

***LE NEOPLASIE
MIELOPROLIFERATIVE
CRONICHE***

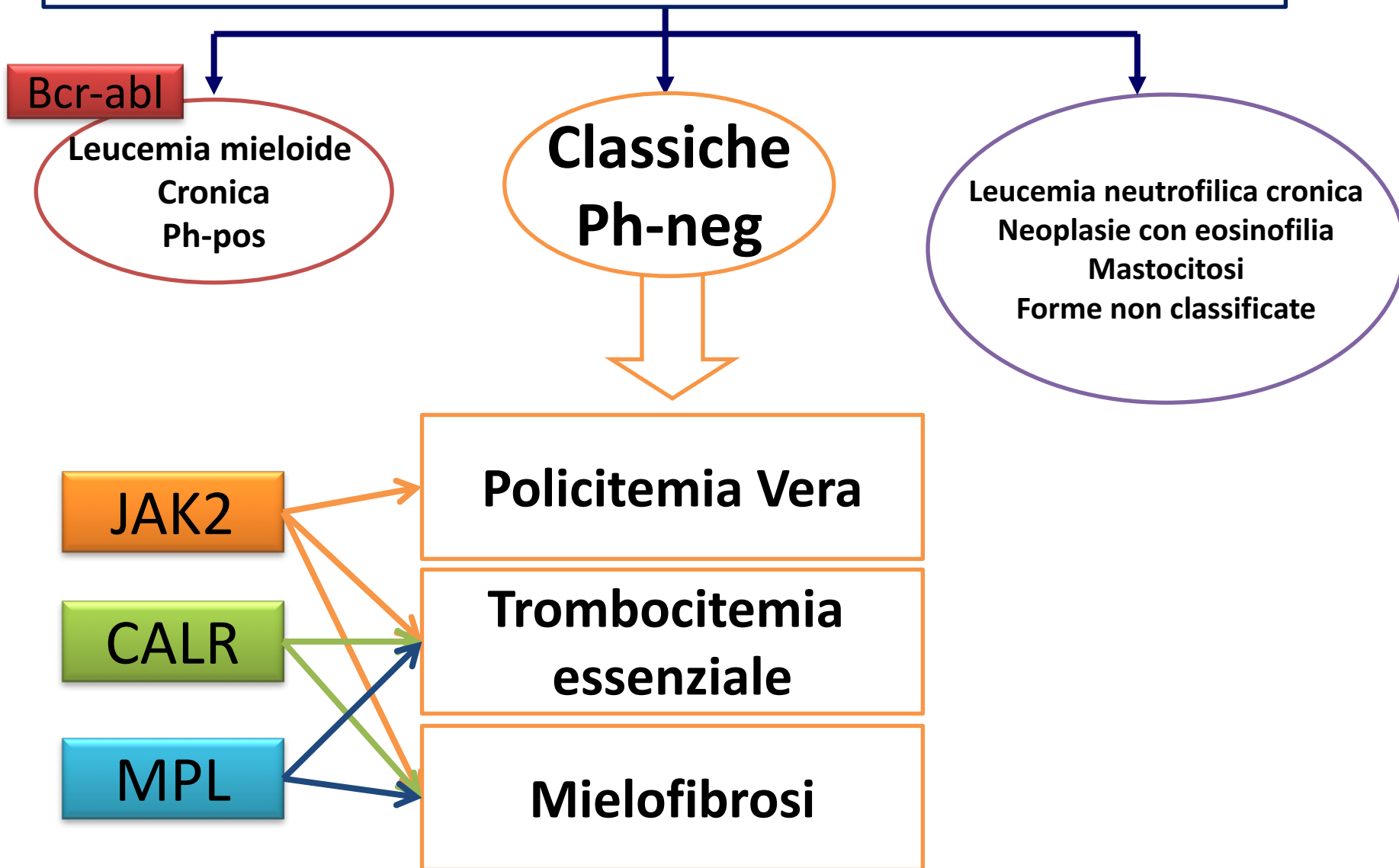
Neoplasie mieloproliferative croniche (NMC) Philadelphia-negative classificazione WHO 2016

1. Leucemia Mieloide cronica (LMC)
2. Policitemia vera(PV)
3. Trombocitemia Essenziale (TE)
4. Mielofibrosi Primaria (PMF)

5. Leucemia neutrofilica cronica (CNL)
6. Leucemia eosinofilica cronica (CEL), non altrimenti specificata
7. Sindrome ipereosinofila (HES)
8. Mastocitosi (MCD)

9. NMC, non classificabile

Neoplasie mieloproliferative (WHO2016)



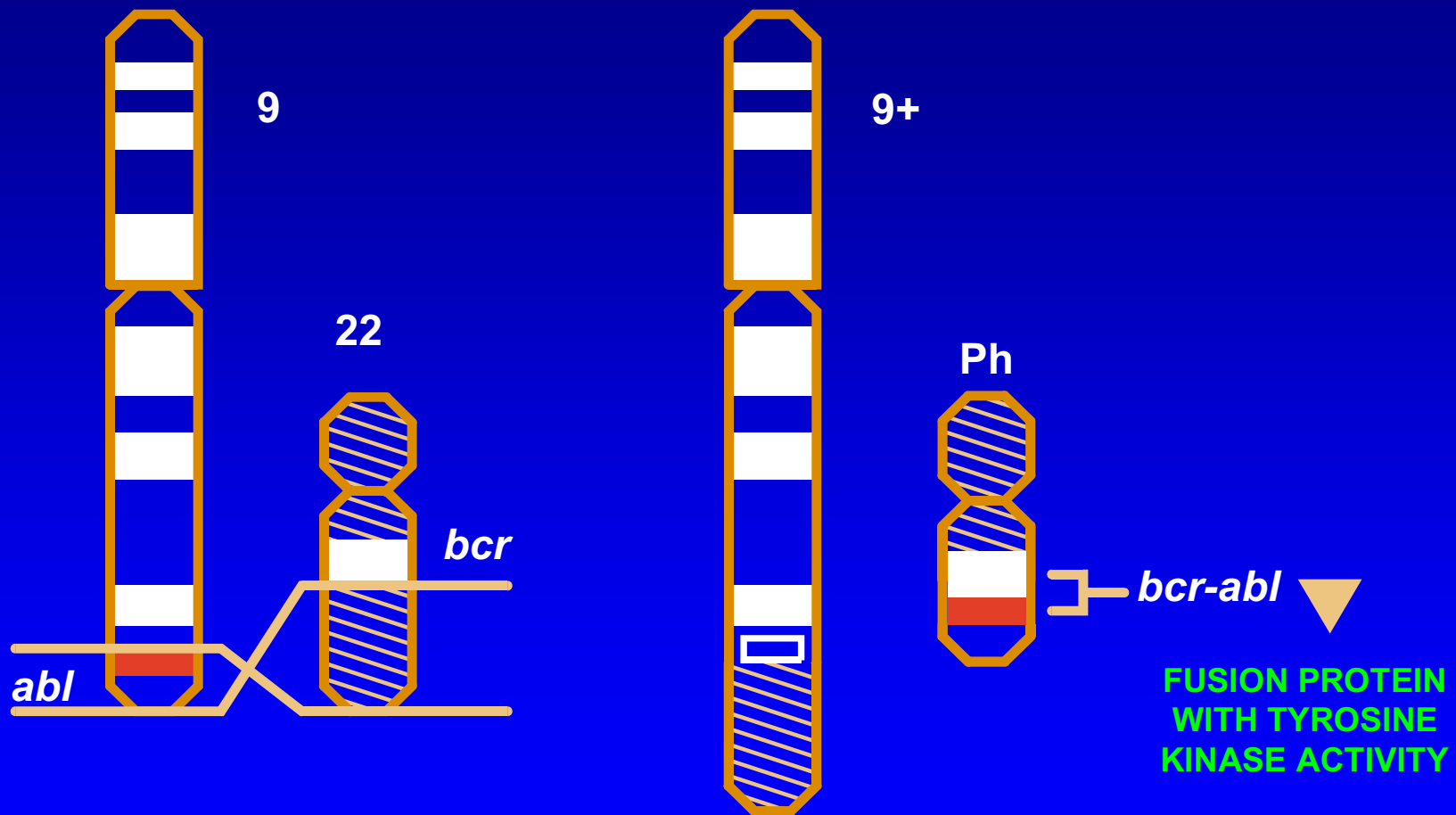
***LA LEUCEMIA MIELOIDE
CRONICA
Ph-positiva***

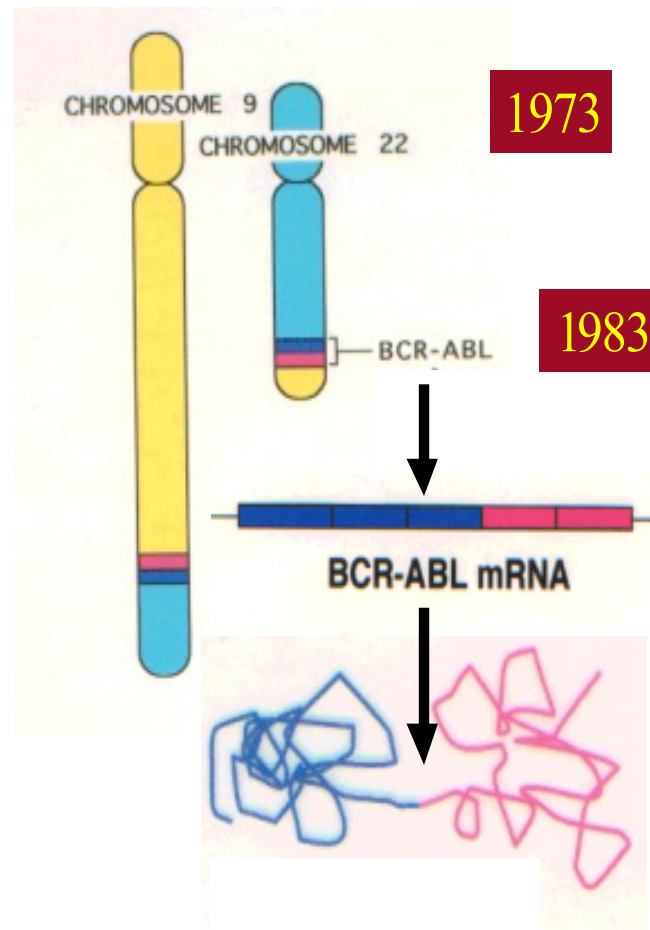
**Patogenesi
Inquadramento generale**

Leucemia mieloide cronica

- Neoplasia della cellula staminale emopoietica che si manifesta con espansione clonale della granulopoiesi, G-CSF indipendente
- La leucocitosi con presenza di precursori circolanti, la eosinofilia e basofilia sono i parametri fondamentali per la diagnosi. Possono associarsi piastrinosi e/o anemia
- L'eziopatogenesi si basa sul riarrangiamento del gene ABL presente sul cromosoma 9 con il gene BCR sul cromosoma 22. Il prodotto di fusione è la tirosin-chinasi oncogenica BCR-ABL, che induce uno stimolo proliferativo incontrollato.
- La traslocazione t(9;22) è presente virtualmente nel 100% dei casi di LMC
- In caso di assenza di traslocazione, occorre ricercare cause secondarie di leucocitosi (altre MPN, reazioni leucemoidi, LMC atipica)
- La disponibilità di inibitori selettivi della tirosino-chinasi BCR-ABL ha rivoluzionato la storia naturale di tale patologia.

