, Robin M, Beelen D, Beauvais D, Chevallier P, Mohty M, Passweg J, Rubio MT, Maertens J, Finke J, Bornhäuser M, Vrhovac R, Helbig G, Mear JB, Castagna L, Reményi P, Angelucci E, Karakasis D, Rifón J, Sirait T, Russo D, de Wreede L, Czerw T, Hernández-Boluda JC, Hayden P, McLornan D, Yakoub-Agha I. Impact of spleen size and splenectomy on outcomes of allogeneic hematopoietic cell transplantation for myelofibrosis: A retrospective analysis by the chronic malignancies working party on behalf of European society for blood and marrow transplantation (EBMT). *Am J Hematol.* 2021 Jan;96(1):69-79. doi: 10.1002/ajh.26020. Epub 2020 Oct 27. PMID: 33064301.

26. Kröger N, Sbianchi G, Sirait T, et al. Impact of prior JAK-inhibitor therapy with ruxolitinib on outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis: a study of the CMWP of EBMT. *Leukemia* 2021; 35: 3551–60

27. Polverelli N, Farina M, D'Adda M, Damiani E, Grazioli L, Leoni A, Malagola M, Bernardi S, Russo D. How We Manage Myelofibrosis Candidates for Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Cells.* 2022 Feb 5;11(3):553. doi: 10.3390/cells11030553. PMID: 35159362; PMCID: PMC8834299.

28. Zaorsky NG, Williams GR, Barta SK, Esnaola NF, Kropf PL, Hayes SB, Meyer JE. Splenic irradiation for splenomegaly: A systematic review. *Cancer Treat Rev.* 2017 Feb;53:47-52. doi: 10.1016/j.ctrv.2016.11.016. Epub 2016 Dec 22. PMID: 28063304; PMCID: PMC7537354.

29. Gupta V, Malone AK, Hari PN, Ahn KW, Hu ZH, Gale RP, Ballen KK, Hamadani M, Olavarria E, Gerds AT, Waller EK, Costa LJ, Antin JH, Kamble RT, van Besien KM, Savani BN, Schouten HC, Szer J, Cahn JY, de Lima MJ, Wirk B, Aljurf MD, Popat U, Bejanyan N, Litzow MR, Norkin M, Lewis ID, Hale GA, Woolfrey AE, Miller AM, Ustun C, Jagasia MH, Lill M, Maziarz RT, Cortes J, Kalaycio ME, Saber W. Reduced-intensity hematopoietic cell transplantation for patients with primary myelofibrosis: a cohort analysis from the center for international blood and marrow transplant research. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2014 Jan;20(1):89-97. doi: 10.1016/j.bbmt.2013.10.018. Epub 2013 Oct 23. PMID: 24161923; PMCID: PMC3886623.

30. Gambella M, Bregante S, Raiola AM, Varaldo R, Ghiso A, Schiavetti I, Carmisciano L, Bacigalupo A, Angelucci E. Haploidentical Hematopoietic Cell Transplantation for Myelofibrosis in the Ruxolitinib Era. *Transplant Cell Ther.* 2023 Jan;29(1):49.e1-49.e7. doi: 10.1016/j.jtct.2022.10.015. Epub 2022 Oct 23. PMID: 36288760.

31. Jain T, Estrada-Merly N, Salas MQ, Kim S, DeVos J, Chen M, Fang X, Kumar R, Andrade-Campos M, Elmariah H, Agrawal V, Aljurf M, Bacher U, Badar T, Badawy SM, Ballen K, Beitinjaneh A, Bhatt VR, Bredeson C, DeFilipp Z, Dholaria B, Farhadfar N, Farhan S, Gandhi AP, Ganguly S, Gergis U, Grunwald MR, Hamad N, Hamilton BK, Inamoto Y, Iqbal M, Jamy O, Juckett M, Khafan-Dabaja MA, Krem MM, Lad DP, Liesveld J, Al Malki MM, Malone AK, Murthy HS, Ortí G, Patel SS, Pawarode A, Perales MA, van der Poel M, Ringden O, Rizzieri DA, Rovó A, Savani BN, Savoie ML, Seo S, Solh M, Ustun C, Verdonck LF, Wingard JR, Wirk B, Bejanyan N, Jones RJ, Nishihori T, Oran B, Nakamura R, Scott B, Saber W, Gupta V. Donor types and outcomes of transplantation in myelofibrosis:

a CIBMTR study. *Blood Adv.* 2024 Aug 27;8(16):4281-4293. doi: 10.1182/bloodadvances.2024013451. PMID: 38916866; PMCID: PMC11372592.

