

A mio padre e mia madre



UNIVERSITÀ DI PISA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA CLINICA E SPERIMENTALE

**CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN MEDICINA E
CHIRURGIA**

“Correlazione tra dati istologici e profili immunofenotipici in pazienti
affetti da Mieloma Multiplo, sottoposti a chemioterapia e
trapianto di midollo”

RELATORE:

Chiar.mo Dott. Giovanni Carulli

CANDIDATO

Giusy Cetani

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

Indice

Riassunto	pag.6
Capitolo 1: Introduzione sul Mieloma multiplo, caratteristiche cliniche, stadiazione, trattamento	pag.8
1.1 Epidemiologia	pag.10
1.2 Eziopatogenesi del Mieloma Multiplo	pag.11
1.2.1 Origine della plasmacellula mielomatosa	pag.11
1.2.2 Eziologia del mieloma multiplo	pag.14
1.2.3 Basi patogenetiche del Mieloma Multiplo: l'instabilità cariotipica, il ruolo del microambiente e il coinvolgimento del tessuto osseo	pag.15
- Genetica del mieloma e instabilità cariotipica	pag.15
- Ruolo del microambiente	pag.21
- Danno osseo	pag.23
1.3 Clinica del Mieloma Multiplo	pag.25
1.3.1 Principali manifestazioni cliniche del Mieloma	pag.25
1.3.2 Criteri diagnostici di Mieloma Multiplo	pag.27
1.4 Stadiazione clinica del Mieloma Multiplo	pag.31
1.5 Stratificazione del rischio e criteri prognostici	pag.33
1.6 Criteri di risposta alla terapia	pag.35
1.7 Stime della sopravvivenza e loro ruolo nel Mieloma Multiplo	pag.40
1.8 Il trattamento del Mieloma Multiplo	pag.41
1.8.1 Mieloma multiplo asintomatico	pag.41
1.8.2 Trattamento del Mieloma sintomatico	pag.41
1.8.3 Terapia del paziente sintomatico passibile di HDT e ASCT	pag.45
1.8.4 Terapia del paziente non candidabile ad HDT e ASCT	pag.49
1.8.5 Terapie di consolidamento e mantenimento	pag.50
1.8.6 Trattamento del mieloma progressivo o della ricaduta e del Mieloma refrattario	pag.51

1.8.7 Terapia di supporto nel Mieloma Multiplo	pag.55
1.9 Ruolo della risposta al trattamento nel Mieloma Multiplo	pag.56
Capitolo 2: L'iter diagnostico e il follow-up nel Mieloma Multiplo	pag.60
2.1 Anamnesi del paziente con sospetto di Mieloma Multiplo	pag.61
2.2 Esami di screening nel Mieloma Multiplo	pag.62
2.3 Ruolo della misura delle catene leggere libere (FLC)	pag.67
2.4 Gli esami morfologici nel Mieloma	pag.69
2.5 Le indagini citogenetiche e la diagnosi molecolare nel Mieloma Multiplo	pag.72
2.6 Diagnostica per immagini nella diagnosi del Mieloma Multiplo	pag.74
2.7 Il follow up	pag.78
Capitolo 3: La citofluorimetria: nuovo strumento per diagnosi e follow up del paziente con MM	pag.80
3.1 Identificazione e caratterizzazione delle plasmacellule mediante MFC	pag.80
3.2 Utilità della citofluorimetria nella diagnosi differenziale del MM	pag.87
3.3 Identificazione della malattia minima residua (MRD) tramite MFC	pag.88
3.4 Valore prognostico dell'analisi dell'immunofenotipo	pag.90
3.5 Ulteriori applicazioni della citofluorimetria multiparametrica	pag.94
Capitolo 4: Correlazione tra dati istologici e profili immunofenotipici nel Mieloma Multiplo, post terapia	pag. 97
4.1 Materiali e metodi	pag.101
- I pazienti	pag.101
- Biopsia osteomidollare	pag.104
- Tipizzazione citofluorimetrica dei campioni di mieloaspirato	pag.105
4.2 Valutazione della risposta al trattamento	pag.109
4.3 Analisi dei dati istologici e immunofenotipici	pag.110

4.4 Confronto tra dati istologici e immunofenotipici nei tre gruppi “terapeutici”: risultati	pag.122
Capitolo 5: Conclusioni	pag.113
Bibliografia	pag.142
Ringraziamenti	pag.156

Riassunto

Il Mieloma multiplo costituisce il 10-15% delle neoplasie ematologiche. I criteri diagnostici e di risposta terapeutica sono stati stabiliti dall'International Myeloma Working Group.

Di recente, sebbene l'esame morfologico rimanga un gold standard sia nell'iter diagnostico che post-terapeutico, si sta sempre più affermando il ruolo dell'immunofenotipizzazione mediante citofluorimetria multiparametrica. In particolare, rapidità di analisi e capacità di discriminazione tra plasmacellule normali e patologiche, fanno di questa tecnica un mezzo vantaggioso soprattutto nella definizione della risposta al trattamento e della malattia minima residua.

Questo lavoro ha confrontato 92 controlli contemporanei di profili immunofenotipici e referti istologici, suddivisi in 3 gruppi in base al tipo di trattamento ricevuto dai rispettivi pazienti (chemioterapia, trapianto autologo di cellule staminali e trapianto allogenico), allo scopo di stabilire la percentuale di concordanza tra referto istologico e profilo immunofenotipico nella definizione della risposta al trattamento. Nel primo gruppo, istologia ed immunofenotipo hanno dimostrato una concordanza pari al 100%, nel secondo dell'89,9% e nel terzo dell'80%. In generale, istologia e citofluorimetria, hanno dato esiti discordanti in 6 controlli: in 5 controlli (gruppo HDT-ASCT), l'analisi citofluorimetrica si è dimostrata superiore a quella morfologica nel definire la

risposta terapeutica. Per uno di essi, la disponibilità di un controllo successivo, ha dimostrato la capacità dell'analisi immunofenotipica di anticipare la risposta.

Solo in un caso (gruppo Allo-SCT), l'esito dell'analisi immunofenotipica si è discostato dalla risposta ottenuta, ma la concordanza si è comunque verificata al controllo successivo.

Alla luce dei risultati ottenuti, è doveroso rivalutare il ruolo ancillare della citofluorimetria multiparametrica nella gestione del Mieloma Multiplo, dal momento che le sue potenzialità potrebbero promuoverla a mezzo diagnostico e prognostico imprescindibile.

1. Introduzione sul Mieloma Multiplo, caratteristiche cliniche, stadiazione, trattamento.

Il **mieloma multiplo** (MM) è una patologia neoplastica maligna in cui plasmacellule, cellule derivanti dalle cellule B, proliferano nel midollo osseo e producono una immunoglobulina monoclonale, la **proteina M**, che si accumula nel siero e/o nelle urine.

La proliferazione incontrollata di tali cellule, frequentemente, comporta l'invasione del tessuto osseo adiacente provocando lesioni osteolitiche e/o osteoporosi grave con o senza fratture compressive, ipercalcemia, anemia, occasionalmente plasmocitomi extramidollari.

L'eccesso di proteina M, inoltre, può provocare iperviscosità ematica e il cosiddetto **Myeloma kidney**, ossia la precipitazione delle catene leggere immunoglobuliniche (*proteina di Bence Jones*) nei tubuli distali e collettori del rene, inducendo insufficienza renale e infezioni batteriche ricorrenti per via dell'intercorrente calo di immunoglobuline policlonali o amiloidosi sistemica associata.

Convenzionalmente, la diagnosi di MM si basa su dati laboratoristici quali: caratteristiche morfologiche, analisi della componente monoclonale, parametri ematologici e biochimici, immunofenotipo, citogenetica, ploidia del Dna e attività

proliferativa delle plasmacellule (labeling index).

Tali esami, inoltre, contribuiscono alla diagnosi differenziale con le altre gammopatie monoclonali, danno indicazioni sul trattamento più appropriato e permettono di valutarne l'efficacia.

Ad oggi, sia i criteri diagnostici che quelli di risposta ai trattamenti sono stati stabiliti dall' International Myeloma Working Group, seppure con qualche aggiornamento e chiarimento. L' International Staging System, invece, costituisce l'attuale sistema di stadiazione.

Per molti anni il MM è stata la patologia ematologica meno trattabile. Tuttavia, recentemente, l'introduzione della chemioterapia ad alte dosi di melphalan seguita dal trapianto autologo di cellule staminali, e la disponibilità di nuovi farmaci a bersaglio molecolare quali immunomodulatori e inibitori del proteosoma, hanno cambiato radicalmente le strategie terapeutiche per esso, ottenendo l'aumento dell'overall survival (OS).

Sono stati anche impiegati modelli terapeutici che prevedono uno o due trapianti autologhi sequenziali. Questo tipo di terapia non può essere offerto a tutti i pazienti soprattutto per limiti di età, considerato che l'età media di presentazione del mieloma si aggira intorno a 70 anni.

Una revisione dei dati della letteratura, che comprende sia pazienti trattati con chemioterapia convenzionale che pazienti trattati con trapianto di cellule staminali autologhe, mette in evidenza una sopravvivenza mediana che va da 42 a

65 mesi.

1.1 Epidemiologia

Il Mieloma Multiplo costituisce l'1% di tutte le patologie neoplastiche maligne e il 10-15% fra quelle ematologiche. Rappresenta la neoplasia ematologica più comune subito dopo i linfomi.

L'incidenza appare in crescita in tutto il mondo occidentale e in Europa è di 4-6/100000/anno ed è più alta in certi gruppi etnici, essendo doppia negli afrocaribici e nei Maori della Nuova Zelanda rispetto ai caucasici. [1]

L'incidenza più bassa si osserva in Asia e nell'Europa orientale.

Il picco di incidenza si colloca tra i 60 e i 70 anni. Solo il 15% e il 2% dei pazienti affetti ha meno di 50 e 40 anni, rispettivamente.

Tale dato fa pensare che il MM sia una patologia età correlata, la cui causa ancora non è nota. [2] Interessa ambedue i sessi, ma con rapporto M:F di circa 1.5:1.

EPIDEMIOLOGIA MIELOMA

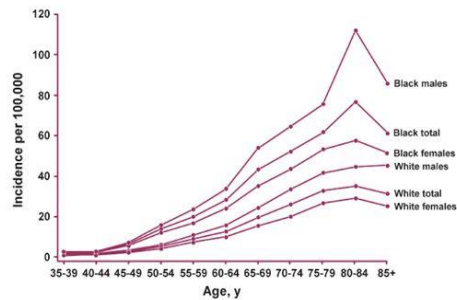
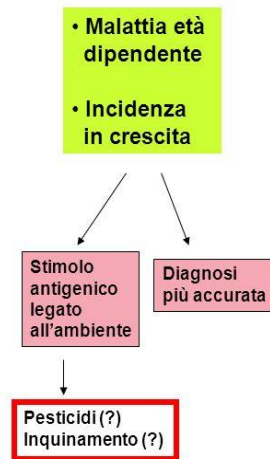


Figure 8. Incidence of multiple myeloma in 1975-2003 by age and race.²⁸

I dati epidemiologi mostrano
a) incidenza in aumento
b) >50% dei casi ha > 70 anni

Figura 1.1: Epidemiologia del mieloma multiplo.

La mortalità è di 4,1/100 000/anno e la media degli anni di vita persi dai pazienti affetti da MM è maggiore rispetto a quella di pazienti con altro cancro e supera i 30 anni nei pazienti con meno di 40 anni ma si riduce a meno di 5 anni nei pazienti anziani, ultraottantenni. [3]

1.2 Eziopatogenesi del Mieloma Multiplo

1.2.1 Origine della plasmacellula mielomatosa

Si pensa che il MM insorga da una condizione premaligna e asintomatica in cui plasmacellule monoclonali proliferano incontrollatamente.

I precursori plasmacellulari sono cellule B post-germinali che hanno subito il

riarrangiamento del gene codificante per le immunoglobuline, con conseguente ipermutazione somatica della regione variabile (V) e switch di classe immunoglobulinica. Infine, queste cellule migrano nel midollo osseo dove si differenziano in plasmacellule (fig 1.2).