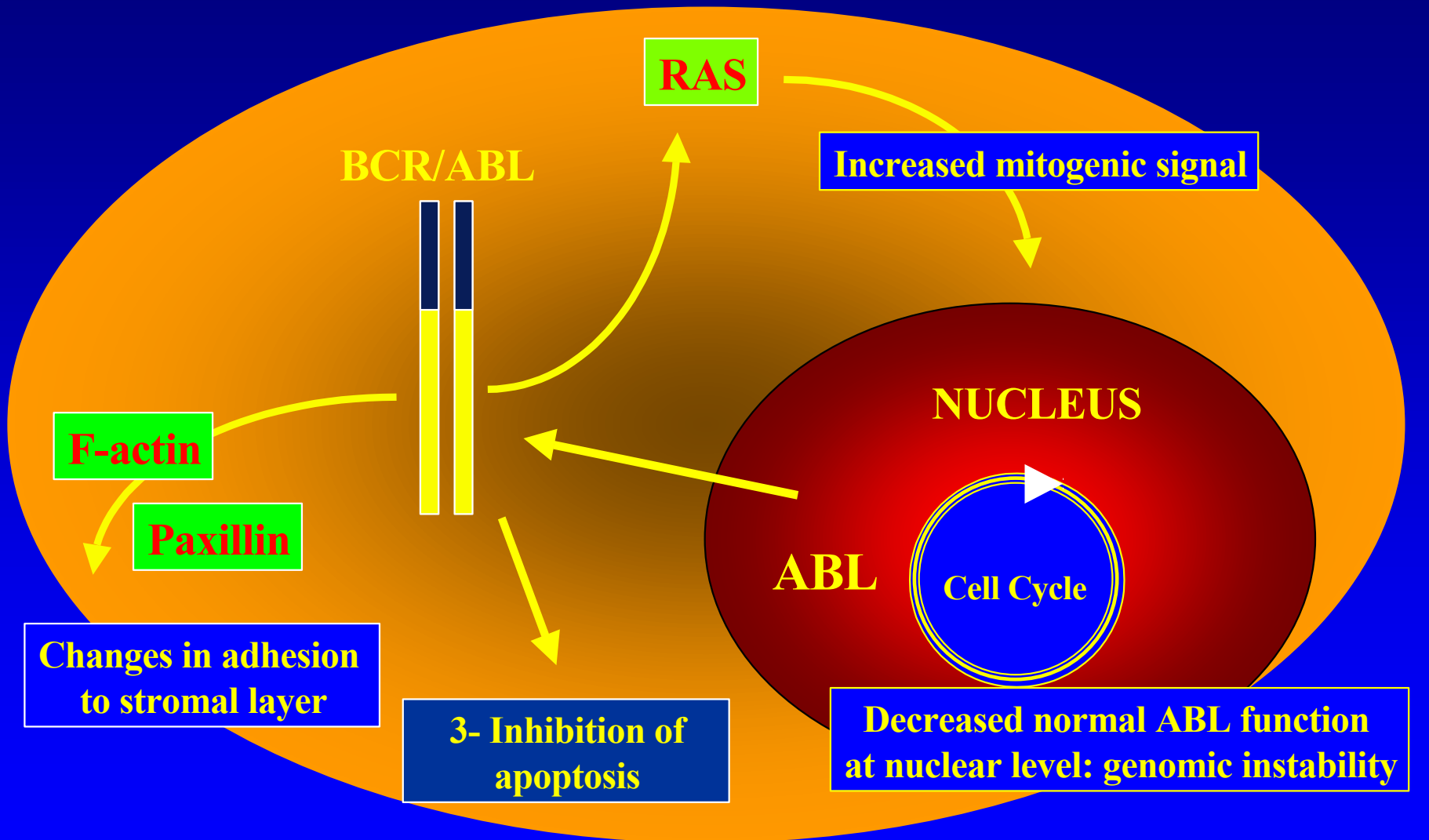
The Philadelphia Chromosome: t(9;22) Translocation

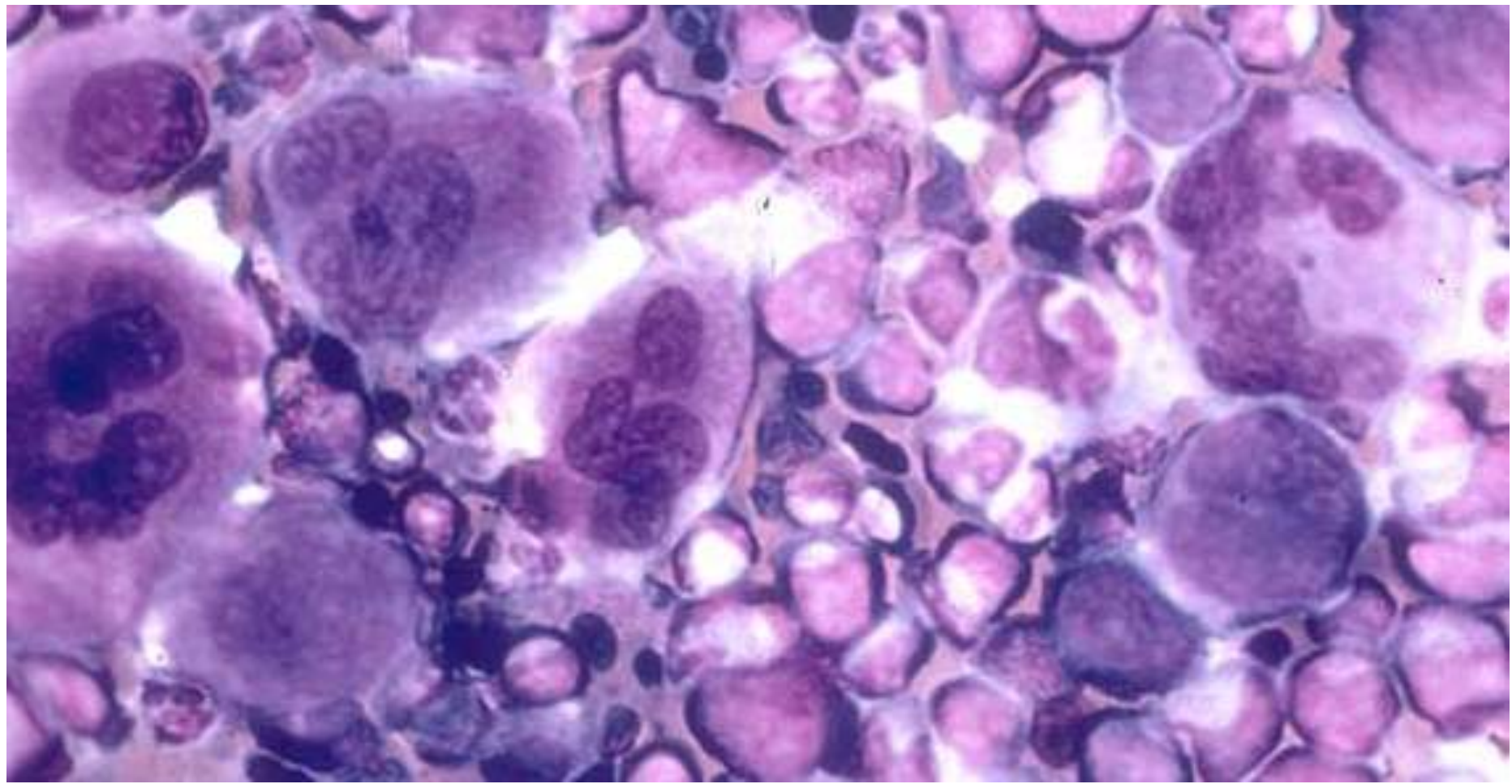




**Ibrid Protein BCR-ABL (P210, P190, P230)
Strong tyrosinichinase activity**

Pathways activated by BCR-ABL expression





**Midollo osseo ipercellulato,
con espansione di tutte le tre serie emopoietiche**

Epidemiologia della LMC

L'**incidenza** della leucemia mieloide cronica risulta essere pari a 1-2 casi per 100.000 abitanti.

LA **prevalenza** è in continuo aumento e si stima che ci saranno più di 180.000 pazienti negli USA affetti da LMC a partire dal 2050

Età mediana di insorgenza 60 anni

L'unico **fattore di rischio** riconosciuto per la LMC è l'esposizione a radiazioni ionizzanti

Iter diagnostico-strumentale

- **Emocromo completo (esame morfologico dello striscio)**
- **Esame obiettivo**
- ***Ricerca riarrangiamento BCR-ABL su s.p.***
- **Aspirato midollare con Cariotipo**

Diagnosi differenziale delle leucocitosi

Tipo di leucocitosi	Meccanismo	Cause	Precursori circolanti	diagnosi	BCR-ABL
Reazione leucemoide	Aumentata mieloproliferaazione da produzione di G-CSF	Infezioni neoplasie	+++	Clinica	-
MDS/MPN	Neoplasia cellula staminale emopoietica	Mutazioni	+++ monocitosi	Clinica Strumentale	-
LAL	Neoplasia cellula staminale emopoietica	Riarrang BCR-ABL	+++ blasti	Clinica Stumentale	+ (più freq P190)
LMC	Neoplasia cellula staminale emopoietica	Riarrang BCR-ABL	+++	Clinica Stumentale	+

Presentazione clinica della LMC

1. Per caso (esame di routine)

2. Con sintomi

- Astenia, calo ponderale, sindrome febbrile, artromialgie, sudorazioni, algie e tensione addominale da splenomegalia, amaurosi

3. Obiettività

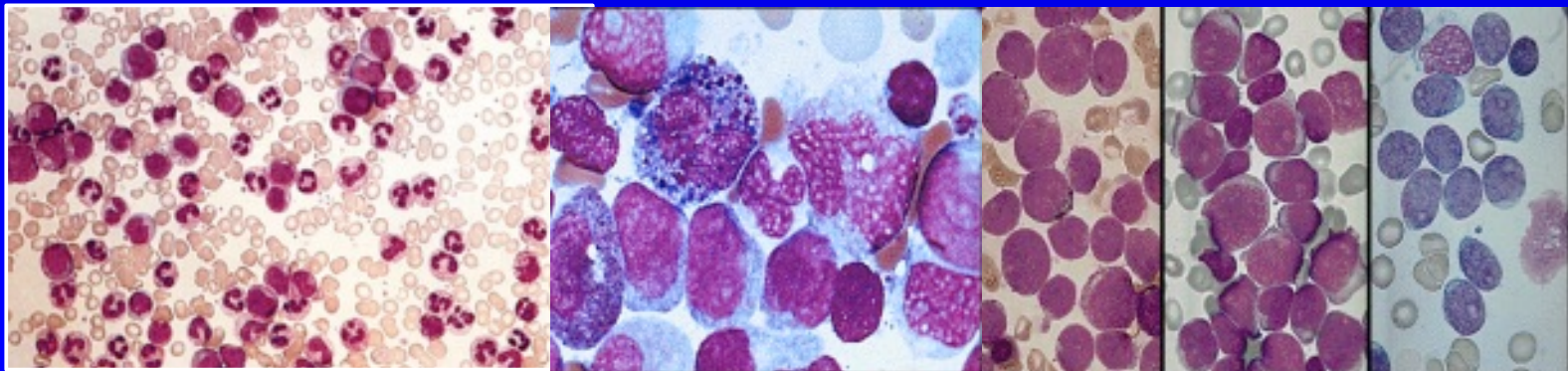

- Splenomegalia, epatomegalia, eventuale interessamento extramidollare (raro)

Formula leucocitaria LMC

	<i>LMC</i>	<i>V.N.</i>
GRANULOCITI NEUTROFILI	50 - 60%	50 - 70%
METAMIELOCITI	2 - 10%	0%
MIELOCITI	3 - 20%	0%
PROMIELOCITI	1 - 6%	0%
MIELOBLASTI	0 - 5%	0%
GRANULOCITI EOSINOFILI	1 - 5%	1 - 2%
GRANULOCITI BASOFILI	1 - 5%	0 - 1%
LINFOCITI	5 - 10%	25 - 45%
MONOCITI	2 - 6%	2 - 6%

Clinical Course: Phases of CML

Chronic phase	Advanced phases	
	Accelerated phase	Blastic phase (blast crisis)
Median 4–6 years stabilization	Median duration up to 1 year	Median survival 3–6 months Terminal phase