32. Robin M, Tabrizi R, Mohty M, Furst S, Michallet M, Bay JO, Cahn JY, De Coninck E, Dhedin N, Bernard M, Rio B, Buzyn A, Huynh A, Bilger K, Bordigoni P, Contentin N, Porcher R, Socié G, Milpied N. Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis: a report of the Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC). *Br J Haematol.* 2011 Feb;152(3):331-9. doi: 10.1111/j.1365-2141.2010.08417.x. Epub 2010 Dec 7. PMID: 21133885.

33. Czerw T, Iacobelli S, Malpassuti V, Koster L, Kröger N, Robin M, Maertens J, Chevallier P, Watz E, Poiré X, Snowden JA, Kuball J, Kinsella F, Blaise D, Reményi P, Mear JB, Cammenga J, Rubio MT, Maury S, Daguindau E, Finnegan D, Hayden P, Hernández-Boluda JC, McLornan D, Yakoub-Agha I. Impact of donor-derived CD34 + infused cell dose on outcomes of patients undergoing allo-HCT following reduced intensity regimen for myelofibrosis: a study from the Chronic Malignancies Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant.* 2022 Feb;57(2):261-270. doi: 10.1038/s41409-021-01540-2. Epub 2021 Dec 1. PMID: 34853433.

34. McLornan D, Szydło R, Koster L, Chalandon Y, Robin M, Wolschke C, Beelen D, Socié G, Bornhäuser M, Angelucci E, Niederwieser D, Gerbitz A, Finke J, Vitek A, Itälä-Remes M, Radujkovic A, Kanz L, Potter V, Chevallier P, Stelljes M, Petersen E, Robinson S, Poiré X, Klyuchnikov E, Hernández-Boluda JC, Czerw T, Hayden P, Kröger N, Yakoub-Agha I. Myeloablative and Reduced-Intensity Conditioned Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Myelofibrosis: A Retrospective Study by the Chronic Malignancies Working Party of the European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019 Nov;25(11):2167-2171. doi: 10.1016/j.bbmt.2019.06.034. Epub 2019 Jul 5. PMID: 31284069.

35. Kröger N, Holler E, Kobbe G, Bornhäuser M, Schwerdtfeger R, Baumann H, Nagler A, Bethge W, Stelljes M, Uharek L, Wandt H, Burchert A, Corradini P, Schubert J, Kaufmann M, Dreger P, Wulf GG, Einsele H, Zabelina T, Kvasnicka HM, Thiele J, Brand R, Zander AR, Niederwieser D, de Witte TM. Allogeneic stem cell transplantation after reduced-intensity conditioning in patients with myelofibrosis: a prospective, multicenter study of the Chronic Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood.* 2009 Dec 17;114(26):5264-70. doi: 10.1182/blood-2009-07-234880. Epub 2009 Oct 7. PMID: 19812383.

36. Popat U, Mehta RS, Bassett R, Kongtim P, Chen J, Alousi AM, Anderlini P, Ciurea S, Hosing C, Jones R, Kebriaei P, Khouri I, Lindsay R PA, Nieto Y, Olson A, Oran B, Qazilbash MH, Rondon G, Shpall EJ, Verstovsek S, Andersson BS, Champlin RE. Optimizing the Conditioning Regimen for Hematopoietic Cell Transplant in Myelofibrosis: Long-Term Results of a Prospective Phase II Clinical Trial. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2020 Aug;26(8):1439-1445. doi: 10.1016/j.bbmt.2020.03.020. Epub 2020 May 11. PMID: 32438043; PMCID: PMC7547798.