Le indagini molecolari effettuate su sangue periferico nel mieloma hanno chiaramente dimostrato la presenza di cellule B circolanti clonali ovvero con lo stesso riarrangiamento genico del gene IgH e con la stessa ipermutazione somatica delle plasmacellule neoplastiche presenti nel midollo. [4]

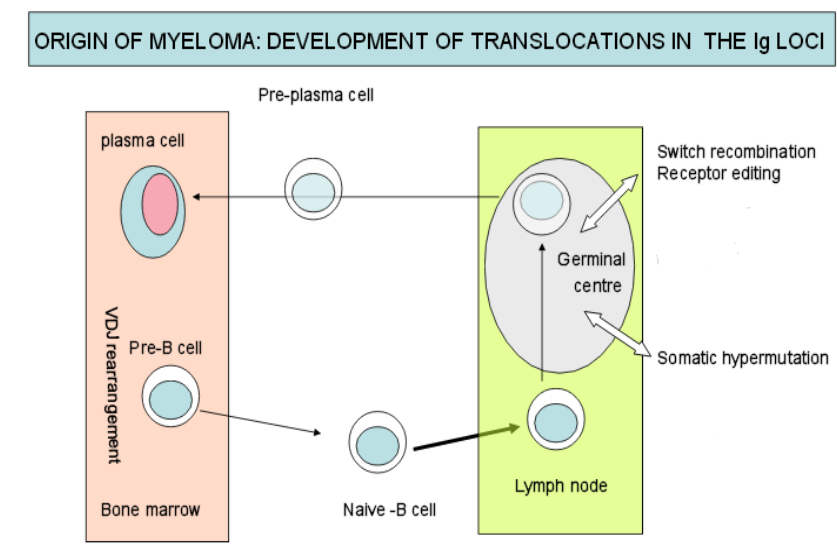


Figura 1.2 Origine della cellula mielomatosa.

Di recente, è stato riconosciuto che, virtualmente, tutti i casi di MM sono preceduti da una gammopatia monoclonale di incerto significato (MGUS), condizione asintomatica in cui la concentrazione sierica della componente monoclonale è inferiore ai 3g/dl e la percentuale di plasmacellule patologiche nel midollo è inferiore al 10% (fig. 1.3).

Su 77 469 soggetti sani, arruolati in un studio statunitense di screening sul cancro, 71 hanno sviluppato MM in corso di osservazione. Per ognuno di essi erano stati raccolti sistematicamente campioni ematici dai 2 ai 10 anni dalla diagnosi e, avvalendosi di elettroforesi, immunofissazione e dosaggio delle catene leggere libere, è stata dimostrata una MGUS a 2, 4, 6, 7 e 8+ anni prima, rispettivamente nel 100, 98, 94, 93 e 82% dei casi [4].

Dunque alla MGUS seguirebbe un mieloma asintomatico o Smouldering myeloma, condizione patologica con stesse caratteristiche sierologiche, morfologiche e immunofenotipiche ma asintomatica, ed infine questo progredirebbe in MM.

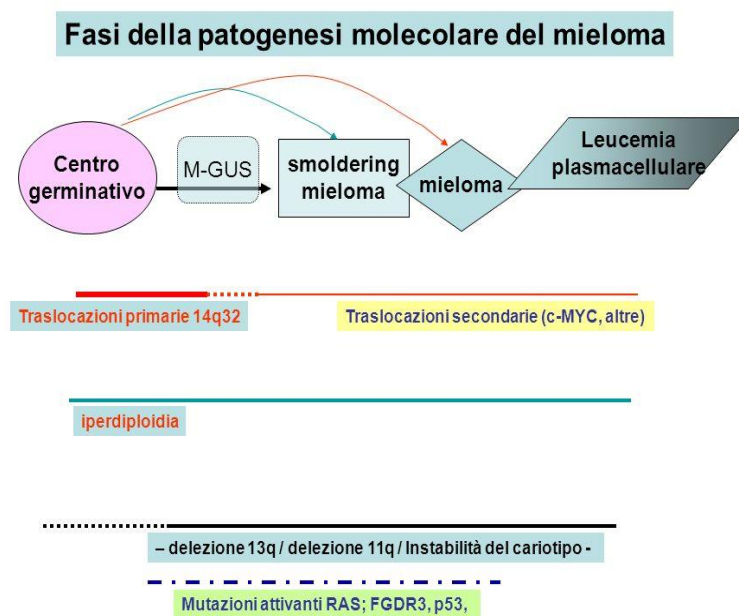


Figura 1.3: Patogenesi molecolare del Mieloma Multiplo

1.2.2 Eziologia del Mieloma Multiplo

Il MM ha base oncogenica ma la sua reale causa non è ancora nota. Di sicuro le *radiazioni ionizzanti* hanno un ruolo causale, data la sua alta incidenza tra i sopravvissuti delle esplosioni atomiche e tra i radiologi esposti per lungo tempo per ragioni professionali.

Una incidenza più alta della media è stata riportata anche tra i contadini che hanno maneggiato alcune classi di pesticidi e/o insetticidi, e nei lavoratori dell'industria che hanno maneggiato solventi a base di benzene.

Infine, il reperto del virus erpetico-associato al sarcoma di Kaposi nelle cellule dendritiche in coltura provenienti dai pazienti con mieloma, suggerisce una relazione con questo virus, il cui genoma codificherebbe per un omologo dell'interleuchina-6. L'interleuchina-6, infatti, promuove la crescita del mieloma e stimola il riassorbimento dell'osso.

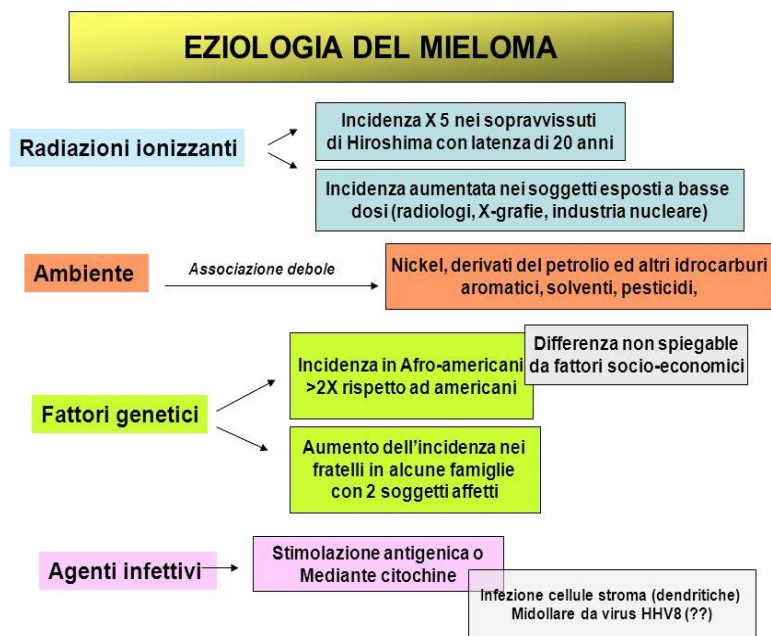


Figura 1.4: Possibili fattori eziologici nel Mieloma Multiplo

1.2.3 Basi patogenetiche del MM: l'instabilità cariotipica, il ruolo del microambiente e il coinvolgimento del tessuto osseo

Genetica del mieloma e instabilità cariotipica. I cariotipi di MM non differiscono molto da quelli dei tumori epiteliali, seppure, l'ibridazione genomica comparativa ha mostrato come nel MM vi sia un maggior numero di traslocazioni sbilanciate, con produzione di cromosomi "derivativi" che hanno perso ampie sequenze geniche dai cromosomi originari.

L'esame del cariotipo convenzionale mostra anomalie clonali nel 30-40% dei pazienti alla diagnosi e fino al 60% nei pazienti trattati. Inoltre mediante tecniche di FISH si possono dimostrare alterazioni clonali nell'80% almeno dei casi.

Sono stati identificati, sulla base del profilo di espressione genica, diversi sottotipi

di mieloma che differiscono in termini di outcome.

Procedendo gerarchicamente, è possibile innanzitutto discriminare sottotipi di MM con cariotipo iperdiploide da sottotipi con cariotipo ipodiploide o non iperdiploide. I primi costituiscono circa il 30% dei casi di MM, danno una malattia più indolente e si caratterizzano per trisomie e/o rare traslocazioni o delezioni del braccio lungo del cromosoma 13 (13q).

I secondi, invece, caratterizzati da un quadro clinico più aggressivo e minor sopravvivenza, rappresentano oltre il 70% dei casi e mostrano soprattutto traslocazioni “primarie” del locus IgH (cr. 14q32.33). [4]

Dunque, in generale, le alterazioni citogenetiche più frequenti nel MM sono: riarrangiamenti della banda 14q32 e la delezione del braccio lungo del cromosoma 13 (13q-).

Per quanto riguarda le anomalie a carico del locus 14q32, esse correlano con un aspetto patogenetico della malattia: nella maggior parte di esse, infatti, la rottura coinvolge la regione di “switching” delle catene pesanti delle immunoglobuline e avviene a livello del centro germinativo. In questa maniera, il cromosoma partner del 14 condiziona il tipo di immunoglobulina prodotta dal clone mielomatoso.

La delezione 13q-, invece, è particolarmente frequente nei mielomi che evolvono da una MGUS.

L’associazione tra anomalie del cromosoma 14 e delezione 13q- è altresì un evento frequente; tale associazione appare sfavorevole dal punto di vista

prognostico, perché il contemporaneo coinvolgimento del 13q- favorirebbe la progressione di malattia. Di fatti, si osservano: stadio clinico più avanzato, livelli più elevati di beta2-microglobulina, e più elevata percentuale midollare di plasmacellule. Inoltre tale associazione caratterizza le forme di mieloma più chemiosensibili, ma anche con maggior frequenza di recidive precoci.

L'ipotesi sarebbe quindi di un meccanismo patogenetico multistep, in cui le traslocazioni a carico della banda 14q32 rappresentano l'evento oncogenico primario, mentre le anomalie coinvolgenti il cromosoma 13 costituiscono un importante evento oncogenico secondario (fig. 1.5).

Associazione e sviluppo di lesioni citogenetiche nel mieloma

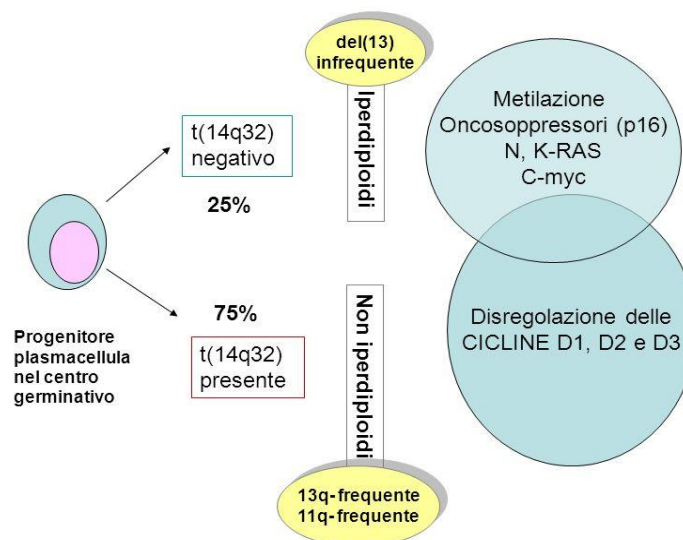


Figura 1.5: Alterazioni citogenetiche del Mieloma Multiplo.

