

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI GENOVA

SCUOLA DI SCIENZE MEDICHE E FARMACEUTICHE

CORSO DI LAUREA IN MEDICINA E CHIRURGIA



**Correlazioni cliniche ed impatto
prognostico della Clonal Hematopoiesis of
Indeterminate Potential (CHIP) in pazienti
con Mieloma multiplo di nuova diagnosi**

Relatore: C. Mo Prof. Roberto Lemoli

Correlatore: C. Mo Prof. Michele Cea

Candidato: Maria Chies

Anno accademico 2020-2021

Sommario

SEZIONE INTRODUTTIVA	3
1. Il Mieloma Multiplo: dalla diagnosi al trattamento.....	3
1.1 Introduzione al Mieloma Multiplo	3
1.2 Epidemiologia	5
1.3 Eziopatogenesi e Fisiopatologia	6
1.4 Clinica	20
1.5 Inquadramento Diagnostico	27
1.6 Criteri Diagnostici.....	34
1.7 Stadiazione, stratificazione del rischio e prognosi 40	
1.8 Trattamento del Mieloma Multiplo	46
SEZIONE SPERIMENTALE	66
2. L'Ematopoiesi Clonale di significato indeterminato: nuove implicazioni clinico-prognostiche	66
2.1 Introduzione e definizione	66
2.2 Materiali e Metodi	73
2.3 Risultati	89
2.4 Discussione	104
BIBLIOGRAFIA	106
Ringraziamenti	115

SEZIONE INTRODUTTIVA

1. Il Mieloma Multiplo: dalla diagnosi al trattamento

1.1 Introduzione al Mieloma Multiplo

Il Mieloma Multiplo (MM) è una neoplasia delle plasmacellule differenziate che rientra nel gruppo delle discrasie plasmacellulari: neoplasie caratterizzate dall'accumulo di cellule monoclonali correlate le une alle altre in virtù della loro origine da progenitori comuni appartenenti alla linea linfocitaria B. Nell'ambito di questo gruppo di patologie vengono anche incluse la macroglobulinemia di Waldenström, l'amiloidosi primitiva e le malattie delle catene pesanti. (1)

Il MM è caratterizzato dalla proliferazione ed il conseguente accumulo di plasmacellule monoclonali prevalentemente nel midollo osseo, ma anche, soprattutto durante le fasi più avanzate di malattia, nel sangue periferico ed in altri siti extra-midollari. Nella maggior parte dei pazienti la malattia si caratterizza per una sintesi massiva di immunoglobuline monoclonali (indicate anche come componente monoclonale o componente M), prodotte dalle plasmacellule neoplastiche, che sono le responsabili del danno d'organo con cui si manifesta clinicamente la malattia. (2)

La quasi totalità dei pazienti evolve da uno stadio preneoplastico asintomatico noto come gammapatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS); il tasso di evoluzione di quest'ultimo in Mieloma Multiplo è pari all'1% per anno. (3)

In molti pazienti può essere invece riconosciuto uno stadio intermedio asintomatico ma più avanzato, noto come mieloma asintomatico o smouldering (SMM). L'SMM progredisce a mieloma sintomatico ad un tasso del 10% per anno entro i primi 5 anni successivi alla diagnosi e del 3% per anno negli ulteriori 5 anni successivi. (4)

Gli specifici cambiamenti che portano a questa evoluzione sono ancora per la maggior parte sconosciuti, ma probabilmente riflettono gli effetti cumulativi di alterazioni coinvolgenti sia la cellula mielomatosa che il microambiente midollare.

Negli ultimi anni sono stati fatti importanti passi in avanti sia nella conoscenza degli aspetti biologici della malattia sia nell'approccio terapeutico con l'introduzione di nuove classi di farmaci quali gli inibitori del proteasoma (PIs) e i farmaci immunomodulanti (IMiDs) che, affiancandosi al trapianto autologo di cellule staminali (ASCT) e a farmaci più tradizionali come i corticosteroidi e gli agenti alchilanti, hanno permesso di ottenere risposte cliniche più evidenti e durature.

1.2 Epidemiologia

Rappresenta l'1% di tutte le neoplasie ed è la seconda neoplasia ematologica più comune, dopo il linfoma non Hodgkin, con una prevalenza di circa il 10%. In Europa si registrano 5 casi per 100.000/anno, con un'età mediana alla diagnosi pari a 72 anni, mentre la mortalità è di 4 casi per 100.000/anno. Globalmente l'incidenza è maggiore nei Paesi più sviluppati e tende ad aumentare con l'età, raggiungendo un picco durante la settima decade di vita. Mostra, inoltre, una preponderanza nel sesso maschile e nell'etnia afroamericana. Nonostante sia descritto un aumento dell'incidenza di Mieloma Multiplo, questo è attribuito in prima ipotesi al miglioramento delle tecniche diagnostiche e, in seconda ipotesi, al generalizzato invecchiamento della popolazione mondiale. Inoltre, negli ultimi anni, c'è stato un netto e significativo aumento della overall survival (OS), ossia del periodo di tempo che intercorre tra la data di diagnosi della patologia o dell'inizio della terapia ed il momento del decesso del paziente; quest'ultima è infatti passata da una mediana iniziale di 3 anni ad una attuale di 8-10 anni, grazie soprattutto allo sviluppo di nuovi agenti terapeutici, alle migliori tecniche diagnostiche e ad un uso sempre più ampio del trapianto autologo di cellule staminali. (1,5,6)

1.3 Eziopatogenesi e Fisiopatologia

1.3.1 Eziologia

La causa del Mieloma Multiplo non è ancora nota, sono stati identificati però alcuni fattori di rischio associati alla comparsa di questa neoplasia. Sicuramente un fattore importante è rappresentato dalla familiarità: infatti, il rischio di sviluppare una discrasia plasmacellulare è raddoppiato nei familiari di pazienti affetti da Mieloma Multiplo. (7)

Anche l'esposizione a radiazioni ionizzanti sembra essere un fattore predisponente, data l'aumentata frequenza di insorgenza nei soggetti che erano stati esposti alle esplosioni nucleari giapponesi, con una latenza di vent'anni. Maggiore frequenza si riscontra anche negli agricoltori, lavoratori del legno, delle pelli o negli esposti ai derivati del petrolio.

Anche l'infezione da parte di alcuni virus potrebbe essere coinvolta nell'aumento del rischio: in quasi il 25% dei pazienti si è riscontrata la presenza di EBV (Epstein-Barr virus), HCV (Hepatitis C virus) ed Helicobacter Pylori. Il trigger per lo sviluppo della patologia sarebbe quindi rappresentato da una infiammazione cronica e disregolata contro questi patogeni. (8)

Sul versante genetico, grazie allo sviluppo di nuove tecniche di analisi laboratoristica, sono stati identificati almeno otto diversi loci allelici che, se mutati, conferiscono ai portatori un aumentato rischio di manifestare la patologia; sono stati inoltre identificati polimorfismi a carico di un singolo nucleotide (SNPs) che portano ad attivazione di *MYC*, il gene responsabile della progressione di malattia. La ricorrenza di fattori genetici come possibile concausa di malattia viene comunque confermata anche da analisi condotte su diversi nuclei familiari che evidenziano come il rischio di comparsa di una gammapatia monoclonale di significato incerto è raddoppiato nei parenti di primo grado di pazienti affetti da MM. (2)

1.3.2 L'evoluzione della cellula mielomatosa

Il Mieloma Multiplo è caratterizzato dall'eccesso di plasmacellule nel midollo osseo, tuttavia non è ancora del tutto nota la cellula B linfocitaria che primitivamente viene colpita dalla trasformazione neoplastica. Si ipotizza che la trasformazione neoplastica avvenga nel centro germinativo dei linfonodi. (7,8)

La cellula mielomatosa, quindi, è una cellula che è andata incontro a maturazione nel centro germinativo. Al suo interno subisce un processo di riarrangiamento della regione variabile (V) dei geni codificanti per le immunoglobuline, uno switch di classe Ig e l'ipermutazione somatica del recettore BCR. A questo punto migra nel midollo osseo, dove differenzia in plasmacellula e si espande clonalmente. (7) Nei pazienti con mieloma è dimostrata infatti la presenza di cloni B circolanti con lo stesso riarrangiamento genico e con la stessa ipermutazione somatica, a cui consegue la presenza di immunoglobuline monoclonali della stessa classe (più frequentemente IgG, ma anche IgA, IgM o IgD). (9) Possiamo quindi identificare mutazioni primitive, che hanno luogo nel centro germinativo e già presenti in stadio non neoplastico, e mutazioni secondarie che si accumulano nel tempo. (7)

Prima del quadro conclamato di Mieloma Sintomatico è possibile affermare che in quasi tutti i casi questo sia preceduto da un disordine clonale pre-maligno definito MGUS, che si differenzia dal Mieloma Multiplo per l'assenza di sintomi, danno d'organo o amiloidosi, ma soprattutto per la minore quantità di plasmacellule e anticorpi monoclonali. (3) Inoltre, Rustad et al, nello studio riguardante la tempistica del primo evento mutazionale responsabile della malattia, ipotizzano che questa possa avvenire intorno alla seconda-terza decade di vita, a cui seguirebbe un lento processo di accumulo di mutazioni fino alla comparsa del quadro sintomatico. (10) Durante questa primissima fase, alcune analisi spettrometriche (11) hanno dimostrato la presenza di minime quantità di proteine monoclonali, anni prima della diagnosi di

MGUS, che potrebbe portare alla definizione di un nuovo stadio pre-MGUS di "Plasmocitosi Monoclonale". (7,11)

È inoltre possibile identificare uno stadio intermedio tra la MGUS e il Mieloma Sintomatico: lo Smoldering Mieloma, caratterizzato da un più alto tasso di cloni plasmacellulari nel midollo osseo. Rimane sempre uno stadio asintomatico. Sono stati ipotizzati due modelli di progressione da SMM a MM Sintomatico: il modello di progressione statica e quello di progressione spontanea. Nel primo caso le cellule neoplastiche sono già presenti allo stadio di Smoldering Mieloma e lo sviluppo dei sintomi è legato alla crescita di quella popolazione cellulare. Questo modello è legato a un'evoluzione a Mieloma Sintomatico entro un anno. Nel secondo caso invece il pool di plasmacellule cambia con il tempo attraverso lo sviluppo di nuove mutazioni cancerogenetiche, con una progressione più lenta. (7)

Due fattori fondamentali concorrono alla progressione e alla patogenesi della malattia: un processo multi-step di accumulo di mutazioni e cambiamento nella struttura dei cromosomi, e l'interazione delle plasmacellule con il microambiente midollare.

1.3.3 La genetica del mieloma multiplo

Le caratteristiche genetiche del Mieloma somigliano maggiormente ai tumori epiteliali e alla Leucemia Mieloide Cronica, rispetto a quelle degli altri tumori emopoietici, con tuttavia un maggior numero di casi di traslocazioni sbilanciate.

Dal punto di vista genomico si possono definire due sottotipi di Mieloma Multiplo: il sottotipo con iperdiploidie e quello senza iperdiploidie.

In quest'ultimo caso le alterazioni più frequenti sono le traslocazioni che coinvolgono il locus IgH; in particolare, le principali sono t(11;14)(q13;q32), t(4;14)(p16;q32) e t(14;16)(q32;q23). (9) Attraverso la mediazione di promotori Ig, tali traslocazioni sono responsabili dell'iperespressione dei geni *CCND1*, *WHSC1*, *MAF*, *MAFB*, *CCND3*, coinvolti probabilmente nella trasformazione maligna. Sono quasi sempre clonali, si autoescludono tra loro e con il sottotipo iperploide. L'insorgenza della traslocazione è da ricercarsi nella fase di switch isotipico delle Ig, favorito dall'enzima AID (Activation Induced Deaminase), responsabile della rottura della doppia elica del DNA. Questi eventi fisiologici sono fondamentali per l'eterogeneità anticorpale, ma sono anche una fase a rischio di mutazioni e costituiscono il principio della malattia. (7)

Il sottotipo iperploide consiste in varie trisomie, ad eccezione dei cromosomi 13 e 17, le cui delezioni, al contrario, sono associate ad alto rischio di progressione da MGUS a Mieloma Multiplo in quanto portatori di importanti geni oncosoppressori. Il sottotipo in esame è inoltre correlato a una forma più indolente di Mieloma. (7,9) La scarsa presenza di duplicazioni nello stadio di MGUS rafforza l'ipotesi che la loro acquisizione possa avvenire attraverso un processo multi-step. Lo studio portato avanti da Maura et Al arriva alla conclusione che anche queste mutazioni hanno origine nel centro germinativo, in cui il gene *AID* ha la sua massima espressione e la cui attività cala fino a scomparire per le mutazioni acquisite successivamente. (7,12)

Se confrontiamo la genomica dell'MGUS e del Mieloma Multiplo possiamo identificare alcuni eventi che possibilmente potrebbero essere correlati a maggiore progressione di malattia.

Tra le traslocazioni, t(4;14), t(14;16) e t(14;20) hanno una maggiore prevalenza nel Mieloma Sintomatico e sono associate anche ad una ridotta sopravvivenza, suggerendo quindi che queste mutazioni potrebbero favorire la progressione alla patologia conclamata.

Anche gli NCAs (Copy Number Aberrations) e le delezioni dei cromosomi 13 e 17 sono più frequenti nella forma conclamata e sintomatica di malattia, proprio a causa della minore trascrizione di geni oncosoppressori. La trisomia del locus 1q21 correla con progressione spontanea, mentre un numero di copie superiore a quattro è associato a Mieloma ad alto rischio e recidive. Un altro fattore favorente la sopravvivenza e la proliferazione delle plasmacellule è il fattore NF-κB (Nuclear Factor-κB). (7,9)

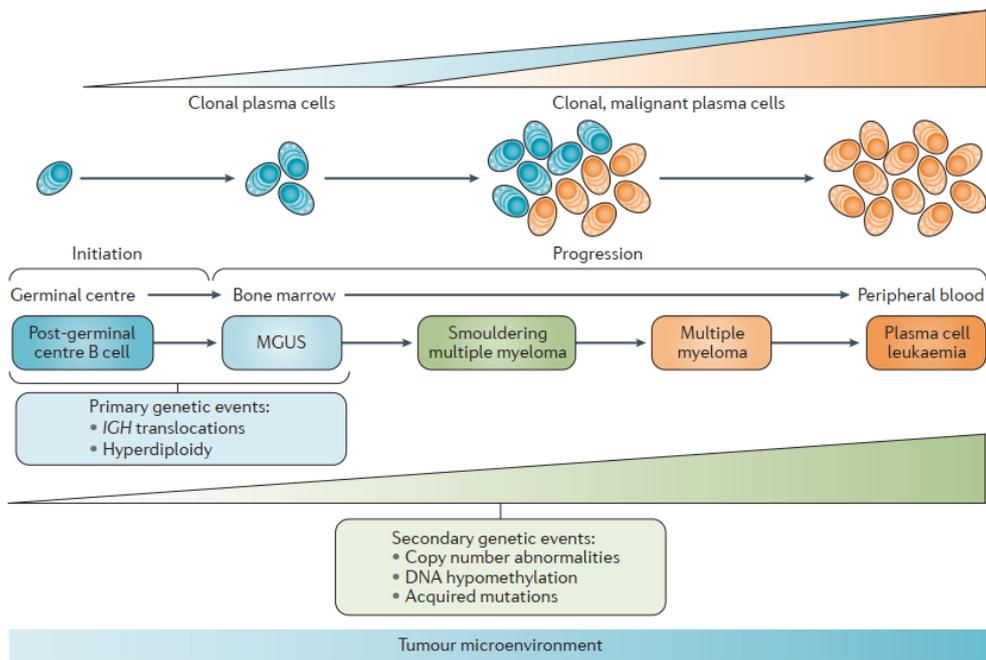


Figura 1.1 – La patogenesi delle gammopatie monoclonali (2)

1.3.4 Il microambiente midollare

L'interazione tra le cellule di Mieloma Multiplo ed il microambiente midollare è cruciale per lo sviluppo, il trattamento e la progressione della malattia. In quest'ultimo sono presenti diversi tipi cellulari, tra cui cellule del sistema ematopoietico (linfociti B, T, NK ed osteoclasti) e non (cellule stromali, osteoblasti e cellule endoteliali). Nel loro insieme, queste cellule secernono diverse molecole che contribuiscono alla migrazione ed alla proliferazione delle cellule mielomatose; l'adesione tra plasmacellule neoplastiche e cellule stromali è mediata da molecole di adesione espresse sulla superficie delle cellule mielomatose e da partners espressi sulle cellule del microambiente e dalla matrice extracellulare. Un esempio tipico è l'interazione esistente tra cellule mielomatose ed osteoclasti che causa un'aumentata produzione di RANKL e ridotti livelli di osteoprotegerina, alla base del massivo interessamento osseo che caratterizza la malattia. RANKL è infatti il ligando del recettore RANK, espresso a sua volta dai preosteoclasti: la formazione di tale legame è causa di un'aumentata differenziazione di questi ultimi in osteoclasti, le cellule deputate al riassorbimento osseo. Ciò si traduce, da un lato, in un'aumentata attività di distruzione scheletrica da parte degli osteoclasti e, dall'altro, in una ridotta attività di deposizione di matrice ossea da parte degli osteoblasti. Il processo di adesione e il signaling citochinico, attivato in conseguenza dell'interazione, influenzano il processo di migrazione e di homing delle plasmacellule neoplastiche nel midollo osseo; tra le citochine prodotte si ricordano IL-6, IGF1, VEGF, TNF α , TGF- β , IL-17, IL-21. La presenza di queste citochine è capace di mediare una serie di meccanismi immunosoppressivi che portano a crescita, sopravvivenza e resistenza delle cellule mielomatose sia ad apoptosi che a trattamenti farmacologici. (13) Non da ultimo, nel MM si osserva una significativa disfunzione immune che coinvolge, tra gli altri, i linfociti T e B; nei soggetti affetti si evidenzia una particolare popolazione cellulare eterogenea, le cellule soppressorie mieloidi (MDSCs). Esse inibiscono l'attività linfocitaria attraverso la produzione di arginasi-1, specie reattive dell'ossigeno e ossido nitrico e, se presenti in numero elevato, sono

associati ad una prognosi negativa. Le stesse plasmacellule neoplastiche, a loro volta, contribuiscono al mantenimento di uno stato di immunosoppressione generalizzata attraverso la produzione di TGF- β , PDL-1 e IL-17. (13) Recenti studi hanno evidenziato che le cellule staminali midollari in pazienti affetti da MM rilasciano esosomi che sono trasferiti alle cellule neoplastiche, influenzando così la crescita tumorale in vivo, promuovendo l'entrata in circolo e inducendo la resistenza ai farmaci, mediante specifici miRNA. Gli esosomi sono nanovesicole (50-100 nm) di origine endocitica che vengono rilasciate nell'ambiente extracellulare da diversi tipi cellulari in condizioni sia fisiologiche che patologiche, come ad esempio nel caso di presentazione dell'antigene, trasmissione di agenti infettivi e tumori. Il profilo dei miRNA contenuti negli esosomi varia tra cellule staminali midollari di soggetti affetti e sani: ad esempio, i livelli del soppressore tumorale miR-15a/16 risultano diminuiti nelle BMSC da MM; ciò promuove la proliferazione delle PC e le protegge dall'apoptosi indotta da farmaci quali gli inibitori del proteasoma. (14) Altri miRNA sono modulati a seguito dell'interazione tra BMSC e cellule di MM, contribuendo all'aumento dell'angiogenesi (miR-199a-5p) e all'alterazione della formazione di osso (miR-135b, 24-3b, 15a-5p). (15) Anche il contenuto proteico degli esosomi risulta alterato, con una maggiore percentuale di proteine oncogeniche, citochine, protein chinasi e molecole di adesione nelle MM-BMSC. Questi dati identificano quindi negli esosomi un nuovo meccanismo di comunicazione cellulare tra PC mielomatose e BMSC, accanto all'adesione ed ai fattori solubili. (16) Come nei tumori solidi, anche nel MM è stato riscontrato un aumento dell'angiogenesi midollare correlata con il grado di infiltrazione neoplastica, l'attività proliferativa delle PC e lo stato di malattia. (17) In MGUS e MM è stata osservata un'aumentata densità microvascolare (MVD) rispetto al midollo osseo di soggetti sani. L'incremento di MVD è correlato allo stadio di malattia ed alla prognosi. Nel MM sono overespressi sia il VEGF (vascular endothelial growth factor), sia HGF (hepatocyte growth factor), entrambi pro-angiogenici. Le alterazioni del microambiente comportano importanti implicazioni

cliniche, poiché la comprensione più approfondita di questi meccanismi ha portato all'utilizzo nella pratica clinica del Mieloma Multiplo di approcci basati sull'immunoterapia. L'importanza del microambiente è stata ulteriormente dimostrata dal fatto che il legame tra cellule mielomatose e cellule stromali è la causa di una maggiore resistenza ad alcuni tipi di terapie in un processo definito "cell adhesion mediated drug resistance" (CAMDR). (17)

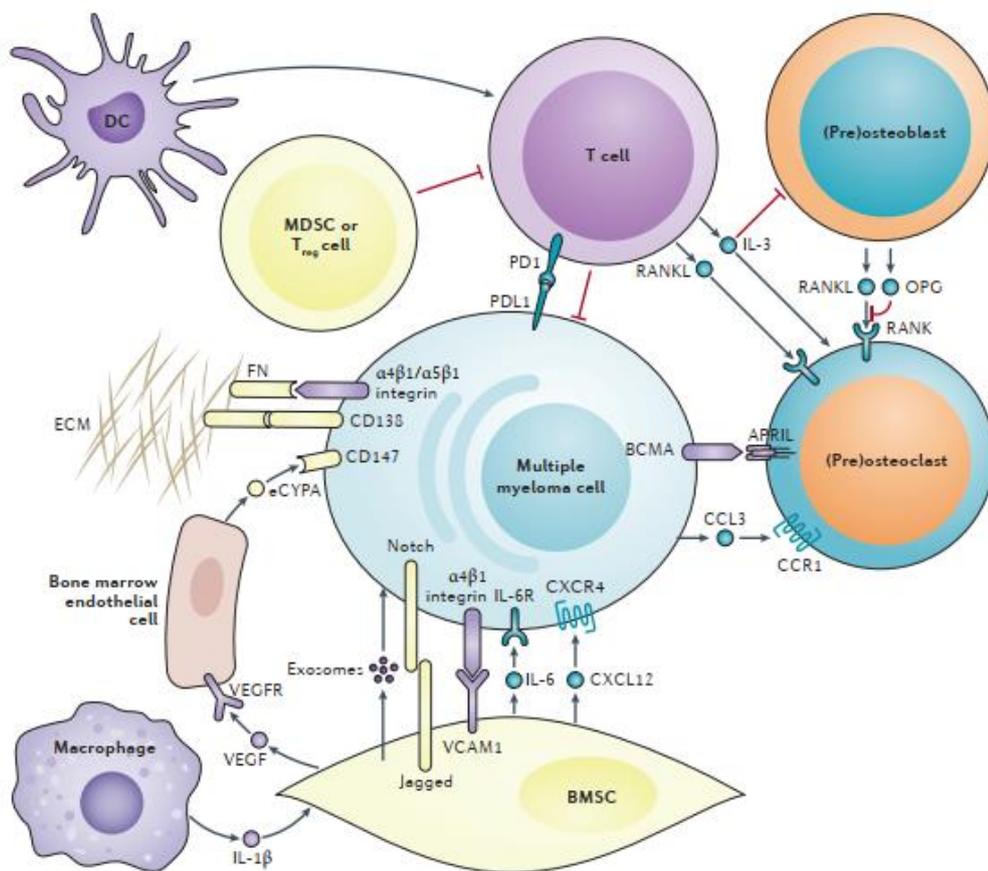


Figura 1.2 - Il microambiente tumorale: le principali interazioni (2)

1.3.5 Fisiopatologia del danno osseo

La patologia ossea con lesioni osteolitiche nel Mieloma Multiplo è presente nell'80% dei pazienti alla diagnosi. Tutte le ossa possono essere coinvolte, ma particolarmente frequenti sono le lesioni dello scheletro assiale e delle ossa lunghe prossimali. La patologia ossea si compone anche di ipercalcemia, dolore osseo e fratture patologiche, con possibile compressione del midollo spinale (*eventi scheletro-relati*). La presenza di danno osseo si correla con una ridotta qualità di vita e la riduzione della sopravvivenza. (18) La patogenesi è legata a uno squilibrio dell'attività osteoclastica rispetto a quella osteoblastica, con quindi un aumento del riassorbimento osseo, a scapito della sua formazione. La regolazione di questo processo coinvolge il legame RANK/RANKL, la cui attivazione fisiologicamente stimola reclutamento, differenziazione e attività delle cellule osteoclastiche. Il RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor KB) è un recettore transmembrana presente sugli osteoclasti e i loro precursori, mentre il suo ligando è prodotto dal microambiente midollare. (19) Le cellule mielomatose, attraverso l'interazione con il microambiente midollare e la produzione di numerose citochine proinfiammatorie (IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β), provocano un aumento del RANKL e una diminuzione dell'osteoprotegerina (OPG). Questa molecola, prodotta da osteoblasti e cellule staminali mesenchimali, è normalmente responsabile dell'inibizione di RANK e quindi dello spegnimento dell'attività osteoclastica. Di conseguenza nel Mieloma il rapporto RANKL/OPG è aumentato. (18)

Un altro fattore che contribuisce alla lisi ossea è l'inibizione dell'attività osteoblastica (e quindi della formazione ossa) attraverso la down-regolazione di un'altra via di segnale: WNT (Wingless), fondamentale per la maturazione di queste cellule. Le plasmacellule tumorali producono citochine e i fattori solubili DKK1, o Dickkopf-1 e il Secreted Frizzles Related Protein, che inibiscono questa via, determinando quindi un blocco nella maturazione e differenziazione dei precursori in osteoblasti maturi. (18,19)

1.3.6 Fisiopatologia del danno renale

L'insufficienza renale è la complicanza più frequente del Mieloma Multiplo, ed è presente già alla diagnosi nella metà dei pazienti. La sua insorgenza si correla con mortalità precoce.