IMATINIB IN Ph POS CML

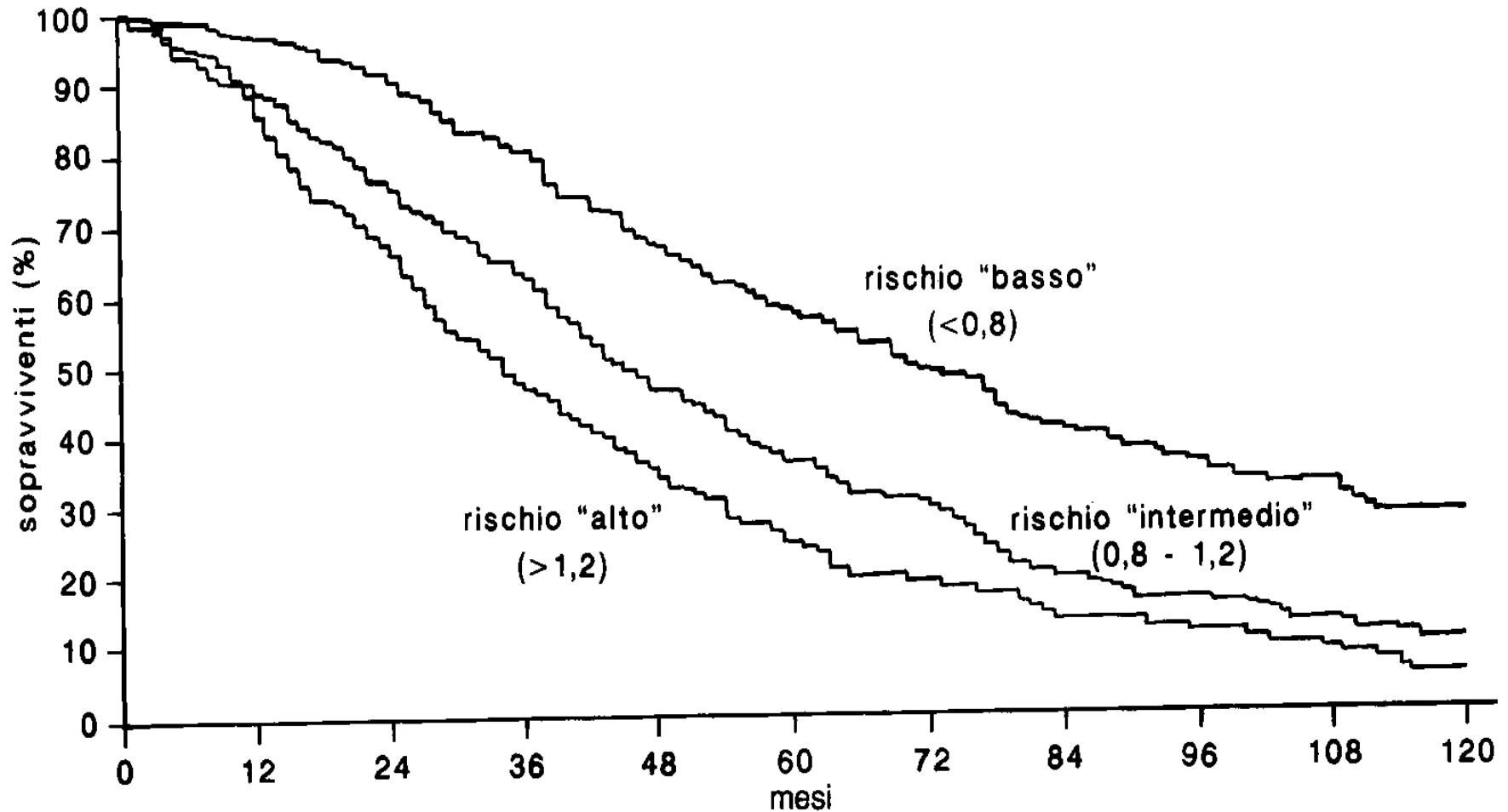
RISK CALCULATION AND DEFINITION

	SOKAL	EURO
Age (years)	0.116 (age - 43.4)	0.666 when age \geq 50
Spleen (cm below costal margin, max distance)	0.0345 (spleen - 7.51)	0.042 x spleen
Platelet count ($\times 10^9/L$)	0.188 [(Platelets ² : 700) - 0.563]	1.0956 when platelets \geq 1500
PB myeloblasts (%)	0.0887 (myeloblasts - 2.10)	0.0584 \times myeloblasts
PB basophils (%)	/	0.20399 when basophils $>$ 3%
PB eosinophils (%)	/	0.0413 \times eosinophils

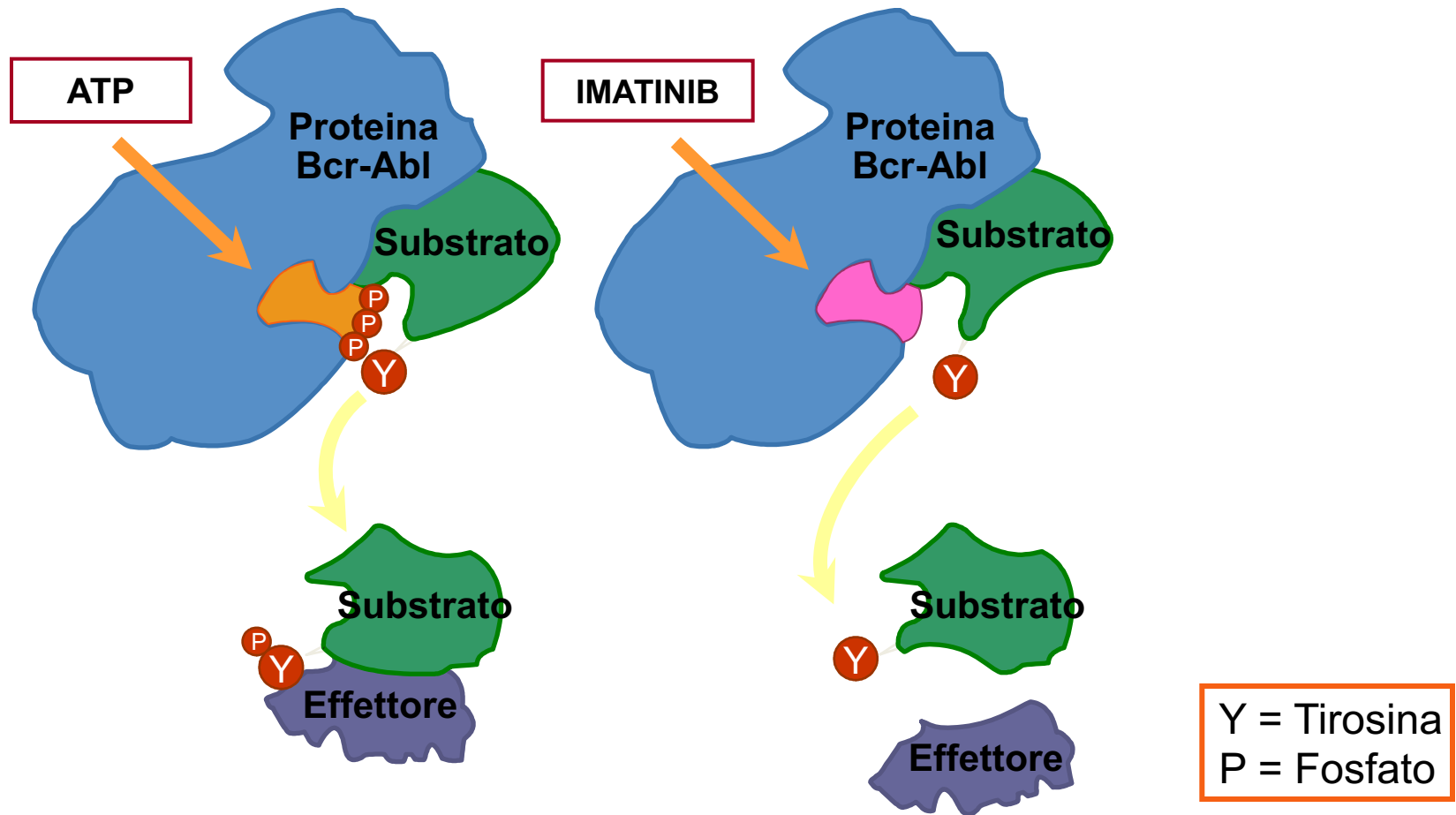
RELATIVE RISK	EXPONENTIAL OF THE TOTAL	TOTAL \times 1000
• LOW	<0.8	≤ 780
• INTERMEDIATE	0.8-1.2	781-1479
• HIGH	>1.2	≥ 1480

LEUCEMIA MIELOIDE CRONICA

Sopravvivenza in epoca pre-inibitori Tyr-chinasi



Meccanismo d'azione inibitori Tyr-chinasi



Obiettivo della terapia



Prolungare la
sopravvivenza

Ridurre il
rischio di
evoluzione

Guarire?

***LE NEOPLASIE
MIELOPROLIFERATIVE
CRONICHE
Ph- negative***

**Patogenesi
Inquadramento generale**

Epidemiologia delle Neoplasie Mieloproliferative Croniche

	EU Incidence* (per 100,000)	EU Prevalence (per 100,000) Rarecare	EU Prevalence (per 100,000) Orphanet	UK Prevalence (per 100,000) THIN database
MF	0.3–1.9	0.5	1–9	0.92
PV	0.6–2.8	5.5	10–50	6.05
ET	0.5–2.2	4.4	NA	6.27

Predisposizione genetica nelle NMC

	No di volte in cui aumenta il rischio di avere una NMC in un familiare di paziente con NMC rispetto alla popolazione normale			
<i>Malattia del paziente</i>	Qualunque NMC	PV	TE	MF
<i>Qualunque NMC</i>	5.6	5.7	7.4	0.9
<i>PV</i>	4.9	6	5.4	N.A.
<i>TE</i>	6.8	5,4	8.0	4.0
<i>MF</i>	2.7	N.A.	N.A.	N.A.

Rischio aumentato di PV, TE e PMF tra 24.577 parenti di primo grado di 11.039 pazienti con malattie mieloproliferative in Svezia (Registro svedese)

Caratteristiche principali delle NMC

- 1) Origine in una cellula progenitrice emopoietica pluripotente
- 2) Eccessiva produzione di una o più cellule ematiche mature clonali, in assenza di uno stimolo fisiologico. Il clone neoplastico si accresce nel contesto di una emopoiesi che è inizialmente policlonale.
- 3) Tendenza a sviluppare eventi vascolari (trombotici e/p emorragici)
- 4) Tendenza a trasformarsi in una leucemia acuta (invariabile nella LMC)
- 5) Possono evolvere le une nelle altre (es: TE → PV; TE/PV → MF secondaria)

➤ **POLICITEMIA VERA**

- Espansione clonale della eritropoiesi, che non è eritropoietina-dipendente

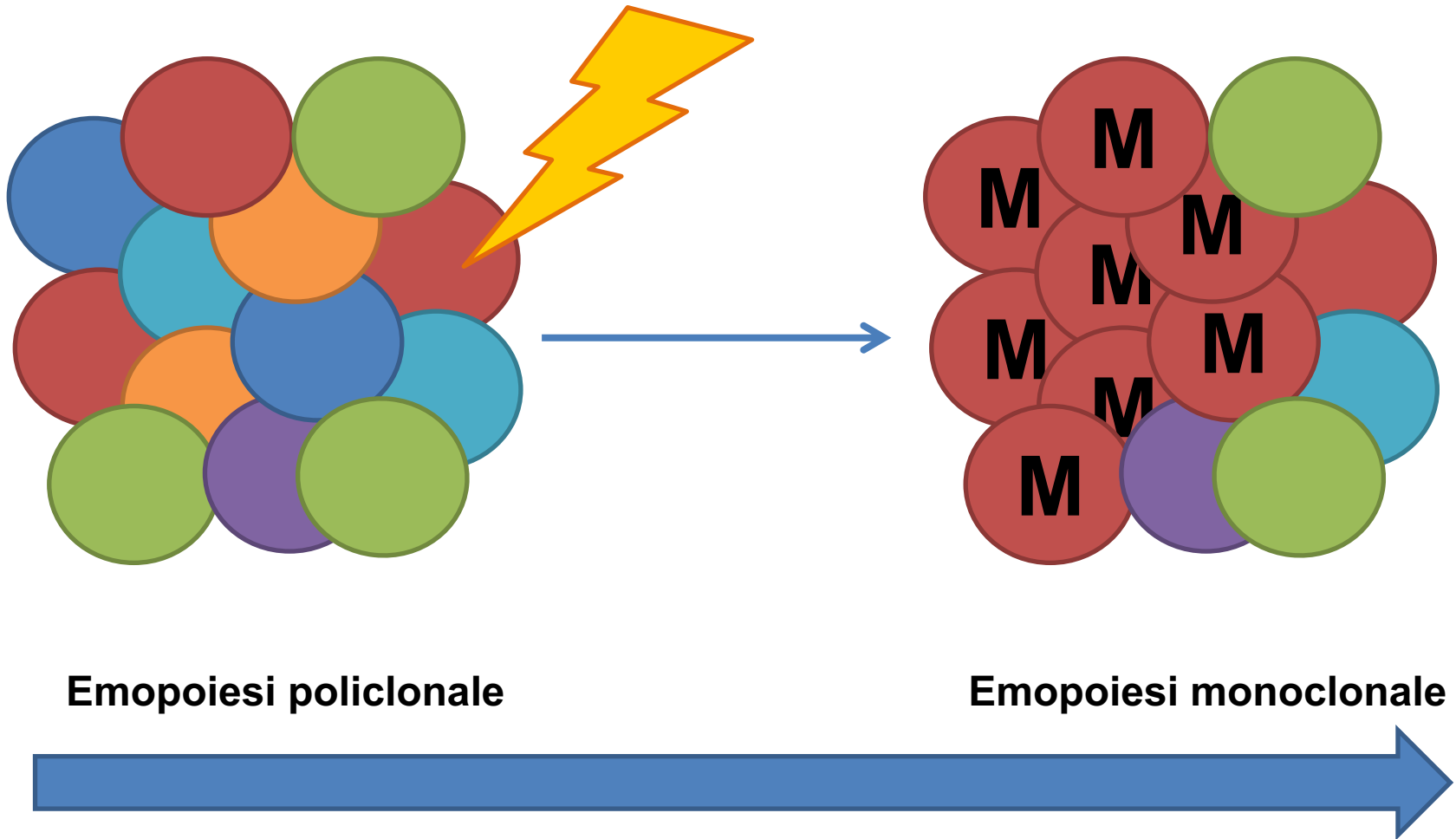
➤ **TROMBOCITEMIA ESSENZIALE**

- Espansione prevalente della piastrinopoiesi, che non è TPO-dipendente

➤ **MIELOFIBROSI PRIMARIA**

- Progressiva fibrosi midollare con espansione della emopoiesi in sedi extra-midollari