Le traslocazioni del locus 14q32 sono definite "primarie": i geni partner con cui il segmento IgH si giustappone e le conseguenti traslocazioni sono in ordine di

frequenza:

- t(11;14)(q13;q32) in cui il locus CCND1 (11q13) codifica per la ciclina D1.
- t(4;14)(p16;q32) in cui il locus FGFR3 /MMSET (4p16) riguarda un dominio proteico per il rimodellamento cromatinico (MMSET) e il recettore tirosin-chinasico del fattore di crescita fibroblastico che controlla la proliferazione cellulare (FGFR3). A seguito di questa traslocazione avviene la deregolazione dei geni adiacenti: MMSET in tutti i casi e FGFR3 nel 30% dei casi.
- t(14;16)(q32;q23) che coinvolge il locus c-MAF (16q23) codificante per un fattore trascrizionale che regola l'espressione della ciclina D2,
- t(6;14)(p21;q23) che riguarda il locus CCND3 (6p21) della ciclina D3,
- t(14;20) (q23;q11) riguardante il locus per il fattore di trascrizione b-MAF (20q12).

Traslocazioni meno frequenti coinvolgono il locus genico del fattore di trascrizione a-MAF (8q24) e il gene della ciclina D2, CCND2 (12p13) (fig. 1.6).

Cytogenetic profile of MM

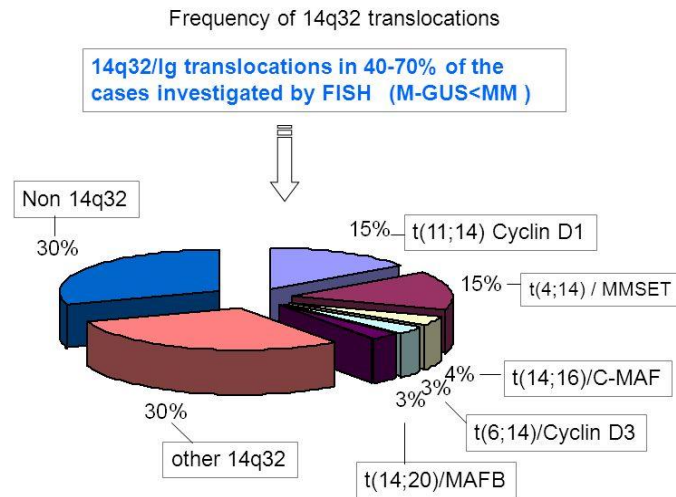


Figura 1.6: Frequenza delle principali anomalie citogenetiche del MM

Per quanto riguarda l'ordine cronologico, le traslocazioni più precoci sarebbero $t(14,16)(q32.33;23)$ e $t(14,4)(q32.33;p16.3)$.

Sostanzialmente si ipotizza che le traslocazioni primarie causino un incremento nell'espressione delle cicline che renderebbe la plasmacellula più responsiva agli stimoli proliferativi e più esposta all'acquisizione di ulteriori alterazioni genetiche, responsabili della progressione della malattia.

Infatti, nella progressione e nel MM aggressivo (e mai nella MGUS o nel MM in fase iniziale), si riscontrano mutazioni geniche comuni anche ad altre neoplasie:

- delezione del locus 13q14 codificante per la proteina RB che inibisce la progressione del ciclo cellulare quando defosforilata,
- delezione del locus 17p13 dell'oncosoppressore p53,
- mutazioni del cromosoma 1 (delezione 1p e amplificazione 1q) con

conseguente attivazione di KRAS e NRAS,

- inattivazione di CDKN2A e CDKN2C, loci della chinasi ciclino-dipendente 2,
- disregolazione epigenetica ovvero alterazioni nel pattern di metilazione e nell'espressione di microRNA. [5]

Altre anomalie fondamentali nella sopravvivenza e proliferazione cellulare sono state identificate nel fattore nucleare NF- κ B e nei fattori inibitori della via cellulare ciclina-dipendenti. [4]

Concludendo, è fondamentale ricordare che lo “stato citogenetico” è sicuramente un importante fattore prognostico del paziente affetto da MM:

- l'iperploidia e l'upregulation della ciclina D1 a seguito della t(11;14) si associano ad una prognosi buona o media;
- le mutazioni di Rb (13q14), la delezione 17p, le anomalie del cromosoma 1 (delezioni 1q- e 1p-) e le traslocazioni t(4;14) e t(4,16), invece, sono fattori prognostici negativi.
- La delezione isolata del 13q accertata con la FISH non è da considerarsi fattore prognostico avverso.

Quindi, lo studio del profilo di espressione genica (GEP, gene expression profiling) o “firma genetica” fornisce notevoli informazioni sulla malattia (capacità proliferativa, apoptosi, capacità riparativa del Dna e farmacoresistenza), consente di associare sottogruppi molecolari del mieloma a determinate caratteristiche cliniche e incentiva la scoperta di farmaci a bersaglio molecolare che agiscono su

pathway di specifici sottogruppi di MM. [1]

In figura [5] sono riassunte le anomalie citogenetiche e gli oncogeni coinvolti nel MM.

Chromosomal abnormality	Genetic location	Incidence of cytogenetic abnormalities detected by conventional cytogenetics or FISH	Involved oncogene	Function
13q deletion t(4;14)	Usually 13q14 4p16.3 14q32	15% (50%) Undetected (15%)	RB-1 FGFR3, MMSET TACC3 Cyclin D2	Cell cycle regulator Growth factor receptor tyrosine kinase Regulator of transcription Unknown Cell cycle regulator
t(6;14)(p21;q32) t(6;14)(p25;q32)	6p21 14q32 6p25 14q32	(3–4%) (5%)	Cyclin D3 MUM/IRF4	Cell cycle regulator Transcriptional regulator of IFN
t(14;16)	14q32 16q23	(2–10%)	c-MAF WWOX	Transcription factor Unknown
t(8;14)(q24;q32) t(14;20)	8q24 14q32 14q32 20q12	4–5% Recently defined	c-myc b-MAF	Cell cycle regulator Transcription factor
t(14;18) 17 p deletion	14q32.33 18q21.3 17p13	(5%) 5% (10–15%)	BCL-2 P53	Apoptosis inhibitor Cell cycle regulator; DNA repair replication
Chromosome 1 abnormalities		20%	K-RAS, N-RAS gene mutations	Signal transduction regulator; cell cycle regulator
t(11;14)	14q32	5% (15–20%)	Cyclin D1 2. MYEOV	Cell cycle regulator Unknown

BCL-2, B cell CLL/lymphoma 2; b-MAF, v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog B (avian); c-MAF, v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian); c-myc, v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian); FGFR3, fibroblast growth factor receptor 3; IFN interferon; K-RAS, V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog; MMSET, multiple myeloma SET domain; MUM/IRF4, maternal effect uncoordinated and malformed/IFN regulatory factor 4; MYEOV, myeloma overexpressed; N-RAS, neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog; p53, protein 53; RB-1, retinoblastoma protein-1; TACC3, transforming, acidic coiled-coil-containing protein 3; WWOX, WW domain-containing oxidoreductase.

Figura 1.7: Anomalie cromosomiche e rispettivi oncogeni coinvolti nell'eziopatogenesi del Mieloma Multiplo

Ruolo del microambiente. Anche i cambiamenti del microambiente sono coinvolti nella trasformazione maligna delle plasmacellule (fig. 1.8). Esse interagiscono, attraverso recettori di superficie, con le cellule stromali del midollo -BMSCs (bone marrow stromal cells) e con le proteine della matrice extracellulare (fibronectina, laminina, collagene e vitronectina). Queste interazioni condizionano, la crescita del tumore, la migrazione e la farmacoresistenza. [5]

L'homing plasmacellulare nel midollo è il risultato della secrezione, da parte delle cellule endoteliali del midollo e delle BMSCs, di IGF-1 (insulin-like growth factor) e SDF-1 (stromal-derived growth factor), che esercitano un'azione chemoattrattante sulle cellule del mieloma.

L'adesione delle cellule mielomatose alle componenti sia emopoietiche che ossee del midollo, induce la secrezione di citochine e di fattori di crescita attraverso sistemi secretivi autocrini e paracrini. [5]

Infatti, l'adesione stromale mediante l'integrina V-CAM1 induce la secrezione paracrina stromale di IL-6, IL-1beta, IL-11, TNFs, TGF-beta e di RANKL.

A sua volta l'IL-6, prodotta sia dalle cellule neoplastiche che stromali per attivazione del fattore di trascrizione NF-kB, è responsabile della sintesi di altri fattori di crescita e molecole di adesione (ad esempio VEGF, E-selectina e V-CAM1) così da sostenere la proliferazione delle plasmacellule maligne e la protezione dall'apoptosi desametasone-indotta.

Al microambiente favorevole al clone mieloma toso, contribuirebbe anche l'inibizione dei linfociti T: meccanismi ancora poco chiari comportano la produzione in alte concentrazioni di interferon-a e la riduzione di interferon-g.

Ovviamente, anche l'angiogenesi è favorita in corso di MM e correla con l'attività di malattia e sopravvivenza. Il VEGF secreto dalle cellule neoplastiche si lega ai recettori espressi sulle cellule endoteliali e ne incentiva migrazione e proliferazione, inoltre, anche altri fattori come il bFGF (basic fibroblast growth

factor) inducono l'angiogenesi. [4]

Danno osseo. Circa il 70% dei pazienti con MM mostra lesioni litiche ed osteoporosi diffusa accompagnate da sintomatologia dolorosa.

L'osteopenia come sola manifestazione del danno osseo si osserva nel 15% dei pazienti.

Nel MM il normale rimodellamento osseo viene alterato dall'eccessiva attività degli osteoclasti non bilanciata da adeguata attività osteoblastica, di deposizione di matrice ossea.

L'attivazione degli osteoclasti e l'aumento del loro numero nella zone ossee interessate dal MM è collegata a due principali fattori: l'alterazione del sistema RANKL-OPG e l'attività delle citochine MIP-1 α , MIP-1 β (macrophage inflammatory protein), HGF (hepatocyte growth factor) e SDF-1 α (stromal derived factor-1 α).

RANKL (TNF-related activation induced cytokine), prodotto dagli stessi osteoclasti e dalle cellule stromali, induce la differenziazione degli osteoclasti e ne aumenta la capacità osteolitica.

OPG (osteoprotegerina), prodotta da osteoblasti e da cellule stromali, agisce come antagonista del RANKL.

Nel MM il rapporto RANKL/OPG risulta a favore del primo, probabilmente perché le plasmacellule neoplastiche inducono un'eccedente produzione del primo.

Inoltre, parte dell'OPG sembrerebbe internalizzata e degradata dalle

plasmacellule mielomatose grazie alla particolare disponibilità di sindecano-1 (CD138) a livello della membrana cellulare.

Un'ulteriore spinta alla differenziazione osteoclastica è fornita da MIP-1 α e MIP-1 β , prodotti dal mieloma, e da SDF-1 α , prodotto da cellule endoteliali e stromali.

Per quanto riguarda il secondo aspetto, nel MM l'osteolisi non è seguita da alcuna reazione osteoblastica di deposizione ossea: questo particolare aspetto è causato dall'inibizione dell'attività e della differenziazione degli osteoblasti, per mezzo sia dell'interazione diretta cellula neoplastica-osteoblasto, sia dell'inibizione della via di Wnt attraverso fattori solubili come DKK-1 (dickkopf-1) e sRFP-2 (soluble frizzled-related protein-2). [4]

Infine, concausa alla perdita ossea è sicuramente l'aumentata densità microvascolare del midollo osseo, conseguenza della neoangiogenesi che procura al mieloma un sistema vascolare nutritivo caotico e anomalo.