37. Murthy GSG, Kim S, Estrada-Merly N, Abid MB, Aljurf M, Assal A, Badar T, Badawy SM, Ballen K, Beitinjaneh A, Cerny J, Chhabra S, DeFilipp Z, Dholaria B, Perez MAD, Farhan S, Freytes CO, Gale RP, Ganguly S, Gupta V, Grunwald MR, Hamad N, Hildebrandt GC, Inamoto Y, Jain T, Jamy O, Juckett M, Kalaycio M, Krem MM, Lazarus HM, Litzow M, Munker R, Murthy HS, Nathan S, Nishihori T, Ortí G, Patel SS, Van der Poel M, Rizzieri DA, Savani BN, Seo S, Solh M, Verdonck LF, Wirk B, Yared JA, Nakamura R, Oran B, Scott B, Saber W. Association between the choice of the conditioning regimen and outcomes of allogeneic hematopoietic cell transplantation for myelofibrosis. *Haematologica.* 2023 Jul 1;108(7):1900-1908. doi: 10.3324/haematol.2022.281958. PMID: 36779595; PMCID: PMC10316233.

38. Robin M, Chevret S, Koster L, Wolschke C, Yakoub-Agha I, Bourhis JH, Chevallier P, Cornelissen JJ, Reményi P, Maertens J, Poiré X, Craddock C, Socié G, Itälä-Remes M, Schouten HC, Marchand T, Passweg J, Blaise D, Damaj G, Ozkurt ZN, Zuckerman T, Cluzeau T, Labussière-Wallet H, Cammenga J, McLornan D, Chalandon Y, Kröger N.

Antilymphocyte globulin for matched sibling donor transplantation in patients with myelofibrosis. *Haematologica*. 2019 Jun;104(6):1230-1236. doi: 10.3324/haematol.2018.201400. Epub 2019 Jan 17. PMID: 30655365; PMCID: PMC6545844.

39. McLornan DP, Hernandez-Boluda JC, Czerw T, Cross N, Joachim Deeg H, Ditschkowski M, Moonim MT, Polverelli N, Robin M, Aljurf M, Conneally E, Hayden P, Yakoub-Agha I. Allogeneic haematopoietic cell transplantation for myelofibrosis: proposed definitions and management strategies for graft failure, poor graft function and relapse: best practice recommendations of the EBMT Chronic Malignancies Working Party. *Leukemia*. 2021 Sep;35(9):2445-2459. doi: 10.1038/s41375-021-01294-2. Epub 2021 May 26. Erratum in: *Leukemia*. 2021 Dec;35(12):3625. doi: 10.1038/s41375-021-01395-y. PMID: 34040148.

40. Bacigalupo A, Ballen K, Rizzo D, Giralt S, Lazarus H, Ho V, Apperley J, Slavin S, Pasquini M, Sandmaier BM, Barrett J, Blaise D, Lowski R, Horowitz M. Defining the intensity of conditioning regimens: working definitions. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2009 Dec;15(12):1628-33. doi: 10.1016/j.bbmt.2009.07.004. Epub 2009 Sep 1. PMID: 19896087; PMCID: PMC2861656.

41. Spyridonidis A, Labopin M, Savani BN, Niittyvuopio R, Blaise D, Craddock C, Socié G, Platzbecker U, Beelen D, Milpied N, Cornelissen JJ, Ganser A, Huynh A, Griskevicius L, Giebel S, Aljurf M, Brissot E, Malard F, Esteve J, Peric Z, Baron F, Ruggeri A, Schmid C, Gilleece M, Gorin NC, Lanza F, Shouval R, Versluis J, Bug G, Fløisand Y, Ciceri F, Sanz J, Bazarbachi A, Nagler A, Mohty M. Redefining and measuring transplant conditioning intensity in current era: a study in acute myeloid leukemia patients. *Bone Marrow Transplant*. 2020 Jun;55(6):1114-1125. doi: 10.1038/s41409-020-0803-y. Epub 2020 Jan 29. Erratum in: *Bone Marrow Transplant*. 2020 Jun;55(6):1213. doi: 10.1038/s41409-020-0835-3. PMID: 31996792.

42. Patriarca F, Masciulli A, Bacigalupo A, et al. Busulfan- or Thiotepa-Based Conditioning in Myelofibrosis: A Phase II Multicenter Randomized Study from the GITMO Group. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2019;25(5):932-940. doi:10.1016/j.bbmt.2018.12.064

43. Chiusolo P, Bregante S, Giammarco S, et al. Full donor chimerism after allogeneic hematopoietic stem cells transplant for myelofibrosis: The role of the conditioning regimen. *Am J Hematol*. 2021;96(2):234-240. doi:10.1002/ajh.26042