La mielopoiesi delle NMC è monoclonale

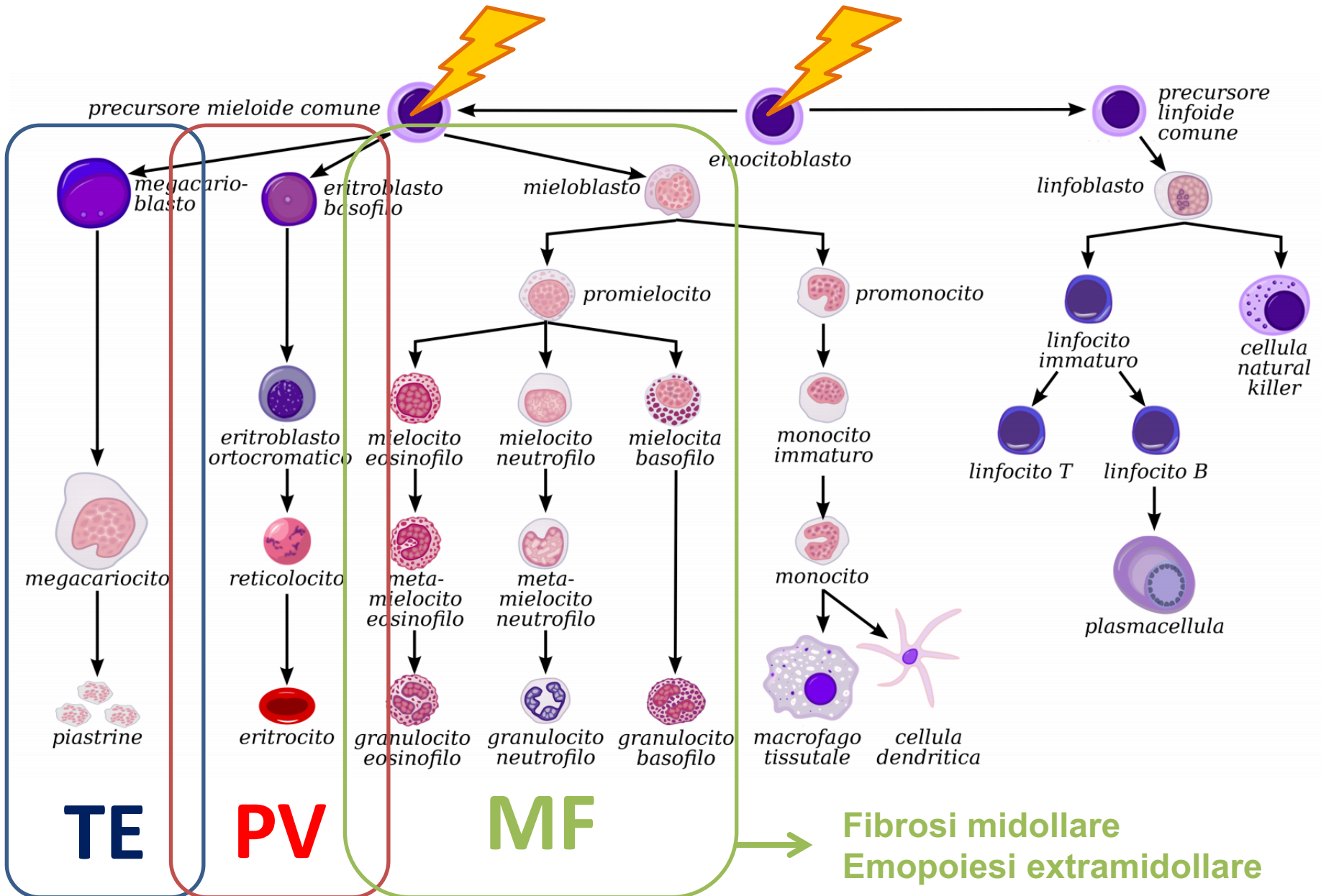


Emopoiesi policlonale

Emopoiesi monoclonale

Tutte le NMC originano da una cellula progenitrice emopoietica pluripotente. Si verifica una eccessiva produzione di una o più cellule ematiche mature clonali, in assenza di uno stimolo fisiologico. Il clone neoplastico si accresce nel contesto di una emopoiesi che è inizialmente policlonale.

La mielopoiesi delle NMC deriva da espansione clonale di una cellula staminale pluripotente

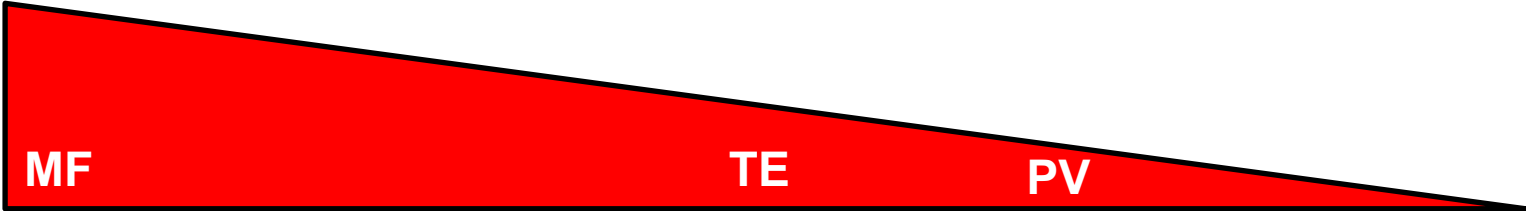


Tutte le NMC hanno un aumentato rischio vascolare

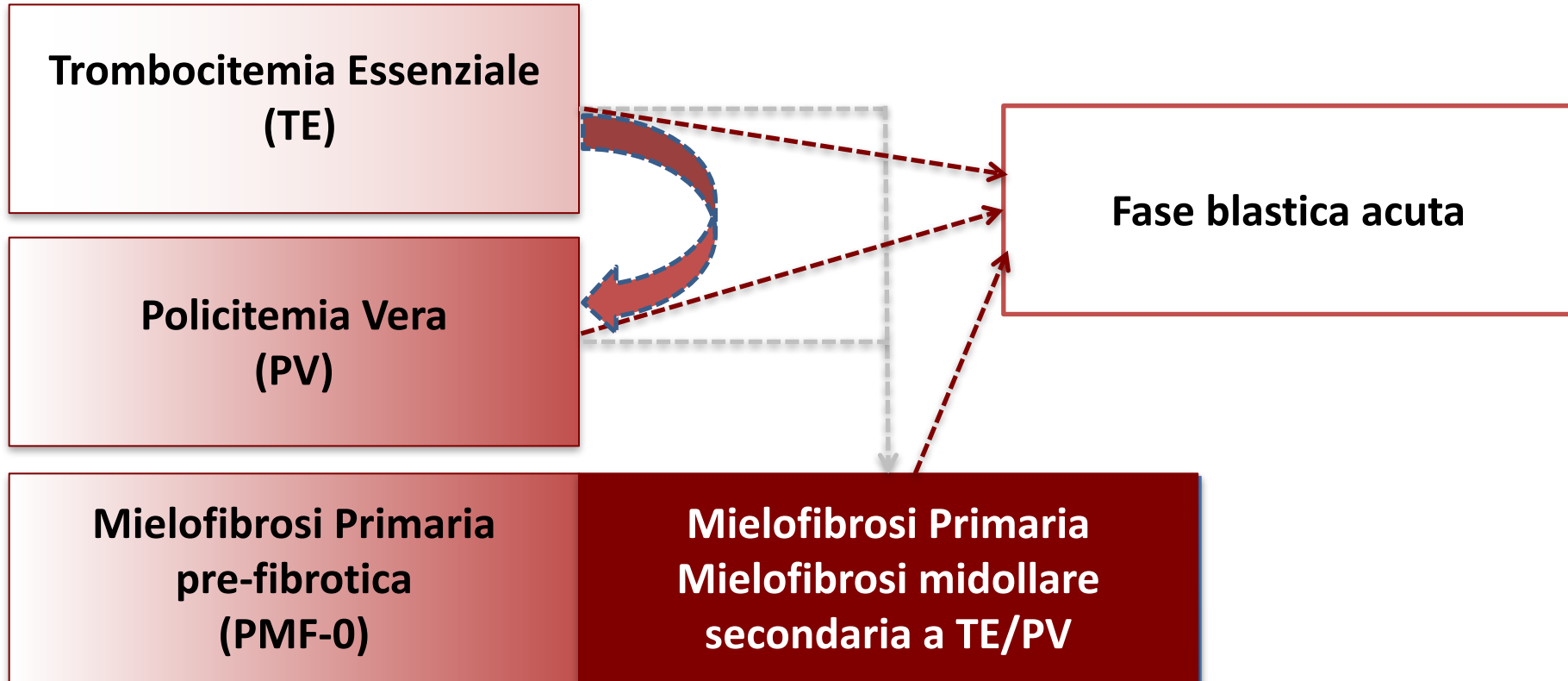
Rischio trombotico



Rischio Emorragico



Storia naturale delle NMP: mimicria clinica e fenotipica



Patogenesi delle NMC

1. Nella maggior parte dei casi di NMC, è possibile riscontrare la presenza di alterazioni geniche.
2. Le 3 mutazioni principali delle MPNs sono a carico dei geni: JAK2, CALR e MPL.
 - **JAK2**: tirosino-chinasi che trasduce il segnale dei fattori di crescita emopoietici (eritropoietina e trombopoietina). Mutazioni attivanti che inducono attività recettoriale costitutiva (indipendente da TPO e EPO)
 - **CALR**: proteina citoplasmatica con numerose funzioni intracellulari (in particolare, omeostasi del calcio). Le sue mutazioni attivano la via di segnale JAK-STAT analogamente a quanto avviene nelle mutazioni di JAK2 e MPL
 - **MPL**: recettore delle trombopoietina. Mutazioni attivanti che inducono attività recettoriale costitutiva (indipendente da TPO)
3. Esistono numerose alterazioni geniche addizionale, che possono rivestire un significato prognostico (soprattutto nella mielofibrosi).
4. L'infiammazione cronica e la sovra-produzione di citochine pro-infiammatorie rappresenta un elemento fondamentale nella patogenesi delle MPNs.

2005: la scoperta di JAK2V617F

Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis

CANCER CELL : APRIL 2005 · VOL. 7

Ross L. Levine,^{1,2,11} Martha Wadleigh,^{2,11} Jan Cools,⁶ Benjamin L. Ebert,^{2,8} Gerlinde Wernig,¹ Brian J.P. Huntly,¹ Titus J. Boggon,⁴ Iwona Wlodarska,⁶ Jennifer J. Clark,¹ Sandra Moore,¹ Jennifer Adelsperger,¹ Sumin Koo,¹ Jeffrey C. Lee,⁸ Stacey Gabriel,⁸ Thomas Mercher,¹ Alan D'Andrea,³ Stefan Fröhling,¹ Konstanze Döhner,⁷ Peter Marynen,⁶ Peter Vandenberghe,⁶ Ruben A. Mesa,⁹ Ayalew Tefferi,⁹ James D. Griffin,² Michael J. Eck,⁴ William R. Sellers,^{2,8} Matthew Meyerson,^{2,8} Todd R. Golub,^{5,8,10} Stephanie J. Lee,^{2,*} and D. Gary Gilliland^{1,2,10,*}

Sequenziamento
genico

Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders

Lancet 2005; 365: 1054-61

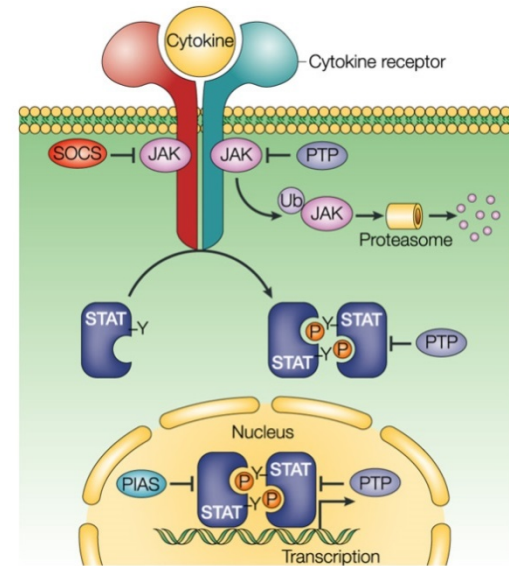
E Joanna Baxter*, Linda M Scott*, Peter J Campbell*, Clare East, Nasios Fourouclas, Soheila Swanton, George S Vassiliou, Anthony J Bench, Elaine M Boyd, Natasha Curtin, Mike A Scott, Wendy N Erber, the Cancer Genome Project†, Anthony R Green

A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders

N Engl J Med 2005;352:1779-90.