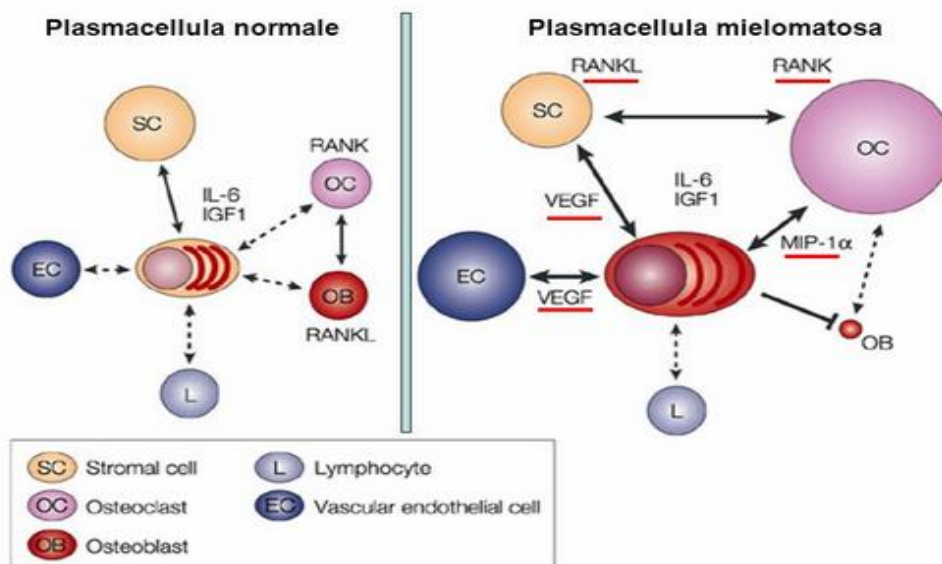


Figura 1.8: Interazione tra plasmacellule (normale, a sinistra- patologica, a destra) e microambiente midollare.

In conseguenza delle alterazioni dell'osteogenesi, nel MM è possibile misurare marcatori sierici ed urinari del riassorbimento osseo (tab. 1.1). [6]

Marker	Campione biologico	Meccanismo	Significato clinico
Dpd	Urine	Riassorbimento osseo	Gravità impegno osseo
Ntx	Urine	Riassorbimento osseo	Gravità impegno osseo
ICTP	Siero	Riassorbimento osseo	Gravità impegno osseo
TRACP- 5b	Siero	Prodotto dagli osteoclasti	Gravità impegno osseo
OC	Siero	Prodotta dagli osteoblasti	Ridotta nel MM
bAP	Siero	Prodotta dagli osteoblasti	Ridotta nel MM
PICP	Siero	Propeptide del procollagene-1	Marker di osteosintesi
PINP	Siero	Propeptide del procollagene-1	Marker di osteosintesi

Tabella 1.1: Marcatori sierici e urinari del riassorbimento osseo in caso di MM. Dpd: Deossipiridinolina; Ntx: Amino-terminal collagen type-1 telopeptide; ICTP: carboxy-terminal collagen type-1 telopeptide; TRACP-5b: isoenzima 5 della fosfatasi acida tartrato-resistente; OC: osteocalcina; bAP: fosfatasi alcalina osseo-specifica; PICP: carboxy-terminal collagen type-1 propeptide; PINP: Amino-terminal collagen type-1 propeptide.

1.3 Clinica del Mieloma Multiplo

1.3.1 Principali manifestazioni cliniche del mieloma

Il quadro clinico del MM è caratterizzato da:

- ✚ Dolore /manifestazioni ossee: sono le manifestazioni principali del MM, si tratta di dolore cronico nelle sedi di riassorbimento osseo o di fratture patologiche, solitamente a carico dello scheletro assiale, lineari e molto

dolorose che rappresentano il motivo per cui il paziente si reca dal medico.

Le sedi più colpite in ordine di frequenza sono:

- rachide (66%)
 - coste (44%)
 - ossa del cranio (41%)
 - ossa pelviche (28%)
 - femore (24%)
 - scapole (10%)
- ✚ Ipercalcemia, conseguente al riassorbimento osseo, che può indurre apatia, letargia, confusione
- ✚ Anemia
- ✚ Compromissione della funzione renale fino all'insufficienza renale cronica.
- In generale si parla di "myeloma kidney" per indicare l'insufficienza funzionale del rene provocata da:
- danno glomerulare da accumulo di proteine a livello della membrana basale,
 - danno tubulare da eccessivo riassorbimento di proteina di Bence Jones,
 - danno interstiziale per la rottura dei tubuli a causa di cilindri proteici,

-amiloidosi da accumulo di AL amiloide ovvero catene leggere.

- ✚ Infezioni batteriche ricorrenti o persistenti (> 2 in 12 mesi)
- ✚ Iperviscosità ematica per eccesso di proteina M nel sangue che favorisce la formazione di rouleaux eritrocitari.

In alcuni pazienti la diagnosi è successiva al riscontro casuale di VES aumentata e/o dosaggi delle sieroproteine e delle globuline alterati.

La compressione del midollo spinale, l'ipercalcemia e l'insufficienza renale rappresentano emergenze mediche che richiedono immediata attenzione, diagnostica e terapeutica. Le infezioni batteriche e l'insufficienza renale, rappresentano rispettivamente la prima e la seconda causa di morte del paziente affetto da MM.

1.3.2 Criteri diagnostici di Mieloma Multiplo

Gli attuali criteri diagnostici del MM e degli altri disordini proliferativi plasmacellulari sono quelli proposti dall' International Myeloma Working Group (IMWG), adottati e leggermente modificati da altri gruppi (fig. 1.9). [7] [8]

Disorder/criteria	Comment
Monoclonal gammopathy of undetermined significance	All 3 criteria must be met
Serum monoclonal protein < 3 g/dL	
Clonal bone marrow plasma cells < 10%	
Absence of end-organ damage, such as hypercalcemia, renal insufficiency, anemia, and bone lesions, which can be attributed to the plasma cell proliferative disorder	
Smoldering multiple myeloma (asymptomatic multiple myeloma)	Both criteria must be met
Serum monoclonal protein (IgG or IgA) \geq 3 g/dL and/or clonal bone marrow plasma cells \geq 10%	
Absence of end-organ damage, such as lytic bone lesions, anemia, hypercalcemia, or renal failure, which can be attributed to a plasma cell proliferative disorder	
Symptomatic multiple myeloma	All 3 criteria must be met except as noted
Clonal bone marrow plasma cells \geq 10%	
Presence of serum and/or urinary monoclonal protein (except in patients with nonsecretory multiple myeloma)*	
Evidence of end-organ damage, which can be attributed to the underlying plasma cell proliferative disorder, specifically	
Hypercalcemia: serum calcium \geq 11.5 mg/dL	
Renal insufficiency: serum creatinine > 2 mg/dL	
Anemia: normochromic, normocytic with a hemoglobin value of > 2 g/dL below the lower limit of normal, or a hemoglobin value < 10 g/dL	
Bone lesions: lytic lesions, severe osteopenia, or pathologic fractures	

*More than 10% clonal plasma cells are required for the diagnosis of nonsecretory myeloma.

Figura 1.9: Criteri diagnostici dei disordini plasmacellulari, secondo IMWG. [7]

Tali criteri distinguono tra MM e MGUS essenzialmente in base a:

- concentrazione sierica e/o urinaria della proteina M,
- percentuale di plasmacellule nel midollo,
- presenza/assenza di coinvolgimento d'organi e tessuti (myeloma-related organ and tissue impairment –ROTI-).

Diagnosi differenziali alternative, in pazienti con componente monoclonale, includono il plasmocitoma e altri disordini linfoproliferativi di tipo B.

Nello specifico, la **MGUS** si caratterizza per una infiltrazione plasmacellulare midollare <10% e una concentrazione sierica della proteina monoclonale (M-protein) < 3g/dl, in assenza di sintomi o eventuali scompensi d'apparato o

d'organo, attribuibili a gammopatia monoclonale.

Quando questi valori sono compatibili con una MGUS, ma il paziente presenta scompenso cardiaco congestizio, sindrome nefritica, ipotensione ortostatica o epatomegalia consistente, si deve piuttosto pensare ad una Amiloidosi Sistemica Primaria o Amiloidosi AL, risultato della deposizione di catene leggere immunoglobuliniche, amiloidogeniche, solitamente lambda.

Per il Mieloma va distinta innanzitutto una condizione asintomatica, definita come **Smouldering Myeloma** (SMM) in cui l'infiltrazione plasmacellulare è pari o superiore al 10% o i livelli sierici di proteina monoclonale sono pari o superiori a 3gr/dl, ma mancano sintomatologia o evidenza di danno tissutale o d'organo.

La diagnosi di **MM sintomatico**, invece, richiede:

- un'infiltrazione plasmacellulare midollare pari o superiore al 10% o plasmocitoma
- presenza di componente monoclonale sierica e/o urinaria, eccetto che nelle forme di MM non secretorio
- evidenza di danno d'organo o tissutale attribuibile alla suddetta patologia (ROTI).

In realtà, circa il 40% dei pazienti con MM sintomatico ha livelli sierici di proteina M < 3gr/dl, un 5%, invece, è affetto da forme non secretorie o oligosecretorie, ed infine un altro 5% presenta un'infiltrazione plasmacellulare del midollo <10%. Di conseguenza, il fattore diagnostico fondamentale è il coinvolgimento di organi e/o

tessuti che si esplica con le manifestazioni cliniche elencate nel paragrafo precedente. [1]

Esse possono essere riassunte nell'acronimo anglosassone **CRAB** (Calcium, Renal Insufficiency, Anaemia, Bone lesions). Nello specifico prevede:

- ipercalcemia (calcemia $\geq 11,5$ g/dl),
- insufficienza renale testimoniata da livelli di creatininemia > 2 g/dl,
- anemia normocromica, normocitica con valori emoglobinici < 10 g/dl o < 2 g/dl rispetto al valore limite inferiore usuale,
- lesioni osteolitiche o osteoporosi o fratture compressive, confermate possibilmente da RM o TC.

Il **plasmocitoma solitario**, invece, è diagnosticato quando sono soddisfatti tutti i seguenti quattro criteri: esame istologico di una lesione ossea o di neoformazione di tessuto soffice con dimostrazione di plasmacellule clonali; midollo emopoietico indenne da infiltrazione da mieloma; normale studio radiografico dello scheletro e normale esame di RMN a carico del bacino e del rachide (con l'eccezione della lesione solitaria); assenza di danno d'organo potenzialmente provocabile dalla malattia mielomatosa (ossia assenza dei sintomi CRAB).

1.4 Stadiazione clinica del Mieloma Multiplo

Negli ultimi 40 anni, sono stati sviluppati diversi sistemi stadiativi per il MM, ma nessuno di essi si è dimostrato soddisfacente.

La classificazione clinica del MM ad opera di Durie e Salmon, è stata la prima ad essere proposta con lo scopo di stimare l'intera massa di MM: conoscendo la produzione immunoglobulinica di ogni plasmacellula e l'emivita di una immunoglobulina circolante, è stato possibile derivare matematicamente il numero delle cellule mielomatose e dunque l'intera massa tumorale. Essa, inoltre, è correlata a manifestazioni cliniche individuali, esami laboratoristici e reperti radiologici (numero e dimensioni delle lesioni ossee). Sulla base di questo, la stadiazione clinica secondo Durie e Salmon prevede tre stadi, in virtù dei seguenti criteri: emoglobina (Hb), calcemia, quantità di proteina M nel siero e nelle urine, entità del danno osseo.

I tre stadi (I, II, III) sono ulteriormente sottoclassificabili come sottostadi A o B, in base alla presenza o assenza di danno renale, designate dai valori di creatininemia (esempio: stadio IA = basso stadio con funzione renale normale; IIIB = stadio elevato con insufficienza renale) (tab.1.3).

Tuttavia, un elemento molto importante di questo sistema stadiativo, ovvero le lesioni osteolitiche, è sfortunatamente operatore-dipendente. Per questa ragione, l'International Myeloma Working Group ha proposto, più recentemente, una

nuova stadiazione definita **International Staging System (ISS)**. Essa identifica tre stadi sulla base dei valori sierici di $\beta 2$ microglobulina e albumina (tab. 1.2). L' ISS presenta molti vantaggi rispetto al sistema precedente: è molto semplice, risulta utile per la stima della sopravvivenza dei pazienti ed è applicabile a tutti i gruppi di pazienti che differiscono per età o trattamento ricevuto. Tuttavia ha anche delle limitazioni: non consente di discernere MGUS e SMM dal mieloma, e inoltre il terzo stadio va a comprendere sia i pazienti in cui la $\beta 2$ microglobulina è elevata per via della massa tumorale, sia quelli in cui l'elevazione è conseguenza dell'insufficienza renale. Infine, l'ISS non può essere adoperata per la stratificazione del rischio terapeutico, soprattutto nell'era dei nuovi chemioterapici [8]. Pertanto, nella pratica clinica, è consigliato l'utilizzo complementare di entrambi i sistemi stadiativi, riassunti nelle tabelle [8] a seguire.