La patogenesi del danno renale è sicuramente multifattoriale. Il fattore principale è rappresentato dall'escrezione urinaria di catene leggere monoclonali (o *proteinuria di Bence Jones*). Contribuiscono poi al danno: ipercalcemia, ipovolemia, farmaci antiinfiammatori non steroidei, pielonefriti e sepsi, invasione del parenchima renale da parte delle plasmacellule e molti altri fattori indipendenti dalle immunoglobuline. (20) Il danno mediato dalle catene leggere ha origine da tre meccanismi diversi che definiscono tre quadri istopatologici diversi.

Il primo caso per frequenza è definito come *Rene da Mieloma* o *Cast Nephropathy*. Fisiologicamente, le catene leggere sieriche vengono filtrate dal glomerulo e riassorbite dal tubulo prossimale insieme alle altre proteine a basso peso molecolare. Il meccanismo patogenetico di base è legato all'eccesso di queste catene e alla loro affinità per le proteine di Tamm-Horsfall – o Uromodulina, la più frequente proteina riscontrabile nelle urine. (21) Le catene in eccesso che non riescono a essere riassorbite a causa della saturazione del trasportatore, si legano all'Uromodulina e precipitano all'interno del lume tubulare sotto forma di cilindri. La localizzazione del danno è generalmente nel tubulo distale. I cilindri accumulatisi possono ostruire il lume e danneggiare l'epitelio tubulare, favorendo così l'infiammazione e l'insorgenza di nefrite interstiziale. A livello del tubulo prossimale, inoltre, le cellule tubulari subiscono un effetto tossico diretto da parte delle catene leggere, che, endocitate, favoriscono la produzione di radicali liberi dell'ossigeno, contribuendo a infiammazione, deposizione di matrice e fibrosi. Per questo motivo la Cast Nephropathy è spesso accompagnata da atrofia tubulo-interstiziale e fibrosi. (20)

Nell'11% dei casi invece riscontriamo un quadro di *Amiloidosi AL*, caratterizzato dalla deposizione di fibrille di amiloide a livello glomerulare.

Contribuiscono alla sua formazione diversi meccanismi, tra cui l'accumulo e la proteolisi delle catene leggere, e la sostituzione di alcuni aminoacidi critici nella regione variabile delle catene. La formazione di amiloide ha luogo nel lisosoma delle cellule glomerulari, all'interno del quale le catene accumulate e degenerate, insieme con altre proteine presenti, si ripiegano in foglietti beta e precipitano sotto forma di fibrille. In rari casi l'amiloide renale origina invece dalle catene pesanti delle immunoglobuline (*Amiloidosi AH*). Il danno glomerulare determina albuminuria, fino anche alla sindrome nefrosica.

L'ultimo quadro istopatologico viene definito *Malattia da deposito di catene leggere* e rappresenta il 5% dei casi riscontrati. Sia i glomeruli che le cellule tubulari vengono danneggiati, a causa della deposizione delle catene leggere a livello della loro membrana basale, che infatti risulta ispessita alla biopsia renale. Il danno prodotto a livello glomerulare induce un fenotipo fibroblastico nelle cellule mesangiali e favorisce così la deposizione di matrice extracellulare. È possibile riscontrare una glomerulosclerosi nodulare con caratteristiche simili alla nefropatia diabetica, con riscontro di proteinuria. A livello tubulare invece il danno è causa di disfunzione del trasporto tubulare prossimale (*Sindrome di Fanconi acquisita*) e di necrosi tubulare acuta per danno diretto. (20)

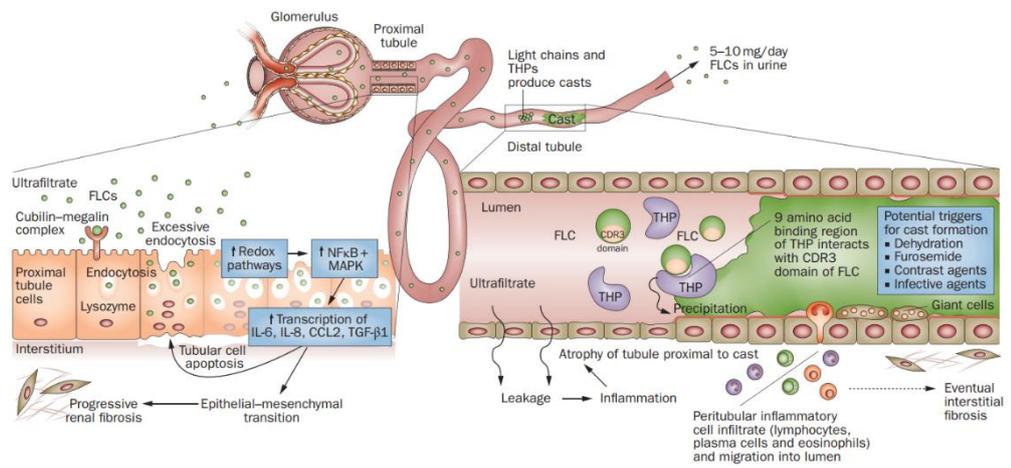


Figura 1.3 - Meccanismi con cui le FLCs provocano danno renale acuto
(22)

1.4 Clinica

Nel 10-20% dei casi il Mieloma Multiplo non presenta sintomi clinici e si giunge alla diagnosi casualmente, attraverso l'esecuzione di esami ematochimici di routine. Le manifestazioni cliniche d'esordio del MM sono varie e riconoscono come substrato patogenetico l'espansione della massa neoplastica e la conseguente infiltrazione midollare, la produzione ad opera delle cellule neoplastiche e/o delle cellule stromali di citochine o di altri fattori di crescita quali IL-6 e VEGF, gli elevati livelli di proteina monoclonale e la deposizione di amiloide. Esse comprendono la sindrome da ipercalcemia, l'insufficienza renale, l'anemia, l'interessamento dell'apparato scheletrico (indicati con l'acronimo inglese CRAB). Da ricordare, inoltre, che in buona parte dei pazienti si riscontrano complicanze infettive e neurologiche, la sindrome da iperviscosità e l'amiloidosi. (19)

1.4.1 Malattia ossea

Circa due terzi dei pazienti affetti da Mieloma Multiplo presentano come sintomo principale il dolore osseo secondario ad interessamento porotico o litico dell'apparato scheletrico. Le sedi più comunemente interessate sono quelle ricche di midollo emopoietico e cioè il rachide, le coste, il bacino e le ossa lunghe. Da segnalare anche, per frequenza di interessamento, il cranio. Il meccanismo del coinvolgimento osseo è multifattoriale:

- esso è secondario, come evidenziato precedentemente, all'aumentata attività osteoclastica, non correttamente bilanciata da un'adeguata attività osteosintetica.
- Il riassorbimento osseo è ulteriormente accentuato dalla presenza di citochine generate dal microambiente midollare tra cui IL-6, IL-1 β , TNF- α responsabili di un aumento del processo di osteoclastogenesi.
- Non da ultimo la distruzione ossea è data anche dall'infiltrazione diretta da parte delle plasmacellule.

Da un punto di vista clinico questo si traduce nella presenza di dolore ingravescente al movimento, crolli vertebrali e conseguente compressione midollare e delle radici nervose. Se sono coinvolti il rachide o gli arti, saranno presenti anche riduzione della mobilità e i problemi conseguenti, tra cui un aumento del rischio trombotico. Il trattamento della malattia ossea si avvale dell'uso dei bifosfonati, nello specifico acido pamidronico (® Aredia) e acido zoledronico (® Zometa) per una durata non superiore ai due anni. Il pamidronato viene somministrato alla dose di 90 mg per via endovenosa 1 volta al mese, mentre lo zoledronato viene somministrato alla dose di 4 mg per via endovenosa 1 volta al mese. La più nota complicanza legata all'uso di zoledronato è l'osteonecrosi della mandibola. Nei pazienti con ricaduta di MM i bifosfonati possono essere ripresi in concomitanza con la terapia attiva sulla malattia. Sono inoltre allo studio nuove molecole come il Denosumab (® Xgeva), anticorpo monoclonale che agisce formando

degli immunocomplessi con il RANKL, neutralizzando così il segnale primario alla rimozione ossea. La chirurgia ortopedica, associata o meno alla radioterapia, è richiesta per quei pazienti con fratture o a rischio di fratture delle ossa lunghe, mentre l'eventuale compressione del midollo spinale che ne consegue è un'emergenza medica che richiede la somministrazione, prima possibile, di Desametasone ad alte dosi insieme al trattamento radioterapico (8,23–25)

1.4.2 Sindrome ipercalcemica

Si osserva nel 25-30% dei pazienti con MM ed è di solito manifestazione di un'elevata quota di malattia. È una condizione legata al coinvolgimento osseo ed alla produzione di varie citochine, che portano ad un aumentato riassorbimento di matrice e, di conseguenza, ad un aumento del rilascio di calcio. L'ipercalcemia di grado lieve (11-11.5 mg/dl) è di solito asintomatica e viene riscontrata nel corso di esami di routine. Alcuni pazienti possono riferire vaghi sintomi di natura neuropsichiatrica, come difficoltà di concentrazione, alterazioni della personalità o depressione. Altri sintomi di esordio possono includere malattia ulcerosa peptica, nefrolitiasi, aumentato rischio di fratture. Nei casi di ipercalcemia più gravi (12-13 mg/dl), soprattutto se instauratisi acutamente, possono osservarsi: sintomi neurologici quali letargia e stupor fino a vere e proprie crisi comiziali, ma anche disturbi gastrointestinali quali nausea, vomito, inappetenza e stipsi. Risulta inoltre ridotta la capacità renale di concentrazione urinaria con conseguente poliuria e polidipsia. Importanti sono anche i disturbi del ritmo cardiaco indotti dagli elevati livelli di calcio evidenziabili all'ECG quali bradicardia, blocchi atrioventricolari e allungamento del QT. L'ipercalcemia può inoltre indurre un danno nefrologico costituito da insufficienza renale acuta, conseguente a massiva disidratazione. È considerata un'emergenza medica che richiede un trattamento tempestivo: nell'arco delle prime 24 ore può essere richiesta l'infusione di 4-6 litri di soluzione fisiologica per via endovenosa. In caso di eventuali comorbilità sottostanti e non prima del ripristino di una normale volemia, può essere richiesta, inoltre, la somministrazione di diuretici dell'ansa, necessari per aumentare l'escrezione di sodio e di calcio (8)

1.4.3 Insufficienza renale

L'insufficienza renale è la più frequente e severa complicanza del MM. È riportata, alla diagnosi, nel 20% circa dei pazienti; in un altro 20-30% dei casi insorge, invece, lungo il decorso della malattia. Più frequentemente si manifesta con le caratteristiche dell'insufficienza renale cronica. Anche in questo caso, la patogenesi è multifattoriale: la causa più comune, ma reversibile, è la deposizione tubulare di catene leggere immunoglobuliniche (più tipicamente di tipo kappa), responsabili dello sviluppo di cast nephropathy. Negli individui sani, le catene leggere sono filtrate dal glomerulo renale e riassorbite a livello del tubulo prossimale. Negli individui affetti, invece, la quantità di catene leggere è tale da superare la capacità di riassorbimento tubulare e ciò che ne consegue è il deposito di queste ultime a livello del segmento distale del nefrone, il loro legame con le glicoproteine di Tamm Horsfall (anche conosciute come uromoduline) e la loro escrezione urinaria come proteinuria di Bence Jones. I più importanti quadri morfologici e funzionali che ne conseguono sono il myeloma kidney e la malattia da deposito di catene leggere. In aggiunta all'escrezione urinaria di catene leggere monoclonali, altri fattori che possono concorrere ad aggravare il danno renale in corso di MM, o più frequentemente, a precipitarne l'insorgenza sono: l'ipercalcemia (che causa diuresi osmotica e conseguente insufficienza renale pre-renale legata alla deplezione di volume), l'uso di farmaci nefrotossici (primi fra tutti gli anti-infiammatori non steroidei), le infezioni, l'iperuricemia, l'uso di mezzi di contrasto iodato, l'uso di bifosfonati e di farmaci chemioterapici. È possibile, inoltre, il depositarsi di sostanza amiloide, più frequentemente associata a catene leggere di tipo lambda a livello glomerulare. L'insufficienza renale è spesso asintomatica fino agli stadi più gravi; quando è presente una sintomatologia, questa è costituita da malessere, astenia, nausea e vomito. (19,20)

1.4.4 Malattie infettive

Rappresentano la principale causa di morte nei pazienti affetti da MM. Tra i fattori patogenetici, il principale è costituito dalla soppressione dell'immunità umorale: ciò avviene non solo attraverso la mediazione del sistema monocito-macrofagico e dei T linfociti, ma anche con la compartecipazione di altri fattori, quali l'aumentato catabolismo delle immunoglobuline e l'immunodeficienza secondaria alla soppressione della normale B linfocitopoiesi. (19)

Ne consegue un rischio fortemente aumentato di sviluppare infezioni batteriche ricorrenti (soprattutto da parte di organismi capsulati e da parte di enterobatteri Gram negativi), infezioni fungine ed una riattivazione del virus Herpes Zoster (quest'ultima più comune in terapia con bortezomib). In entrambi i casi è indicato l'uso di farmaci in profilassi. La suscettibilità alle infezioni è ulteriormente aumentata dagli interventi terapeutici, specialmente dai corticosteroidi. Il rischio infettivo è maggiore nei primi due mesi dopo l'inizio della terapia, per l'azione combinata dell'immunosoppressione legata alla malattia e di quella iatrogena. (8)

1.4.5 Amiloidosi

Le proteine monoclonali, in particolar modo le catene leggere, sono normalmente solubili ma, talora, possono depositarsi sottoforma di amiloide, una proteina fibrillare insolubile, a livello di vari organi, distruggendone così struttura e funzione. Circa il 20% di pazienti con amiloidosi primitiva (AL) hanno una concomitante diagnosi di Mieloma Multiplo e tutti i pazienti con amiloidosi AL presentano una produzione clonale di catene leggere. La presentazione clinica è legata alla deposizione ed al conseguente accumulo di amiloide principalmente a livello di rene, cuore, SNP, fegato. Segni classici di amiloidosi includono, inoltre, porpora periorbitaria e macroglossia (19,20)

1.5 Inquadramento Diagnostico

1.5.1 Diagnostica di primo livello

Nel caso di riscontro di una componente monoclonale sierica o di un sospetto clinico di Mieloma Multiplo gli esami di primo livello sono l'elettroforesi delle proteine e l'immunofissazione del siero, a cui si aggiungono l'elettroforesi e l'immunofissazione nelle urine delle 24 ore o lo studio delle catene leggere libere nel siero. Questo iter diagnostico di primo livello permette il raggiungimento di una sensibilità del 97%. (25)

L'elettroforesi delle proteine sieriche identifica in genere la presenza di una componente monoclonale, rappresentata da un profilo elettroforetico "a guglia di duomo", con picco molto alto e stretto in gamma (o talvolta in beta2 quando le immunoglobuline secrete sono leggere o si frammentano). Questo mi permette di distinguere un picco monoclonale (e quindi neoplastico o potenzialmente neoplastico) da uno policlonale, generalmente più basso e largo del precedente, che potrebbe essere il risultato di un processo infiammatorio o infettivo.

Nel Mieloma non secernente o in presenza di proteinuria di Bence Jones è possibile invece riscontrare un'ipo-gammaglobulinemia all'elettroforesi o un profilo normale. Questo profilo necessita di approfondimenti diagnostici al pari di quello descritto in precedenza.

Le tecniche di elettroforesi di scelta sono il gel Agarosio o l'elettroforesi capillare. Sono consigliate anche una densitometria e una nefelometria per quantificare la componente M. Sono tecniche complementari e in particolare la nefelometria può essere utile in caso di valori bassi di Immunoglobuline. In caso di valori alti, invece, questa tecnica tende a sovrastimarne la concentrazione.

Anche il dosaggio dell'albumina risulta fondamentale, rappresentando una componente chiave nella stadiazione prognostica dell'International Staging System (ISS). Il dosaggio con nefelometria è più accurato ma meno utilizzato nell'approccio clinico: viene spesso preferita la

densitometria, ma che tende a sovrastimarne la concentrazione in presenza di elevati livelli di proteine monoclonali.

L'esame successivo è rappresentato dalla immunofissazione, necessaria per confermare la diagnosi, per tipizzare la classe Ig secreta e per distinguere le catene leggere e pesanti che le formano. Dovrebbe essere richiesto anche in caso di ipogammaglobulinemia o di profilo normale, in caso di forte sospetto clinico di Mieloma Multiplo. Infatti, livelli bassi di proteine monoclonali possono essere associati a un profilo elettroforetico normale.

Lo studio delle urine delle 24 ore con elettroforesi e immunofissazione ha lo scopo di valutare l'eventuale presenza di danno renale e di proteinuria di Bence Jones. Anche in questo caso la presenza di una proteina monoclonale viene riscontrata come un picco omogeneo e la sua concentrazione può essere calcolata tramite densitometria sulla base della grandezza del picco e la quantità totale di proteine nelle urine raccolte in 24 ore. L'immunofissazione urinaria può essere utile nella diagnosi di Mieloma Multiplo micromolecolare, dal momento che in alcuni casi risulta negativo all'elettroforesi e all'immunofissazione sierica. La presenza di catene leggere nelle urine si ha solo se la loro concentrazione supera la capacità di riassorbimento renale. La positività delle catene leggere nelle urine viene definita come proteinuria di Bence-Jones. (26)

Per completare la valutazione sul danno d'organo si consigliano: Calcemia, Creatininemia, Azotemia, indici di necrosi e colestasi epatica, bilirubinemia, PCR e ferritina. All'anamnesi è fondamentale la ricerca di eventuali dolori ossei, astenia, calo ponderale, febbre e infezioni recenti, fratture pregresse, alterazioni dell'alvo, sintomi da iperviscosità, ipotensione ortostatica e impotenza. L'esame obiettivo è volto alla ricerca di linfadenomegalie, epatosplenomegalia, segni di neuropatia periferica o disautonomia, alterazioni cutanee e segni di amiloidosi: macroglossia, porpora periorbitaria, edemi declivi. (27)

1.5.2 Diagnostica di secondo livello

Nell'iter diagnostico di secondo livello, volto alla diagnosi differenziale con MGUS, Mieloma Asintomatico, Macroglobulinemia di Waldenström o Plasmocitoma Solitario, sono indicati: Dosaggio delle catene leggere libere sieriche κ e λ , albuminuria, aspirato midollare o biopsia osteomidollare per valutare l'infiltrato plasmacellulare ed esami radiologici. Questi ultimi comprendono RX dello scheletro o TC total-body a basse dosi, RMN e PET-TC per valutare l'eventuale coinvolgimento osseo, le sedi e l'estensione delle sue localizzazioni. (26,27)

Il dosaggio delle catene leggere libere nel siero è raccomandato in tutte le nuove diagnosi di discrasia plasmacellulare. Attraverso questo esame di laboratorio è possibile dosare la concentrazione delle catene leggere κ e λ i cui valori di riferimento sono rispettivamente 3.3-19.4 mg/l e 5.7-26.3 mg/l. Si può identificare la catena clonale sulla base del rapporto κ/λ : valori al di sotto di 0.26 indicano un eccesso di catene libere λ , mentre valori al di sopra di 1.65 un eccesso di catene κ . La catena prodotta in eccesso, e quindi monoclonale viene definita "involved", mentre l'altra, non monoclonale, "uninvolved". Questo esame di laboratorio può essere utilizzato anche in fase di diagnostica di primo livello in associazione all'immunofissazione sierica in sostituzione dell'immunofissazione delle urine delle 24 ore. Tuttavia, una volta accertata la diagnosi di gammapatia monoclonale, l'immunofissazione urinaria dovrebbe comunque essere eseguita.

È molto importante la sua esecuzione anche nel caso di mieloma non secernente e negatività all'immunofissazione sierica e urinaria, di mieloma oligosecernente e di mieloma secernente solo catene leggere. È utile anche per la valutazione dei pazienti con MGUS e smoldering mieloma dal momento che valori anormali possono essere associati a un maggiore rischio di progressione a mieloma sintomatico. Non ne viene raccomandato il dosaggio nelle urine. Un risultato inaspettato che si è ottenuto con l'utilizzo di questa metodica è quello del suo valore prognostico. Non è del tutto chiaro il meccanismo patogenetico, ma si

ipotizza che valori elevati di catene leggere libere nel siero siano associate a traslocazioni IgH, un maggiore rischio di progressione da MGUS e mieloma asintomatico e a un più alto carico tumorale. (28)

L'esecuzione di un aspirato o di una biopsia midollari sono necessari per confermare la diagnosi in caso di riscontro di un infiltrato plasmacellulare superiore al 10%. Per una determinazione accurata dovrebbe essere utilizzato un marcatore per CD138. La clonalità plasmacellulare viene stabilita con l'identificazione di un'immunoglobulina monoclonale nel citoplasma della cellula, attraverso una tecnica di immunoperossidasi o di immunofluorescenza. La biopsia dovrebbe essere scelta, quando possibile, in sostituzione dell'aspirato, per la sua accuratezza maggiore nel determinare la percentuale di infiltrato plasmacellulare e per ridurre la necessità di ripetere la procedura a causa di un prelievo inadeguato.

Dovrebbe essere incluso anche uno studio citogenetico standard in metafase: fornisce informazioni prognostiche importanti, distinguendo tra forme iperploidi e non iperploidi e identificando anche forme infrequenti di addizioni, delezioni e traslocazioni. Tuttavia, la sensibilità di questa metodica non è molto alta, per questo motivo in aggiunta dovrebbe essere eseguita un'ibridazione fluorescente in situ (FISH, fluorescent in situ hybridization) per identificare specifiche anomalie cromosomiche, con sonde che includano anche 17p13, t(4;14) e t(14;16).

Lo studio radiologico tradizionale dello scheletro, grazie al suo basso costo e alla sua ampia disponibilità, è stato a lungo l'esame di imaging standard alla diagnosi. Permette di studiare aree ampie e la presenza di *impending fracture* (lesioni a rischio di frattura imminente). Le proiezioni da includere sono:

- Posteroanteriore del torace
- Anteroposteriore e laterale dei segmenti vertebrali cervicale, toracico e lombare,
- Anteroposteriore e laterale di omeri e femori
- Anteroposteriore e laterale del cranio

- Anteroposteriore della pelvi (26)

Circa l'80% dei pazienti ha evidenza di coinvolgimento scheletrico allo studio radiografico dello scheletro in toto (WBXR – whole body radiographic skeletal survey), colpendo in ordine di frequenza: vertebre (66%), coste (45%), cranio (40%), pelvi (40%), ossa lunghe (25%). Il mieloma si presenta con lesioni litiche a margine non sclerotico e ad aspetto “perforato”. Altri possibili reperti sono un aspetto generalizzato a macchie dell'osso affetto e nelle ossa lunghe una smerlatura endostale. Ha un ruolo anche nel definire il rischio di fratture nelle ossa lunghe con malattia osteolitica. Lo score di Mirel, il più comune modello di predizione, suggerisce che i pazienti ad alto rischio di frattura beneficiano di fissazione interna preventiva, mentre quelli a basso rischio possono ricevere la sola radioterapia.

Tuttavia, la radiologia tradizionale ha dei limiti: ha una bassa sensibilità (le lesioni sono visibili solo quando più del 30% delle trabecole è distrutto), è necessario molto tempo per acquisire tutte le immagini dello scheletro con multipli riposizionamenti, può essere difficile visualizzare correttamente alcune aree, come pelvi e rachide, e risulta complessa la diagnosi differenziale tra fratture da compressione osteoporotiche e le lesioni osteolitiche da Mieloma. Inoltre, ha una bassa sensibilità nella definizione di risposta al trattamento.

La TC total-body a basse dosi (e in genere senza mezzo di contrasto) è un esame imaging molto più sensibile nella ricerca di lesioni osteolitiche. Permette, inoltre, di valutare lesioni midollare non litiche determinate da infiltrazione plasmacellulare, visibili come un aumento dell'attenuazione dei tessuti molli. Nonostante questo, la Risonanza Magnetica Nucleare rimane l'esame di scelta per lo studio dei tessuti molli, per la sua maggiore sensibilità.

L'identificazione di una lesione osteolitica ≥ 5 mm rientra nei criteri aggiornati dell'IMWG, soddisfacendo i criteri CRAB di coinvolgimento osseo. Al contrario, le lesioni di dimensioni inferiori o equivoche visibili

solo alla TC o alla PET/TC non soddisfano il criterio e dovrebbero essere rivalutate a 3-6 mesi prima di fare diagnosi di Mieloma Multiplo. La RMN e la PET/TC hanno una maggiore utilità anche nell'identificazione di malattia extra-midollare.

La TC è utile anche nella valutazione delle fratture patologiche e nella stima della stabilità della colonna nel caso di fratture vertebrali, aiutando nell'identificare i soggetti candidati a fissazione preventiva.

Alla TC, come nella radiologia tradizionale, le lesioni litiche sono visibili come lesioni a margini non sclerotici, con aspetto perforato. In rari casi, invece, sono lesioni espansive o sclerotiche.