Robert Kralovics, Ph.D., Francesco Passamonti, M.D., Andreas S. Buser, M.D., Soon-Siong Teo, B.S., Ralph Tiedt, Ph.D., Jakob R. Passweg, M.D., Andre Tichelli, M.D., Mario Cazzola, M.D., and Radek C. Skoda, M.D.

Mappatura cromosomica



Nature Reviews | Immunology

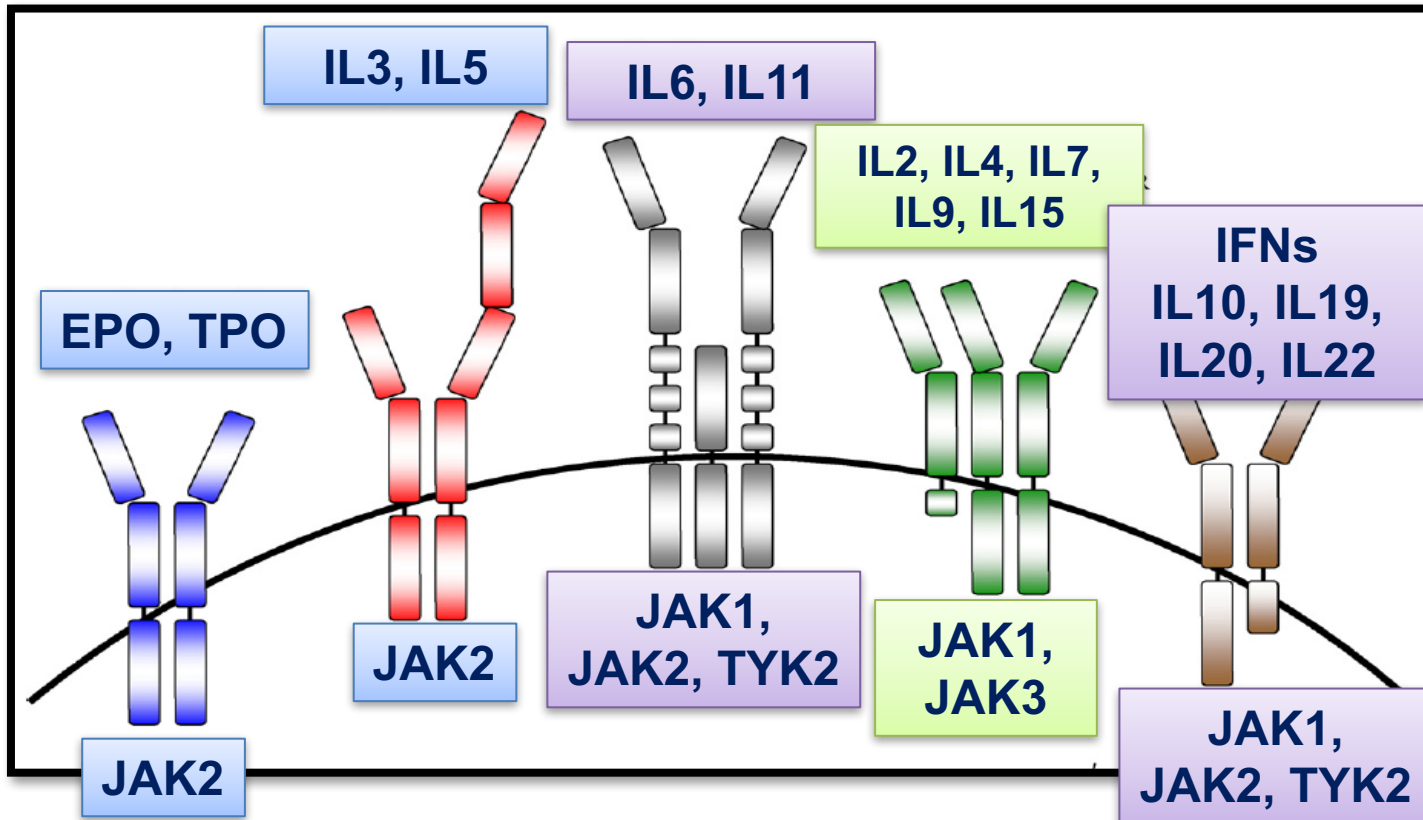
A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera

NATURE | VOL 434 | 28 APRIL 2005 |

Chloé James^{1*}, Valérie Ugo^{1,2,3*}, Jean-Pierre Le Couëdic^{1*}, Judith Staerk⁴, François Delhommeau^{1,3}, Catherine Lacout¹, Loïc Garçon¹, Hana Raslova¹, Roland Berger⁵, Annelise Bennaceur-Griscelli^{1,6}, Jean Luc Villeval¹, Stefan N. Constantinescu¹, Nicole Casadevall^{1,3} & William Vainchenker^{1,7}

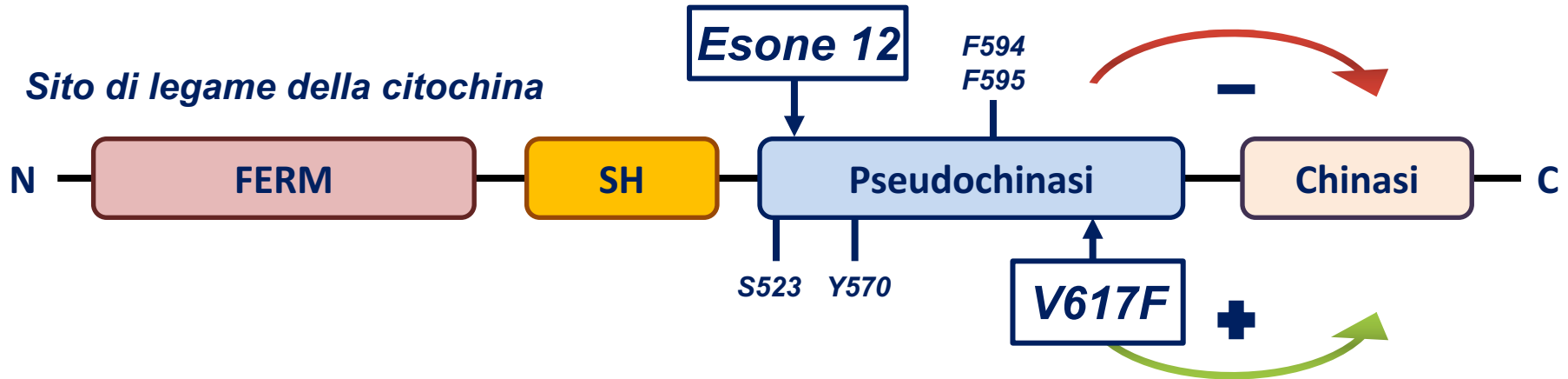
siRNA che riconosce
JAK2

La famiglia dei JAK



- 1) **JAK2** è critico per il segnale di molte citochine di superficie fattori di crescita (**eritropoietina e trombopoietina**)
- 2) **JAK1** ha un ruolo fondamentale nella trasduzione delle **citochine pro-infiammatorie**, che sono elevate nelle MPNs e nella mielofibrosi in particolare

Struttura di JAK2



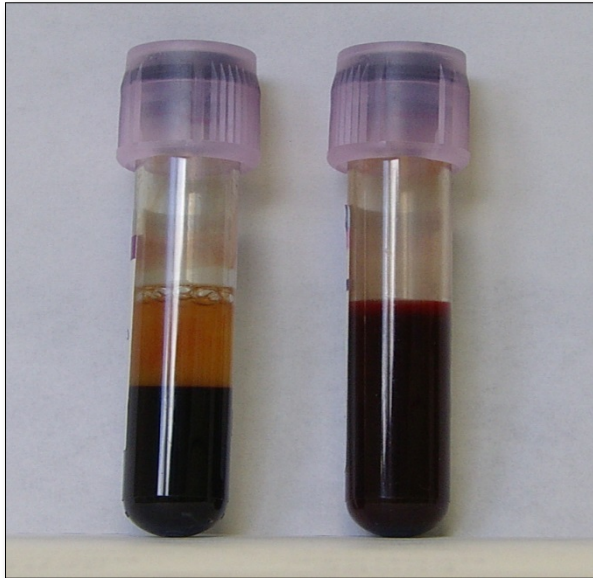
Le mutazioni V617F e a carico dell'esone 12 sono localizzate nel dominio pseudochinasico del gene JAK2 (JH2)

JH2 è una porzione cataliticamente attiva con **effetti inibitori** sull'attività di JAK2

Le **mutazioni V617F** e dell'**esone 12** causano una **stabilizzazione** del **dominio pseudochinasico** in una **conformazione inattiva**, inducendo un'**attivazione costitutiva di JAK2** indipendentemente dal legame con la citochina

La mutazione JAK2V617F nelle neoplasie ematologiche

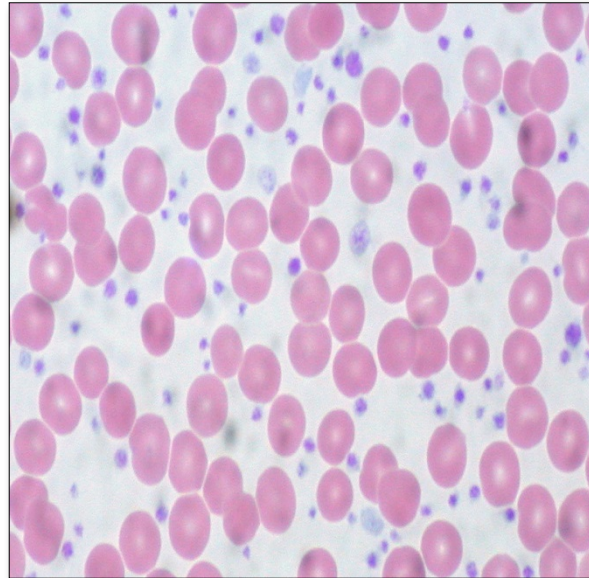
PV



95-97%

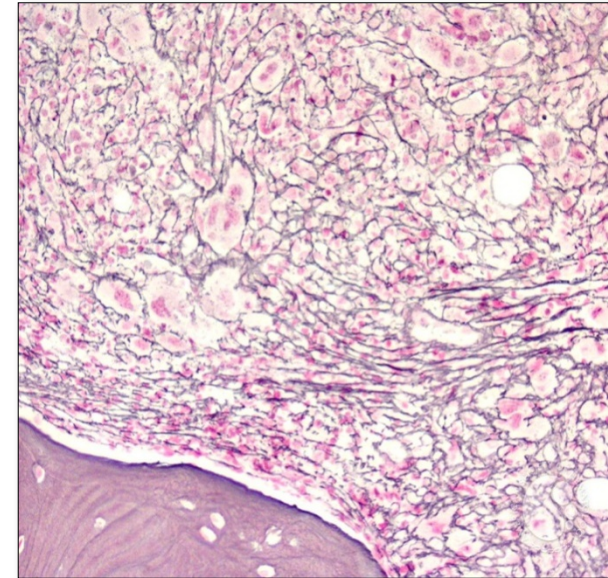
Esone 12 ~ 2%

TE



50-60 %

MF



50-60 %

Altre neoplasie ematologiche

Frequenza (%)

Anemia refrattaria con sideroblasti ad anello e piastrinosi (RARS-T)

~ 50 %

Leucemia mielomonocitica cronica (CMML)