STADIO	SOPRAVVIVENZA MEDIA (mesi)
STADIO I: $\beta 2$ microglobulina < 3.5 mg/l Albumina > 3.5 g/dl	62
STADIO II: Né stadio I né stadio III	44
STADIO III: $\beta 2$ microglobulina > 5.5 mg/l	29

Tabella 1.2: International Staging System for Multiple Myeloma.

STADIO	CRITERI
I	Devono essere presenti tutti i seguenti criteri <ul style="list-style-type: none"> - Hb > 10,5 g/dl; Hct > 32% - Calcemia normale - IgG < 5 g/dl; IgA < 3 g/dl; Proteinuria di B-J < 4 g/24 h) - Osteolisi ed osteoporosi assenti
III	Deve essere presente almeno uno dei seguenti parametri <ul style="list-style-type: none"> - Hb < 8,5 g/dl, Hct < 25% - Calcemia > 12 mg/dl - IgG > 7 g/dl; IgA > 5 g/dl; Proteinuria di B-J > 12 g/24 h) - > 3 lesioni osteolitiche
II	Criteri che non rientrano nella definizione di stadio I o III
A / B	A creatininemia < 2 mg/dl; B creatininemia > 2 mg/dl

Tabella 1.3: Stadiazione clinica secondo Durie e Salmon. La sopravvivenza in mesi riportata dall'ISS è una sopravvivenza media ("median survival") ossia il tempo in cui si verifica la morte del 50% dei pazienti. In realtà molti pazienti sopravvivono più a lungo rispetto a quanto stimato dalla sopravvivenza media.

1.5 Stratificazione del rischio e criteri prognostici

Vi è una grande variabilità nella sopravvivenza dei pazienti con MM, legata sia alle caratteristiche del paziente che della neoplasia. Sicuramente, giovane età e buon *performance status* rappresentano fattori prognostici favorevoli.

Altri fattori prognostici sono quelli considerati nei sistemi stadiativi precedentemente illustrati. Sicuramente i criteri prognostici più significativi sono quelli citogenetici e cinetici, poiché permettono di identificare casi di MM con

rischio più alto.

Gli studi di citogenetica convenzionale mostrano un cariotipo anomalo solo in 1/3 dei pazienti con MM: comunque, l'ipoploidia o la delezione 13q- sono fattori predittivi di ridotta sopravvivenza.

La FISH, invece, rivela anormalità in più del 90% dei pazienti con MM. In un trial clinico dell'ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) effettuato su 351 pazienti, la presenza di t(4,14), t(14,16) o la delezione 17p, è stata associata ad una prognosi sfavorevole, pari ad una sopravvivenza media di 25 mesi. [8]

Anche un labeling index elevato (indice di proliferazione) implica una prognosi avversa. Il gruppo di studio della Mayo Clinic ha identificato le caratteristiche del MM "high risk" e ne ha verificato la frequenza nei casi di nuova diagnosi (tab. 1.4).

Caratteristiche di "alto rischio"	% nelle nuove diagnosi
CITOGENETICA	
-delezione cr.13 o monosomia	14
-ipoploidia	9
-entrambe	17
FISH	
-t(4;14)	15
-t(14;16)	5
-17p-	10
PLASMA CELL LABELING INDEX > 42%	6
UNA QUALSIASI	25-30

Tabella 1.4: Mayo Clinic risk stratification for myeloma. [8]

Lo stesso gruppo ha quindi proposto un flow-chart utile (fig. 1.10) per la programmazione dell'intervento terapeutico nei mielomi sintomatici alla prima diagnosi, distinguendo i casi ad alto rischio da quelli con rischio standard [6].

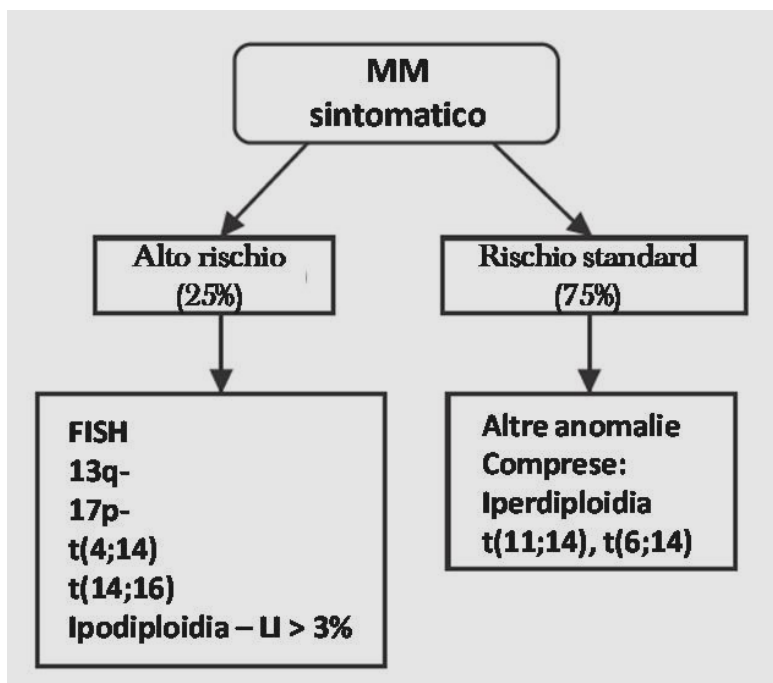


Figura 1.10: Flow chart di stratificazione del rischio nel MM, secondo la Mayo Clinic

1.6 Criteri di risposta alla terapia

I primi criteri di risposta alla terapia per il MM sono stati stabiliti dal Chronic Leukemia Myeloma Task Force (CLMTF) già nel 1968 in cui una riduzione del 50% della CM era considerata come il principale parametro di risposta.

Nel 1972, il Southwest oncology group (SWOG), definì, invece, la risposta parziale (PR) come il decremento di almeno il 75% della proteina M nel siero e/o il decremento di almeno il 90% dell'escrezione urinaria delle catene leggere.

All'epoca, poiché una risposta completa (CR) veniva di rado osservata dopo le terapie convenzionali, né i criteri di risposta definiti dal CLMTF né quelli del SWOG, ne includevano la definizione. Inoltre non erano contemplate neppure quelle di progressione e ricaduta. [1]

Successivamente l'European group of blood and bone marrow transplant (EMBT), insieme all'American bone marrow transplant registry (ABMTR) e all'International bone marrow transplant registry (IBMTR), hanno delineato le definizioni di risposta completa, parziale, malattia minima residua, ricaduta e progressione, per i casi trattati con trapianto di cellule staminali, comunemente note come "The Bladè criteria" o "EBMT criteria".

Nel 2006, l'IMWG, riconoscendo l'importanza di avere criteri di risposta uniformi e universalmente riconosciuti, ha modificato ed ampliato i criteri EBMT (tab. 1.11).

In particolare:

- Ha introdotto le categorie di risposta completa stringente (sCR) e di "very good partial response" (VGPR),
- Ha modificato il concetto di progressione per i pazienti in CR,
- Ha definito i criteri di risposta e progressione nei pazienti in cui l'unica misura della malattia è fornita dai livelli sierici di catene leggere libere (FLC: free light chain), essendo la proteina M non misurabile sia nel siero che nelle urine. La malattia è misurabile quando la proteina M nel siero supera 1gr/100ml o se la sua escrezione nelle urine è superiore ai 200mg in 24h.

- Ha eliminato l'obbligo temporale di 6 settimane per confermare la risposta, previsto dall'EBMT
- Ha stabilito che ogni tipo di risposta (CR, sCR, VGPR e PR) preveda due controlli consecutivi fatti nel periodo antecedente l'istituzione di ogni nuova terapia.

Dunque, è possibile parlare di risposta completa (CR complete response) alla terapia quando l'infiltrazione midollare da parte delle plasmacellule è $\leq 5\%$, l'immunofissazione sierica ed urinaria sono negative e scompaiono eventuali plasmocitomi dei tessuti molli.

Quando le plasmacellule clonali a livello del midollo sono del tutto assenti e il rapporto delle catene leggere libere (FLC ratio) è normale, si parla di risposta completa stringente (sCR).

Il risultato è una "very good partial response" (VGPR) se la proteina M è rintracciabile mediante immunofissazione (ma non per mezzo dell'elettroforesi) nel siero e nelle urine, o se la sua riduzione nel siero è $\geq 90\%$ e si accompagna ad escrezione nelle urine $< 100\text{mg}/24\text{h}$. La categoria VGPR è una misura utile dell'intensità della risposta; identifica i pazienti con una risposta eccellente ma non ancora in CR.

Si parla di risposta parziale (PR partial response) se la proteina M sierica si riduce $\geq 50\%$ e la sua escrezione urinaria nelle 24 h è ridotta $\geq 90\%$ o è $< 200\text{mg}/24\text{h}$.

Inoltre, se presenti alla diagnosi, si assiste ad un riduzione $\geq 50\%$ delle dimensioni

dei plasmocitomi dei tessuti molli.

La definizione di malattia progressiva (PR) è più articolata e prevede un incremento del 25% rispetto al più basso valore ottenuto, in uno o più tra i seguenti dati: proteina M sierica e/o urinaria, differenza tra i livelli delle FLC monoclonale (“involved”) e non (“uninvolved”) nei pazienti con malattia non misurabile, percentuale di infiltrazione midollare (incremento assoluto $\geq 10\%$), dimensioni delle lesioni ossee o dei plasmocitomi tissutali preesistenti o sviluppo ex novo di lesioni ossee o plasmocitomi, ipercalcemia.

Quando mancano i criteri per tutte le categorie di risposta suddette, si parla di malattia stabile (SD stable disease). [8]

<i>Response subcategory</i>	<i>Response criteria</i>
Complete response ^a (CR)	Negative immunofixation of serum and urine and Disappearance of any soft tissue plasmacytomas, and <5% plasma cells in bone marrow
Stringent complete response (sCR)	CR as defined above plus Normal FLC ratio and Absence of clonal cells in bone marrow by immunohistochemistry or immunofluorescence
Very good partial response (VGPR) ^a	Serum and urine M-component detectable by immunofixation but not on electrophoresis or $\geq 90\%$ or greater reduction in serum M-component plus urine M-component <100 mg per 24 h
Partial response (PR)	$\geq 50\%$ reduction of serum M protein and reduction in 24-h urinary M protein by $\geq 90\%$ or to <200 mg per 24 h If the serum and urine M protein are unmeasurable, a $\geq 50\%$ decrease in the difference between involved and uninvolved FLC levels is required in place of the M protein criteria If serum and urine M protein are unmeasurable, and serum free light assay is also unmeasurable, $\geq 50\%$ reduction in bone marrow plasma cells is required in place of M protein, provided baseline percentage was $\geq 30\%$ In addition to the above criteria, if present at baseline, $\geq 50\%$ reduction in the size of soft tissue plasmacytomas is also required
Stable disease (SD)	Not meeting criteria for CR, VGPR, PR or progressive disease
Progressive disease (PD) ^a	Increase of 25% from lowest response value in any one or more of the following: Serum M-component (absolute increase must be ≥ 0.5 g/100 ml) ^c and/or Urine M-component (absolute increase must be ≥ 200 mg per 24 h) and/or Only in patients without measurable serum and urine M-protein levels: the difference between involved and uninvolved FLC levels (absolute increase must be >100 mg/l) Bone marrow plasma cell percentage (absolute % must be $\geq 10\%$) Definite development of new bone lesions or soft tissue plasmacytomas or definite increase in the size of existing bone lesions or soft tissue plasmacytomas Development of hypercalcemia (corrected serum calcium >11.5 mg/100 ml) that can be attributed solely to the plasma cell proliferative disorder

^aNote clarification to IMWG criteria for coding CR and VGPR in patients in whom the only measurable disease is by serum FLC levels: CR in such patients is defined as a normal FLC ratio of 0.26–1.65 in addition to CR criteria listed above. VGPR in such patients is defined as a >90% decrease in the difference between involved and uninvolved free light chain (FLC) levels.