Lo sviluppo di un margine sclerotico, di una attenuazione del grasso interno o la ricrescita di osso corticale sono caratteristiche spesso identificate nei pazienti con risposta positiva al trattamento. Cambiamenti nella dimensione delle lesioni midollari sembrano correlare con cambiamenti degli indici ematologici. Tuttavia, la TC ha un ruolo limitato nella valutazione della risposta al trattamento, rispetto a RMN e PET/TC.
(29)

Lo studio con risonanza magnetica nucleare fornisce informazioni utili sul coinvolgimento e sul pattern (focale, diffuso o variegato) del midollo osseo e permette la valutazione dell'estensione della malattia dalle lesioni ossee ai tessuti molli. Inoltre, identifica precocemente lesioni asintomatiche. Per questo motivo lo studio con RMN dovrebbe essere considerato nei pazienti con mieloma asintomatico, in modo da identificare lesioni nascoste agli studi radiologici tradizionali. Se presenti, sono un indice di più rapida progressione a forma sintomatica.

Nei pazienti con Mieloma Multiplo la risonanza magnetica dovrebbe rappresentare una valutazione di routine per poter visualizzare lesioni focali non sospette e plasmocitomi dei tessuti molli a livello dello scheletro o della pelvi e perché alcuni aspetti anormali, come il pattern diffuso o con grande numero di lesioni focali, hanno un significato prognostico. È poi necessario per uno studio dettagliato di un'area

dolente dello scheletro per la ricerca di una massa nei tessuti molli o per individuare una compressione midollare, la sua esatta localizzazione, l'estensione della compressione al midollo o alle radici dei nervi, la grandezza della massa e il grado con cui interessa lo spazio epidurale.

È utilizzata anche per la diagnostica differenziale eziologica di una vertebra collassata e dolorosa di nuovo riscontro: tra una causa legata al mieloma o come risultato di osteoporosi. Infine, la risonanza è fortemente raccomandata nei pazienti con mieloma non secernente per la valutazione iniziale e il follow-up di risposta ai trattamenti. (26)

La PET-TC con 18F-fluorodesossiglucosio (18F-FDG) ha un ruolo sia nella diagnosi, che nella prognosi e nella valutazione della risposta terapeutica. Questa tecnica imaging combina uno studio funzionale dell'attività tumorale con informazioni morfologiche TC. Può essere utile per distinguere tra Mieloma Smoldering e Mieloma Multiplo attivo: ha infatti una maggiore sensibilità della radiologia nell'identificare lesioni ossee nel rachide e nella pelvi. Alcune caratteristiche osservabili alla PET-TC sono associate a una peggiore prognosi: la presenza di ≥ 3 lesioni focali, un indice SUVmax > 4.2 e la presenza di malattia extramidollare riducono di quattro anni la sopravvivenza libera da malattia. Questi ultimi due sono anche correlati a una riduzione della sopravvivenza generale. Il ruolo maggiore, tuttavia, risulta essere quello della definizione della risposta al trattamento e dell'identificazione di progressione di malattia.

Per l'iniziale inquadramento di un sospetto Mieloma Multiplo si raccomanda quindi l'utilizzo di TC total-body a basse dosi. La PET-TC viene consigliata come primo esame imaging quando si sospetta una malattia extramidollare o un mieloma non secernente. Gli studi TC o RMN sono preferibili in caso di sospetta compressione midollare. (29)

1.6 Criteri Diagnostici

I criteri attualmente presi in considerazione per la diagnosi di Mieloma Multiplo e delle altre discrasie plasmacellulari sono stati stabiliti dall'International Myeloma Working Group nel 2003, e poi aggiornati nel 2014. (30,31)

Diagnosi	Definizione
MGUS (non-IgM)	<ul style="list-style-type: none"> • Componente monoclonale non-IgM < 30 g/L • Infiltrato plasmacellulare del midollo osseo < 10% • Assenza di danno d'organo attribuibile al disordine plasmacellulare: ipercalcemia, insufficienza renale, anemia, lesioni ossee, amiloidosi.
MGUS IgM	<ul style="list-style-type: none"> • Componente monoclonale IgM < 30 g/L • Infiltrato plasmacellulare del midollo osseo < 10% • Assenza di anemia, sintomi costituzionali, iperviscosità, linfadenopatie, epatosplenomegalia, o altro danno d'organo che può essere attribuito al disordine linfoproliferativo
MGUS a catene leggere	<ul style="list-style-type: none"> • Rapporto FLC alterato (< 0.26 o > 1.65) • Aumentati livelli ematici della catena leggera coinvolta, K per rapporti > 1.65, λ per rapporti < 0.26 • Assenza di catene pesanti delle immunoglobuline all'immunofissazione • Assenza di danno d'organo attribuibile al disordine plasmacellulare: ipercalcemia, insufficienza renale, anemia, lesioni ossee, amiloidosi. • Infiltrato plasmacellulare del midollo osseo < 10% • Proteinuria monoclonale < 500 mg/24h

<p>SMM (Mieloma Smoldering)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Componente monoclonale (IgG o IgA) \geq 30 g/L o proteinuria monoclonale \geq 500 mg/24h e/o infiltrato plasmacellulare 10-60% • Assenza di segni/sintomi attribuibili alla discrasia plasmacellulare
<p>MM</p>	<ul style="list-style-type: none"> • \geq 10% di plasmacellule monoclonali nel midollo osseo o biopsia diagnostica per plasmocitoma solitario o extramidollare e uno o più dei seguenti eventi definenti il Mieloma: <ul style="list-style-type: none"> ○ Ipercalcemia: calcio sierico $>$ 0.25 mmol/L o 1 mg/dL rispetto al limite superiore della norma, oppure valore assoluto $>$ 2.75 mmol/L o 11 mg/dL ○ Insufficienza renale: Clearance della creatinina $<$ 40 mL/min o creatininemia $>$ 177 μmol/L o 2 mg/dL ○ Anemia: Emoglobina $>$ 20 g/L al di sotto del limite inferiore della norma, oppure Emoglobina $<$ 100 g/L ○ Lesioni ossee: una o più lesioni osteolitiche alla radiografia dello scheletro, TC o PET-TC ○ Infiltrato plasmacellulare midollare \geq 60% ○ Rapporto FLC coinvolta/non coinvolta nel siero \geq 100 ○ $>$ 1 lesione focale alla RMN

Tabella 1.1 – I criteri diagnostici aggiornati dall'IMWG nel 2014 (31)

1.6.1 Gammapatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS)

Viene definita con il termine MGUS la presenza di una proteina monoclonale in assenza di evidenza di Mieloma Multiplo, Macroglobulinemia di Waldenström, Amiloidosi o altre patologie plasmacellulari o linfoproliferative. La proteina monoclonale deve essere presente in quantità inferiori a 30 g/L nel siero e l'infiltrato plasmacellulare del midollo osseo < 10%. Inoltre, non devono essere presenti segni di danno d'organo o apparato a esso correlati facenti parte dei criteri CRAB, come di seguito specificati.

1.6.2 Mieloma Asintomatico e Sintomatico

All'interno della diagnosi di Mieloma Multiplo dobbiamo ulteriormente distinguere tra una condizione asintomatica, lo Smoldering Mieloma, e il Mieloma Multiplo sintomatico. Il termine "sintomatico" comprende tuttavia anche le rare casistiche prive di sintomi, ma con evidenza di danno d'organo.

Il Mieloma Asintomatico è quindi definito per un'infiltrazione plasmacellulare compresa tra il 10% e il 59%, o per livelli di proteina M \geq 30 g/L, o per livelli di proteina monoclonale nelle urine delle 24 ore \geq 500mg. La positività di uno di questi criteri deve essere accompagnata dall'assenza di sintomi e segni di danno tissutale o d'organo e dall'assenza di amiloidosi.

I pazienti vengono stratificati in classi di rischio di progressione: quelli a basso rischio possono non richiedere trattamento per anni o non progredire mai a MM sintomatico. L'alto rischio di progressione (\geq 50% a 2 anni dalla diagnosi) è correlato a:

- Presenza di una CM sierica \geq 3g/dl
- Istotipo IgA
- Immunoparesi
- Incremento della CM/catene leggere libere sieriche \geq 25% a due controlli successivi a 6 mesi di distanza.
- Alterazioni citogenetiche prognosticamente sfavorevoli (t(4;14), del(17p) o 1q amplificazione)
- Presenza di una lesione focale alla RMN
- Presenza di lesioni captanti in PET-TC senza evidenza di lesioni osteolitiche sottostanti.

Viene quindi avviato un follow-up con valutazioni cliniche e strumentali ravvicinate, con lo scopo di identificare precocemente l'eventuale progressione. Non è invece indicato un trattamento con chemioterapici.

Non esistono ad oggi criteri noti che possano predire con certezza quali pazienti con Mieloma Smoldering presentino solo plasmacellule pre-

maligne e quali invece presentino già plasmacellule tumorali, e quindi un significativo aumento del rischio di progressione.

La diagnosi di Mieloma Multiplo sintomatico richiede, in aggiunta a un infiltrato plasmacellulare $\geq 10\%$ o di una biopsia che documenti la presenza di un plasmocitoma, la positività di almeno uno tra i criteri di danno d'organo *CRAB* (Calcium, Renal Insufficiency, Anaemia, Bone Lesions, introdotti nel 2003 e maggiormente chiariti nel 2014), o uno tra i criteri biochimici recentemente introdotti.

Tra i primi:

- Ipercalcemia: Calcio sierico più alto di 1 mg/dL del limite superiore della norma o > 11 mg/dL
- Insufficienza Renale: Creatininemia > 2 mg/dL o una clearance renale < 40 ml/min
- Anemia: Valori di emoglobina < 2 g/dl rispetto al limite inferiore della norma o < 10 g/dL
- Lesioni Ossee: evidenza di uno o più lesioni osteolitiche alla radiografia dello scheletro, TC o PET-TC

I nuovi criteri comprendono:

- Infiltrato plasmacellulare nel midollo osseo $\geq 60\%$
- Rapporto tra la catena leggera coinvolta (maggiormente escreta) e quella non coinvolta (FLC ratio) ≥ 100
- Presenza di più di una lesione focale (≥ 5 mm) alla RMN scheletro.
(30,31)

1.7 Stadiazione, stratificazione del rischio e prognosi

Il decorso del Mieloma Multiplo è variabile ed il comportamento clinico è estremamente eterogeneo. I principali sistemi di stadiazione utilizzati nei pazienti affetti da Mieloma Multiplo sono diversi. Da un punto di vista storico è importante ricordare il primo sistema di stadiazione della malattia proposto da Durie e Salmon nel 1975, il cui ruolo, però, è sicuramente oggi più marginale. Esso prevede la stratificazione dei pazienti secondo tre stadi di malattia, corrispondenti ad una massa tumorale progressivamente più espansa ed ulteriormente suddivisi in due varietà (indicate con A e B rispettivamente) a seconda che la funzionalità renale sia alterata o meno come indicato dai livelli di creatinina sierica. I parametri su cui si basa tale classificazione sono: concentrazione emoglobinica e della componente monoclonale, calcemia, numero di lesioni ossee e, se presente, quantificazione della proteinuria di Bence Jones nelle urine delle 24 h. (32)

Stadio	Criteri	Massa tumorale (cellule x 10 ¹² /m ²)
I	Tutti i seguenti: <ol style="list-style-type: none"> 1. Hb > 10 g/100 ml 2. Calcemia ≤ 12 mg/dl 3. Struttura normale o unico plasmocitoma alla radiologia 4. Basso tasso di produzione della componente M <ol style="list-style-type: none"> a. IgG < 5 g/dl b. IgA < 3 g/dl c. Catene leggere urinarie all'elettroforesi < 4 g/24 ore 	< 0.6 (basso)
II	Non soddisfa i criteri degli stadi I e III	0.6 – 1.20 (intermedio)
III	Uno o più dei seguenti: <ol style="list-style-type: none"> 1. Hb < 8.5 g/100 ml 2. Calcemia > 12 mg/dl 3. Lesioni Litiche avanzate 4. Alto tasso di produzione della componente M <ol style="list-style-type: none"> a. IgG > 7 g/dl b. IgA > 5 g/dl c. Catene leggere urinarie all'elettroforesi > 12 g/24 ore 	> 1.20 (alto)
A = funzione renale relativamente normale (creatinina < 2.0 mg/dl)		
B = funzione renale alterata (creatinina ≥ 2.0 mg/dl)		

Tabella 1.2 Stadiazione secondo Durie/Salmon. (33)

L'International Myeloma Working Group ha poi indicato come criteri classificativi i soli valori di β_2M e albumina. Quindi L'ISS (2005) consiste in tre stadi:

- Stadio I: $\beta_2M < 3.5$ mg/l e albumina sierica ≥ 3.5 g/dl – sopravvivenza mediana 62 mesi
- Stadio II: non soddisfa i criteri di I e III – sopravvivenza mediana 44 mesi
- Stadio III: $\beta_2M \geq 5.5$ mg/l – sopravvivenza mediana 29 mesi

Questo sistema ha molti vantaggi: è più riproducibile del sistema Durie/Salmon e più facilmente comparabile nei trial clinici. Tuttavia, anch'esso ha dei limiti: non è utile in caso di MGUS, Smoldering Mieloma o altre discrasie plasmacellulari, ma solo in caso di diagnosi di Mieloma. Inoltre, lo stadio III comprende pazienti con elevato β_2M sia per cause legate al carico tumorale, sia per insufficienza renale. L'ISS non può essere usato per una stratificazione del rischio terapeutico o non fornisce una stima accurata del carico tumorale. Infine, non è stato stabilito il suo ruolo prognostico con l'avvento dei nuovi farmaci. (34)

Nel 2015 sono stati aggiunti due importanti fattori prognostici: le anomalie cromosomiche e il valore di lattato deidrogenasi (LDH) nel siero che rientrano nella Revised ISS (R-ISS), un sistema che migliora in maniera significativa la valutazione prognostica dei pazienti sia in termini di progression free survival (PFS) che di overall survival (OS). L'LDH è un enzima presente in tutte le cellule e rilasciato a livello sierico nel momento in cui queste ultime sono danneggiate o distrutte e, talora, è aumentato anche in altre condizioni patologiche. Tra le alterazioni citogenetiche le più ricorrenti sono le traslocazioni t(4;14) e t(14;16) e la delezione del braccio corto del cromosoma 17 (tutte associate ad alto rischio e a prognosi infausta), mentre la traslocazione t(11;14) e la delezione del braccio lungo del cromosoma 13 sono associate a rischio standard e a prognosi benigna. La PFS mediana dei pazienti con stadio R-ISS 1 è di 66 mesi, di 42 mesi per i pazienti con R-ISS 2 e di 29 mesi dei pazienti con R-ISS 3, mentre la OS a 5 anni dei pazienti con stadio

R-ISS 1 è pari all'82%, pari all'62% per i pazienti con R-ISS 2 e del 40% per i pazienti con R-ISS 3. (35) Esistono tuttavia altri importanti fattori prognostici legati sia alla biologia del tumore (quali la presenza o meno di malattia extramidollare alla diagnosi, gli indici proliferativi, il numero di plasmacellule circolanti, l'immunoparesi, la presenza di mutazione di TP53) sia all'eventuale risposta terapeutica.

Il valore superiore alla norma di LDH correla con un'aumentata aggressività tumorale e suggerisce un alto indice di proliferazione e/o la presenza di una massa tumorale extra-midollare o extra-ossea.

Il Revised-ISS, quindi, modifica i tre stadi precedentemente citati aggiungendo questi due nuovi parametri:

- Stadio I: ISS-I e citogenetica a rischio standard e LDH normale
- Stadio II: non soddisfa i criteri di I e III
- Stadio III: ISS-III e/o citogenetica ad alto rischio e/o LDH alto (35)

In aggiunta alle anomalie cromosomiche precedentemente citate si raccomanda la ricerca con metodica FISH di trisomie, traslocazioni IgH, traslocazioni MYC e anomalie dei cromosomi 1, 13 e 17. (25).

Infatti, la Mayo Clinic ha identificato nuovi fattori prognostici da valutare nella scelta della strategia terapeutica. Questi possono essere suddivisi in 3 gruppi: biologia tumorale, carico tumorale e fattori legati al paziente, anche se i fattori prognostici più rilevanti rimangono quello citogenetico e di carico tumorale (Tabella 1.3).

Sulla base di questi, i pazienti vengono suddivisi in rischio standard, intermedio e alto, come riportato in Tabella 1.3 e la mediana di sopravvivenza cambia radicalmente. (36)

Fattori Prognostici		
Biologia Tumorale	Carico Tumorale	Malattia Extramidollare
<ul style="list-style-type: none"> - Ploidia - Del 17p - t(14;16) - t(14;20) - t(4;14) - del 13 - alterazioni del cromosoma 1 - t(11;14) - t(6;14) - LDH - Indice di proliferazione plasmacellulare - Presentazione come leucemia plasmacellulare - Alto rischio nel profilo di espressione genico 	<ul style="list-style-type: none"> - Durie/Salmon - ISS - Malattia extramidollare 	<ul style="list-style-type: none"> - ECOG performance status (Eastern Cooperative Oncology Group) - Età - Funzionalità renale

Tabella 1.3 Fattori prognostici Mayo Clinic (36)

Alto rischio	Rischio Intermedio	Rischio Standard
FISH <ul style="list-style-type: none"> - Del 17p - t(14;16) - t(14;20) GEP = gene expression profiling <ul style="list-style-type: none"> - Espressione ad alto rischio 	FISH <ul style="list-style-type: none"> - t(4;14) Del 13 alla citogenetica convenzionale Ipoploidia PCLI (plasma cell labeling index – proliferazione plasmacellulare) ≥ 3%	Tutti gli altri fattori, includendo: FISH <ul style="list-style-type: none"> - t(11;14) - t(6;14)
Incidenza: 20% Sopravvivenza mediana: 3 anni	20% 4-5 anni	60% 8-10 anni

Tabella 1.4 rischio citogenetico secondo Mayo Clinic (36)

1.8 Trattamento del Mieloma Multiplo

Il trattamento e l'outcome clinico del Mieloma Multiplo sono notevolmente cambiati negli ultimi decenni, con un significativo aumento della OS mediana fino a 8-10 anni. Ciò si deve: in primo luogo all'introduzione di nuove classi di farmaci quali gli inibitori del proteasoma (PIs) e gli agenti immunomodulanti (IMiDs) e, in secondo luogo, allo sviluppo delle tecniche trapiantologiche; ad oggi, il trapianto autologo di cellule staminali (ASCT) è lo standard of care nei pazienti con nuova diagnosi di Mieloma Multiplo. I più importanti criteri per capire se il paziente possa essere candidabile o meno al trapianto sono l'età, la presenza di comorbidità e la valutazione della funzione d'organo. Convenzionalmente l'età anagrafica a cui il paziente può essere sottoposto ad ASCT è ≤ 65 anni; occorre però ricordare che il MM è una patologia che colpisce prevalentemente i soggetti più anziani, nei quali la presentazione clinica e la prognosi variano ampiamente e restano più sfavorevoli rispetto ai soggetti più giovani. Questo si è visto essere legato ad una più alta frequenza di interruzioni del trattamento terapeutico ed alla comparsa di eventi avversi non ematologici legati alla terapia. Inoltre, i soggetti anziani sono più fragili e meno frequentemente arruolati nei trials clinici e, di conseguenza, le evidenze di possibili benefici derivanti dall'uso di nuove classi di farmaci sono nettamente inferiori; ciò si deve alla presenza di più comorbidità ed alla maggiore frequenza di politerapie e di interazioni che possono complicare il trattamento di questa categoria di pazienti. Dato il rapido invecchiamento generale della popolazione ed il sempre maggior numero di pazienti anziani, vengono richiesti strumenti validi per poter valutare le loro vulnerabilità e l'impatto che la patologia ha sul compiere e portare a termine le normali attività di vita quotidiana; da qui l'importanza di inserire, nel corso dell'iter diagnostico, una valutazione geriatrica che possa permettere di scegliere la strategia terapeutica migliore e mirata alle esigenze del paziente. Il concetto della cosiddetta fitness ha assunto un ruolo sempre più importante non solo in ambito geriatrico, ma nell'intero campo onco-ematologico, dal momento

che circa il 60% delle neoplasie viene diagnosticata in soggetti con più di 65 anni di età e tale dato è destinato ad accrescere parallelamente all'invecchiamento della popolazione generale.

Vista l'estrema variabilità con cui si presenta la malattia, nel 2015 L'IMWG ha proposto un nuovo metodo di calcolo per definire il profilo di fragilità nei pazienti anziani con Mieloma Multiplo. Tale tipologia di pazienti, infatti, non è eterogenea ed emerge quindi la necessità di definirne il profilo in funzione del declino funzionale e della sopravvivenza globale, in modo da fornire una valutazione oggettiva per identificare le terapie più adeguate. L'elemento principale attualmente utilizzato per decidere il trattamento in pazienti anziani con Mieloma Multiplo è l'età anagrafica, ma vi è una crescente consapevolezza che la fragilità, determinata sulla base di altre misure quali la presenza di comorbidità al momento della diagnosi, possa fornire indicazioni più utili per la corretta scelta terapeutica. Il Myeloma Frailty Score, proposto dall'IMWG, calcola tale indice di fragilità basandosi non solo sull'età anagrafica, ma anche su tre diverse scale di valutazione: La Katz Activity of Daily Living (ADL), la Lawton Instrumental Activity of Daily Living (IADL) e la Charlson Comorbidity Index (CCI). Tale valutazione è evidentemente complessa e, di conseguenza, sono stati proposti degli strumenti di calcolo che agevolano questo passaggio. È infatti emerso che il tempo investito in questo processo viene bilanciato dal vantaggio di ridurre di circa un terzo il conseguente rischio di incorrere in eventi avversi gravi legati al trattamento assegnato. Sulla base di questa valutazione è così possibile stratificare i pazienti in 3 categorie: fit, frail e unfit prevedendo il rischio di mortalità sulla base del loro stato cognitivo e funzionale. (37)

La terapia del Mieloma Multiplo è molto cambiata nei decenni passati, grazie all'introduzione all'interno degli schemi terapeutici di due classi di farmaci: gli immunomodulatori (capostipite la Thalidomide, a cui si aggiungono i suoi derivati di seconda e terza generazione: rispettivamente Lenalidomide e Pomalidomide) e gli inibitori del proteasoma (Bortezomib, Carfilzomib, Ixazomib, Marizomib). Queste due

classi, associate a basse dosi di Desametasone, hanno radicalmente modificato la sopravvivenza: 88% OS a 3 anni con schema VRD (Bortezomib, Lenalidomide, Desametasone) - (38) rispetto al 40% con schema chemioterapico di combinazione (CCT) (39).

Nel primo caso il meccanismo d'azione è legato alla soppressione dell'angiogenesi, all'inibizione del TNF-alfa, la prevenzione del danno al DNA mediato da radicali liberi, all'aumento di effetti citotossici cellulomediati e l'alterazione nell'espressione di molecole di adesione cellulare, determinando quindi l'effetto immunomodulatore che dà il nome alla classe di farmaci. La Pomalidomide sembra ottenere un maggiore effetto immunomodulatorio e antiangiogenico degli altri farmaci della classe, tuttavia ha anche una maggiore tossicità.

La seconda classe di farmaci è rappresentata da inibitori del proteasoma 26S, una proteasi intracellulare adenosina-difosfato dipendente coinvolta nel catabolismo proteico. Se fisiologicamente le proteine destinate al catabolismo vengono prima ubiquitinate e poi degradate nella porzione centrale del proteasoma – evento critico e fondamentale per il normale ciclo cellulare, l'inibizione di questa via crea un disequilibrio tra le proteine regolatrici che porta all'arresto del ciclo cellulare e all'apoptosi. Si ipotizza quindi che l'effetto terapeutico sia il risultato di un effetto citotossico diretto sul microambiente del midollo osseo. Inoltre, al pari degli immunomodulatori, questa classe ha come effetto la diminuzione nell'espressione di molecole di adesione e di fattori di crescita, sopravvivenza e angiogenici, determina accumulo di I κ B (un'inibitore del fattore di trascrizione NF- κ B) e ha un effetto pro-apoptotico. Il Bortezomib è parte della prima generazione, mentre Carfilzomib, Ixazomib e Marizomib sono farmaci di seconda generazione. (40)

L'attuale approccio terapeutico al Mieloma Multiplo prevede tre fasi: una di induzione, il trapianto autologo se il paziente è eleggibile e una di consolidamento/mantenimento.

I pazienti candidati a terapia con Trapianto Autologo di cellule staminali emopoietiche (ASCT) sono pazienti in buone condizioni di salute – definiti “fit” – con normale funzionalità cardiaca, polmonare ed epatica al di sotto dei 70 anni di età, in grado di sostenere una terapia chemioterapica ad alte dosi (HDT) seguita dal trapianto.