~ 5-10 %

Leucemia eosinofilica cronica, aCML, mastocitosi sistemica

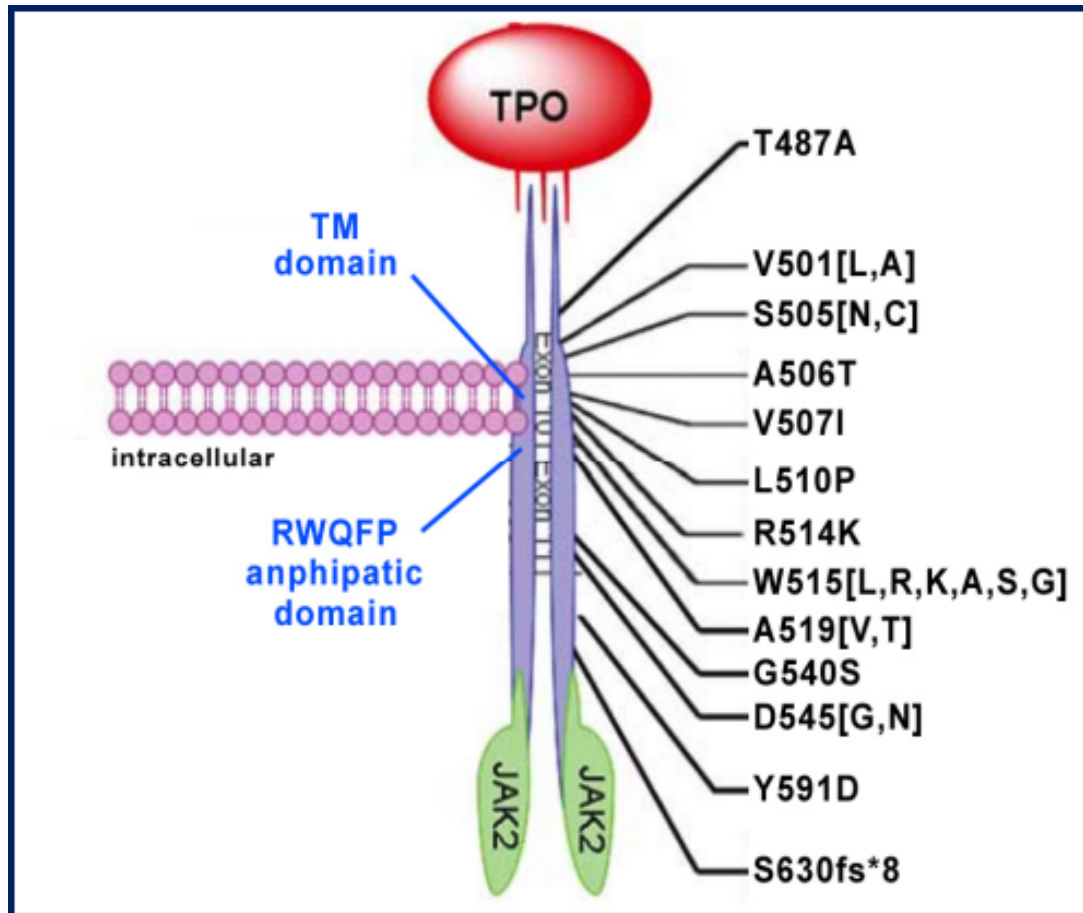
< 5 %

Leucemia acuta mieloide

33

< 5 %

MPL (myeloproliferative leukemia virus oncogene)



Codifica per il recettore della trombopoietina (**TPO-R**)

Localizzato sul cromosoma 1 (locus 1q34)

Identificate numerose mutazioni puntiformi

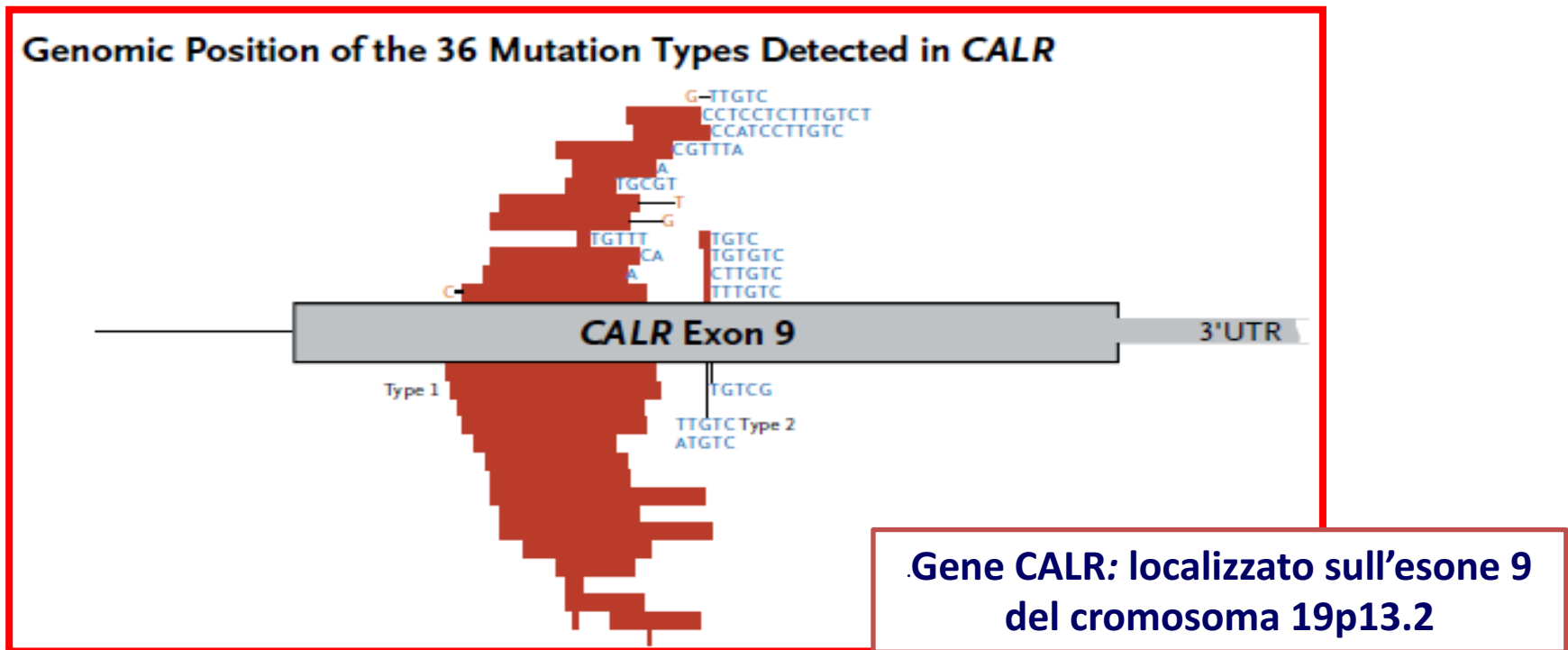
Principali: W515L/K e S505N/C

Inducono una attivazione costitutiva del pathway di JAK/STAT

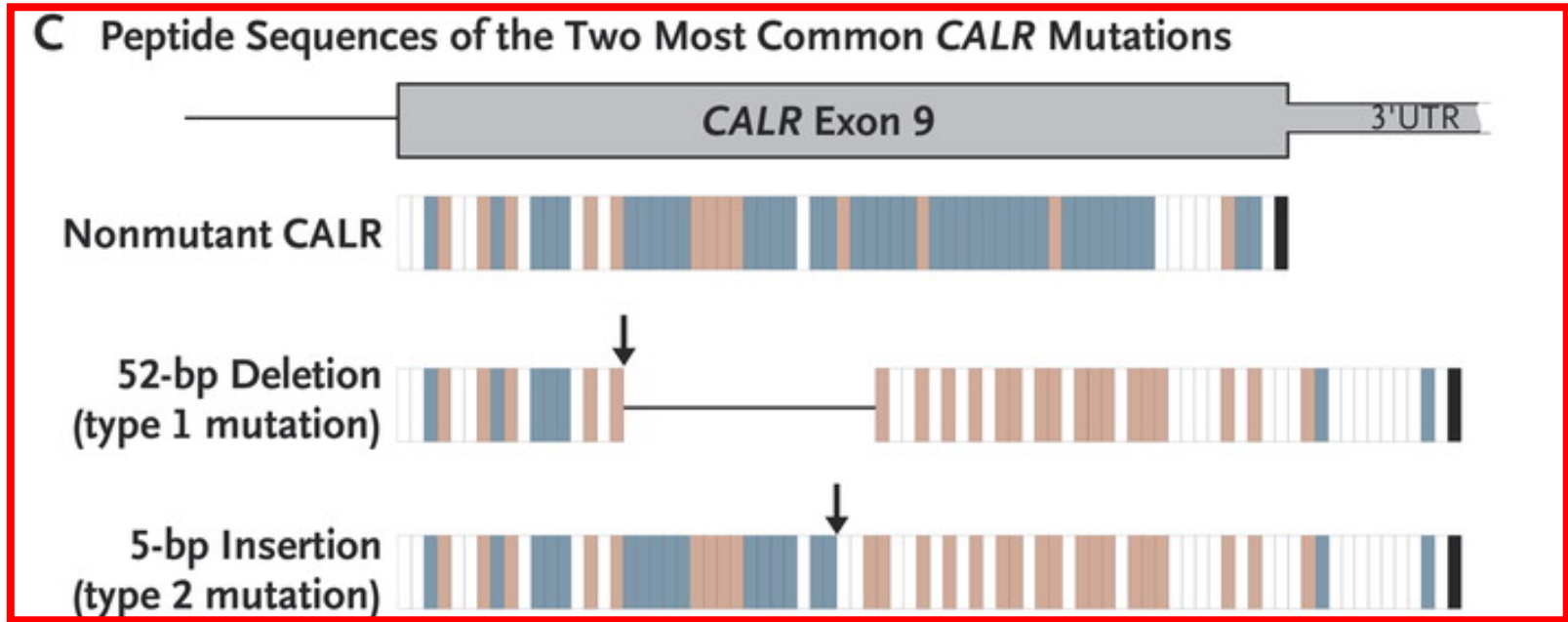
- ❑ **Frequenza: 3-4% TE**
10% MF

Mutazioni di CALR nelle MPNs

Sono state identificate **36 differenti inserzioni o delezioni a carico del gene JAK2**. Tutte causano una variazione della sequenza amminoacidica della proteina inducendo un nuovo peptide C terminale nella proteina mutata. Tutte le mutazioni di CALR sono **mutualmente esclusive** con quelle di **JAK2** ed **MPL**



Mutazioni di tipo 1 e 2 della calreticulina nelle MPNs



TIPO 1: delezione di 52-bp che determina l'eliminazione di tutti i residui aminoacidici a carica negativa. E' più frequente nella MF rispetto alla TE

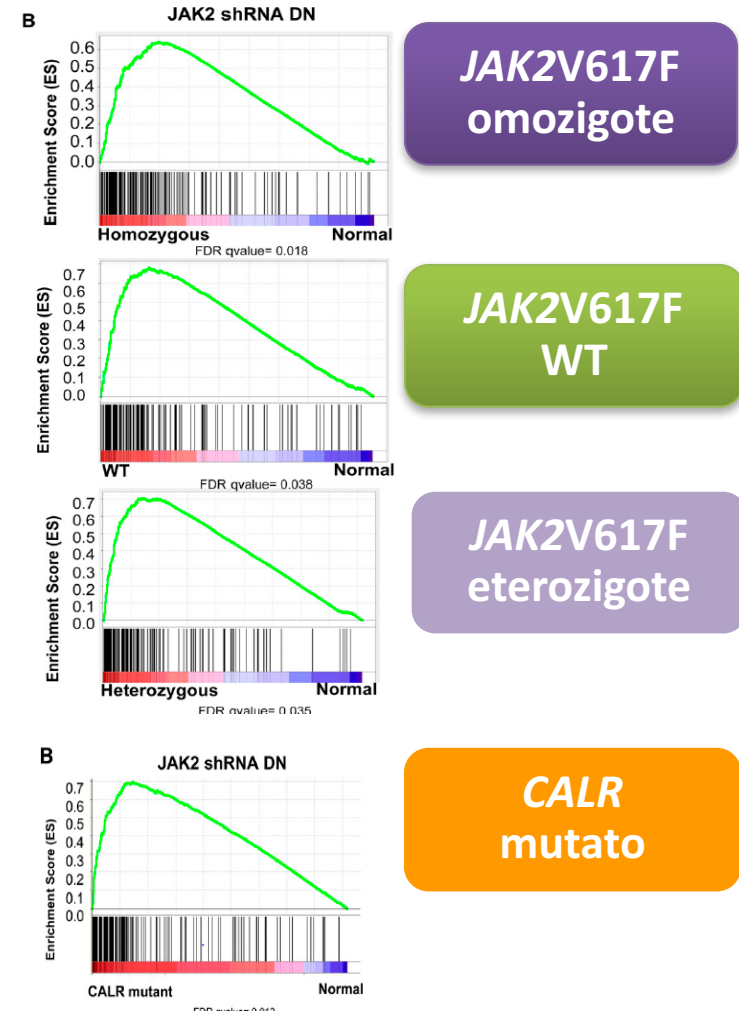
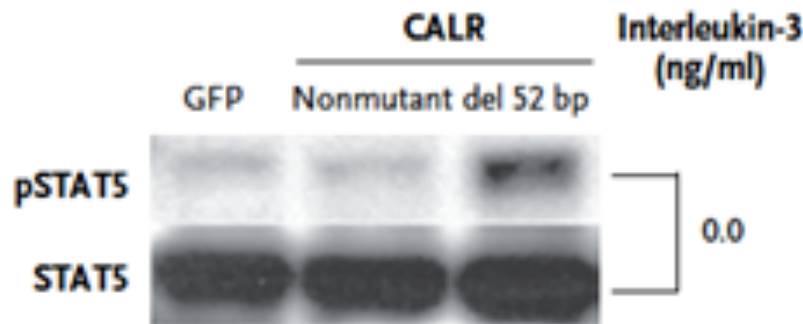
TIPO 2: inserzione di 5-bp che determina la riduzione di circa la metà degli aminoacidi carichi negativamente