All response categories (CR, sCR, VGPR and PR) require two consecutive assessments made at any time before the institution of any new therapy; complete, PR and SD categories also require no known evidence of progressive or new bone lesions if radiographic studies were performed. Radiographic studies are not required to satisfy these response requirements. Bone marrow assessments need not be confirmed.

Adapted with permission from Durie *et al.* ²⁹

^c for progressive disease, serum M-component increases of ≥ 1 gm/100 ml are sufficient to define relapse if starting M-component is ≥ 5 gm/100 ml.

Figura 1.11: Criteri di risposta al trattamento nel MM, secondo IMWG

Successivamente all'IMWG, un pannello dell'American Society of Hematology e dalla Food and Drugs Administration (ASH-FDA) (fig. 1.12) ha ridefinito la ricaduta "relapsed myeloma" (assenza di risposta dopo un primo regime di trattamento) e il mieloma refrattario con ricaduta o "relapsed refractory myeloma" (ricaduta che avviene durante terapia di salvataggio o progressione entro 60 giorni dall'ultima terapia). Inoltre, ha specificato che i criteri della progressione non possono essere utilizzati per definire anche la progressione dello SMM in mieloma attivo. Infine, ha reintrodotta la categoria di risposta minore (MR minor response) cancellata dall'IMWG, applicandola ai pazienti "relapsed and refractory" che ottengono un segnale di attività negli studi di fase I e II sui nuovi farmaci. [8]

<i>Category</i>	<i>Criteria</i>
Definition of relapsed myeloma and relapsed and refractory myeloma	Relapsed myeloma: at least one prior regimen, and not meeting criteria for relapsed and refractory myeloma Relapsed and refractory myeloma: relapse of disease while on salvage therapy, or progression within 60 days of most recent therapy
Minor response (MR) in patients with relapsed refractory myeloma	≥25% but <49% reduction of serum M protein and reduction in 24 h urine M protein by 50–89%, which still exceeds 200 mg per 24 h In addition to the above criteria, if present at baseline, 25–49% reduction in the size of soft tissue plasmacytomas is also required No increase in size or number of lytic bone lesions (development of compression fracture does not exclude response)
Progression to active myeloma in patients with smoldering myeloma	Evidence of progression based on the IMWG criteria for progressive disease in myeloma (Table 5) and Any one or more of the following felt related to the underlying clonal plasma cell proliferative disorder Development of new soft tissue plasmacytomas or bone lesions Hypercalcemia (> 11 mg/100 ml) Decrease in hemoglobin of ≥2 g/100 ml Serum creatinine level ≥2 mg/100 ml

Figura 1.12: Criteri aggiuntivi di risposta al trattamento, secondo ASH-FDA

1.7 Stime della sopravvivenza e loro ruolo nel Mieloma Multiplo

Al fine di descrivere al meglio l'outcome del paziente trattato per MM, è necessario definire gli "end points" che ne stimano la sopravvivenza nel tempo dopo i trattamenti.

Si definisce "Disease free survival" (DFS), il lasso di tempo trascorso tra l'inizio di una risposta completa e la ricaduta. Ovviamente tale end point si applica solo a quei pazienti che abbiano ottenuto CR.

Per "Duration of response" (DOR) si intende la durata del periodo di tempo che intercorre tra l'inizio della CR, o almeno PR, e la progressione. Esprime, dunque, la durata di una risposta che sia almeno PR.

"Time to progression" (TTP), invece, indica il tempo intercorso tra l'inizio della terapia e la progressione. E' un parametro molto utile per stimare l'attività di un farmaco e la durata del beneficio che ne deriva. Tuttavia, non considera che un certo trattamento possa essere associato ad un incremento delle morti farmaco dipendenti, ragion per cui andrebbe sempre considerato assieme al "Progression-free survival" (PFS) ossia il periodo di tempo che intercorre tra l'inizio di una terapia e la progressione o la morte.

In molti studi, si utilizza con la stessa accezione del PFS, il parametro "Event-free survival" (EFS). Per la verità PFS è preferito perché più preciso, a meno che EFS non includa nella sua definizione ulteriori "eventi", ritenuti importanti al pari della

progressione e del decesso, ad esempio, la tossicità farmacoindotta. [8]

1.8 Il trattamento del mieloma multiplo

1.8.1 Mieloma multiplo asintomatico

Nei casi di SMM, ossia di mieloma asintomatico, l'unico presidio terapeutico raccomandato è l'osservazione clinica del paziente, giacché il trattamento precoce con chemioterapici convenzionale non ha mostrato alcun impatto in termini di sopravvivenza. I pazienti asintomatici possono rimanere tali per molto tempo, senza alcuna terapia; costituiscono circa il 20% dei casi di mieloma e in media progrediscono nella forma sintomatica nell'arco di 2-3 anni. La malattia dovrà essere valutata a intervalli regolari di 2-3 mesi. [4]

Comunque, poiché si ritiene che la maggior parte dei MM siano l'evoluzione di una MGUS, sono in corso diversi studi al fine di valutare la capacità dei nuovi agenti immunomodulatori di ritardare la progressione del mieloma asintomatico a mieloma sintomatico. [5]

1.8.2 Trattamento del mieloma sintomatico

L'obiettivo della terapia del MM non è solo ottenere la CR, ma mantenerla il più a

lungo possibile. Il raggiungimento dell'obiettivo, inoltre, è particolarmente importante nei pazienti con malattia ad alto rischio, come definito dal profilo di espressione genica.

La terapia del MM si è evoluta notevolmente durante l'ultima decade e la disponibilità di nuovi farmaci, ha espanso le opzioni terapeutiche e migliorato l'outcome dei pazienti affetti dalla patologia, incrementando la probabilità e la qualità della CR. D'altra parte vi sono studi in cui la risposta completa non necessariamente implica un outcome migliore, specie nei pazienti più anziani.

In generale i nuovi farmaci anti mieloma possono essere distinti in due categorie principali: gli inibitori del proteosoma e i farmaci immunomodulatori (iMIDs), a loro volta comprendenti agenti di diverse generazioni.

Entrambi agiscono mediante:

- Interruzione delle vie di segnalazione cellulare che supportano crescita, proliferazione e sopravvivenza delle cellule neoplastiche, in particolare la via di NF- κ B;
- Induzione dell'apoptosi e inibizione di angiogenesi, adesione al microambiente midollare, circuiti citochinici;
- Stimolazione di una risposta immune versus mieloma da parte dei linfociti T e cellule NK dell'ospite.

Tra gli inibitori del proteosoma si annoverano bortezomib, di prima generazione, e carfilzomib, ixazomib e marizomib, di seconda generazione.

Per quanto riguarda gli iMIDs, si tratta della thalidomide e dei suoi analoghi di seconda e terza generazione, rispettivamente noti come lenalidomide e pomalidomide. Quest'ultima ha maggiore azione immunomodulatrice e antiangiogenica. Per completezza, è vero anche che, man mano che si espandono le conoscenze sui meccanismi e le vie di segnalazione che favoriscono la crescita del MM (fig. 1. 13), diversi nuovi farmaci a bersaglio molecolare sono al vaglio nei trial clinici:

- Inibitori della via PI3K/mTOR/AKT
- Inibitori di KSP
- Aurora e altri inibitori di chinasi
- Inibitori di HDAC (istone deacetilasi)
- Inibitori di HSP90
- Anticorpi monoclonali contro IL-6R, CS1, CD138
- Inibitori di FGFR3 e altri.

La loro attività clinica è testata in combinazione con gli inibitori del proteosoma e gli iMIDs. [5]

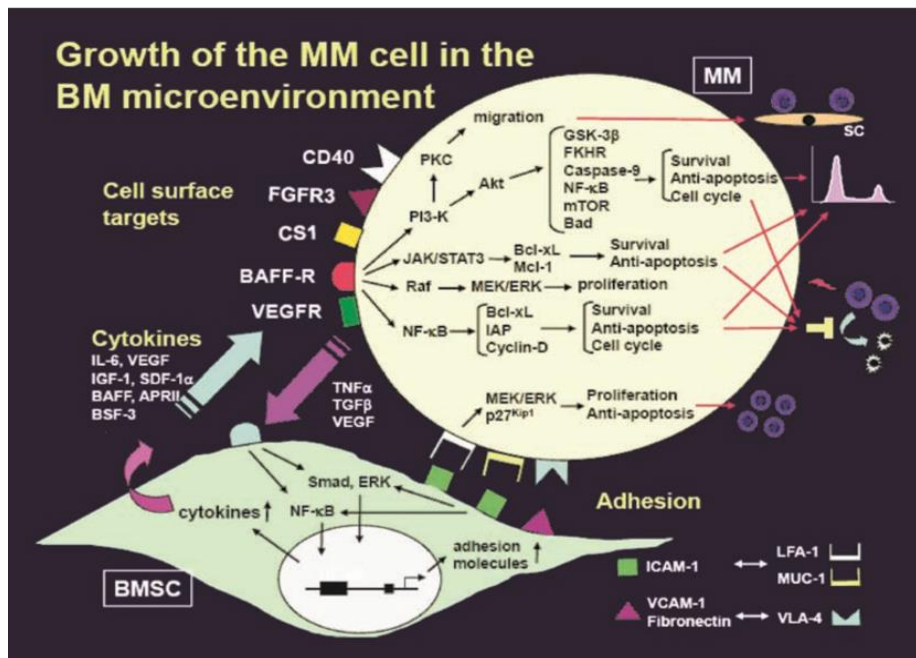


Figura 1.13: Attuali conoscenze sulla crescita delle plasmacellule mielomatose nel microambiente midollare. [5]

Con l'introduzione dei nuovi farmaci, nel MM di nuova diagnosi, le opzioni terapeutiche dipendono dalla capacità del paziente di sottoporsi ad una chemioterapia ad alte dosi (HDT, high dose chemotherapy) seguita da trapianto autologo di cellule staminali (ASCT, autologous stem cell transplantation) (fig 1.14).

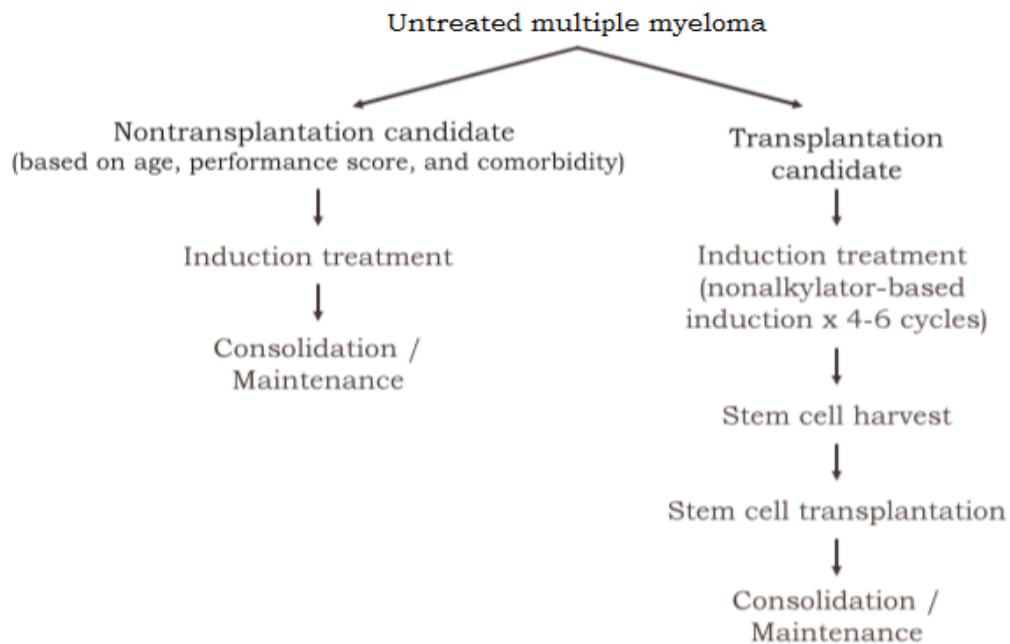


Figura 1.14: Flow chart terapeutico per mieloma multiplo alla diagnosi. [5]

1.8.3 Terapia del paziente sintomatico passibile di HDT e ASCT

Il paziente affetto da MM candidabile a HDT e ASCT, non deve avere significative comorbidity internistiche e/o psichiatriche e l'età anagrafica da sola non rappresenta più un fattore limitante (generalmente non oltre i 70-75 anni di età).