Nei pazienti > 70 anni e/o non candidati a trapianto autologo, deve essere eseguita un'accurata valutazione della fragilità e adattare il dosaggio dei farmaci successivamente descritti alla loro tollerabilità. (27)

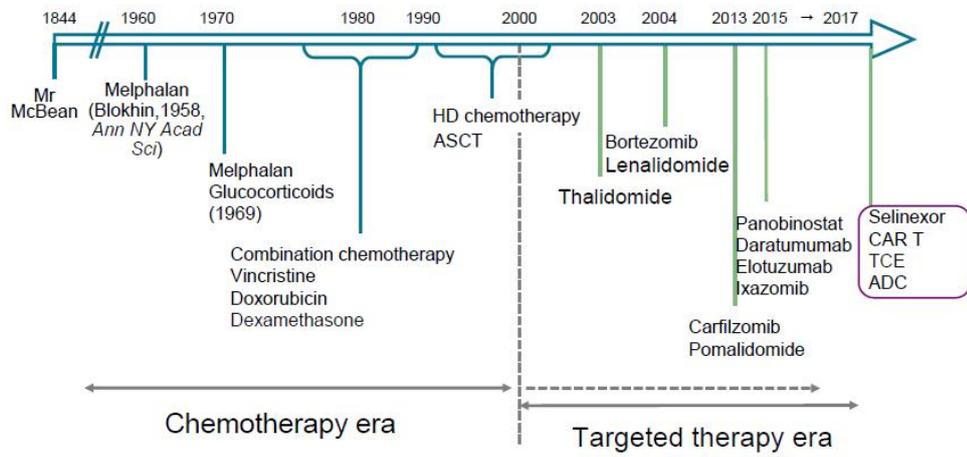


Figura 1.4 – La terapia anti-MM nel tempo (41)

1.8.1 Terapia di prima linea nei pazienti < 65-70 anni, candidabili a trapianto autologo di cellule staminali

I pazienti eleggibili per trapianto generalmente ricevono quattro cicli di terapia di induzione, seguita dalla raccolta delle cellule staminali e dal trapianto autologo. A seguire deve essere valutata la possibilità di una terapia di mantenimento/consolidamento. La scelta si basa sulla presenza o meno di caratteristiche citogenetiche ad alto rischio. (25)

I farmaci utilizzati non devono essere tossici per le cellule staminali emopoietiche e per questo motivo l'utilizzo di agenti alchilanti dovrebbe essere evitato. (40)

In passato il regime chemioterapico convenzionale prevedeva l'utilizzo di Vincristina, Adriamicina e Desametasone, con un tasso di risposta completa del 5-10% prima del trapianto, del 35% dopo il trapianto e una sopravvivenza mediana di 6 anni. Questa associazione è stata rimpiazzata dallo schema a due farmaci composto da Thalidomide e Desametasone (TD), mantenendo però un basso tasso di risposta completa pre-trapianto (< 10%). L'utilizzo del Bortezomib in alternativa alla Thalidomide raggiunge un tasso di CR del 12% prima del trapianto, con un risultato superiore a breve e medio termine. Tuttavia, non si osservano benefici dopo il trapianto (CR 33%). Risultati molto più promettenti sono stati raggiunti con schemi che prevedano l'utilizzo di tre farmaci come Bortezomib/Thalidomide/Desametasone: CR 43% pre-trapianto e 52% post-trapianto. (42)

Oggi i principali regimi di induzione utilizzati nel trattamento del Mieloma Multiplo di nuova diagnosi sono:

- Lenalidomide e Desametasone (Rd)
- Bortezomib, Lenalidomide e Desametasone (VRD)
- Bortezomib, Talidomide e Desametasone (VTD)
- Bortezomib, Ciclofosfamide e Desametasone (VCD)

Lo schema VRD si è rivelato ottenere una sopravvivenza libera da malattia (PFS) e una Overall-Survival significativamente superiore allo

schema Rd. Anche il triplo schema con Talidomide si è rivelato superiore ad altri schemi con due farmaci, e un recente studio randomizzato ha dimostrato la superiorità di questo rispetto allo schema VCD. Sulla base di questi studi i regimi di induzione da preferire nei pazienti eleggibili per trapianto e nei pazienti fit non eleggibili per trapianto sono VRD e VTD. (25)

Il triplo regime che prevede l'utilizzo di Carfilzomib, Lenalidomide e Desametasone è stato associato con un alto tasso di risposta. A causa delle preoccupazioni riguardanti la tossicità cardiaca del Carfilzomib, attualmente lo schema è approvato solamente per le recidive di Mieloma Multipla e può essere tenuto in considerazione nei pazienti con Mieloma ad alto rischio. (24)

Per minimizzare l'insorgenza di effetti collaterali viene consigliato di utilizzare schemi con basse dosi di desametasone. Allo stesso modo, anche il Bortezomib dovrebbe essere somministrato una sola volta a settimana, invece di due, per diminuire la neurotossicità. Alte dosi di desametasone e/o la somministrazione di Bortezomib due volte a settimana può essere considerata se si cerca una risposta più rapida, se si manifesta insufficienza renale acuta da cast nephropaty, malattia extramidollare estesa, leucemia plasmacellulare o un'imminente compressione midollare. (25)

Nonostante il trattamento non sia curativo, il trapianto autologo con cellule staminali emopoietiche aumenta la probabilità di una risposta completa, prolunga la sopravvivenza libera da malattia e la sopravvivenza generale. Rappresenta la terapia più efficace del Mieloma e nel 50% dei pazienti può essere trattata solo ambulatorialmente. La mortalità del trattamento è del 1-2 %. (40) Lo studio di Attal et al del 2015 ha valutato i tassi di risposta completa, la sopravvivenza libera da malattia e la sopravvivenza totale in pazienti trattati con regime VRD e con o senza ASCT successivo. Il mantenimento in entrambi i casi è stato fatto con Lenalidomide. La risposta completa riscontrata nel braccio trattato con ASCT è stata del 58%, rispetto al 46% senza, la

sopravvivenza libera da malattia del 61% (rispetto al 48%) a tre anni, mentre la sopravvivenza generale è simile nei due bracci: 88% a tre anni. (38)

Il regime di condizionamento standard pre-trapianto è rappresentato da 200 mg/m² di Melphalan endovena. Sono in corso studi per determinare se il condizionamento può beneficiare dell'aggiunta di Bortezomib o Carfilzomib. Viene preferita la raccolta di cellule progenitrici da sangue periferico rispetto al midollo osseo. (24,25)

Alcuni trial clinici hanno evidenziato come la sopravvivenza non si modifichi se il trapianto di cellule staminali viene eseguito precocemente (subito dopo le quattro settimane di induzione) o ritardato (come terapia di salvataggio alla ricaduta).

In uno studio randomizzato, il gruppo Francophone du Myelome e l'istituto Dana-Farber Cancer hanno comparato due gruppi di pazienti: uno trattato con ASCT precoce e uno invece alla recidiva di malattia. Nel primo caso i pazienti ricevevano tre cicli di VRD seguiti da trapianto e consolidamento con due cicli di VRD. Nel secondo caso otto cicli di VRD. Entrambi i bracci hanno ricevuto un mantenimento con Lenalidomide per un anno. Come ci si aspettava, la sopravvivenza libera da malattia è stata superiore per il primo gruppo di pazienti in esame, ma non si è riscontrata una differenza nella sopravvivenza totale. Nonostante questo risultato, dato l'impatto negativo sulla qualità di vita dei pazienti di una prolungata chemioterapia viene preferito eseguire l'ASCT precocemente, specialmente nei pazienti con rischio citogenetico moderato-alto – mutazioni t(4;14) e del(17p) – dal momento che in alcuni trial hanno ottenuto outcome paragonabili a pazienti a rischio standard se il trapianto veniva eseguito precocemente. (25,38)

Un trapianto ritardato può essere ragionevole nei pazienti a rischio standard che tollerano e rispondono bene alla terapia di induzione.

In alcuni studi svolti prima dell'introduzione dei nuovi agenti farmacologici, si era valutata la possibilità di eseguire due trapianti di

cellule staminali in tandem, con il risultato di una sopravvivenza libera da malattia e una sopravvivenza totale superiori nel gruppo che ha eseguito il doppio trapianto rispetto al singolo. I benefici erano visibili in coloro che non avevano ottenuto una risposta completa o una riduzione di malattia superiore al 90% dopo il primo trapianto. Con i nuovi regimi di induzione la maggioranza dei pazienti ottiene questi due risultati dopo il primo trapianto, il ruolo del trapianto tandem quindi rimane limitato.

Al momento della raccolta si cerca di ottenere abbastanza cellule staminali per due trapianti: l'obiettivo non è quello del trapianto tandem, ma quello di poter eseguire un trapianto di salvataggio al momento di una possibile recidiva dopo il primo.

Molti studi hanno mostrato come la terapia di consolidamento aumenti la profondità della risposta, tuttavia a causa della tossicità degli agenti utilizzati e la mancanza di evidenze abbastanza solide, questo tipo di terapia non è ancora molto utilizzato in pratica clinica. Alcuni studi come EMN02/H095 e BMT CTN 0702 in corso chiariranno il ruolo del consolidamento post-trapianto. (24,25)

Il regime di mantenimento ottimale dovrebbe porsi come obiettivo il prolungamento della fase di remissione, in assenza di qualsiasi impatto sulla qualità di vita. L'utilizzo di talidomide in mantenimento ha portato ad un beneficio sulla PFS; tuttavia, i pazienti con citogenetica ad alto rischio sembrano non beneficiare di questo approccio terapeutico. Anche la lenalidomide, se impiegata in mantenimento, ha dimostrato un beneficio sostanziale in termini di PFS; inoltre, una metanalisi dei primi 3 studi randomizzati ha evidenziato un beneficio anche in termini di OS in tutti i sottogruppi, ad eccezione dei pazienti con citogenetica avversa. Questi ultimi pazienti sembrerebbero beneficiare di una terapia di mantenimento a base di bortezomib, che ha dimostrato nel trial HOVON65/GMMG-HD4 una significativa riduzione del rischio di progressione quando confrontato con talidomide. Il beneficio è stato evidenziato nel sottogruppo dei pazienti con del17p ed alterata funzionalità renale. In Italia, i farmaci approvati dall'ente regolatorio

(AIFA) ed indicati nel setting di mantenimento post-trapianto sono talidomide e lenalidomide. In conclusione, le raccomandazioni per i pazienti con nuova diagnosi di Mieloma Multiplo eleggibili a trapianto autologo di cellule staminali prevedono un regime d'induzione basato su nuovi farmaci quali inibitori del proteasoma e agenti immunomodulanti, un regime di consolidamento basato su bortezomib e IMiDs ed infine un regime di mantenimento. (28)

1.8.2 Terapia di prima linea nei pazienti > 65-70 anni, non candidabili a terapie intensificate

Diversi studi clinici hanno valutato la possibilità, con adeguate riduzioni di dosaggio della chemioterapia di condizionamento (MEL 140 oppure 100 mg/mq), di effettuare l'autotrapianto anche in una popolazione di pazienti di età compresa tra 65 e 70 anni, senza comorbidità significative, dimostrando la fattibilità della procedura, vista l'assenza di differenze significative in termini di TRM (transplant related mortality). L'invecchiamento, infatti, è associato ad una riduzione della funzione d'organo e del metabolismo dei farmaci, con un potenziale aumento della tossicità e della TRM. Utilizzando sistemi prognostici disegnati per la valutazione pre-trapianto, come il R MCI (Revised Myeloma Comorbidity Index) e l'HTC CI (Hematopoietic Stem Cell Transplantation – Specific Comorbidity Index) è consigliabile prendere in considerazione il trapianto per punteggi pari rispettivamente a 4-6 e 1-2. (43) Per i pazienti non eleggibili a trapianto è possibile utilizzare un regime terapeutico basato su bortezomib associato a melphalan e prednisone (VMP), oppure una combinazione di lenalidomide e desametasone (RD); entrambe le alternative sono autorizzate nel nostro Paese dall'ente regolatorio. Lo schema VMP ha dimostrato nel trial VISTA una superiorità in termini di rischio di progressione e decesso se confrontato con il precedente standard of care (melphalan/prednisone). Inoltre, la possibilità di impiegare uno schema ad intensità ridotta (monosettimanale) e con somministrazione sottocutanea ha permesso di ridurre significativamente l'incidenza di neuropatia periferica. In un altro studio clinico, inoltre, lo schema VMP ha dimostrato risultati significativamente migliori anche rispetto alla combinazione MPT (melphalan, prednisone, thalidomide). (44–46) L'efficacia della combinazione RD è stata dimostrata da 3 studi randomizzati di fase 3; in particolare dallo studio FIRST MM-020, che ha confrontato MPT/RD per 18 cicli/RD fino a progressione di malattia, dimostrando un vantaggio significativo in termini di PFS per lo schema RD fino a progressione. (47)

Non sono ancora disponibili risultati di trials clinici che abbiano effettuato una comparazione diretta e prospettica tra i due regimi utilizzabili in prima linea per il paziente non eleggibile al trapianto, tuttavia esistono alcuni dati da prendere in considerazione che possono, almeno in parte, guidare la scelta terapeutica nella pratica clinica. Un'analisi retrospettiva caso-controllo ha confrontato i pazienti trattati con VMP e RD in due studi randomizzati di fase 3, su 479 pazienti totali. Il trattamento con VMP è risultato associato con più alto tasso di CR e con una significativa riduzione del rischio di PFS nei primi 12 mesi dopo l'inizio della terapia, rischio che non presentava differenze significative tra i due gruppi nel periodo compreso tra i 12 e i 32 mesi di trattamento e che diventava favorevole a RD dopo i 32 mesi. Questo si può probabilmente spiegare con la maggiore rapidità di risposta profonda osservata con VMP, mentre l'azione di RD, più lenta inizialmente, continua ad esercitare i suoi benefici attraverso la prosecuzione in continuo della terapia. Nonostante questi dati, l'OS mediana risulta significativamente più lunga per i pazienti trattati con VMP. Inoltre, la terapia con VMP sembra superare l'impatto negativo della citogenetica ad alto rischio sulla PFS. In conclusione, nella pratica clinica l'uso di VMP dovrebbe essere consigliato in quei pazienti con significativo tumor burden, che necessitano di rapida riduzione della massa tumorale, nei pazienti con compromissione della funzionalità renale (per le caratteristiche farmacocinetiche di bortezomib rispetto a lenalidomide) e nei pazienti con citogenetica ad alto rischio.

(44)

1.8.3 Terapia delle recidive e del mieloma refrattario

La tabella 2 mostra i criteri di definizione di recidiva proposti dall'IMWG nel 2016. La possibilità di iniziare un secondo trattamento in un paziente ricaduto deve tenere in considerazione diversi fattori tra cui: età e il valore del frailty score, comorbidità e tossicità residue, il rischio citogenetico e la cinetica di raddoppiamento della componente monoclonale.

La scelta della migliore opzione terapeutica deve basarsi sull'efficacia in termini di PFS e OS, le terapie a cui il paziente è stato sottoposto precedentemente e la durata della risposta ottenuta, le eventuali tossicità riscontrate in trattamenti precedenti, le comorbidità presenti, la modalità di somministrazione (orale, endovena, sottocute) ed il relativo numero di accessi al centro, nonché l'impatto che essa potrà avere sulla qualità di vita del soggetto. Il trattamento può essere ritardato nei casi di recidiva biochimica senza segni di danno d'organo, in particolar modo in quei pazienti con malattia di stadio I/II alla diagnosi, che ricadono dopo una remissione completa. Al contrario, un trattamento precoce dovrebbe essere considerato nei pazienti con: malattia aggressiva alla diagnosi e/o raddoppiamento della componente monoclonale in due determinazioni successive a distanza di almeno due mesi e/o incremento di almeno 10g/L o 500 mg/24 ore (rispettivamente per la componente monoclonale sierica e urinaria). Nel caso in cui si manifesti una ripresa di malattia dopo almeno un anno dalla sospensione della terapia di prima linea o sei mesi dopo la terapia di salvataggio, può essere preso in considerazione il ritrattamento. I pazienti candidabili all'autotrapianto dovrebbero ricevere una breve reinduzione basata su PIs/IMiDs, mentre per i pazienti in cui i regimi basati su PIs e IMiDs falliscono è considerata appropriata una chemioterapia convenzionale di debulking, per esempio con lo schema PACE (cisplatino, doxorubicina, ciclofosfamide ed etoposide). (49) La combinazione dei già citati "nuovi farmaci" con agenti dotati di un meccanismo d'azione differente, quali gli anticorpi monoclonali Elotuzumab e Daratumumab, ha permesso di ottenere risultati senza precedenti in termini di profondità di risposta e prospettive di sopravvivenza nel contesto dei pazienti con MM recidivato/refrattario. La

maggior parte degli schemi terapeutici disponibili alla recidiva contengono IMiDs: RD (lenalidomide-desametasone), KRd (carfilzomib-lenalidomide-desametasone), ELOTUZUMAB-RD (lenalidomide-desametasone) e il DARA-RD (daratumumab-lenalidomide-desametasone). Quest'ultimo regime, quando è clinicamente applicabile, porta ai risultati migliori in termini di tasso di sopravvivenza, PFS, OS. Il Daratumumab (®Darzalex) agisce sul recettore CD38 espresso sulle plasmacellule neoplastiche durante tutte le fasi di malattia, stimolando direttamente la risposta del sistema immunitario. ELOTUZUMAB (®Empliciti) è un anticorpo monoclonale umanizzato che riconosce come target molecolare l'antigene SLAMF7 (Signaling Lymphocyte Activation Molecule), una glicoproteina di superficie altamente espressa sia sulle cellule mielomatose, sia sulle cellule NK. Il farmaco presenta, dunque, un doppio meccanismo d'azione: da un lato attiva in maniera diretta le cellule NK, dall'altro, legandosi alle cellule neoplastiche, le rende più facilmente riconoscibili ed aggredibili attivando in questo modo in maniera indiretta le cellule NK. Se la ricaduta avviene oltre i dodici mesi dal completamento della terapia di induzione, si può procedere al ritrattamento con lo stesso ciclo utilizzato in induzione. Un secondo trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche dovrebbe essere considerato dopo una durata minima di remissione di diciotto mesi a seguito del primo ASCT; questo limite potrebbe essere esteso a ventiquattro mesi nel contesto di induzione/mantenimento con nuovi farmaci. Tuttavia, un secondo ASCT dovrebbe essere offerto come prima terapia di salvataggio piuttosto che dopo il fallimento di plurime linee di terapia. (49)

Recidiva Clinica	<ul style="list-style-type: none"> • Positività di uno o più dei seguenti criteri: <ul style="list-style-type: none"> ○ Indicatori diretti di inasprimento della malattia e/o della disfunzione d'organo correlati al sottostante disordine clonale plasmacellulare ○ Aumento definito della dimensione delle lesioni ossee preesistenti o dei plasmocitomi. L'aumento viene calcolato come la somma dei prodotti dei diametri perpendicolari massimi delle lesioni e viene considerato positivo quando $\geq 50\%$ e ≥ 1 cm ○ Ipercalcemia > 11 mg/dl ○ Calo dell'emoglobina ≥ 2 g/dL, non correlato a terapia o altre condizioni ○ Aumento della creatinina ≥ 2 mg/dL rispetto all'inizio della terapia anti-mieloma e attribuibile alla malattia ○ Iperviscosità correlata alle paraproteine sieriche
Recidiva da risposta completa	<ul style="list-style-type: none"> • Positività di uno o più dei seguenti criteri: <ul style="list-style-type: none"> ○ Ricomparsa della componente monoclonale nel siero o nelle urine all'immunofissazione o all'elettroforesi ○ Sviluppo di una massa plasmacellulare $\geq 5\%$ nel midollo osseo ○ Comparsa di altri segni di progressione (nuovo plasmocitoma, nuova lesione litica, ipercalcemia, etc come sopra)
Recidiva da Minima Malattia	<ul style="list-style-type: none"> • Positività di uno o più dei seguenti criteri: <ul style="list-style-type: none"> ○ Perdita dello stato di MRD negativa = evidenza di plasmacellule clonali all'NGF

Residua (MRD) negativa	<ul style="list-style-type: none"> ○ NGS, o imaging positivo per ricorrenza di Mieloma ○ Sviluppo di una massa plasmacellulare \geq 5% nel midollo osseo ○ Comparsa di altri segni di progressione (nuovo plasmocitoma, nuova lesione litica, ipercalcemia, etc come sopra)
-------------------------------	---

Tabella 1.5 – Criteri di recidiva dell'IMWG del 2016 (48)

1.8.4 Terapia di supporto e delle tossicità da terapia

Se dunque da un lato l'utilizzo di sempre più numerosi farmaci per il trattamento del Mieloma Multiplo ha permesso di migliorare la prognosi dei pazienti che ne sono affetti, dall'altro lato ha aumentato l'incidenza di complicanze legate alla terapia che, se non affrontate in modo corretto, possono essere causa di interruzioni inappropriate del trattamento e, in casi estremi, portare alla morte del paziente. L'avvento dei "nuovi farmaci" impone la necessità di saper distinguere i pazienti che possono essere trattati a dosaggio pieno rispetto a quelli più fragili, di età più avanzata o con numerose comorbidità, nei quali è necessario utilizzare le stesse molecole, ma a dosaggi ridotti; questo permette non solo di evitare l'insorgenza di complicanze ematologiche coinvolgenti le diverse linee cellulari (anemia, neutropenia, piastrinopenia) ma anche di complicanze non riguardanti direttamente il sistema emopoietico come neuropatie, trombosi, insufficienza renale e disturbi gastrointestinali. Nell'ambito delle complicanze ematologiche l'uso di desametasone, prednisone o melfalan è causa di anemia di grado 3-4 nel 3-19% dei pazienti. (50)

L'uso dell'eritropoietina è indicato quando i livelli di emoglobina (Hb) sono inferiori a 9 g/dl, mentre deve essere invece sospesa o ridotta ad una dose di mantenimento quando l'Hb raggiunge i 12 g/dl, al fine di evitare eventi avversi (trombosi) che si possono verificare per valori superiori a 13g/dl. Tali eventi sono riportati nel 15-20% dei casi in cui l'eritropoietina viene associata a farmaci quali lenalidomide o alte dosi di cortisone. (51)

La neutropenia è complicanza frequentemente indotta dall'utilizzo di nuovi farmaci quali la lenalidomide e il bortezomib. L'incidenza di neutropenia di grado 3-4 nei pazienti in recidiva trattati con lenalidomide e desametasone varia dal 30 al 46% e aumenta in modo significativo nei pazienti precedentemente trattati con trapianto autologo di cellule staminali o in pazienti con insufficienza renale. (52) Al contrario l'incidenza di neutropenia è più bassa nei pazienti trattati con il solo bortezomib. I pazienti neutropenici hanno un rischio elevato di avere

infezioni, che, come ricordato precedentemente, sono una delle principali cause di morbidità in corso di MM. Per questo motivo, l'uso di fattori di crescita stimolanti i granulociti (G-CSF) viene raccomandato per prevenire l'insorgenza di importanti neutropenie. In caso di neutropenie di grado 4 (neutrofili < 500/ μ l,) durante i trattamenti si consiglia di sospendere la terapia specifica ed eseguire terapia antibiotica con ciprofloxacina e G-CSF fino a quando i neutrofili non avranno raggiunto il valore di 1000/ μ l.

La piastrinopenia rappresenta una complicanza piuttosto comune nei pazienti trattati con agenti alchilanti, lenalidomide o bortezomib. Quest'ultimo causa soprattutto un alterato rilascio dei trombociti da parte dei megacariociti più che una tossicità midollare. La lenalidomide nel 23% dei pazienti di nuova diagnosi si associa a piastrinopenia (53); il bortezomib induce piastrinopenia nel 15-30% dei casi in pazienti trattati per recidiva e nel 21-38% dei pazienti che ricevono bortezomib, melfalan e prednisone come prima linea di terapia. (54) Se nel corso del trattamento si sviluppasse piastrinopenia sarebbe necessario interrompere la terapia, intervenendo con farmaci antifibrinolitici e concentrati di piastrine (in presenza di sanguinamenti) e riducendo i dosaggi delle terapie in rapporto alla tempistica della ripresa midollare.

Tra le complicanze non ematologiche sono da ricordare, oltre alla già citata neuropatia periferica, anche gli eventi tromboembolici. Questi ultimi hanno cause multifattoriali: da un lato la trombogenicità della patologia in sé, probabilmente dovuta alle caratteristiche fisico-chimiche della componente monoclonale, dall'altro l'uso di terapie con talidomide e lenalidomide, eritropoietina ed alte dosi di desametasone. Comunemente, la più alta incidenza di trombosi si ha nei pazienti con MM alla diagnosi e durante i primi 4-6 mesi di trattamento. Uno screening di coagulazione al momento dell'inizio del nuovo trattamento non è raccomandato per pazienti asintomatici per problematiche emorragiche o trombotiche. Talidomide e lenalidomide da soli non aumentano l'incidenza della trombosi venosa che, al contrario, aumenta con

l'aggiunta di desametasone. Nell'ambito delle nuove molecole utilizzate, sarà importante prendere in considerazione una profilassi antitrombotica per i soli pazienti trattati con agenti immunomodulanti e la terapia dovrà tener presente dei fattori di rischio presenti nei singoli pazienti. Tra questi: quelli individuali (età, obesità, anamnesi positiva per eventi trombotici, cateteri venosi centrali, cardiopatia, pregressi interventi chirurgici), quelli correlati alla malattia (esordio di malattia, iperviscosità) e quelli correlati alla terapia (alte dosi di desametasone, doxorubicina o schemi di polichemioterapia). L'aspirina verrà utilizzata nei pazienti che non hanno fattori di rischio o con un fattore di rischio individuale o dovuto alla malattia, mentre l'eparina a basso peso molecolare o le dosi terapeutiche di warfarin in caso di pazienti con almeno due fattori di rischio individuali o legati alla malattia, o in trattamento con alte dosi di desametasone o polichemioterapia. (55)

1.8.5 Terapia del mieloma asintomatico

Nell'attuale definizione di Mieloma Asintomatico (IMWG criteria (24)) si possono identificare pazienti a basso (< 5% di rischio all'anno di progressione) ed alto rischio (25% di rischio all'anno di progressione). (25)

Il tempo medio di progressione a malattia è di 2-3 anni e la sopravvivenza è simile se la terapia viene somministrata alla diagnosi o dopo progressione a forma sintomatica. La malattia deve essere valutata con follow up stringenti (2-3 mesi) per identificare precocemente la progressione. (9)

Attualmente non è raccomandato il trattamento, tuttavia un recente studio randomizzato ha riscontrato che i pazienti ad alto rischio avevano un beneficio nella sopravvivenza se trattati con schema Rd rispetto alla sola osservazione. In particolare, hanno osservato un tasso di sopravvivenza del 94% a 3 anni, rispetto all'80% ($p=0,03$) (35). Sono risultati molto promettenti che tuttavia necessitano ancora di conferma. (25)

SEZIONE SPERIMENTALE

2. L'Ematopoiesi Clonale di significato indeterminato: nuove implicazioni clinico-prognostiche

2.1 Introduzione e definizione

La frequenza di tumori ematologici e solidi aumenta con l'età, così come lo sviluppo di mutazioni spontanee (o somatiche) nelle cellule dell'organismo. Queste, nella maggior parte dei casi, non hanno espressione fenotipica, ma talvolta possono fornire un vantaggio proliferativo alla cellula interessata, che pertanto si espande in maniera clonale. Il risultato di quest'ultimo fenomeno è il cosiddetto "mosaicismo somatico": le cellule dell'individuo diventano un mosaico di diversi genotipi e mutazioni. Uno dei tessuti più interessati da questo fenomeno è sicuramente il sistema ematopoietico, in quanto altamente proliferante.