CALR è coinvolto nella via di segnale JAK-STAT

CALR è una proteina citoplasmatica

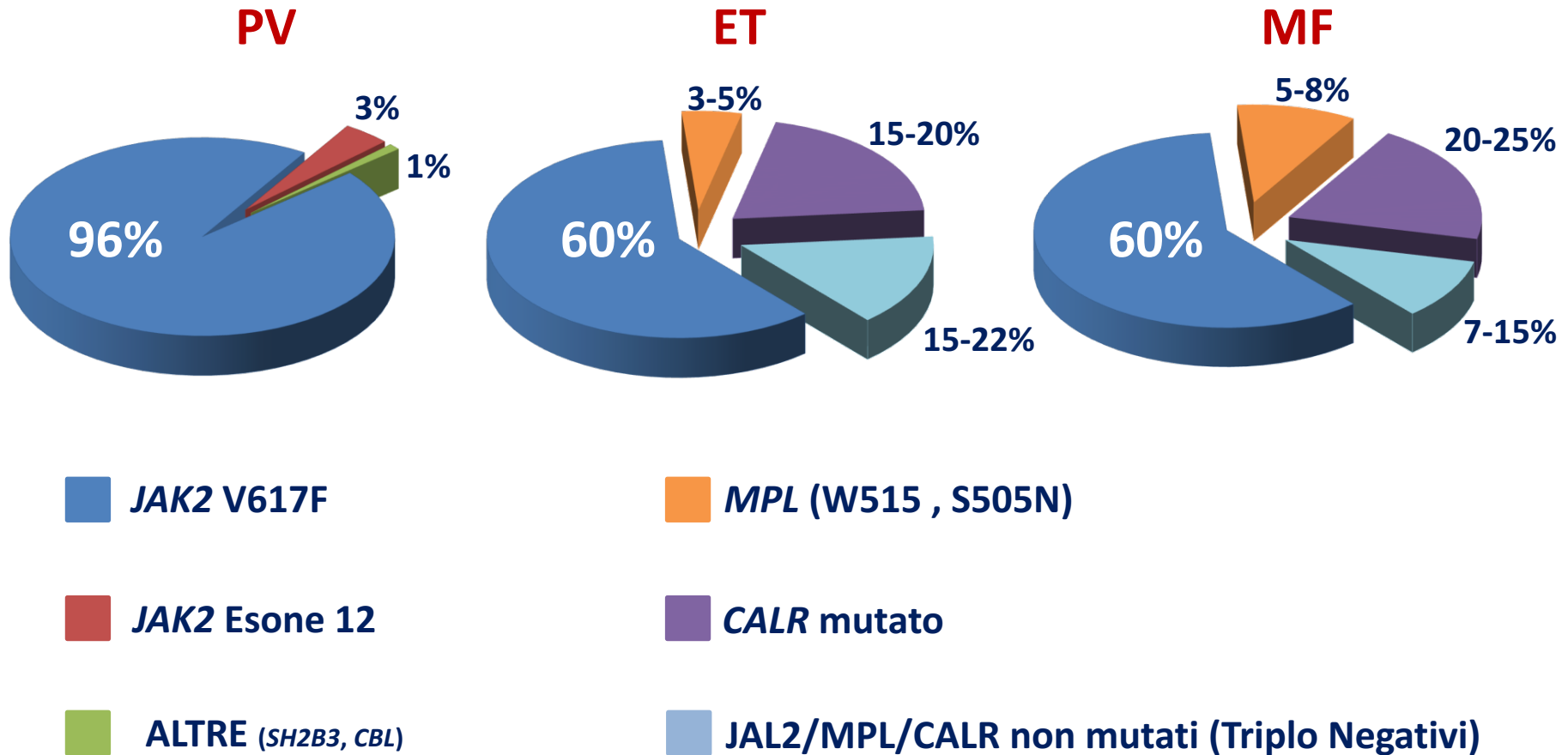
Multiple funzioni:

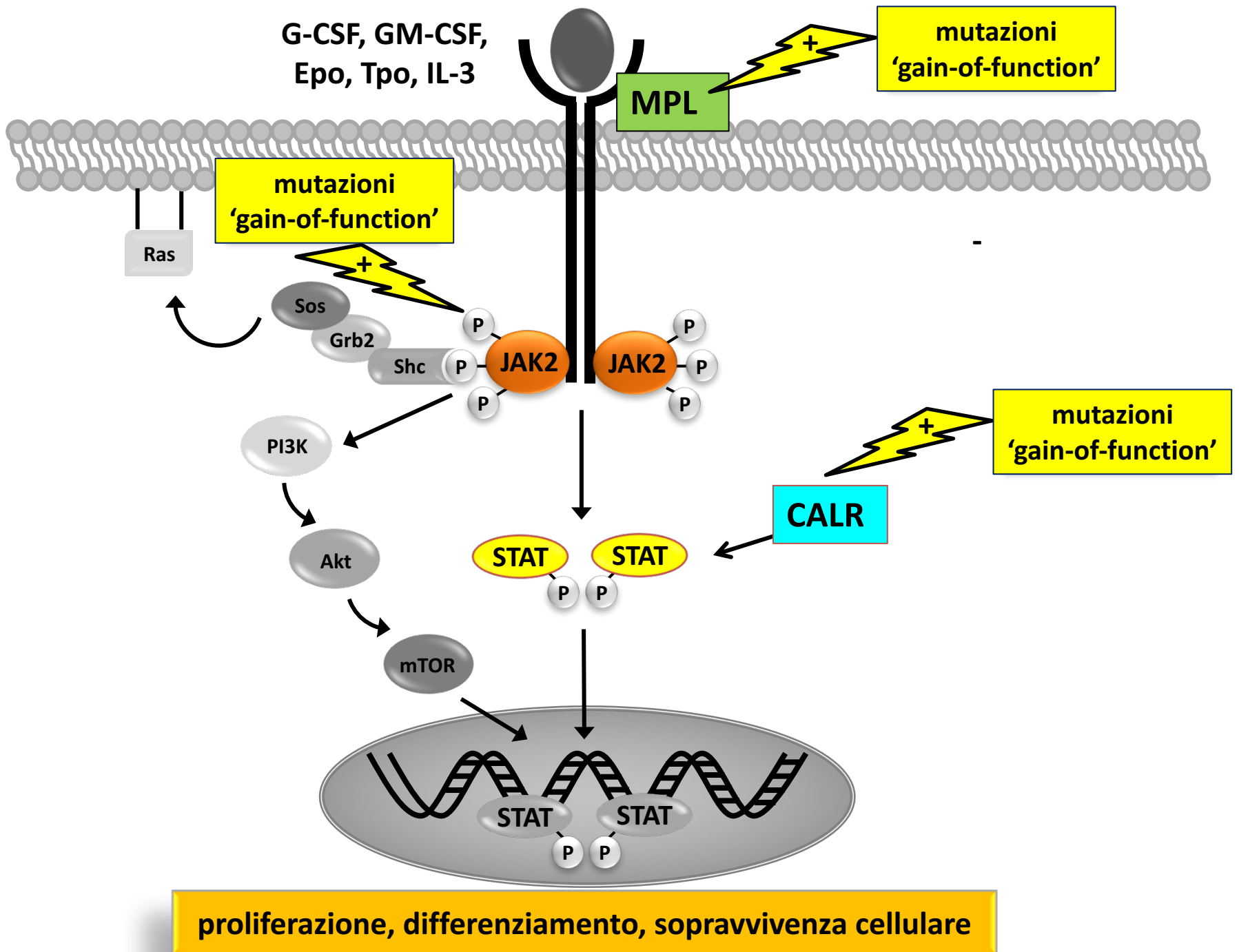
1. Chaperon protein (agevola il ripiegamento delle glicoproteine)
2. Legata all'omeostasi del calcio
3. Diverse attività cellulari (risposta immune, adesione cellulare, proliferazione, fagocitosi, apoptosi, ecc.)



Un profilo di espressione genica caratterizzato dall'attivazione della via di segnale di JAK2 è presente in tutti i pazienti MPN, inclusi i pazienti con mutazioni di CALR

Profilo mutazionale nelle MPNs





“Multiple mutazioni nelle MPNs”

Mutazioni di
geni coinvolti
nel pathway
JAK-STAT

JAK2
CALR
MPL
LNK
c-CBL

Mutazioni che
coinvolgono
“geni regolatori
dell’epigenetica”

EZH2
TET2
ASXL1
IDH1/2
DNMT3A

Mutazioni
coinvolte nella
trasformazione
leucemica

IDH1/2
NRAS - KRAS
NF1
IKZF1
TP53
RUNX1

Mutazioni
coinvolte nello
splicing di RNA

SRSF2
SF3B1
U2AF1

Queste mutazioni si riscontrano con frequenza variabile da 1% al 35% a seconda del tipo di mutazione e del tipo di NMC. Nella MF, rivestono un significato prognostico

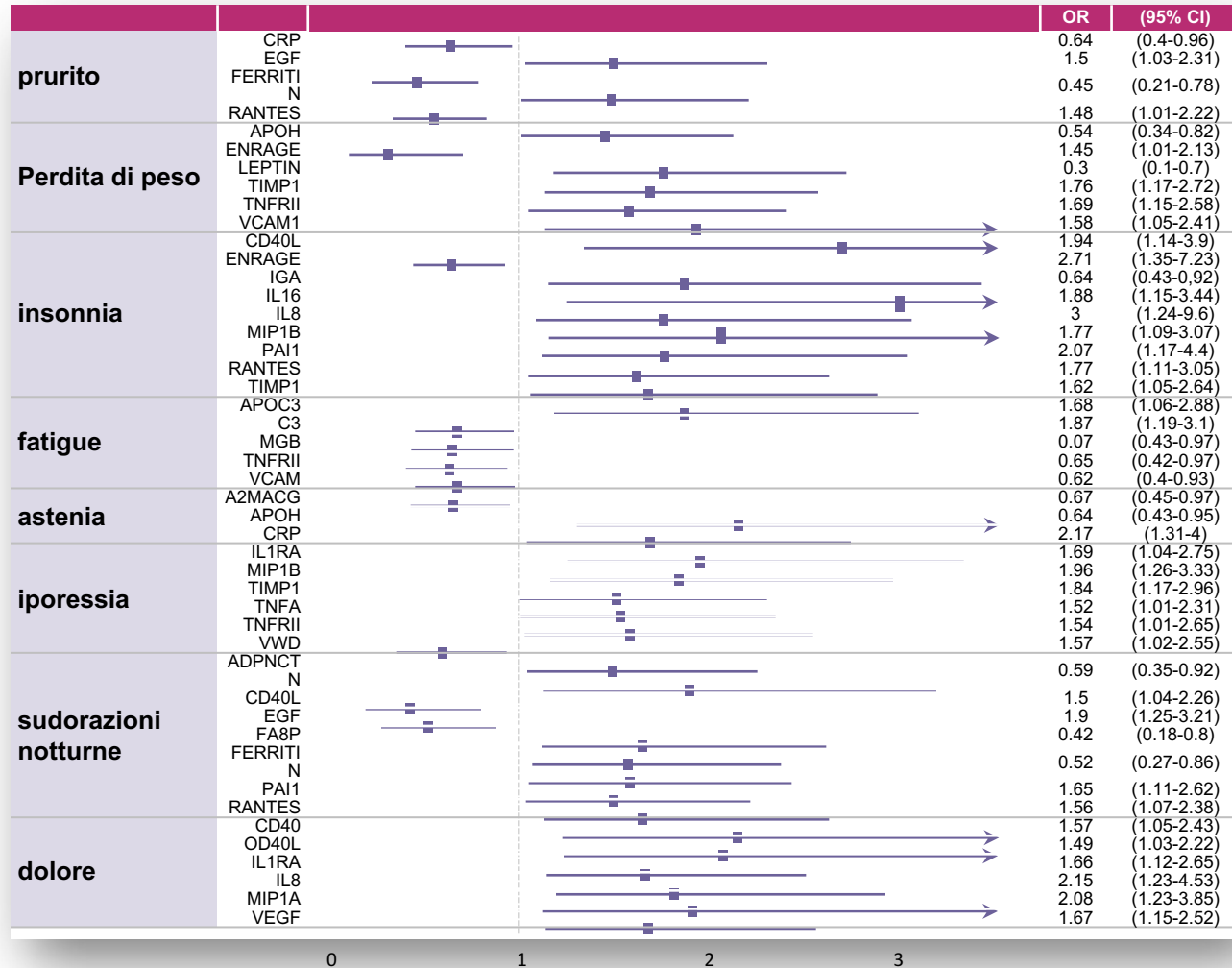
Le citochine pro-infiammatorie sono over-espresse

Table 3
Dysregulated cytokines and cytokine expression levels in patients with MF.