In passato, la terapia di induzione prevedeva l'uso combinato di Vincristina (alcaloide della Vinca che blocca la formazione del fuso mitotico), adriamicina (nota anche come doxorubicina, è una antraciclina che blocca sintesi degli acidi nucleici e mitosi, agendo nella fase S del ciclo cellulare) e desametasone (VAD); tale regime comportava percentuali di CR pre e post trapianto rispettivamente del 5-10% e del 35%, e una sopravvivenza media di 6 anni.

Successivamente, l'associazione di thalidomide e desametasone ha rimpiazzato il regime VAD ed è stato approvato dalla FDA come regime di induzione

pretrapianto. Per la verità il tasso di CR pretrapianto ottenuto da questo regime è <10%, inoltre ha efficacia subottimale nei pazienti con malattia ad alto rischio e in quelli con plasmocitomi extramidollari.

Attualmente, il ciclo con bortezomib, talidomide e desametasone è considerato uno dei gold standard per l'induzione di questi pazienti. Infatti, ha riportato rispettivamente il 19-32% di CR nel pre-trapianto e il 42-52% nel post-trapianto [1].

In uno studio randomizzato, inoltre, tale regime si è dimostrato superiore alla terapia con talidomide e desametasone sia in termini di risposta (RR, response rate) che di PFS. [5]

Lo schema VTD, di recente, è stato oggetto anche di uno studio retrospettivo, effettuato dall'Università di Pisa, in cui per la prima volta è stato messo a confronto col regime TAD (thalidomide con doxorubicina e desametasone). Lo scopo dello studio era di osservare se VTD avrebbe migliorato le percentuali di CR e CR+VGPR rispetto all'altro regime terapeutico, e inoltre, avvalendosi dell'esame citofluorimetrico e della tecnologia PCR, se fosse stato possibile rintracciare malattia residua molecolare (MDR) nel sottogruppo di pazienti con CR.

L'analisi retrospettiva ha preso in esame 87 pazienti candidabili all'ASCT, trattati presso l'Ospedale Santa Chiara di Pisa tra il 2007 e il 2011: 44 pazienti hanno ricevuto terapia di induzione con TAD e 43 con VTD. La valutazione delle risposte ottenute dopo l'induzione ha mostrato percentuali di CR+VGPR e CR più elevate

nel gruppo sottoposto a VTD (rispettivamente 51% vs. 18% e 30% vs.2%). Inoltre nell'unico paziente che aveva ottenuto una CR con TAD, l'esame citofluorimetrico e la PCR sono stati in grado di rintracciare MRD, al contrario, entrambi gli esami hanno avuto esito negativo in ben il 77% dei pazienti in CR dopo VTD. [9]

In accordo con quanto detto finora, i pazienti con nuova diagnosi sottoponibili a HDT, dovrebbero essere trattati con 4-6 cicli di un regime di induzione contenente un IMiD o bortezomib. In particolare, il regime VTD ad oggi rappresenterebbe un nuovo standard terapeutico per massimizzare grado e velocità della riduzione della neoplasia nei pazienti candidabili al trapianto.

Gli studi più recenti sulla stratificazione del rischio, hanno raccomandato regimi contenenti talidomide o lenalidomide nei pazienti con malattia a rischio standard, e regimi a base di bortezomib in quelli con malattia ad alto rischio: queste raccomandazioni derivano dall'osservazione che gli individui con t(4;14) che hanno ricevuto LD (lenalidomide, desametasone ad alte dosi) hanno riportato OS minore di quelli senza t(4;14). In contrasto, l'induzione con bortezomib ha migliorato l'OS dei pazienti con la traslocazione, ma non quella dei pazienti con la delezione 17p13. In futuro, quindi, le strategie di trattamento guidate dalle stratificazioni del rischio, diverranno una costante. [5]

Alla terapia di induzione, segue HDT con melphalan e ASCT, previa mobilizzazione e raccolta delle cellule staminali del paziente. Nei pazienti più vecchi o con patologie coesistenti, il regime di condizionamento con melphalan può essere

ridotto (generalmente 100mg/m²).

L'OS è simile sia che il trapianto che venga fatto alla diagnosi o che venga effettuato alla ricaduta, sebbene, fatto precocemente, prolunghi significativamente PFS e l'intervallo temporale libero da trattamenti. [5]

I principali effetti collaterali derivati dall'uso di thalidomide sono la neuropatia periferica (12%-17% dei pazienti), che limita dose e durata del trattamento, e la trombosi venosa profonda (8%-23%), il cui rischio è maggiore quando si associa un chemioterapico, specie l'adriamicina. Per questa ragione, è obbligatoria la profilassi anticoagulante con aspirina o eparina a basso peso molecolare.

La lenalidomide, invece, dà soprattutto tossicità ematologica, neutropenia, in particolare. L'uso del bortezomib, è gravato da neuropatia periferica, sintomatologia gastrointestinale e trombocitopenia.

Per i pazienti più giovani, l'approccio curativo migliore è il trapianto allogenico, anche se questa procedura, preceduta da un regime di condizionamento mieloablativo, è gravata da un tasso di mortalità compreso tra il 30% e il 50%, mentre la percentuale dei pazienti effettivamente curati non supera il 15%. Con l'introduzione di un regime di condizionamento più blando, allo-RIC (dose-reduced intensity conditioning), la mortalità legata al trapianto si è ridotta al 10-20%, mentre la percentuale di raggiungimento della CR è salita al 50%. Con l'uno e l'altro regime, si registrano rispettivamente il 30% e il 60% di "graft-versus-host disease" (GVHD). I principali fattori predittivi dell'outcome sono lo sviluppo della

GVHD cronica e una massa tumorale ridotta al momento del trapianto.

A tal proposito, più recentemente, l'uso dell'ASCT per ridurre la massa neoplastica, subito seguito da allo-RIC, per ottenere un beneficio dall'effetto "graft versus myeloma", ha mostrato un plateau di PFS del 25-30% oltre 6 anni dall'allo-RIC. [1]

1.8.4 Terapia del paziente non candidabile ad HDT e ASCT

Nei pazienti di età superiore ai 65 anni o in quelli più giovani ma con gravi comorbidità, per molti anni, la terapia di induzione standard prevedeva in passato l'associazione di melphalan e prednisone (MP).

Negli ultimi anni, invece, i nuovi farmaci come thalidomide, lenalidomide e bortezomib, sono stati incorporati nei suddetti regimi.

Anche in questo setting di pazienti, gli schemi di associazione tra melphalan, steroide e thalidomide (MPT) o di bortezomib, steroide e melphalan (MPV) sono diventati gli standard di riferimento. Comparato a MP, MPV ha portato un grande miglioramento dell'ORR (71% versus 35%), del tasso di CR (30% versus 4%), TTP (24 mesi versus 16,6 mesi) e anche della sopravvivenza globale (OS) a 3 anni (72% versus 59%).

Per quanto riguarda gli effetti avversi, rispetto a MP, il regime MPT è gravato da una maggiore incidenza di effetti collaterali non ematologici, di terzo/quarto

grado (neuropatia periferica, infezioni, cardiotossicità e trombosi venosa profonda), mentre MPV da maggiore incidenza di astenia, sintomi gastrointestinali, infezione da herpes zoster ed anche neuropatia periferica.

Concludendo, il trattamento in questa categoria di pazienti, dovrebbe essere scelto non solo in base all'età e alle comorbidità, ma anche tenendo conto dei diversi profili di tossicità dei regimi, soprattutto se il paziente ha più 75 anni o in è più giovani ma ha altre problematiche, al fine di prevenire l'interruzione dei trattamenti per le tossicità.

Una valida alternativa può essere rappresentata dalla lenalidomide in associazione allo steroide come terapie di prima linea. [4]

In caso di insufficienza renale, il trattamento di scelta prevede bortezomib e desametasone per rapidità d'azione, assenza di effetto mielodepressivo e di necessità di ridurre la dose.

Bortezomib e thalidomide, invece, dovrebbero essere evitati nei pazienti con neuropatia periferica grave. [1]

1.8.5 Terapie di consolidamento e mantenimento

Nei pazienti sottoposti a trapianto, il consolidamento/mantenimento rappresenta una fase fondamentale. Recentemente si è assistito al miglioramento di PFS, OS e tasso di CR a seguito dell'introduzione dei nuovi farmaci (thalidomide,

lenalidomide o bortezomib) anche nel consolidamento e, in particolare, la triplice terapia VTD ha indotto una remissione molecolare di lunga durata e aumentato le CR dal 15 al 49%. [5]

Il rischio di neuropatia periferica certamente limita l'utilizzo della thalidomide, mentre la lenalidomide può offrire gli stessi benefici con minori effetti collaterali, sia nei pazienti più giovani che in quelli più anziani. Per questa ragione lenalidomide al momento rappresenta la scelta più adatta per il mantenimento.

La durata del beneficio derivante dal mantenimento può essere valutata stimando la malattia minima residua (MRD, minimal residual disease) mediante ricerca delle cellule mielomatose nel midollo attraverso la citofluorimetria (studio a 4 colori) o indagini molecolari attraverso la PCR, soprattutto nei pazienti già in CR sierologica. In ogni caso, il beneficio di una terapia di mantenimento è indiscutibile in tutte le categorie di pazienti e a prescindere dalla categoria di risposta ottenuta dopo l'induzione. [5]

1.8.6 Trattamento del mieloma progressivo o della ricaduta e del mieloma refrattario

La ricaduta e la refrattarietà del mieloma ai trattamenti è in parte dovuta alle modificazioni biologiche tumorali. In queste evenienze, la scelta della terapia di salvataggio viene effettuata sulla base di:

- Durata della risposta alla terapia di induzione: Innanzitutto, alla ricaduta, bisogna decidere se ritentare la terapia di prima linea oppure cambiare. La decisione sarà influenzata dalla durata della remissione ottenuta e dal profilo di tossicità.

Se è stata ottenuta una lunga remissione (> 6 mesi) per mezzo di una terapia di breve durata e le tossicità sono state accettabili, è possibile riprovare con la terapia di prima linea. [10]

Se, invece, la remissione è stata breve (<6 mesi) dopo una terapia lunga o con tossicità importanti, allora è opportuno cambiare strategia.

- Componenti della terapia di prima linea: poiché i nuovi agenti farmacologici sono ormai parte integrante delle terapie di induzione, per essi bisogna tener conto anche della “sequenzialità”: se la ricaduta avviene dopo una lunga terapia a base di iMDIs, sarebbe opportuno considerare un nuovo regime a base di bortezomib, e viceversa. In alternativa, il bortezomib può essere riconsiderato se ha dato in prima istanza buona risposta, con un intervallo libero da trattamenti <6 mesi.
- Età e performance status del paziente: nel paziente con insufficienza renale o con lesioni ossee estese, sono da preferire regimi a base di bortezomib.
- Tipo di ricaduta, aggressiva o “indolente”: se aggressiva, considerare trattamenti con bortezomib, altrimenti preferire regimi a base di thalidomide o lenalidomide.

- Tossicità pregresse: se all'induzione si è manifestata neuropatia periferica, potrebbe essere conveniente passare ad un agente non neurotossico, come la lenalidomide.