Pertanto, la presenza di mutazioni somatiche che favoriscono la proliferazione clonale delle cellule emopoietiche configura un quadro noto come ematopoiesi clonale. (56) Questo è quindi il risultato di una mutazione somatica in una cellula del sistema emopoietico, alla quale fornisce un vantaggio proliferativo. Studi epidemiologici che hanno utilizzato l'NGS per la ricerca di mutazioni somatiche nei principali geni drivers delle neoplasie ematologiche hanno mostrato che la presenza di *cloni benigni* nei soggetti al di sotto dei 60 anni è molto raro, mentre raggiunge il 10-20% nei pazienti sopra i 70 anni. (57–59) A conferma di ciò, un recente studio pubblicato sul New England Journal of Medicine ha mostrato le seguenti prevalenze di tali cloni benigni: 9.5% nelle persone tra i 70 e i 79 anni, 11.7% tra gli 80 e gli 89 anni e 18.4% tra i 90 e i 108 anni, con un aumento di frequenza per ogni decade osservata (Figura 2.1). (57)

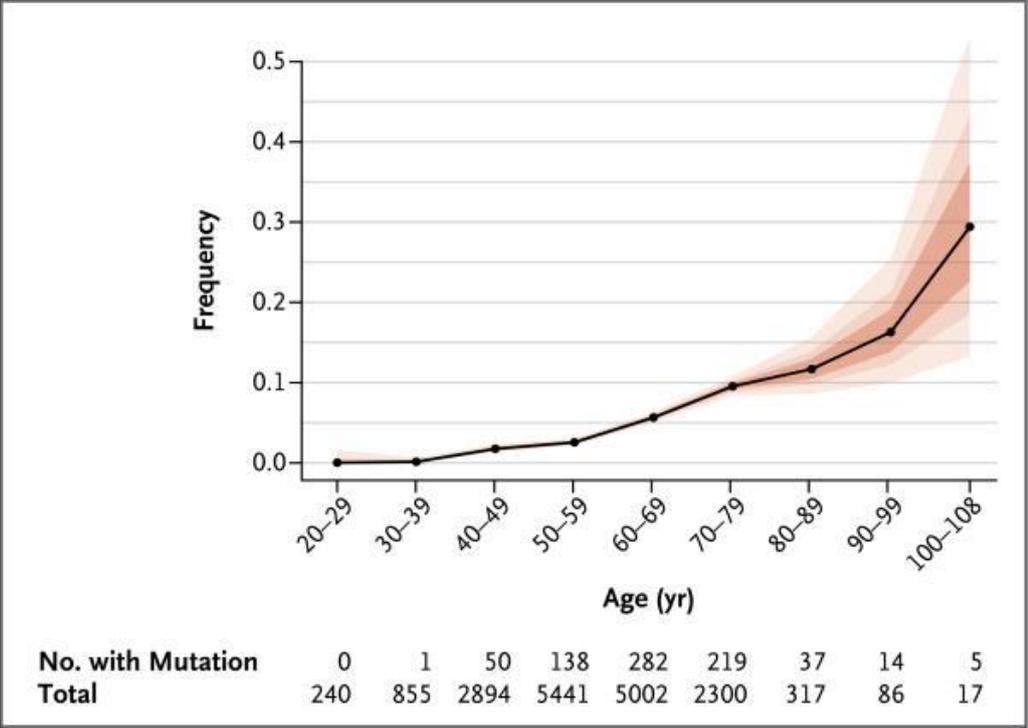


Figura 2.1 - La prevalenza delle mutazioni somatiche in base all'età

Il termine “ematopoiesi clonale di significato indeterminato” è stato coniato per definire una clonalità emopoietica non maligna caratterizzata da mutazioni tumore-associate, e si distingue rispetto alle altre forme di ematopoiesi clonale maligna come la Emoglobinuria Parossistica Notturna, la Linfocitosi B monoclonale (MBL) o la MGUS. Il termine “di significato indeterminato” vuole evidenziare l’incerto significato clinico di questa condizione. (60)

L’ematopoiesi clonale di significato indeterminato (o CHIP) indica quindi la presenza di un clone espanso di una cellula emopoietica che porta una mutazione in un gene noto come driver per una malignità ematologica. I criteri quindi proposti per definire la CHIP sono:

- assenza di criteri di malignità
- frequenza di variante allelica > 2%: ossia il 2% degli alleli (e il 4% delle cellule, se si assume siano eterozigoti) sequenziati contiene la mutazione. (61)

Tuttavia, questa definizione potrebbe modificarsi con lo sviluppo di nuove conoscenze riguardanti la CHIP e il suo impatto sulla salute. Inoltre, una percentuale di mutazioni che favoriscono la clonalità emopoietica potrebbe riguardare geni drivers non ancora noti. Al pari di MGUS e linfocitosi B monoclonale, la CHIP è associata a un aumentato rischio di sviluppare una neoplasia ematologica come: Sindrome Mielodisplastica (MDS), Leucemia mieloide acuta (LAM) ma anche altre neoplasie mieloidi e linfoidi; tuttavia, nella maggior parte dei soggetti, l’ematopoiesi clonale è benigna e non progredisce. Allo stesso modo, il rischio di progressione è molto simile tra le varie anomalie: 0.5 – 1 % all’anno per la CHIP, 1% all’anno per la MGUS e 1-2% all’anno per la MBL (rischio di sviluppare Leucemia Linfatica Cronica e Linfomi non Hodgkin). Tuttavia, mentre la MBL ed MGUS indicano una espansione clonale di una linea cellulare ben differenziata (linfociti o plasmacellule, rispettivamente), la CHIP coinvolge cellule staminali emopoietiche o progenitrici meno mature: per questo motivo può essere un’entità che caratterizza un ampio range di malattie ematologiche. (62)

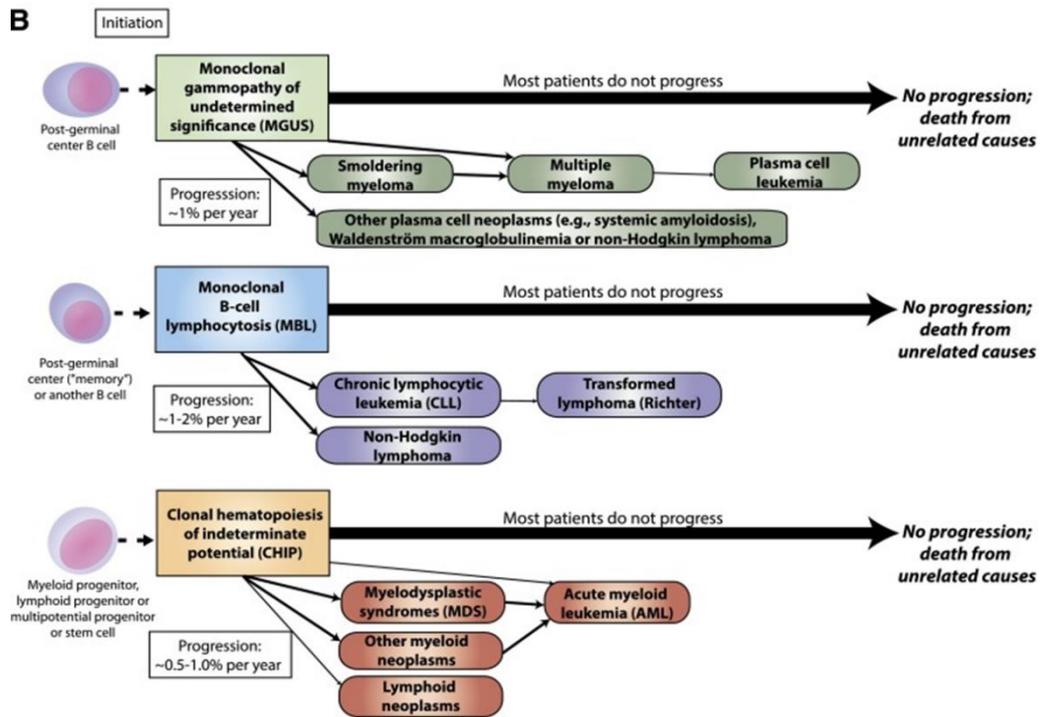


Figura 2.2 – Analogie nella storia clinica di MGUS, MBL e CHIP

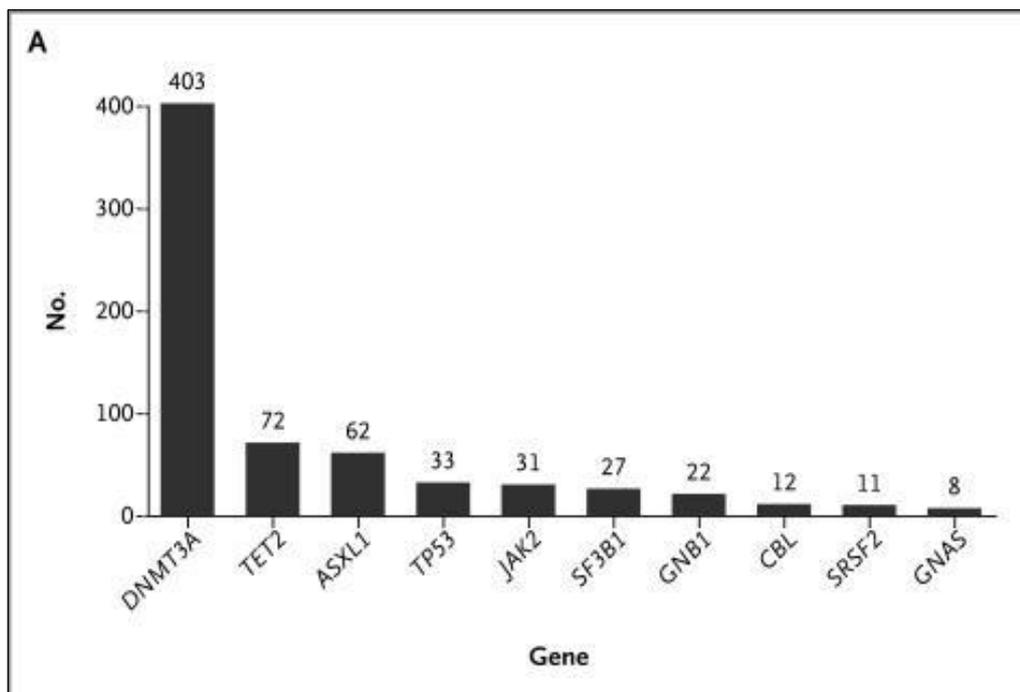


Figura 2.3 - I geni più frequentemente mutati negli individui con CHIP

Le mutazioni più frequentemente identificate come responsabili di CHIP sono state individuate mediante tecnica di NGS ed interessano prevalentemente i geni *DNMT3A*, *TET2* e *ASXL1*, rispettivamente. Altre mutazioni sono a carico dei geni *TP53*, *JAK2* e *SF3B1*, ma rappresentano la minoranza rispetto alle precedenti, con percentuali indicate in Figura 2.3. (57)

Studi successivi hanno mostrato che esiste una inaspettata associazione tra la CHIP e l'aumento della mortalità per tutte le cause. I primi studi a riguardo sono stati pubblicati sul *New England Journal of Medicine* nel 2014 (57,58), ma successivamente sono stati confermati anche da molti reports indipendenti che hanno mostrato un rischio di mortalità fino al 40-50%, in base all'età analizzata, con i valori più alti riscontrati tra gli over 70. L'aumento del rischio di mortalità può essere solo in parte spiegato dalla progressione verso neoplasie ematologiche legate alle mutazioni presenti. Infatti, i tumori ematologici hanno una frequenza molto bassa nella popolazione generale e non potrebbero spiegare un incremento di mortalità di questo tipo. (56) Quale potrebbe essere quindi la possibile spiegazione di questo fenomeno? In un'analisi condotta da Jaiswal e collaboratori, è stata riscontrata una elevata incidenza di eventi cardio e cerebrovascolari nei pazienti con emopoiesi clonale, che quindi giustificerebbe la maggior mortalità osservata in pazienti portatori di CHIP rispetto alla popolazione controllo. (57) I geni che maggiormente sono stati associati sono *TET2*, *DNMT3A*, *ASXL1* e *JAK2*. L'ipotesi principale è che il meccanismo patogenetico di tale fenomeno inizi dall'aterosclerosi, seguita da trombosi venosa o arteriosa. La causa principale sarebbe l'incremento nell'espressione di geni pro-infiammatori, che a sua volta determina un aumento dell'infiammazione. *TET2*, ad esempio, quando non mutato, sopprime la trascrizione di fattori pro-infiammatori. È noto, infatti, che l'infiammazione sia un fattore determinante nello sviluppo di aterosclerosi e nell'accelerazione della stessa. A sostegno di ciò alcuni studi hanno osservato come topi con perdita nell'espressione di *TET2* abbiano sviluppato lesioni aterosclerotiche aortiche superiore del 50-70% rispetto ai controlli. Sono

stati inoltre osservati anche una riduzione nella frazione di eiezione e un aumento della fibrosi cardiaca. Anche le mutazioni di *DNMT3A* sono state associate a un'augmentata incidenza di ipertrofia e fibrosi cardiaca. Eventi mutazionali a carico di *JAK2* sono stati associati a un aumento del rischio di malattia coronarica di dieci volte superiore, oltre che a un marcato aumento di fenomeni di trombosi venosa e arteriosa. L'aterosclerosi accelerata e il rischio di malattia coronarica sembrano persistere anche qualora i livelli ematici di colesterolo siano normali o bassi, di frequente riscontro in questi pazienti a causa forse del sequestro nelle membrane plasmatiche dovuto all'incremento dell'eritropoiesi. Gli effetti della CHIP sulla trombosi sono invece meno chiari. (63)

Una correlazione evidenziata recentemente e che merita una analisi approfondita riguarda il legame con le discrasie plasmacellulari. Se infatti l'aumentato rischio di sviluppare MDS per i pazienti con Mieloma Multiplo trattati con lenalidomide e melphalan era già noto da tempo, invece il rischio dei pazienti affetti da MGUS rappresenta un dato che necessita di spiegazioni approfondite non avendo questi ultimi mai ricevuto terapia anti-MM. Inoltre, in una significativa porzione di pazienti affetti da MM e anomalie fenotipiche MDS-associate (MDS-PA; circa l'11-13%) è stata documentata anche una ematopoiesi clonale genetica e/o morfologica, che persiste anche dopo trattamento con ASCT e che, nella maggior parte dei casi, era già presenti al momento della diagnosi. Inoltre, i pazienti con MDS-PA sono esposti a un maggiore rischio di tossicità ematologica (citopenie) durante il trattamento, oltre che ad un peggiore outcome clinico: riduzione in termini di OS e PFS. (64,65)

Nonostante negli ultimi anni gli studi riguardanti la CHIP siano in costante aumento, sono ancora poche le conoscenze sui risvolti clinici di questo evento biologico. Pertanto, l'obiettivo dello studio prospettico è quello di valutare la presenza di CHIP e delle mutazioni ad essa associate in pazienti con MM di nuova diagnosi in modo da evidenziare eventuali implicazioni cliniche e prognostiche di questo nuovo biomarker. Sulla base dei risultati del nostro studio, verranno disegnati trials multicentrici

con screening su tutta la popolazione affetta da Mieloma Multiplo per individuare classi di pazienti in cui la presenza della CHIP riveste un ruolo prognostico e terapeutico significativo.

2.2 Materiali e Metodi

2.2.1 Disegno dello studio e obiettivi

In questo studio prospettico sono stati inclusi 36 pazienti seguiti dalla Clinica Ematologica del Policlinico San Martino di Genova ed affetti da: Mieloma Multiplo di nuova diagnosi (NDMM; n=25), gammopatia monoclonale di significato indeterminato (MGUS; n=2), Mieloma Multiplo Recidivato Refrattario (RR/MM; n=6) ed un paziente affetto da linfoma non-Hodgkin marginale. Tutti i pazienti analizzati avevano un'età minima di 46 anni e venivano sottoposti a prelievo di sangue venoso periferico, in EDTA, al momento della diagnosi/recidiva. Successivamente i campioni ottenuti sono stati conservati a -20°C entro 24 ore dal prelievo ed analizzati successivamente.

Di ogni campione è stato valutato il rischio citogenetico tramite analisi del FISH su cellule CD138 positive al fine di ricercare traslocazioni [t(11;14) e t(4;14)] e delezioni (del 13q e del 17p). In base a tale analisi il rischio citogenetico veniva definito alto in presenza di anomalie citogenetiche quali del 17p, t(4;14) e t(14;16), in base ai dati della letteratura. Inoltre, per ogni campione veniva eseguita una analisi citofluorimetrica per valutare il livello di espressione dei vari clusters of differentiation (CD), utilizzati per distinguere le plasmacellule a fenotipo normale da quelle neoplastiche (restrizione clonale).

Tutti i campioni sono stati sottoposti a un'analisi di sequenziamento targeted di nuova generazione (NGS), che permette di leggere ogni sequenza numerose volte, in modo da poter individuare varianti meno rappresentate, presenti quindi in una piccola parte della popolazione cellulare analizzata, che viene definita clone. Il pannello utilizzato è stato realizzato in maniera "custom", includendo 36 geni, indicati nella tabella 2.1. Per alcuni geni è stata selezionata l'intera regione codificante, per altri, solo alcuni esoni, nei quali cadono le mutazioni più frequenti (hotspots). I geni scelti per il sequenziamento sono stati selezionati tra

quelli responsabili dell'insorgenza di AML e MDS, con una sottoselezione di quelli più frequentemente mutati in letteratura. (59,63,66).

Gene	Regione Target	Gene	Regione Target	Gene	Regione Target
<i>ASXL1</i>	full	<i>GATA2</i>	full	<i>PPM1D</i>	5, 6
<i>BCOR</i>	full	<i>GNAS</i>	8,9	<i>PTEN</i>	full
<i>BCORL1</i>	full	<i>GNB1</i>	5-7	<i>PTPN1</i>	2-4, 8, 13
<i>BRAF</i>	11, 15	<i>IDH1</i>	4	<i>1</i>	full
<i>BRCC3</i>	full	<i>IDH2</i>	4	<i>RAD21</i>	full
<i>CBL</i>	8,9	<i>IKZF1</i>	full	<i>RUNX1</i>	13-16
<i>CREBB</i>	full	<i>JAK2</i>	12, 14	<i>SF3B1</i>	full
<i>P</i>	full	<i>KRAS</i>	2,3	<i>SMC3</i>	1
<i>CUX1</i>	full	<i>MPL</i>	10	<i>SRSF2</i>	full
<i>DNMT3</i>	full	<i>MYD88</i>	3-5	<i>STAG1</i>	full
<i>A</i>	14, 15, 20	<i>NF1</i>	full	<i>STAG2</i>	full
<i>EZH2</i>	full	<i>NOTCH1</i>	26-28, 34	<i>TET2</i>	full
<i>FLT3</i>				<i>TP53</i>	
<i>GATA1</i>					

Tabella 2.1 – I geni scelti per il sequenziamento NGS da sangue periferico

2.2.2 Protocollo di estrazione e sequenziamento dei campioni

Il DNA dei campioni di sangue periferico è stato estratto con kit QIAamp® DNA Blood Midi kit" (Qiagen, Hilden, Germany) e procedura Spin. Il protocollo di estrazione del DNA prevede l'utilizzo di 1 ml di sangue, che viene, per prima cosa, sottoposto a degradazione delle proteine con proteasi e lisi cellulare con Buffer AL. I campioni vengono poi mixati con etanolo per assicurare il distacco del DNA dalle restanti componenti. I campioni vengono posti quindi sulle colonnine QIAamp Midi, dotate di membrane che legano il DNA, centrifugati per eliminare i reagenti e, con una serie di lavaggi con buffer a base di alcoli e centrifugazioni, si assicura la purificazione del DNA. Un buffer finale a base acquosa è necessario per staccare il DNA dalla membrana della colonna utilizzata.

Il DNA ottenuto è stato quantificato con lo spettrofotometro NanoDrop OneC® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Si tratta di uno strumento che misura il DNA a doppio filamento in 1-2 microlitri di campione, che ha assorbanza 260 nm, e lo mette in rapporto con le componenti con assorbanza 230 nm e 280 nm. Il rapporto 260/230 indica i contaminanti da sali, verosimilmente dovuti a contaminazione da parte dei buffer usati per l'estrazione del DNA, mentre quello 260/280 dà indicazione della contaminazione da proteine. Vengono considerati validi rapporti rispettivamente di 2-2.2 e 1.8-2. Dall'analisi viene rilasciato un grafico che mostra le concentrazioni riconosciute dallo spettrofotometro per ogni lunghezza d'onda. In base a questa analisi abbiamo ottenuto concentrazioni di DNA comprese tra 22,8 e 139,8 ng/μL e rapporti di contaminazione validi secondo gli standard di riferimento. I campioni sono stati poi diluiti in modo da ottenere per ogni paziente la stessa concentrazione di DNA: 200 ng/μL

Il sequenziamento è stato eseguito con Protocollo Illumina DNA Prep with Enrichment® (Illumina, San Diego, USA) che si compone di quattro fasi: Preparazione delle librerie, Amplificazione dei cluster, Sequenziamento e Analisi dei dati (Figura 2.4).