Disease type	No. of patients	Prior treatment	Experimental protocol	Elevated cytokines	Source
ET, PV, CML	70 with clonal thrombocytosis (31 ET, 22 PV, 17 CML), 28 with reactive thrombocytosis	Treatment naïve	PB and BM samples; ELISA	THPO, IL-6, sIL-6, IL-8, SCF	[63]
ET, PV, PMF, CML	83 (40 ET, 8 PV, 25 MF with MMM, 10 CML)	Yes	PB and BM samples; ELISA	IL-2 and sIL-2R α were elevated in all types; IL-6 was elevated in MMM and CML; THPO was elevated in MMM	[64]
ET, PV, PMF	20 (5 ET, 5 PV, 10 PMF)	None on active therapy	PB samples; ELISA	TIMP1, MIP-1 β , IGFBP2	[65]
PV	58	Treatment naïve	PB and/or BM samples; ELISA and RT-PCR	IL-11, HGF	[66]
PMF	127	90 treatment naïve; 37 currently receiving or had received some form of treatment	PB samples; ELISA	IL-1 β , IL-1R α , IL-2R, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, TNF α , IFN α , IFN γ , MIP-1 α , MIP-1 β , IP10, MCP-1, VEGF, HGF, G-CSF, MIG	[30]
MF	32 (5 PET-MF, 3 PPV-MF, 24 PMF)	None on active therapy	PB samples; ELISA	IL-1 β , IL-1R α , IL-2R, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, TNF α , INF γ , GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , HGF, IP10, MIG, RANTES (CCL5), MCP-1, VEGF	[67]
ET, PV, PMF	69 (19 ET, 41 PV, 9 PMF)	Most with ET or PV prior therapy; 8 of 9 with PMF treatment naïve	WB samples; microarray	IFI27, TMEM158, EGFR, PF4V1, XK, CA1, GYPB, GYPB, HBG2, HBG1, CD177, SNC α , ANKRD9, RHAG, MMP8, CEACAM8, CEACAM6, DEF α 4, ELA2, OLFM4	[27]
ET, PV, PMF	69 (19 ET, 41 PV, 9 PMF)	Most with ET or PV prior therapy; 8 of 9 with PMF treatment naïve	WB samples; microarray	IFI27, IFI27L2, MRGPRX3, EGFR, TMEM158, LOC157627, GKAP1, C9orf82 (CAAP1), FIJ14109, CLEC1A, CD177, ZD46F04, ANKRD9, CA1, MMP8, AQP1, AZU1, CEACAM8, ELA2, DEFA4, GYPB, OLFM4, CTSG	[29]
ET, PV, PMF	51 (16 ET, 36 PV, 9 PMF)	Most on cytoreductive therapy (HU); IFN α therapy excluded	WB samples; microarray	PTX3, ORM1, CXCL3, C5, CXCL2, ORM2, ITGB3, MAPK1, IL-22, CXCL11, IL-17C, C3, CCL7, CCL25, IL-5, CARD18, IL-1F6, VEGF, HGF, G-CSF, MIG	[28]
PV	65	Treatment naïve	PB samples; ELISA	IL-1R α , EGF, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-13, IL-15, IFN γ , GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , HGF, IP10, MIG, RANTES, MCP-1, VEGF	[31]

I pazienti con NMC presentano **più alti livelli di citochine proinfiammatorie** rispetto ai soggetti sani

I livelli di citochine correlano con i sintomi sistemici delle NMC



I livelli di citochine correlano con la fibrosi nella MF

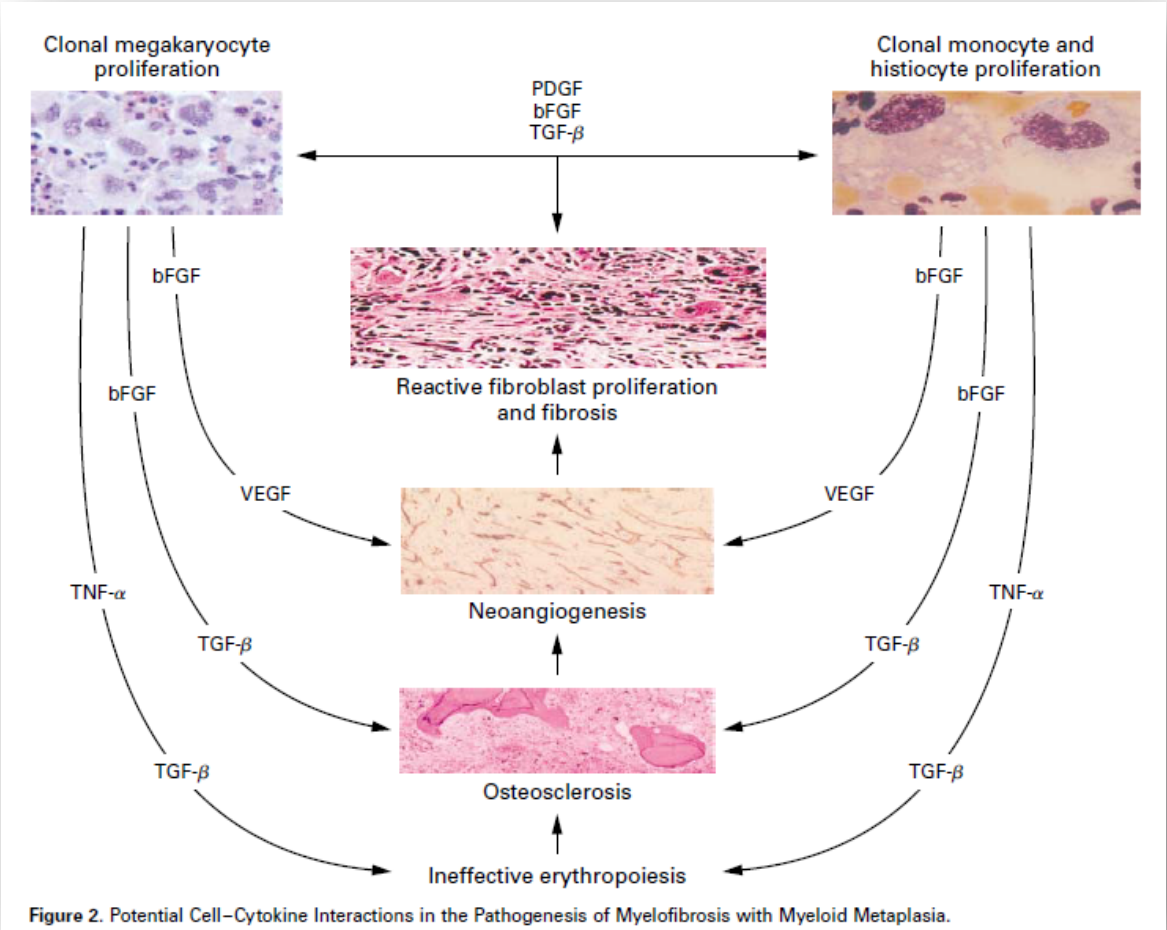


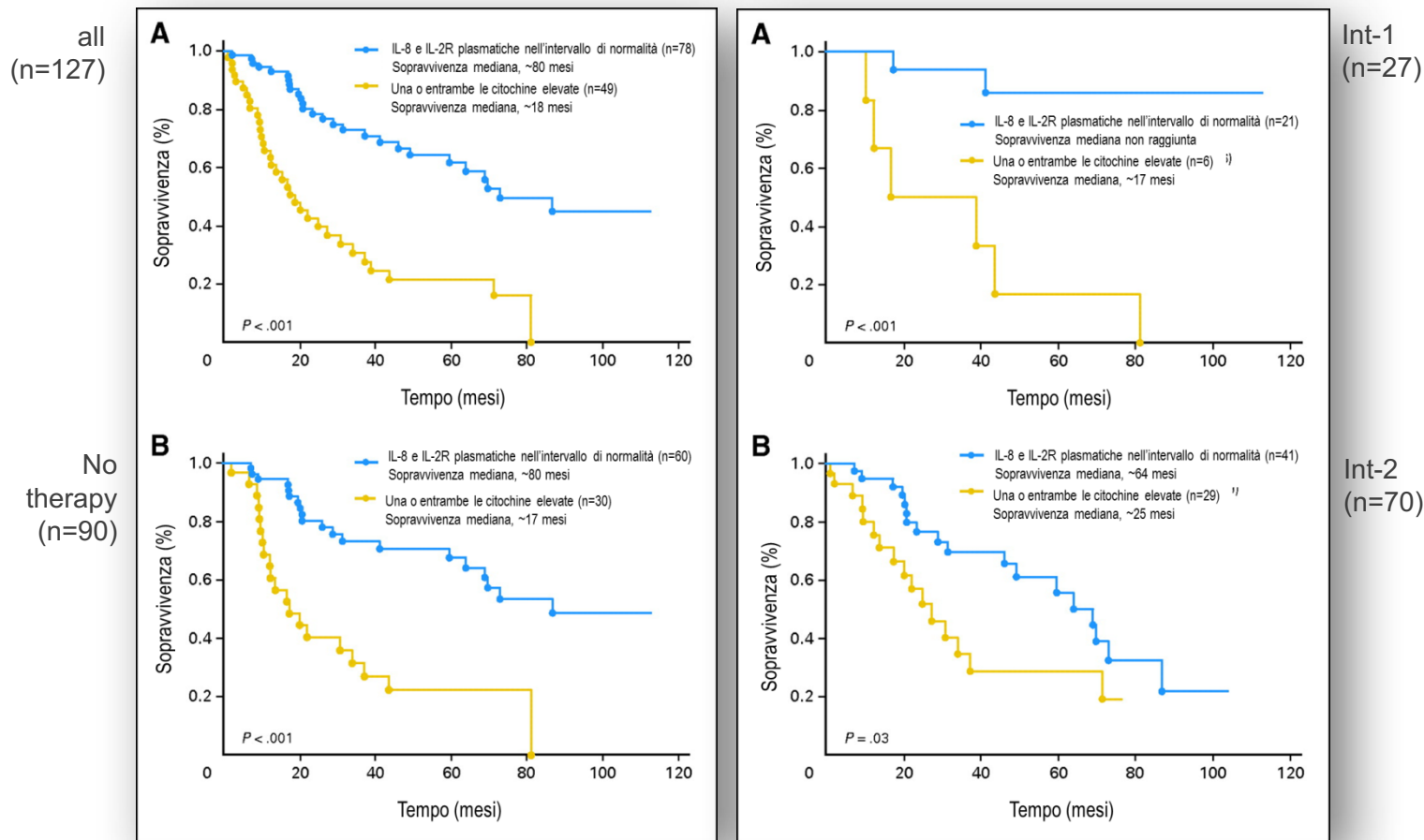
Figure 2. Potential Cell–Cytokine Interactions in the Pathogenesis of Myelofibrosis with Myeloid Metaplasia.

- le citochine pro-infiammatorie sono prodotte da cellule clonali neoplastiche (MK e monociti)
- attivano la proliferazione dei fibroblasti, che causano la fibrosi midollare
- Livelli aumentati di PDGF, FGFb, TGF-beta e VEGF sono coinvolti nei processi di fibrogenesi e angiogenesi della MF

1. Hasselbalch HC. Cytokine Growth Factor Rev 2013; 24(2): 133-45; 2. Le Bousse-Kerdiles MC, et al. Annals of Hematology 1999;78:437–44; 3. Tefferi A. N Engl J Med. 2000 ; 342(17): 1255-65.

I livelli di citochine correlano con la prognosi nella MF

Livelli aumentati di IL-8 and IL-2R correlano con la sopravvivenza libera da leucemia



NMC come “modello dell’infiammazione cronica”