44. Battipaglia G, Mauff K, Wendel L, et al. Thiotepa-busulfan-fludarabine (TBF) conditioning regimen in patients undergoing allogeneic hematopoietic cell transplantation for myelofibrosis: an outcome analysis from the Chronic Malignancies Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant*. 2021;56(7):1593-1602. doi:10.1038/s41409-021-01222-z

45. Harris AC, Young R, Devine S, Hogan WJ, Ayuk F, Bunworasate U, Chanswangphuwana C, Efebera YA, Holler E, Litzow M, Ordemann R, Qayed M, Renteria AS, Reshef R, Wöfl M, Chen YB, Goldstein S, Jagasia M, Locatelli F, Mielke S, Porter D, Schechter T, Shekhovtsova Z, Ferrara JL, Levine JE. International, Multicenter Standardization of Acute Graft-versus-Host Disease Clinical Data Collection: A Report from the Mount Sinai Acute GVHD International Consortium. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2016 Jan;22(1):4-10. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.09.001. Epub 2015 Sep 16. PMID: 26386318; PMCID: PMC4706482.

46. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, Palmer J, Weisdorf D, Treister NS, Cheng GS, Kerr H, Stratton P, Duarte RF, McDonald GB, Inamoto Y, Vigorito A, Arai S, Datile MB, Jacobsohn D, Heller T, Kitko CL, Mitchell SA, Martin PJ, Shulman H, Wu RS, Cutler CS, Vogelsang GB, Lee SJ, Pavletic SZ, Flowers ME. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Mar;21(3):389-401.e1. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.12.001. Epub 2014 Dec 18. PMID: 25529383; PMCID: PMC4329079.

47. Hernández-Boluda JC, Pereira A, Kröger N, Cornelissen JJ, Finke J, Beelen D, de Witte M, Wilson K, Platzbecker U, Sengeloev H, Blaise D, Einsele H, Sockel K, Krüger W, Lenhoff S, Salaroli A, Martin H, García-Gutiérrez V, Pavone V, Alvarez-Larrán A, Raya JM, Zinger N, Gras L, Hayden P, Czerw T, P McLornan D, Yakoub-Agha I. Allogeneic hematopoietic cell transplantation in older myelofibrosis patients: A study of the chronic malignancies working party of EBMT and the Spanish Myelofibrosis Registry. *Am J Hematol.* 2021 Oct 1;96(10):1186-1194. doi: 10.1002/ajh.26279. Epub 2021 Jul 8. PMID: 34152630.
48. Kunte S, Rybicki L, Viswabandya A, Tamari R, Bashey A, Keyzner A, Iqbal M, Grunwald MR, Dholaria B, Elmariah H, Ozga M, Singh A, Abedin S, DeZern AE, Jones RJ, Gupta V, Gerds AT, Jain T. Allogeneic blood or marrow transplantation with haploidentical donor and post-transplantation cyclophosphamide in patients with myelofibrosis: a multicenter study. *Leukemia.* 2022 Mar;36(3):856-864. doi: 10.1038/s41375-021-01449-1. Epub 2021 Oct 18. PMID: 34663912; PMCID: PMC10084790.
49. Raj K, Eikema DJ, McLornan DP, Olavarria E, Blok HJ, Bregante S, Ciceri F, Passweg J, Ljungman P, Schaap N, Carlson K, Zuckerman T, de Wreede LC, Volin L, Koc Y, Diez-Martin JL, Brossart P, Wolf D, Blaise D, Bartolomeo PD, Vitek A, Robin M, Yakoub-Agha I, Chalandon Y, Kroger N. Family Mismatched Allogeneic Stem Cell Transplantation for Myelofibrosis: Report from the Chronic Malignancies Working Party of European Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2019 Mar;25(3):522-528. doi: 10.1016/j.bbmt.2018.10.017. Epub 2018 Nov 5. PMID: 30408564.
50. Ciurea SO, Thall PF, Milton DR, Barnes TH, Kongtim P, Carmazzi Y, López AA, Yap DY, Popat U, Rondon G, Lichtiger B, Aung F, Afshar-Kharghan V, Ma Q, Fernández-Viña M, Champlin RE, Cao K. Complement-Binding Donor-Specific Anti-HLA Antibodies and Risk of Primary Graft Failure in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2015 Aug;21(8):1392-8. doi: 10.1016/j.bbmt.2015.05.001. Epub 2015 May 15. PMID: 25985919; PMCID: PMC4506716.