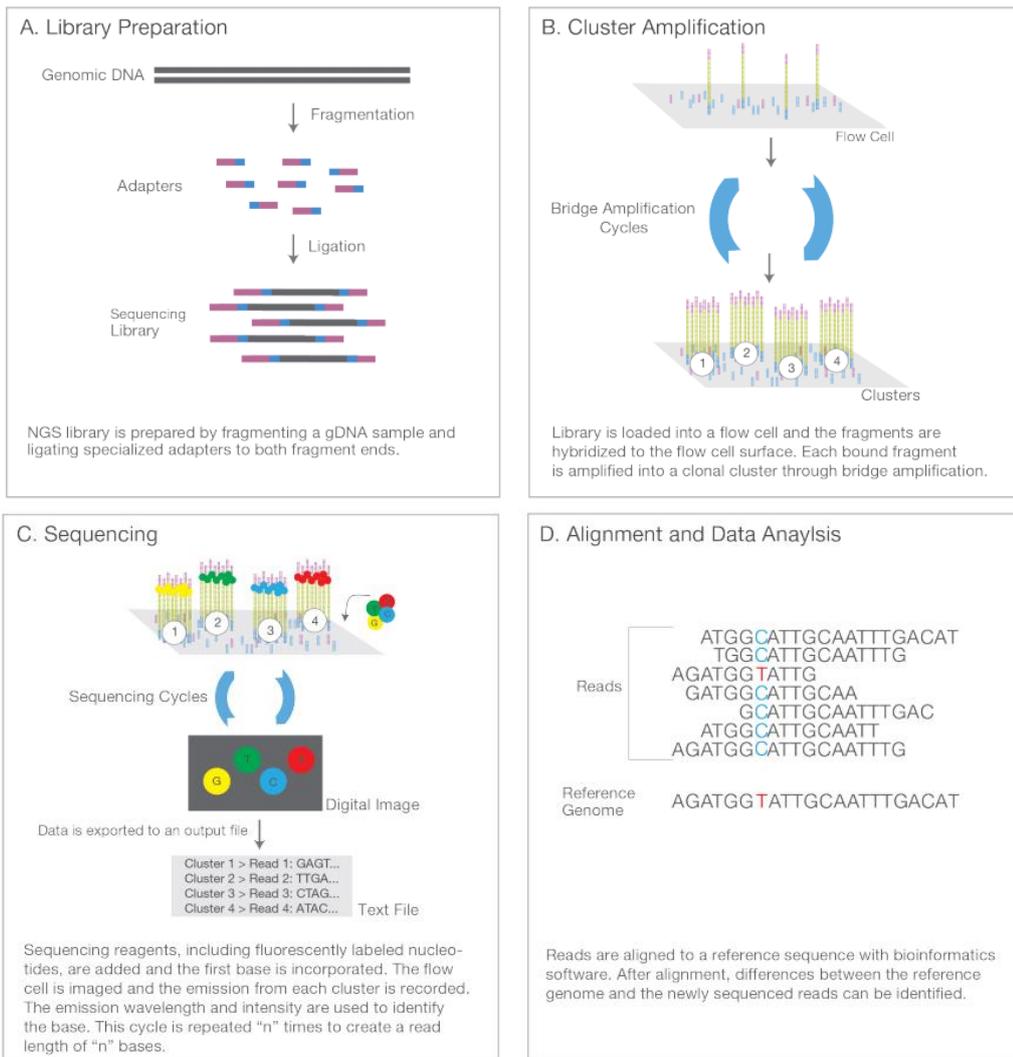


Figura 2.4 – Le fasi del sequenziamento ILLUMINA (67)

Per la preparazione delle librerie, come prima fase, definita come “tagmentazione”, sono state utilizzate delle biglie magnetiche (Enriched Bead-Linked Transposome) che presentano alle estremità dei trasposoni. Queste biglie hanno la funzione di frammentare il DNA a lunghezze specifiche (circa 250 paia di basi) e legare delle sequenze complementari ai primer che serviranno nella fase di sequenziamento vero e proprio. Le sequenze di DNA sono state amplificate con cicli di PCR ridotti e legate a sequenze complementari ai primer precedentemente inseriti (Rd1 SP e Rd2 SP). Legati a queste sono presenti, diverse per ogni campione, sequenze indice, necessarie per poter mischiare campioni diversi e distinguerli in fase di analisi dei dati, e sequenze adapter p5 e p7 (Figura 2.5). Queste ultime sono complementari alle sequenze presenti sulla Flow Cell. La PCR utilizzata per tutte le fasi è stata SimpliAmp Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

Il DNA è stato quindi purificato con biglie magnetiche (AMPure XP, Beckman coulter) che, ad una specifica concentrazione, legano i frammenti della lunghezza desiderata e ne permettono la separazione dai frammenti di lunghezza inappropriata attraverso l'utilizzo di un rack magnetico. Le librerie sono state quantificate con fluorimetro Qubit dsDNA BR Assay Kit® (Invitrogen ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) ottenendo una concentrazione compresa tra 24 e 41 ng/μL, e sono state scelte in modo casuale alcune librerie da valutare qualitativamente con TapeStation 2200 Sistema Agilent® (Agilent, Santa Clara, USA), un sistema di elettroforesi capillare che permette la separazione dei frammenti di DNA in base alla loro lunghezza. A questo punto 300ng di ogni libreria sono stati usati per creare dei “pool” da 12 campioni ciascuno, poi sottoposti a processo di “cattura” tramite sonde complementari alle regioni di interesse (Target Enrichment Workflow). Le sonde sono legate a biotina, mentre le sequenze vengono selezionate tramite biglie legate a molecole di streptavidina. Le librerie create sono state poi ulteriormente amplificate con PCR e purificate. (Figura 2.6)

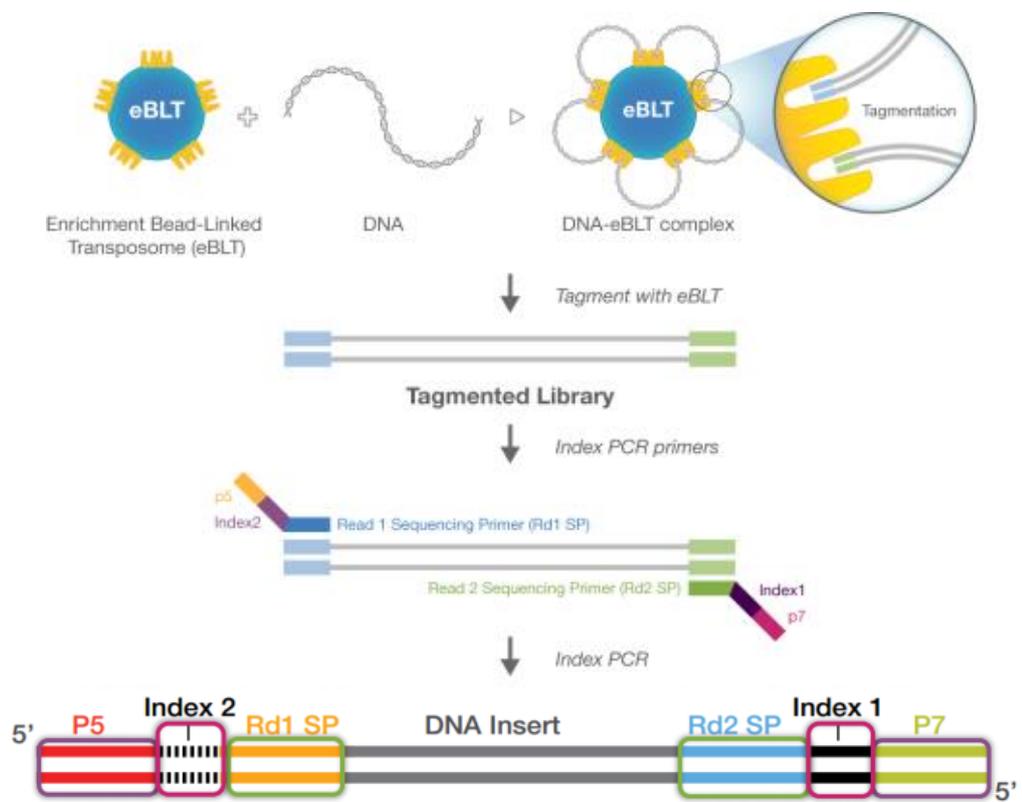


Figura 2.5 – Preparazione delle librerie (68)

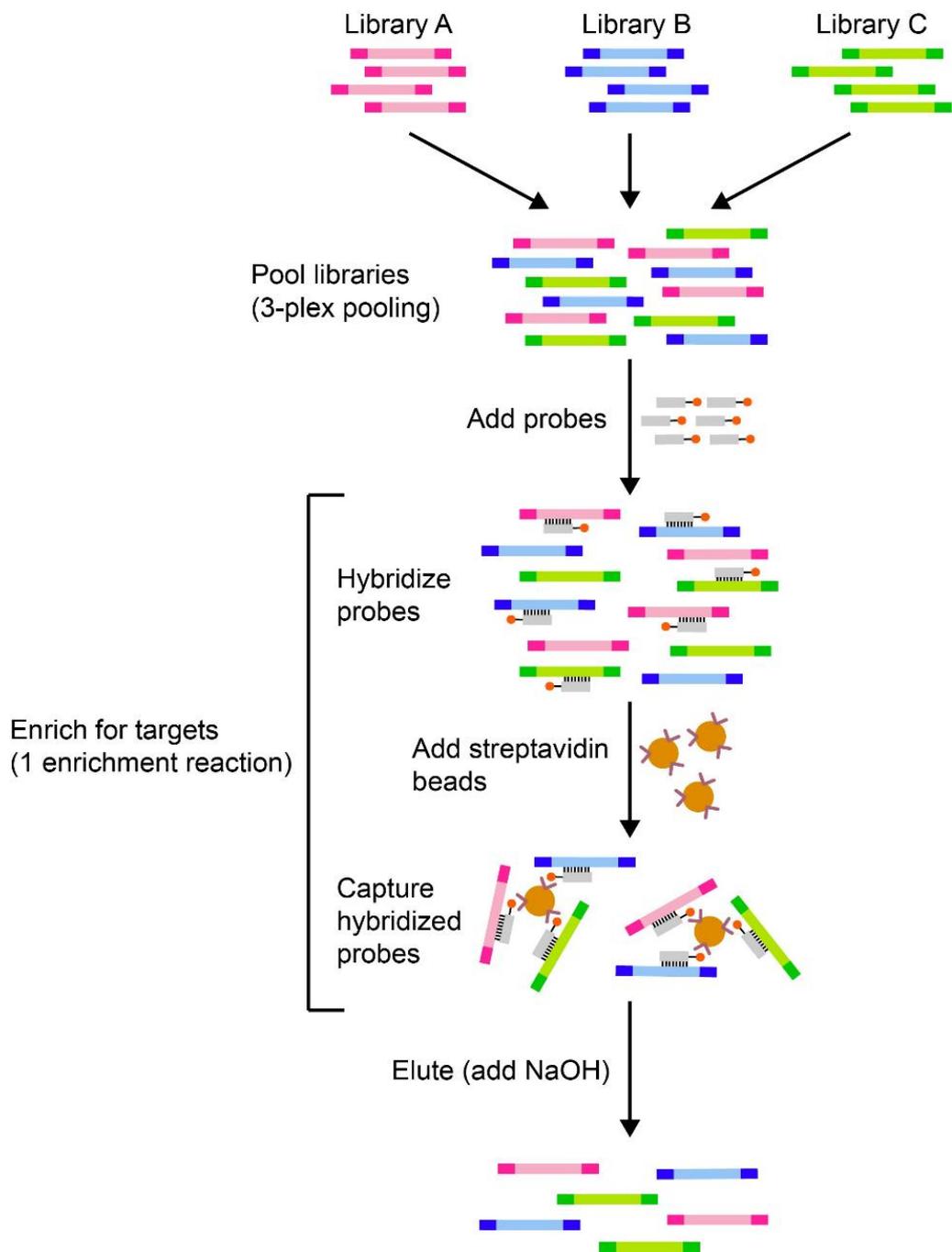


Figura 2.6 – Il processo di cattura delle sequenze (69)

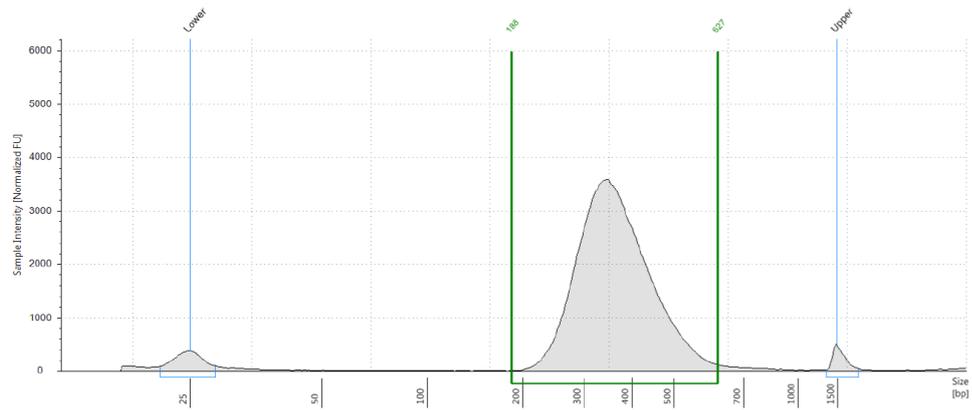
La validità dei tre pool ottenuti è stata valutata con TapeStation 2200 Sistema Agilent® (Agilent). Ogni pool aveva un picco medio di lunghezza dei frammenti di circa 350bp, regione selezionata per il calcolo della molarità (ovvero il numero di molecole/litro presente nella regione del picco) (Figura 2.7). I campioni ottenuti sono stati diluiti a 4nM.

Le fasi di amplificazione dei cluster e di sequenziamento sono state eseguite con Sistema Myseq® (Illumina, San Diego, USA). Questo utilizza una flow cell: uno spesso strato di vetro con canali o corsie, ognuna delle quali è ricoperta in modo casuale con una distesa di oligonucleotidi complementari alle sequenze adapter.

Le librerie, poste all'interno della flow cell e poi nel sistema MiSeq, si legano alle sequenze complementari e, attraverso vari cicli di polimerasi, ogni frammento viene amplificato in cluster clonali attraverso un'amplificazione a ponte (Figura 2.8). Vengono poi aggiunti i primer di sequenziamento, complementari a Rd1 SP e Rd2 SP.

Successivamente vengono sequenziati i cluster attraverso un sistema "by synthesis" a quattro canali. A ogni ciclo di sintesi, a partire dai primer di sequenziamento, vengono inseriti tutti e quattro gli oligonucleotidi (terminatori reversibili), di cui uno solo si lega.

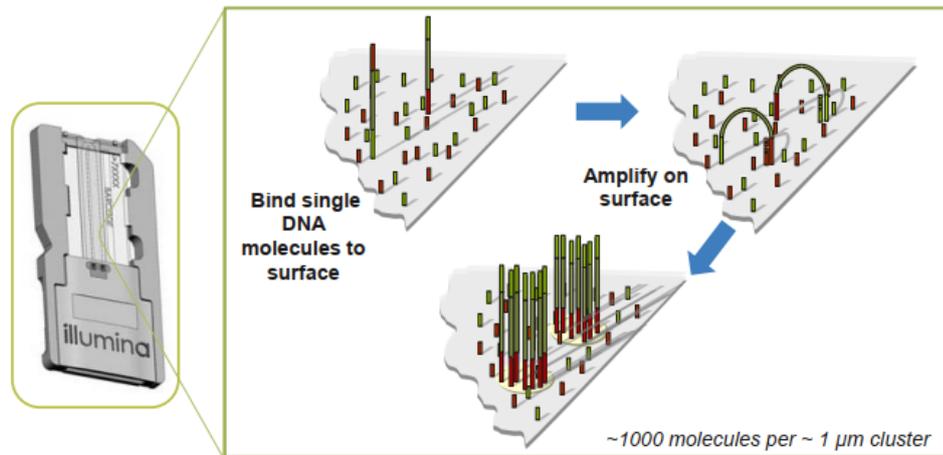
Ogni nucleotide è legato a un fluorocromo e, una volta irradiato con una fonte di luce, emette fluorescenza con una lunghezza d'onda diversa a seconda del nucleotide. L'immagine ottenuta viene quindi letta dal sistema ottico. (Figura 2.9 e 2.10). Questo processo è stato ripetuto per un totale di 300 cicli (150 per il filamento forward e 150 per il filamento reverse). L'insieme delle immagini viene poi raccolto ed analizzato dal software di analisi, che attribuisce una base ad ogni spot luminoso generato, per ogni immagine, fino a ricostruire l'intera sequenza di ogni frammento.



Region Table

From [bp]	To [bp]	Average Size [bp]	Conc. [pg/μl]	Region Molarity [pmol/l]	% of Total	Region Comment	Color
188	627	371	10600	45700	96.10		■

Figura 2.7 – Un esempio di traccia TapeStation



(Figura 2.8 – Amplificazione dei cluster)

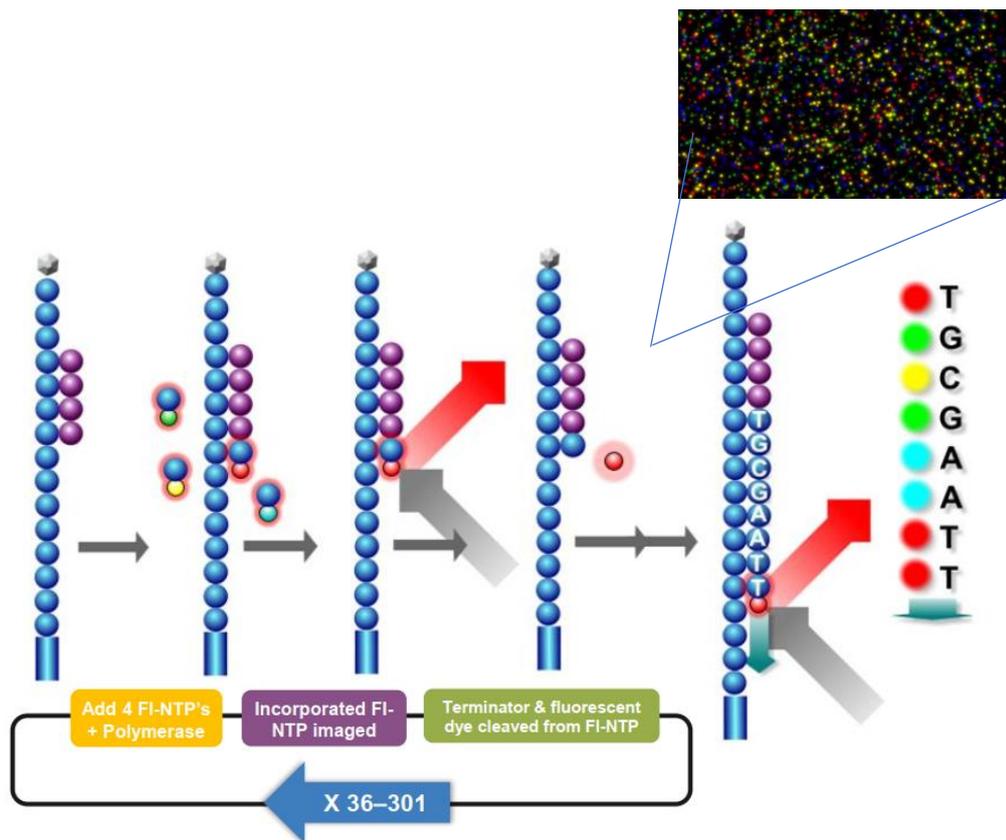


Figure 2.9 – Sequenziamento “by synthesis”

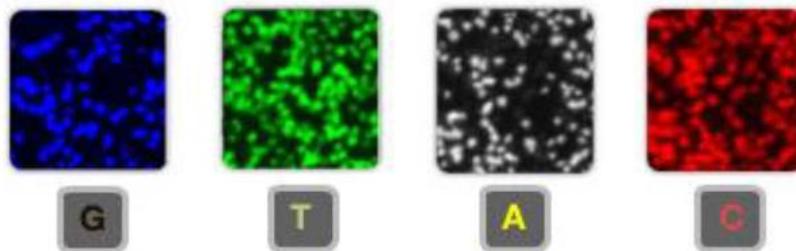
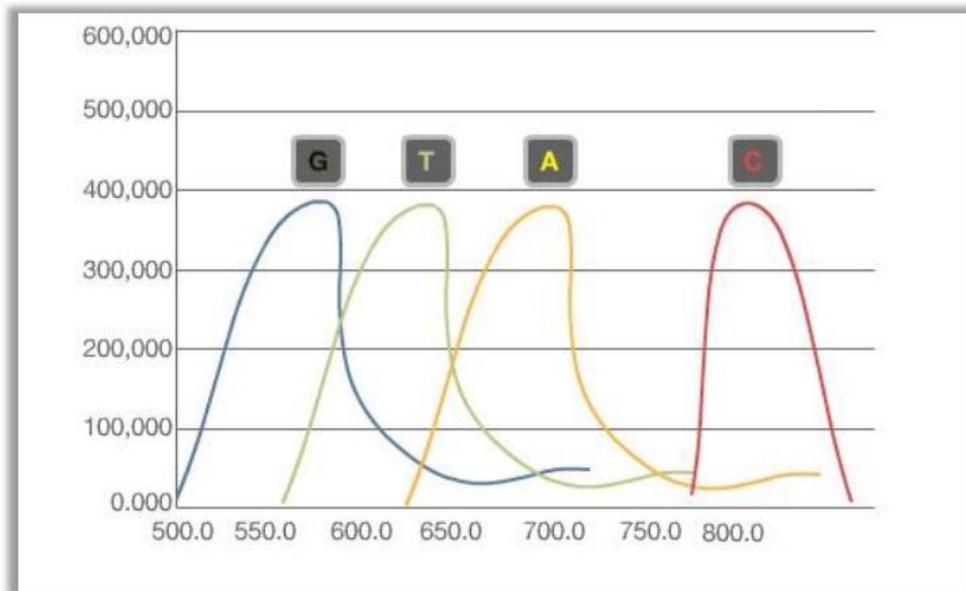


Figure 2.10 – Il sequenziamento a quattro canali

2.2.3 L'analisi dei Dati

L'analisi dei dati ottenuti è stata eseguita con il Software BaseSpace® (Illumina, San Diego, USA) e pipeline "Illumina Enrichment", algoritmo che permette un rapido allineamento e rilevamento delle varianti nei casi di sequenziamento mirato. L'impostazione del variant caller è stata settata su "somatic" e con soglia minima di frequenza allelica dell'1%.

Il workflow dell'algoritmo prevede diversi step:

- 1- Allineamento delle letture eseguite, confrontandole con il genoma di riferimento (in questo caso Hg19), attraverso Isaac Aligner®.
- 2- Richiamo delle varianti strutturali, attraverso Manta®.
- 3- Richiamo di piccole varianti germinali (SNV e Indels) attraverso Starling® o di varianti somatiche attraverso Pisces Variant Caller®.
- 4- Annotazione delle varianti attraverso Illumina Annotation Engine®.
- 5- Calcolo dell'allineamento e delle metriche di chiamata delle varianti, attraverso Pluggable Universal Metrics Analyzer (PUMA)®

La Mean Target Coverage Depth – cioè in media quante volte ogni sequenza catturata è stata letta da MiSeq – minima raggiunta è stata di 475.3x.

Per ogni campione analizzato è disponibile un report che fornisce informazioni sulle letture eseguite – totali, uniche e la Copertura Minima raggiunta – sull'enrichment eseguito, e sulle varianti riscontrate.

Un indicatore della qualità del sequenziamento è la copertura, che descrive il numero medio di letture che si allineano o "coprono" le basi di riferimento note. A livelli di copertura più elevati, ogni base è coperta da un numero maggiore di letture di sequenza allineate, quindi è possibile effettuare l'identificazione delle basi con un grado di sicurezza più elevato. L'istogramma della copertura rappresenta l'intervallo e l'uniformità della copertura del sequenziamento. (70)

Coverage Summary

Mean Target Coverage Depth	Uniformity of Coverage (Pct > 0.2*mean)	Percent Targeted Unique Overlapping Bases
587.8	98.72%	33.99%

Note: Uniformity of coverage is the percentage of targeted base positions in which the read depth is greater than 0.2 times the mean region target coverage depth.

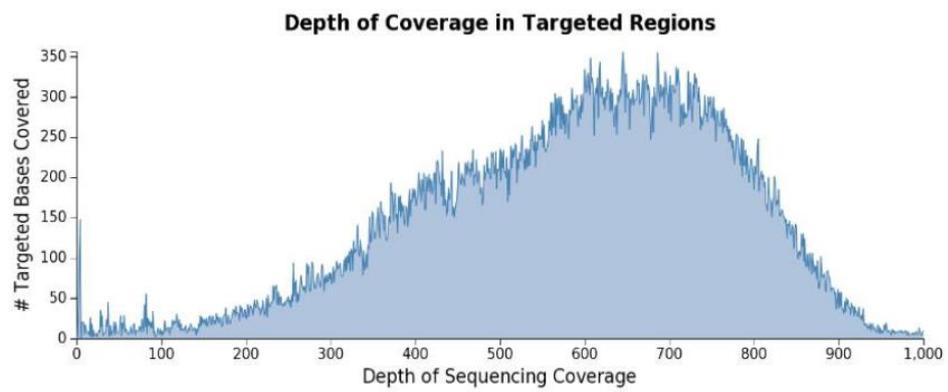


Figure 2.11 – Esempio di report della copertura raggiunta

Sono stati esclusi dalle varianti VAF > 50%, indicativi di varianti presenti a livello germinale, e quelli considerati polimorfismi (Frequenza nella popolazione generale > 1%). Sono state inoltre escluse le varianti introniche, quelle sinonime e quelle riportate “benign” o likely benign” in ClinVar (71). Sono state escluse inoltre le mutazioni missenso non riportate in COSMIC, e con score CADDphred < 25. (72) CADD è un algoritmo che fornisce uno score alle sole mutazioni missenso con indicazione su quanto la variante impatti sulla funzione proteica e di conseguenza dà indicazione della sua patogenicità.

2.2.4 Analisi Statistica

Per studiare la relazione tra variabili binarie o categoriche e variabili continue, è stato utilizzato il test t di student, mentre la correlazione tra variabili continue è stata valutata calcolando il coefficiente di correlazione di Pearson.

2.3 Risultati

2.3.1 Caratteristica della popolazione in studio

Le caratteristiche dei pazienti analizzati nello studio sono riassunte nella tabella 2.2. In particolare la tabella riporta le variabili dei pazienti analizzati: caratteristiche di tipo demografico (età anagrafica e alla diagnosi, sesso), dati relativi alla patologia (isotipo, stadiazione secondo i sistemi Durie Salmon, ISS e R-ISS, rischio citogenetico) e presenza di malattia scheletrica (Tabella 2.2, figura 2.13A). L'età mediana alla diagnosi era di 70 anni (range 55-82 anni), con un'equa distribuzione tra i sessi (50% maschi e 50% femmine). Il dato relativo al rischio citogenetico era disponibile al momento della diagnosi per 30 pazienti (92%), con 6 di questi (16%) considerati a rischio elevato ed i rimanenti assegnati al gruppo a standard rischio citogenetico. Relativamente alla stadiazione secondo R-ISS, disponibile solamente in 27 pazienti (67%), la maggioranza dei pazienti apparteneva al gruppo II (n=16) 7 pazienti (23%) appartenevano allo stadio III e 5 pazienti allo stadio I (13%). Al momento della diagnosi 25 pazienti (80%) presentavano localizzazioni extramidollari di malattia, comprendenti localizzazioni linfonodali, testicolari e pleuriche, a fronte di 7 pazienti (10%) che presentavano malattia confinata al solo midollo. Tutti i pazienti sono stati seguiti per un follow up mediano di 10 mesi.

Paziente	Sesso	età alla diagnosi	età al decesso	diagnosi	istotipo	R-ISS	Altri Tumori	Citogenetica	Malattia Scheletrica	CHIP
1	M	59		SMM	IgG k	na	no	standard	no	no
2	M	86	86	MM	IgG k	III	no	alto rischio	si	si
3	F	72		SMM	IgG λ	na	no	standard	no	no
4	F	83		MM	IgG λ	II	no	alto rischio	si	no
5	M	55		MM	IgG λ	II	no	standard	no	no
6	M	73		MM	IgG k	II	no	alto rischio	si	no
7	M	64		Recidiva	IgM k	II	no	alto rischio	si	si
8	M	62	62	Leucemia Plasmacellulare	IgG λ	III	no	na	si	no
9	M	75		MM	IgG k	II	no	standard	si	si
10	M	76		MM	IgG k	III	si	na	no	si
11	F	78		MM	IgG λ	I	no	na	si	no
12	F	73		MM	IgG λ	III	no	standard	si	si
13	F	69		MM	IgA k	I	no	standard	si	no
14	F	46		MM	IgG k	I	no	standard	no	no
15	F	78		MM	IgG k	III	no	alto rischio	no	no
16	M	74		Recidiva	IgG k	I	no	standard	si	si
17	F	52		MM	IgG k	III	no	alto rischio	si	si
18	F	67		MM	IgA λ	II	no	alto rischio	si	no
19	M	57		Recidiva	micromolecolare k	II	no	alto rischio	si	si
20	F	77		Recidiva	IgA	III	no	alto rischio	si	no
21	F	73		Linfoma	na	na	no	na	no	no
22	F	62		Recidiva	micromolecolare λ	II	no	alto rischio	si	no
23	M	63		MM	IgG k	I	no	alto rischio	si	si
24	M	73	73	MM	micromolecolare λ	III	no	alto rischio	si	si
25	M	79		MM	IgG λ	II	no	standard	si	no
26	M	85		MGUS	IgG k	na	no	na	no	no
27	F	62		MM	IgG k	II	si	alto rischio	si	no
28	M	75		MM	IgA k	II	no	alto rischio	si	no
29	M	54		MM	IgA k	II	no	standard	si	no
30	M	59		Recidiva	IgG λ	na	no	standard	si	no
31	F	71		MM	IgG k	I	no	standard	no	no
32	M	81		MM	IgA k	II	si	standard	si	si
33	M	78		MM	IgA k	II	no	alto rischio	si	no
34	M	79		MM	IgG λ	I	no	na	si	no
35	F	71		MGUS	IgG k	na	no	na	no	no
36	F	82		MM	IgG λ	II	no	na	no	no

Tabella 2.2 – Caratteristiche demografiche e cliniche dei pazienti in esame

2.3.2 Prevalenza della CHIP nella casistica studiata

Sono stati analizzati 36 pazienti in totale. La CHIP è stata osservata in 11 pazienti (30%), di cui 2 (5%) presentavano mutazioni in due geni diversi (Figura 2.12 A e C). Tutti i pazienti portatori di CHIP avevano una diagnosi confermata di Mieloma Multiplo sintomatico, di cui 3 in fase di recidiva. Tra i portatori di CHIP, 2 pazienti sono di sesso femminile e 9 di sesso maschile con una età compresa tra 52 e 86 anni.

I geni trovati mutati sono: *TET2*, *ASXL1*, *BRAF*, *JAK2*, *BRCC3*, *CREBBP*, *KRAS*, *DNMT3A* e *TP53*, con una Variant Allele Fraction (VAF) compresa tra 2.10% e 38.60% (tabella 2.3). Da notare che 3 pazienti analizzati presentavano altri tumori (trombocitemia essenziale, adenocarcinoma del colon e carcinoma delle tonsille, vescica e prostata) oltre al Mieloma Multiplo con la CHIP osservata in 2. In dettaglio il paziente #10 presenta carcinoma alla prostata, vescica e tonsilla oltre che trombocitemia essenziale, probabilmente correlata alla identificazione della variante in *JAK2* p.V617F; analogamente il paziente #32 con adenocarcinoma del colon. Nessuno dei pazienti con mutazioni ha sviluppato, nel periodo di follow-up, MDS o LAM.

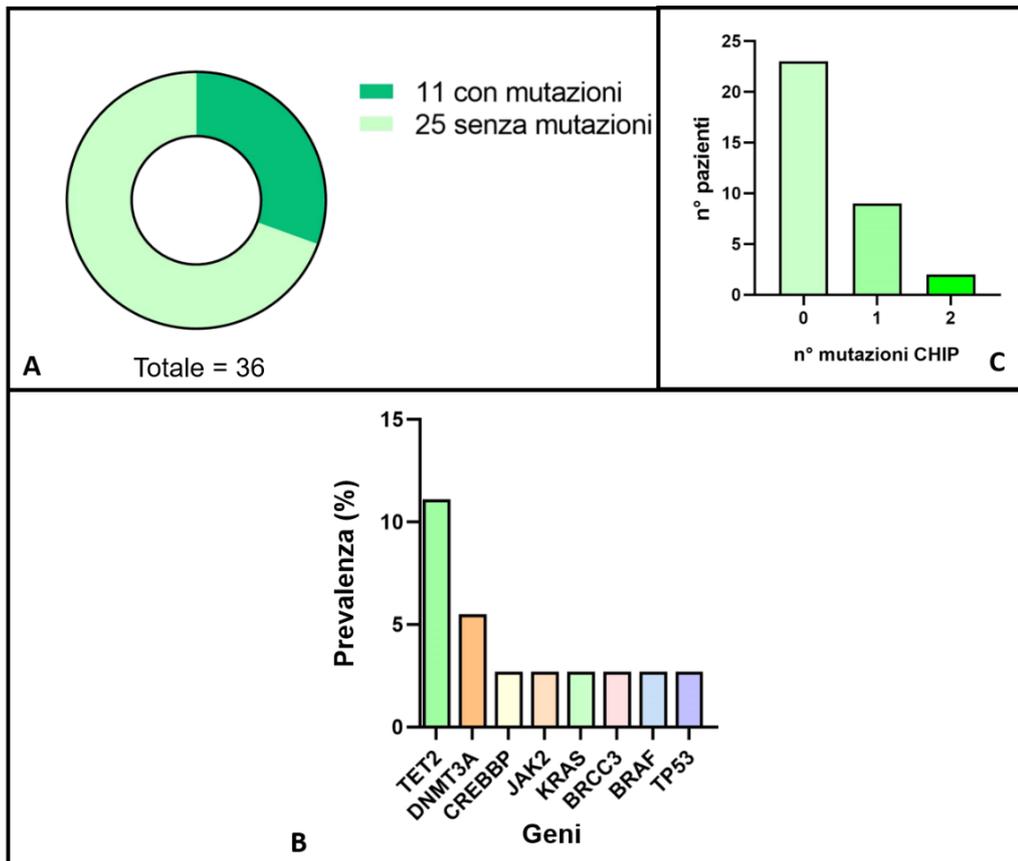


Figura 2.12 – Risultati del sequenziamento con ILLUMINA. A: la frequenza delle mutazioni CHIP nella casistica esaminata. B: Prevalenza delle mutazioni trovate. C: Numero di pazienti per numero di mutazioni CHIP trovate.

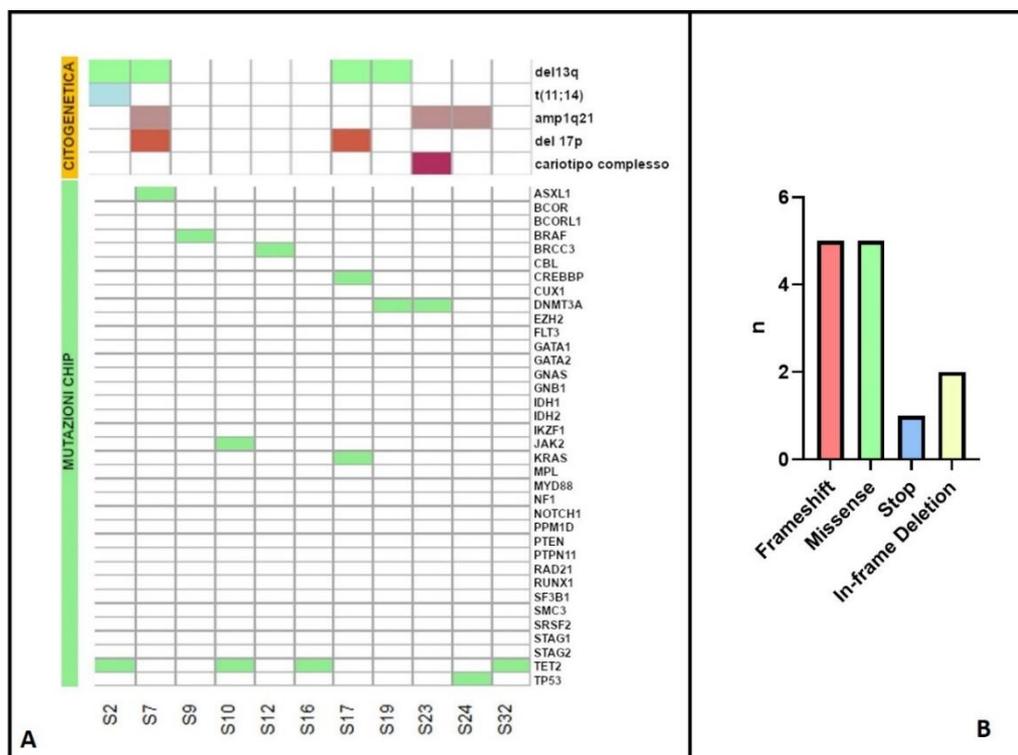


Figura 2.13 – A: Mutazioni trovate al sequenziamento in relazione alla citogenetica dei pazienti. B: frequenza del tipo di mutazioni trovate.

sample	Chr	cDNA_annotation	protein_annotation	Consequence	Gene	VAF
2	4	NM_001127208.1: c.3732_3733del	p.Tyr1245Leufs*22	Frameshift	TET2	38.60%
7	20	c.2323_2324insA	p.L775Yfs*12	Frameshift	ASXL1	3.70%
9	7	NM_004333.4:c.21 44A>T	p.E715V	Missenso	BRAF	4.60%
10	9	NM_004972.3(JAK 2):c.1849G>T	(p.Val617Phe)	Missenso	JAK2	4.20%
10	4	NM_017628.4:c.23 75C>G	p.792*	Codone di Stop	TET2	7.50%
12	X	NM_024332.2:c.27 4del	p.I92Phefs*18	Frameshift	BRCC3	9.30%
16	4	c.3718_3719del	p.L1240Gfs*2	Frameshift	TET2	2.10%
17	16	NM_004380.3:c.66 36_delCTG	NP_004371.2:p.Gln 2216del	Delezione in-frame	CREBBP	2.30%
17	12	NM_004985.5(KR AS):c.34G>T	(p.Gly12Cys)	Missenso	KRAS	4.20%
19	2	NM_022552.5:c.16 28G>T	p.G543V	Missenso	DNMT3A	5.20%
23	2	c.2193_2195del	NP_783328.1:p.Phe 732del	Delezione in-frame	DNMT3A	18.10%
24	17	NM_000546.6:c.72 2C>A	p.Ser241Tyr	Missenso	TP53	20.70%
32	4	NM_017628.4:c.18 25del	p.S609Pfs*30	Frameshift	TET2	2.50%

Tabella 2.3 – Caratteristiche principali delle mutazioni ottenute dal sequenziamento

2.3.3 I fattori clinici dei pazienti in rapporto alla presenza di CHIP e alla VAF.

Dai dati riportati in letteratura, la CHIP si associa all'aumento dell'età, per cui inizialmente abbiamo indagato se tale correlazione venisse mantenuta anche nella nostra casistica. I pazienti sono stati quindi suddivisi in fasce d'età (40-59; 60-69; 70-79 e over 80) ed è stata calcolata la percentuale di pazienti con e senza CHIP in ogni fascia d'età. La prevalenza della CHIP non varia al variare dell'età, fatta eccezione dell'incremento registrato nei pazienti over 80, comunque non significativo. (p value = 0.3).

Poiché l'età non è un fattore di rischio per la presenza di CHIP nella nostra casistica, ci siamo chiesti se potesse influire o meno sulla frequenza allelica (VAF) delle mutazioni riscontrate; abbiamo quindi effettuato un test di correlazione di Pearson tra l'età e la VAF. Analizzando tutti i pazienti non si osservava alcuna correlazione ($R^2 = 0,178$, p value = 0,15), invece dividendo i casi in base alla prognosi (usando la classificazione R-ISS) si ottiene una forte correlazione positiva tra età e prognosi peggiore, ossia il R-ISS=3 group. ($R^2 = 0,807$, p value = 0.04) (Figura 2.14C).

Essendo il sesso maschile un fattore prognostico negativo per le neoplasie ematologiche, abbiamo indagato come la presenza di CHIP si modifica nei due sessi. La prevalenza della CHIP nella nostra casistica è maggiore negli individui di sesso maschile rispetto al sesso femminile, così come la VAF è in media più elevata nei maschi, anche se la differenza tra i due sessi non può essere considerata significativa (p value = 0.4569) (Figura 2.15). Quanto alla malattia scheletrica non si osservavano differenze significative tra la presenza di clonalità emopoietica in presenza o meno di malattia ossea.

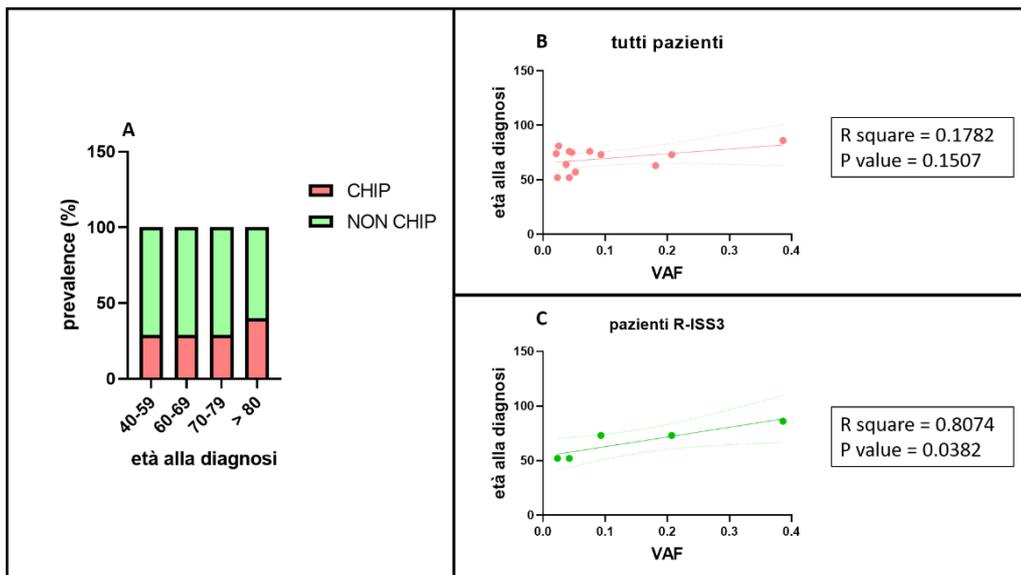


Figura 2.14 – A: Confronto nella prevalenza dei pazienti con e senza CHIP, divisa per fasce di età. B: Correlazione di Pearson tra età alla diagnosi e VAF in tutti i pazienti. C: Correlazione di Pearson tra età alla diagnosi e VAF, nei pazienti con R-ISS 3

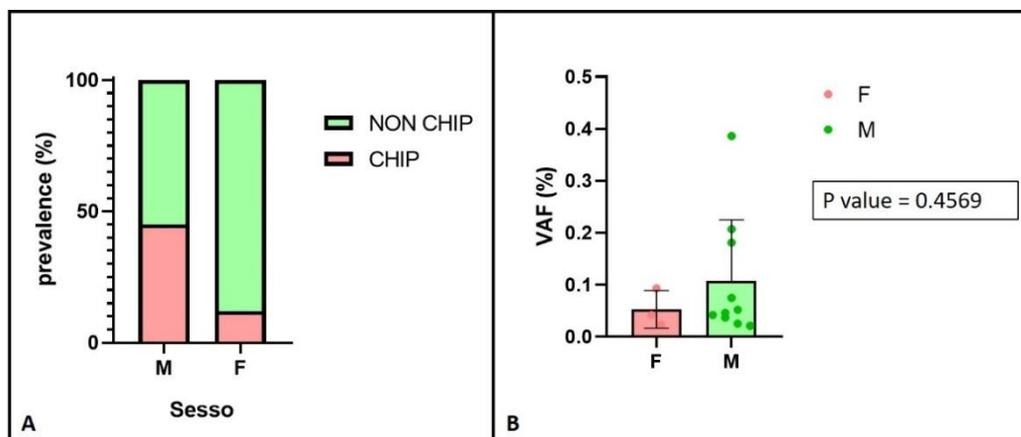


Figura 2.15 - A: Confronto nella prevalenza dei pazienti con e senza CHIP nei due sessi. B: la relazione tra la VAF e il sesso.

2.3.4 I fattori prognostici dei pazienti in rapporto alla VAF

Le anomalie citogenetiche a carico della plasmacellula tumorale sono considerate un fattore prognostico e definiscono i pazienti a più alto rischio, con sopravvivenza e sopravvivenza libera da progressione statisticamente peggiori rispetto ai pazienti privi di alterazioni. In base alle alterazioni cromosomiche presenti, sono stati quindi definiti due gruppi di pazienti:

- “ad alto rischio” con: del17p, amp1q21, t(11;14); t(4;14), t(14;16), cariotipo complesso e
- “a basso rischio” con cariotipo normale.

Tra i due gruppi, abbiamo osservato un numero maggiore di pazienti con CHIP tra quelli ad alto rischio, che in media hanno anche una frequenza allelica più elevata, sebbene tale differenza non sia significativa (p value = 0.1484) (Figura 2.16 A-B)

Nella valutazione del rischio però, oltre alle alterazioni citogenetiche, vengono anche considerati altri fattori determinanti, come il valore di albumina, l'LDH e la beta2 microglobulina. Insieme questi dati vanno a comporre il “revised- international staging system” (R-ISS). Pertanto, andando a dividere i pazienti in base al loro R-ISS, si denota una crescente prevalenza di CHIP all'aumentare del rischio, mentre non si osserva una differenza significativa nella VAF tra i tre gruppi. (p value>0.05) per tutte le classi. (Figura 2.17 A-B)

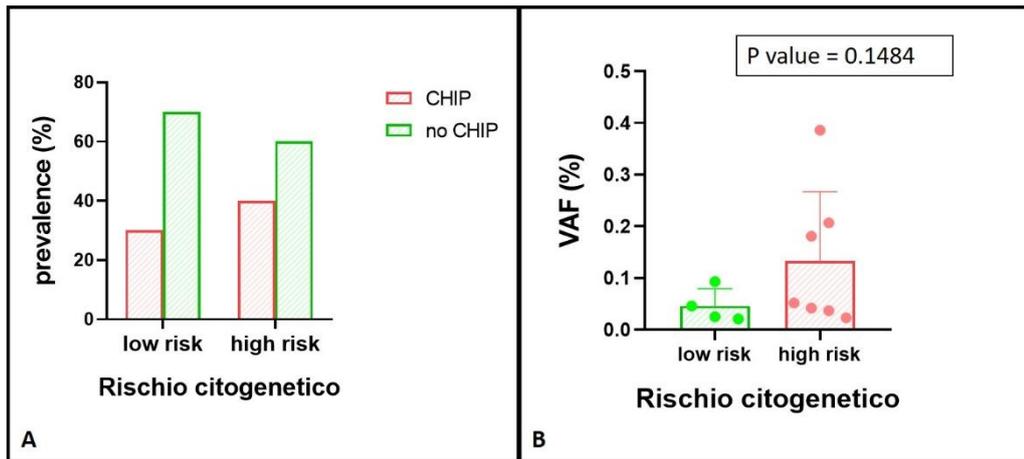


Figura 2.16 – A: Confronto nella prevalenza dei pazienti con e senza CHIP in base al rischio citogenetico. B: la relazione tra la VAF e il rischio citogenetico

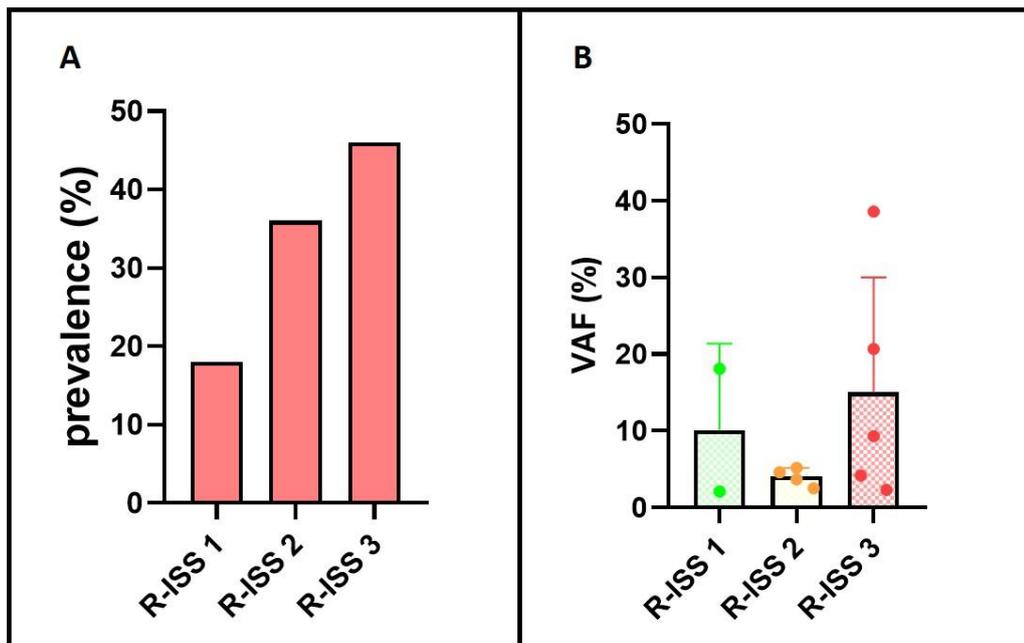


Figura 2.17 – A: La prevalenza delle classi di rischio R-ISS nei pazienti con CHIP. B: relazione tra la VAF e lo score prognostico R-ISS

2.3.4 CHIP e rischio cardiovascolare.

Recentemente la presenza di mutazioni associate ad ematopoiesi clonale è stata classificata come un fattore di rischio per le malattie cardiovascolari, al pari dei fattori di rischio cardiovascolare: fumo di sigaretta, ipercolesterolemia e disordini metabolici. In particolare, 4 geni risultano i più direttamente coinvolti nella formazione della placca aterosclerotica: *TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *JAK2*. Nei pazienti con Mieloma Multiplo, la presenza di fattori di rischio cardiovascolari può determinare la scelta terapeutica o un follow-up mirato atto a prevenire l'insorgenza di eventi avversi dovuti alla cardiotossicità dei chemioterapici utilizzati come il carfilzomib. Per indagare la correlazione tra la presenza di CHIP e il rischio cardiovascolare, sono state raccolte tra le informazioni cliniche quelle relative al rischio CV (diabete, ipercolesterolemia, ipertensione) e la presenza di pregressi eventi cardiovascolari (ictus, Infarto Miocardico Acuto, presenza di aterosclerosi arteriosa, impianto di pacemaker cardiaco, Fibrillazione Atriale, episodi di Trombosi Venosa Profonda, Aneurismi cerebrali, aortici e agli arti inferiori). Per una più agile valutazione del rischio cardiovascolare ad ogni paziente è stato attribuito un punteggio CVS (cardiovascular risk score) compreso tra 0 e 3 sulla base della presenza o meno di fattori di rischio e/o pregressi eventi CV. In dettaglio è stato attribuito lo score = 0 se non è presente nessun fattore di rischio, 1 se è presente un solo fattore di rischio, 2 se sono presenti due o più fattori di rischio e 3 se è stato registrato un evento CV (Tabella 2.4).

In figura 2.18B sono indicate le prevalenze dei fattori di rischio esaminati nei pazienti portatori di mutazioni. In dettaglio si osserva una elevata prevalenza della CHIP nei pazienti con ipertensione e con pregressi eventi cardiovascolari rispetto ai pazienti privi di tali fattori di rischio/eventi.

Paziente	ipertensione	ipercolesterolemia	diabete	Progressi Eventi CV	CVS
1	no	no	no	no	0
2	si	no	si	si	3
3	no	no	no	no	0
4	si	no	no	no	1
5	si	si	no	no	2
6	si	no	si	si	3
7	si	no	no	no	1
8	no	no	no	no	0
9	si	no	no	no	1
10	si	no	si	si	3
11	si	no	no	si	3
12	si	no	no	si	3
13	si	no	no	no	1
14	no	no	no	no	0
15	si	no	no	si	3
16	si	no	no	si	3
17	no	si	no	no	1
18	si	no	no	no	1
19	no	no	no	no	0
20	si	si	no	si	3
21	si	no	no	no	1
22	no	no	si	no	1
23	si	si	no	si	3
24	si	si	no	si	3
25	si	no	no	no	1
26	si	no	no	no	1
27	si	no	no	no	1
28	si	no	no	no	1
29	no	no	no	no	0
30	si	no	no	si	3
31	no	si	no	no	1
32	no	no	no	no	0

33	no	no	no	no	0
34	si	no	no	si	3
35	si	si	no	no	2
36	si	no	no	no	1

Tabella 2.4 – Caratteristiche cliniche di rischio CV nella casistica esaminata.

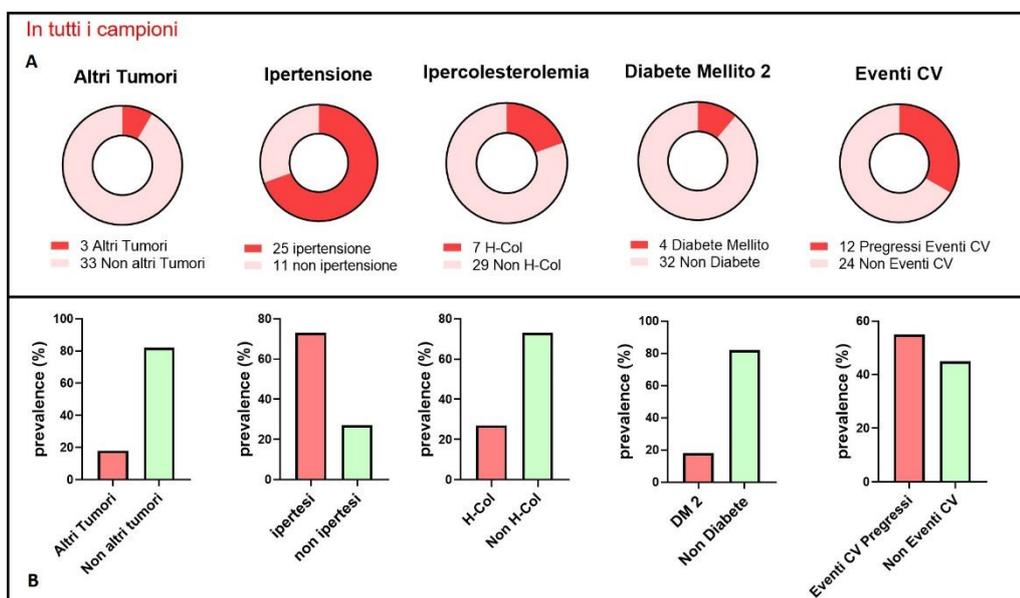


Figura 2.18 – A: Frequenza nella popolazione in esame di: altri tumori, ipertensione, ipercolesterolemia, diabete mellito tipo 2 e progressi eventi cardiovascolari. B: Prevalenza delle stesse caratteristiche cliniche nei pazienti con CHIP

Per valutare se la presenza di CHIP potesse costituire un fattore di rischio cardiovascolare anche nella nostra casistica di pazienti con MM, abbiamo indagato la presenza o meno di una correlazione positiva tra il punteggio derivato dal CVS e la presenza o meno di CHIP e di conseguenza di una relazione tra il CVS e la VAF nei campioni mutati. Sebbene non possa essere stabilita una correlazione significativa tra la presenza di CHIP e CVS, a causa della esigua corte di pazienti analizzati, la forza della correlazione è maggiore nei pazienti con CHIP rispetto a quelli che non presentavano mutazioni. ($R^2 = 0,21$ vs $R^2 = 0,10$) Per quanto riguarda invece la VAF, si osserva un trend di aumento della frequenza allelica delle mutazioni nei pazienti con più alto CVS, sebbene tale differenza non possa essere considerata significativa.

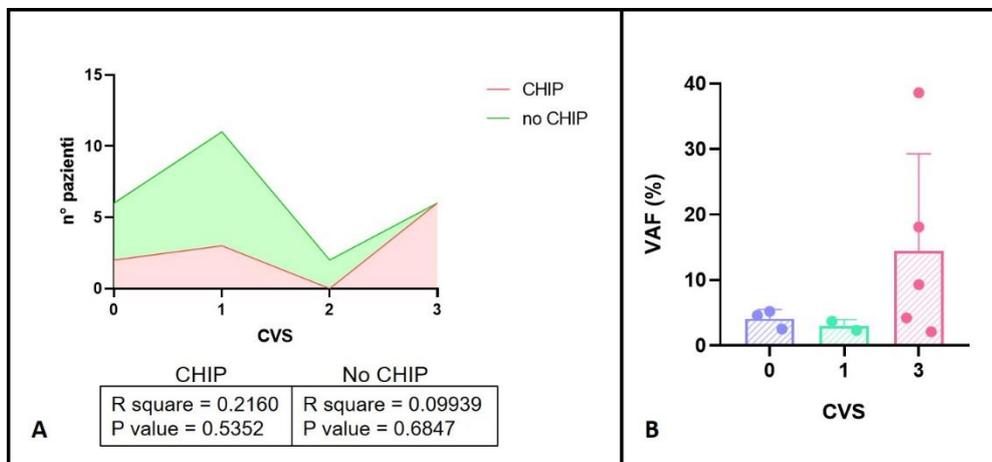


Figura 2.19 – A: Relazione tra la presenza o meno di CHIP e il punteggio CVS attribuito. B: Relazione tra la VAF e il punteggio CVS

2.4 Discussione

Nel nostro studio abbiamo analizzato la relazione esistente tra la presenza della CHIP e le caratteristiche cliniche in 36 pazienti affetti da Mieloma Multiplo e seguiti dalla clinica ematologica del Policlinico San Martino. Nella casistica in esame abbiamo ottenuto una prevalenza del 30%, superiore all'atteso e a quanto riportato in precedenza in letteratura, in cui la prevalenza tende ad attestarsi intorno al 5% nei pazienti con Mieloma Multiplo. (73)

Questo risultato potrebbe essere dovuto alla metodica NGS utilizzata, che riesce ad ottenere un'alta profondità di lettura con l'ottenimento di valori bassi di frequenza allelica (> 2%). Le mutazioni osservate più frequentemente si trovano in TET2 e DNMT3A, due geni noti per svolgere ruoli importanti nella risposta al danno al DNA e nella resistenza alla chemioterapia. In particolare, TET2 è risultato alterato con maggiore frequenza (4 su 13 mutazioni), rispetto a DNMT3A (2 su 13). Infatti, DNMT3A è il gene associato a CHIP che è stato riscontrato mutato con maggiore frequenza nella popolazione generale. Infatti, nel lavoro di Jaiswal viene riportata la presenza di 403 varianti di DNMT3A in una coorte di 805 mutazioni somatiche trovate, rispetto alle 72 di TET2. (57)

Recenti evidenze individuano la mutazione di TET2 come nuovo significativo fattore di rischio cardiovascolare. (74)

Dalla nostra analisi, 3 dei 4 pazienti con mutazione TET2 sono associate a CVS pari a 3, ossia il massimo punteggio, che corrisponde alla positività in anamnesi di un pregresso evento cardiovascolare.

Il campione scelto per l'analisi è risultato esiguo e questo non ha permesso di trovare correlazioni con i fattori clinici e prognostici indagati. Non abbiamo ottenuto un significativo incremento nella presenza di CHIP e nella VAF con l'aumentare dell'età come ci si sarebbe aspettato, se non un modesto incremento nella fascia di età al di sopra degli 80 anni. Nonostante questo, è stato possibile evidenziare come nei pazienti ad alto rischio prognostico (R-ISS 3) ci sia invece una forte correlazione tra età alla diagnosi e VAF riscontrata. Sono necessari ulteriori studi prospettici per determinare se la presenza di mutazioni specifiche al momento della diagnosi comportano un alto rischio di aggressività biologica della malattia e quindi potrebbero giustificare l'inizio di terapie particolarmente invasive nei pazienti con MM che li ospitano.

Poiché il trattamento per il MM continua a migliorare con un concomitante aumento dell'aspettativa di vita del paziente, i potenziali rischi non ematopoiетici a lungo termine associati alla CHIP sono stati analizzati, in particolare il rischio di insorgenza di malattia cardiovascolare. Sebbene non possa essere stabilita una correlazione significativa tra la presenza di CHIP e CVS, a causa della esigua corte di pazienti analizzati, una incidenza maggiore di eventi cardiovascolari si osserva nei pazienti con CHIP rispetto a quelli che non presentavano mutazioni. Coerentemente con questo risultato, i pazienti con CHIP avevano un livello più alto di beta2-microglobulina rispetto a quelli senza CHIP. Esistono diversi potenziali meccanismi attraverso i quali la CHIP potrebbe promuovere una maggiore progressione del MM. È possibile che i pazienti con CHIP siano più inclini allo sviluppo di citopenie e altre tossicità dovute alla terapia, aumentando così la frequenza dei ritardi del trattamento o della riduzione della dose e limitando la loro capacità di ricevere una terapia mirata al mieloma ottimale. In alternativa, la presenza di CHIP potrebbe alterare il microambiente del midollo osseo (BM) in modo tale da promuovere la progressione del MM. È stato riportato infatti che le cellule mieloidi che portano mutazioni in *TET2* e *DNMT3A* stimolano l'infiammazione attraverso la sovraregolazione di IL-1 β e IL-6 (66,75)

Se un fenotipo iper-infiammatorio all'interno della nicchia BM possa favorire la crescita delle cellule di MM e promuovere una malattia più aggressiva è una prospettiva che richiederà ulteriori indagini sia nei modelli animali che nei pazienti. Sicuramente la prevalenza di CHIP osservata nei pazienti ad alto rischio suggerisce la maggiore aggressività biologica della malattia in questi pazienti, anche da un punto di vista cardiovascolare, che rende così questo parametro un potenziale marcatore biologico. Grazie all'identificazione di questo trend è possibile ipotizzare che studi che prevedano un monitoraggio mirato di un numero superiore di pazienti con MM e portatori di mutazioni compatibili con CHIP possano avvalorare quanto ipotizzato. Se confermato, potrebbe essere validato uno studio sistematico dell'ematopoiesi clonale nei pazienti con nuova diagnosi di MM come ulteriore fattore prognostico negativo.

BIBLIOGRAFIA

1. Fauci AS, Braunwald E, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Jameson L. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17^a ed. McGraw-Hill Education; 2008. 2754 pag.
2. Kumar SK, Rajkumar V, Kyle RA, van Duin M, Sonneveld P, Mateos M-V, et al. Multiple myeloma. *Nat Rev Dis Primer*. 20 luglio 2017;3:17046.
3. Landgren O, Kyle RA, Pfeiffer RM, Katzmann JA, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Monoclonal gammopathy of undetermined significance (MGUS) consistently precedes multiple myeloma: a prospective study. *Blood*. 28 maggio 2009;113(22):5412–7.
4. Kyle RA, Remstein ED, Therneau TM, Dispenzieri A, Kurtin PJ, Hodnefield JM, et al. Clinical course and prognosis of smoldering (asymptomatic) multiple myeloma. *N Engl J Med*. 21 giugno 2007;356(25):2582–90.
5. AIRTUM Working Group, Busco S, Buzzoni C, Mallone S, Trama A, Castaing M, et al. Italian cancer figures--Report 2015: The burden of rare cancers in Italy. *Epidemiol Prev*. febbraio 2016;40(1 Suppl 2):1–120.
6. *Epidemiol Prev*. 2011;35 (5-6)(suppl 3):1–200.
7. Da Vià MC, Ziccheddu B, Maeda A, Bagnoli F, Perrone G, Bolli N. A Journey Through Myeloma Evolution: From the Normal Plasma Cell to Disease Complexity. *HemaSphere*. dicembre 2020;4(6):e502.
8. Kasper DL, Fauci AS, Longo DL, Hauser SL, Jameson L, Loscalzo J. Harrison Principi di Medicina Interna. 19^a ed. Vol. 1. Casa Editrice Ambrosiana; 2017. 3960 pag.
9. Dimopoulos MA, Terpos E. Multiple myeloma. *Ann Oncol*. 1 ottobre 2010;21:vii143–50.
10. Rustad EH, Yellapantula V, Leongamornlert D, Bolli N, Ledergor G, Nadeu F, et al. Timing the initiation of multiple myeloma. *Nat Commun*. 21 aprile 2020;11(1):1917.
11. Murray D, Kumar S, Kyle R, Dispenzieri A, Dasari S, Larson D, et al. Detection and Prevalence of Monoclonal Gammopathy of Undetermined

Significance: A study utilizing mass spectrometry-based monoclonal immunoglobulin rapid accurate mass measurement. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* 1 ottobre 2019;19(10):e45.

12. Maura F, Bolli N, Angelopoulos N, Dawson KJ, Leongamornlert D, Martincorena I, et al. Genomic landscape and chronological reconstruction of driver events in multiple myeloma. *Nat Commun.* 23 agosto 2019;10(1):3835.
13. Hoffman R, Benz EJ, Silberstein LE, Heslop HE, Weitz JL, Anastasi J. *Hematology: Basic Principles and Practice.* 6^a ed. Elsevier Saunders; 2013.
14. Raimondi L, Amodio N, Di Martino MT, Altomare E, Leotta M, Caracciolo D, et al. Targeting of multiple myeloma-related angiogenesis by miR-199a-5p mimics: in vitro and in vivo anti-tumor activity. *Oncotarget.* 14 marzo 2014;5(10):3039–54.
15. Giuliani N, Storti P, Bolzoni M, Palma BD, Bonomini S. Angiogenesis and multiple myeloma. *Cancer Microenviron Off J Int Cancer Microenviron Soc.* dicembre 2011;4(3):325–37.
16. Roccaro AM, Sacco A, Maiso P, Azab AK, Tai Y-T, Reagan M, et al. BM mesenchymal stromal cell-derived exosomes facilitate multiple myeloma progression. *J Clin Invest.* aprile 2013;123(4):1542–55.
17. Damiano JS, Cress AE, Hazlehurst LA, Shtil AA, Dalton WS. Cell adhesion mediated drug resistance (CAM-DR): role of integrins and resistance to apoptosis in human myeloma cell lines. *Blood.* 1 marzo 1999;93(5):1658–67.
18. Rasch S, Lund T, Asmussen JT, Lerberg Nielsen A, Faebo Larsen R, Østerheden Andersen M, et al. Multiple Myeloma Associated Bone Disease. *Cancers.* 30 luglio 2020;12(8).
19. Tura S. *Corso di Malattie del Sangue e degli Organi Emolinfopoietici.* 6^a ed. Bologna: Società Editrice Esculapio; 2015. 340–357 pag.

20. Heher EC, Goes NB, Spitzer TR, Raje NS, Humphreys BD, Anderson KC, et al. Kidney disease associated with plasma cell dyscrasias. *Blood*. 2 settembre 2010;116(9):1397–404.
21. Sathick IJ, Drosou ME, Leung N. Myeloma light chain cast nephropathy, a review. *J Nephrol*. aprile 2019;32(2):189–98.
22. Hutchison CA, Batuman V, Behrens J, Bridoux F, Sirac C, Dispenzieri A, et al. The pathogenesis and diagnosis of acute kidney injury in multiple myeloma. *Nat Rev Nephrol*. gennaio 2012;8(1):43–51.
23. Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *The Lancet*. 25 luglio 2009;374(9686):324–39.
24. Moreau P, Miguel JS, Sonneveld P, Mateos MV, Zamagni E, Avet-Loiseau H, et al. Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up†. *Ann Oncol*. 1 luglio 2017;28:iv52–61.
25. Rajkumar SV, Kumar S. Multiple Myeloma: Diagnosis and Treatment. *Mayo Clin Proc*. gennaio 2016;91(1):101–19.
26. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand J-P, Rajkumar SV, San Miguel J, Chanan-Khan A, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood*. 5 maggio 2011;117(18):4701–5.
27. LINEE GUIDA Mieloma [Internet]. AIOM. 2018 [citato 21 dicembre 2020]. Disponibile su: <https://www.aiom.it/mieloma-2017/>
28. Dispenzieri A, Kyle R, Merlini G, Miguel JS, Ludwig H, Hajek R, et al. International Myeloma Working Group guidelines for serum-free light chain analysis in multiple myeloma and related disorders. *Leukemia*. febbraio 2009;23(2):215–24.
29. Baffour FI, Glazebrook KN, Kumar SK, Broski SM. Role of imaging in multiple myeloma. *Am J Hematol*. agosto 2020;95(8):966–77.
30. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br J Haematol*. 2003;121(5):749–57.

31. Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Palumbo A, Blade J, Merlini G, Mateos M-V, et al. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.* novembre 2014;15(12):e538-548.
32. Greipp PR, San Miguel J, Durie BGM, Crowley JJ, Barlogie B, Bladé J, et al. International staging system for multiple myeloma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 20 maggio 2005;23(15):3412–20.
33. Durie BG, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer.* settembre 1975;36(3):842–54.
34. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia.* gennaio 2009;23(1):3–9.
35. Palumbo A, Avet-Loiseau H, Oliva S, Lokhorst HM, Goldschmidt H, Rosinol L, et al. Revised International Staging System for Multiple Myeloma: A Report From International Myeloma Working Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 settembre 2015;33(26):2863–9.
36. Mikhael JR, Dingli D, Roy V, Reeder CB, Buadi FK, Hayman SR, et al. Management of newly diagnosed symptomatic multiple myeloma: updated Mayo Stratification of Myeloma and Risk-Adapted Therapy (mSMART) consensus guidelines 2013. *Mayo Clin Proc.* aprile 2013;88(4):360–76.
37. Komatsuda A, Masai R, Ohtani H, Togashi M, Maki N, Sawada K, et al. Monoclonal immunoglobulin deposition disease associated with membranous features. *Nephrol Dial Transplant.* 1 dicembre 2008;23(12):3888–94.
38. Attal M, Lauwers-Cances V, Hulin C, Facon T, Caillot D, Escoffre M, et al. Autologous Transplantation for Multiple Myeloma in the Era of New Drugs: A Phase III Study of the Intergroupe Francophone Du Myelome (IFM/DFCI 2009 Trial). *Blood.* 3 dicembre 2015;126:391–391.

39. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for multiple myeloma: an overview of 6,633 patients from 27 randomized trials. Myeloma Trialists' Collaborative Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. dicembre 1998;16(12):3832–42.
40. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *N Engl J Med*. 28 ottobre 2004;351(18):1860–73.
41. Rodríguez-Otero P, Paiva B, Engelhardt M, Prósper F, Miguel JFS. Is immunotherapy here to stay in multiple myeloma? *Haematologica*. 1 marzo 2017;102(3):423–32.
42. Bladé J, Cibeira MT, Fernández de Larrea C, Rosiñol L. Multiple myeloma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. ottobre 2010;21 Suppl 7:vii313-319.
43. Gay F, Engelhardt M, Terpos E, Wäsch R, Giaccone L, Auner HW, et al. From transplant to novel cellular therapies in multiple myeloma: European Myeloma Network guidelines and future perspectives. *Haematologica*. febbraio 2018;103(2):197–211.
44. Gentile M, Magarotto V, Offidani M, Musto P, Bringhen S, Teresa Petrucci M, et al. Lenalidomide and low-dose dexamethasone (Rd) versus bortezomib, melphalan, prednisone (VMP) in elderly newly diagnosed multiple myeloma patients: A comparison of two prospective trials. *Am J Hematol*. marzo 2017;92(3):244–50.
45. Morabito F, Bringhen S, Larocca A, Wijermans P, Victoria Mateos M, Gimsing P, et al. Bortezomib, melphalan, prednisone (VMP) versus melphalan, prednisone, thalidomide (MPT) in elderly newly diagnosed multiple myeloma patients: A retrospective case-matched study. *Am J Hematol*. aprile 2014;89(4):355–62.
46. San Miguel JF, Schlag R, Khuageva NK, Dimopoulos MA, Shpilberg O, Kropff M, et al. Bortezomib plus melphalan and prednisone for initial treatment of multiple myeloma. *N Engl J Med*. 28 agosto 2008;359(9):906–17.

47. Benboubker L, Dimopoulos MA, Dispenzieri A, Catalano J, Belch AR, Cavo M, et al. Lenalidomide and dexamethasone in transplant-ineligible patients with myeloma. *N Engl J Med*. 4 settembre 2014;371(10):906–17.
48. Kumar S, Paiva B, Anderson KC, Durie B, Landgren O, Moreau P, et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol*. agosto 2016;17(8):e328–46.
49. Bladé J, Rosiñol L, Fernández de Larrea C. How I treat relapsed myeloma. *Blood*. 5 marzo 2015;125(10):1532–40.
50. Jonsdottir G, Björkholm M, Turesson I, Hultcrantz M, Diamond B, Porwit A, et al. Cumulative exposure to melphalan chemotherapy and subsequent risk of developing acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes in patients with multiple myeloma. *Eur J Haematol*. 9 maggio 2021;
51. Palumbo A, Rajkumar SV, Dimopoulos MA, Richardson PG, San Miguel J, Barlogie B, et al. Prevention of thalidomide- and lenalidomide-associated thrombosis in myeloma. *Leukemia*. febbraio 2008;22(2):414–23.
52. Mitani Y, Usami E, Kimura M, Nakao T, Okada K, Matsuoka T, et al. Risk factors for neutropenia with lenalidomide plus dexamethasone therapy for multiple myeloma. *Pharm*. giugno 2016;71(6):349–51.
53. Chen N, Zhou S, Palmisano M. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Lenalidomide. *Clin Pharmacokinet*. febbraio 2017;56(2):139–52.
54. Velasco R, Alberti P, Bruna J, Psimaras D, Argyriou AA. Bortezomib and other proteasome inhibitors-induced peripheral neurotoxicity: From pathogenesis to treatment. *J Peripher Nerv Syst JPNS*. ottobre 2019;24 Suppl 2:S52–62.
55. Mateos M-V, Hernández M-T, Giraldo P, de la Rubia J, de Arriba F, López Corral L, et al. Lenalidomide plus dexamethasone for high-risk smoldering multiple myeloma. *N Engl J Med*. 1 agosto 2013;369(5):438–47.

56. Evans MA, Sano S, Walsh K. Cardiovascular Disease, Aging, and Clonal Hematopoiesis. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 24 gennaio 2020;15(1):419–38.
57. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med.* 25 dicembre 2014;371(26):2488–98.
58. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med.* 25 dicembre 2014;371(26):2477–87.
59. Young AL, Challen GA, Birman BM, Druley TE. Clonal haematopoiesis harbouring AML-associated mutations is ubiquitous in healthy adults. *Nat Commun.* 22 agosto 2016;7(1):12484.
60. Jaiswal S, Ebert BL. Clonal hematopoiesis in human aging and disease. *Science.* 1 novembre 2019;366(6465).
61. Steensma DP. Clinical consequences of clonal hematopoiesis of indeterminate potential. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 30 novembre 2018;2018(1):264–9.
62. Steensma DP, Bejar R, Jaiswal S, Lindsley RC, Sekeres MA, Hasserjian RP, et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. *Blood.* 2 luglio 2015;126(1):9–16.
63. Jaiswal S, Libby P. Clonal haematopoiesis: connecting ageing and inflammation in cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* marzo 2020;17(3):137–44.
64. Maia C, Puig N, Cedena M-T, Goicoechea I, Valdes-Mas R, Vazquez I, et al. Biological and clinical significance of dysplastic hematopoiesis in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood.* 25 giugno 2020;135(26):2375–87.
65. Neri P. Clonal hematopoiesis in myeloma: root of all maladies! *Blood.* 25 giugno 2020;135(26):2330–1.

66. Jaiswal S, Natarajan P, Silver AJ, Gibson CJ, Bick AG, Shvartz E, et al. Clonal hematopoiesis and risk for atherosclerotic cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 13 luglio 2017;377(2):111–21.
67. Next-Generation Sequencing (NGS) | Explore the technology [Internet]. [citato 31 maggio 2021]. Disponibile su: <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing.html>
68. Illumina DNA Prep with Enrichment Reference Guide (1000000048041). :69.
69. Understanding library pooling for Illumina DNA enrichment kits [Internet]. [citato 23 giugno 2021]. Disponibile su: <https://emea.support.illumina.com/bulletins/2017/09/understanding-library-pooling-for-illumina-dna-enrichment-kits.html>
70. Sequencing Coverage for NGS Experiments [Internet]. [citato 18 giugno 2021]. Disponibile su: <https://emea.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/plan-experiments/coverage.html>
71. Landrum MJ, Lee JM, Benson M, Brown GR, Chao C, Chitipiralla S, et al. ClinVar: improving access to variant interpretations and supporting evidence. *Nucleic Acids Res.* 4 gennaio 2018;46(D1):D1062–7.
72. Rentzsch P, Schubach M, Shendure J, Kircher M. CADD-Splice-improving genome-wide variant effect prediction using deep learning-derived splice scores. *Genome Med.* 22 febbraio 2021;13(1):31.
73. Chitre S, Stölzel F, Cuthill K, Streetly M, Graham C, Dill C, et al. Clonal hematopoiesis in patients with multiple myeloma undergoing autologous stem cell transplantation. *Leukemia.* settembre 2018;32(9):2020–4.
74. Ferrone CK, Blydt-Hansen M, Rauh MJ. Age-Associated TET2 Mutations: Common Drivers of Myeloid Dysfunction, Cancer and Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 17 gennaio 2020;21(2):E626.
75. Fuster JJ, MacLauchlan S, Zuriaga MA, Polackal MN, Ostriker AC, Chakraborty R, et al. Clonal hematopoiesis associated with TET2

deficiency accelerates atherosclerosis development in mice. *Science*. 24 febbraio 2017;355(6327):842–7.

Ringraziamenti

Vorrei fare un breve ringraziamento a tutte le persone che mi hanno accompagnato in questo lungo percorso che mi ha fatto crescere a livello professionale e personale.

Ringrazio i miei genitori, mia sorella e tutta la mia famiglia per il sostegno, soprattutto morale ma anche economico, che ho avuto in questi anni di formazione. Un pensiero va a mio cugino Livio che ha avuto un ruolo fondamentale nella scelta di questa professione.

Un ringraziamento speciale a Claudio, il mio ragazzo, che con il suo supporto fin dall'inizio mi ha aiutato tantissimo, prima nella decisione di intraprendere questo percorso e poi nel raggiungere tutti i miei obiettivi.

Grazie a tutti per avermi sostenuto e per aver sempre creduto in me.

Un ringraziamento anche a tutti gli amici, con i quali ho condiviso questo percorso.

Un ringraziamento al Prof. Roberto Lemoli, che ha accettato di svolgere il ruolo di relatore, e al Prof. Michele Cea, che mi ha aiutato nella stesura di questa tesi e che è sempre stato disponibile a risolvere ogni problema.

Infine, un ringraziamento alla Dr.ssa Elisa Gelli, un prezioso aiuto nel portare avanti questo lavoro.