Come già anticipato, grazie ai nuovi studi sulla biologia del MM, attualmente sono disponibili nuovi agenti farmacologici: tra i più promettenti si annoverano la pomalidomide (Actimid[®], che può agire nei casi refrattari alla lenalidomide), carflizomib (utile in caso di resistenza a bortezomib), gli inibitori della istone deacetilasi (Vorinostat[®], Panobinostat[®]), gli agenti alchilanti come la bendamustina, gli inibitori di AKT o delle HSP. Essi vengono usati come terzo farmaco da associare ai regimi ormai "collaudati" quali VD o LD. [4]

Nelle linee guida del National Comprehensive Cancer Network MM Panel, i regimi terapeutici di salvataggio sono distinti in "preferiti" e "altri", sulla base del livello di evidenza (categoria 1: alto livello; 2A: basso livello di evidenza) e del bilancio efficacia-tossicità.

I regimi di salvataggio definiti "preferiti", sono:

- Ripetizione della terapia di induzione (se ricaduta > 6 mesi)
- Bortezomib (categoria 1)
- VD
- VRD
- Bortezomib/doxorubicina liposomiale (categoria 1)
- VTD: (categoria 2A) la triplice associazione si è mostrata superiore alla

duplice associazione TD per TTP, PFS, percentuali di CR. Nessuna significativa differenza per OS. Maggior frequenza di neuropatia periferica di grado 3 nel triplo regime.

- Carfilzomib: per i pazienti che hanno ricevuto almeno 2 terapie di prima linea, inclusive di bortezomib e un iMID e che sono andati incontro a progressione entro 60 giorni dal completamento dell'ultima terapia (categoria 2A). Sono in corso studi internazionali di fase III (ASPIRE, ENDEAVOR, FOCUS) per valutare eventuali associazione di carfilzomib ad altri farmaci (ad esempio con Ld).
- CVD (ciclofosfamide, bortezomib, desametasone)
- DT-PACE (cisplatino, doxorubicina, ciclofosfamide, etoposide) ± Bortezomib (VTD-PACE)
- Ciclofosfamide ad alte dosi
- LD (categoria 1)
- TD

Le alternative, invece, sono costituite da:

- Bendamustina
- Bortezomib/vorinostat (categoria 2A)
- Lenalidomide/bendamustina/desametasone (categoria 2A). [10]

1.8.7 Terapia di supporto nel Mieloma Multiplo

E' fondamentale instaurare una terapia di supporto nel paziente trattato per MM, a causa degli eventi avversi, secondari ai trattamenti, che potrebbero verificarsi.

In particolare, i pazienti ricevanti regimi a base di thalidomide o lenalidomide in combinazione a corticosteroidi ad alte dosi o agenti citotossici, hanno un'incidenza aumentata di eventi tromboembolici, ragion per cui dovrebbero ricevere la trombofilassi con aspirina o LMWH.

La neuropatia periferica, invece, costituisce l'evento avverso più temuto dei regimi contenenti bortezomib a thalidomide, ma anche alcaloidi della vinca e cisplatino.

La neuropatia bortezomib-indotta si presenta ben nel 70% dei pazienti, e, sebbene tenda a migliorare col tempo, ha un impatto importante sulla qualità della vita.

Per questo motivo spesso bisogna ridurre o interrompere la terapia. Nei pazienti con neuropatia preesistente o ad alto rischio di sviluppo, è possibile sostituire la somministrazione endovenosa con la somministrazione sottocutanea. [10]

Inoltre, l'uso di bortezomib rende obbligatoria la profilassi per il virus herpes zoster con aciclovir.

Per migliorare la sintomatologia ossea o prevenire complicanze scheletriche, si consiglia sempre la somministrazione, durante i trattamenti e per 1-2 anni dopo la terapia di induzione, di un bisfosfonato (pamidronato o acido zaledronico), previa bonifica dentaria (l'uso a lungo termine dei bisfosfonati può provocare

osteonecrosi mandibolare).

Nei pazienti in cui i valori emoglobinici siano $<10\text{g/dl}$, in accordo con le raccomandazioni di ASH e ASCO, è raccomandata la prescrizione di eritropoietina al fine di riportare i valori intorno ai 12g/dl .

1.9 Ruolo della risposta al trattamento nel MM

In generale, esiste una correlazione statistica tra la massima risposta ottenibile da un trattamento e la prognosi del paziente. Nel caso del MM, l'impatto della CR è stato dimostrato solo a seguito dell'introduzione della HDT+ ASCT, in quanto con essi, l'ottenimento della CR o per lo meno di VGPR, è stato associato ad un allungamento del tempo di PFS. Questo è vero anche per le ricadute, grazie all'impiego dei regimi VD e LD.

Per quanto riguarda l'OS, il beneficio non è ancora del tutto chiaro e gli studi randomizzati hanno dato risultati contrastanti: in alcuni, la sopravvivenza globale non è aumentata nei pazienti che hanno ottenuto CR con ASCT o nuove terapie rispetto ai pazienti trattati tradizionalmente. Si pensa che questo risultato possa essere dovuto ad un follow-up troppo breve e/o alle migliorate terapie di salvataggio nel braccio di controllo.

Comunque, l'impatto sulla sopravvivenza dato dal raggiungimento di una CR, varia da paziente a paziente e quindi ha molte variabili: il tipo di trattamento, l'età del paziente, presentazione clinica e biologia del MM.

Un trattamento più intenso, ad esempio un doppio ASCT, sicuramente comporta CR e VGPR più "profonde" che a loro volta possono influenzare una sopravvivenza più duratura.

Dall'altro lato, l'utilizzo di terapie più efficaci ma più aggressive in pazienti molto anziani o fragili induce tossicità più gravi e frequenti che possono prevalere sul potenziale beneficio legato al raggiungimento della CR.

Per quanto riguarda la presentazione clinica, l'ottenimento della CR, ai fini di una sopravvivenza più lunga, non è cruciale per le forme indolenti o meno aggressive, e per lo stadio ISS1. Al contrario, nelle forme aggressive e ad alto rischio, come quelle caratterizzate da del(17p) e t(4;14), ottenere almeno VGPR innalza significativamente PFS e OS rispetto al raggiungimento di una PR.

Alla base di queste conclusioni vi è il substrato biologico della malattia: nelle forme aggressive, caratterizzate da un clone plasmacellulare altamente proliferante, l'eliminazione di tale clone è fondamentale per una risposta prolungata, mentre, nelle forme non aggressive, esisterebbe un subclone a bassa velocità di replicazione, resistente alla terapia che non viene eliminato, per cui pur ottenendo CR, non ci sono ripercussioni in termini di sopravvivenza.

Comunque, raggiungere la CR non è l'unico obiettivo delle terapie, soprattutto

delle nuove, in quanto, prolungandole con mantenimento/consolidamento, è possibile migliorare ulteriormente l'intensità della risposta, e quindi prolungare la stessa CR fino ad ottenere la remissione molecolare. Ciò è stato dimostrato dal gruppo di studio italiano che ha sottoposto i pazienti in CR o VGPR post-ASCT allo schema di consolidamento con VTD.

In sintesi, ottenere la CR, potrebbe non essere l'obiettivo principale del trattamento del MM: si pensi ai pazienti più anziani e/o compromessi, o quelli in stadio ISS1, specie se il trattamento è potenzialmente tossico.

Al contrario, in tutti gli altri pazienti, specie quelli ad alto rischio genetico, ottenere CR è un obiettivo importantissimo perché influisce statisticamente sulla prognosi (outcome migliore), essendo la CR un surrogato dell'efficacia del trattamento.

Oltre a ciò, è necessario mantenere la CR ottenuta, riducendo la massa tumorale che comprende anche cellule non secernenti proteina M.

Per questo motivo, in futuro, sarà necessario ridefinire la CR: gli esami sierologici non sono sufficientemente in grado di valutare la malattia residua, per cui bisognerà rivedere l'impatto prognostico della CR, nuovamente intesa: molecolare, immunofenotipica o guidata dall'imaging.

La remissione molecolare, infatti, è associata a remissioni più durature e possibilmente alla guarigione. Per ora, questo "privilegio" ha interessato esclusivamente un piccolissimo sottogruppo di pazienti tra quelli sottoposti ad

allo-SCT, ma non si esclude che la combinazione tra HDT e nuovi farmaci possa un giorno estenderlo a più pazienti. Purtroppo la valutazione della remissione molecolare (su midollo, per mezzo della RQ-PCR, real time quantitative polymerase chain reaction) è costosa, difficoltosa e disponibile solo in un numero limitato di centri specializzati.

La remissione immunofenotipica, cioè valutata con citofluorimetria multiparametrica, è sicuramente meno sensibile e specifica della remissione molecolare, ciò non toglie che nel paziente con immunofissazione negativa, ottenerla, sia il principale fattore prognostico per PFS.

Infine, le tecniche di imaging come PET e RMI, consentono di identificare focolai di malattia residua, contenenti cellule non secernenti, sottolineando ancora una volta i limiti di definizione della CR supportata da esami sierologici e la necessità di definire un nuovo status di CR. [11]

2. L'iter diagnostico e il follow-up nel mieloma multiplo

Nella pratica quotidiana, c'è ancora della confusione circa l'uso dei test laboratoristici che valutano la componente monoclonale nel siero e nelle urine, e sta prendendo sempre più piede il dosaggio delle catene leggere libere nel siero. Inoltre, sempre più importanti sono diventate le tecniche di imaging.

A partire dal 2009, l'IMWG ha fornito le raccomandazioni utili alla diagnosi del MM, da adottare nel sospetto di esso.

E' stato definito un ordine di priorità con cui effettuare esami e procedure per arrivare alla diagnosi e definire al meglio le caratteristiche della malattia:

- ✓ Anamnesi (ed esame obiettivo) del paziente;
- ✓ Esami di screening per MM;
- ✓ Esami e procedure diagnostici per MM;
- ✓ Esami utili a definire la massa tumorale e ai fini prognostici;
- ✓ Esami e procedure utili a definire il danno d'organo, mieloma correlato;
- ✓ Esami specifici, che trovano indicazione in certi pazienti.

2.1 Anamnesi del paziente con sospetto di Mieloma Multiplo

Quando si sospetta una gammopatia monoclonale quale il MM, è opportuno indagare la storia familiare e personale del paziente, ricercando nei parenti di primo grado eventuali diagnosi di patologie maligne ematologiche, ad esempio diagnosi di linfoma, leucemia linfatica cronica o altre discrasie plasmacellulari.

L'anamnesi patologica remota e prossima dovranno, invece, focalizzarsi sulle comorbidità che possono condizionare le eventuali scelte terapeutiche: nello specifico andranno ricercate malattia coronarica, scompenso cardiaco congestizio, ipertensione, malattie renali, epatiche e polmonari. [12]

2.2 Esami di screening nel Mieloma Multiplo

Innanzitutto vengono eseguiti:

- un emocromo completo,
- uno striscio ematico periferico per la ricerca di reperti quali “rouleaux eritrocitari” e plasmacellule circolanti.

A seguire, dovranno essere effettuati esami biochimici e chimici clinici che includano:

- test di funzionalità epatica e renale, includendo uremia e creatininemia,
- elettroliti,
- calcemia,
- albuminemia,
- $\beta 2$ microglobulina
- LDH
- elettroforesi sierica e immunofissazione
- quantificazione delle Ig sieriche mediante nefelometria
- esame delle urine standard, uricemia, raccolta delle urine/24h per elettroforesi e immunofissazione.
- FLC sieriche (free light chain)

Dunque, è necessario effettuare la ricerca della proteina M sia nel siero che nelle urine.

L'elettroforesi (fig. 2.1) rappresenta l'esame di elezione per la rilevazione della CM e per la sua quantificazione: qualunque sia la tecnica prescelta (gel di agarosio o elettroforesi capillare) è importante che il metodo adottato raggiunga una sensibi-

lità <1g/l e che il personale addetto all'ispezione visiva dei tracciati sia specificamente formato ed esperto. [13]

La quantificazione avviene mediante densitometria sul picco del tracciato elettroforetico.

In genere la CM si localizza nella zona delle gamma -globuline, ma non è infrequente che possa essere ritrovata nella zona delle beta-globuline. In alcune circostanze, a causa di particolari aspetti di polimerizzazione, la CM si frammenta in due o più frazioni con diversa migrazione in campo elettrico.

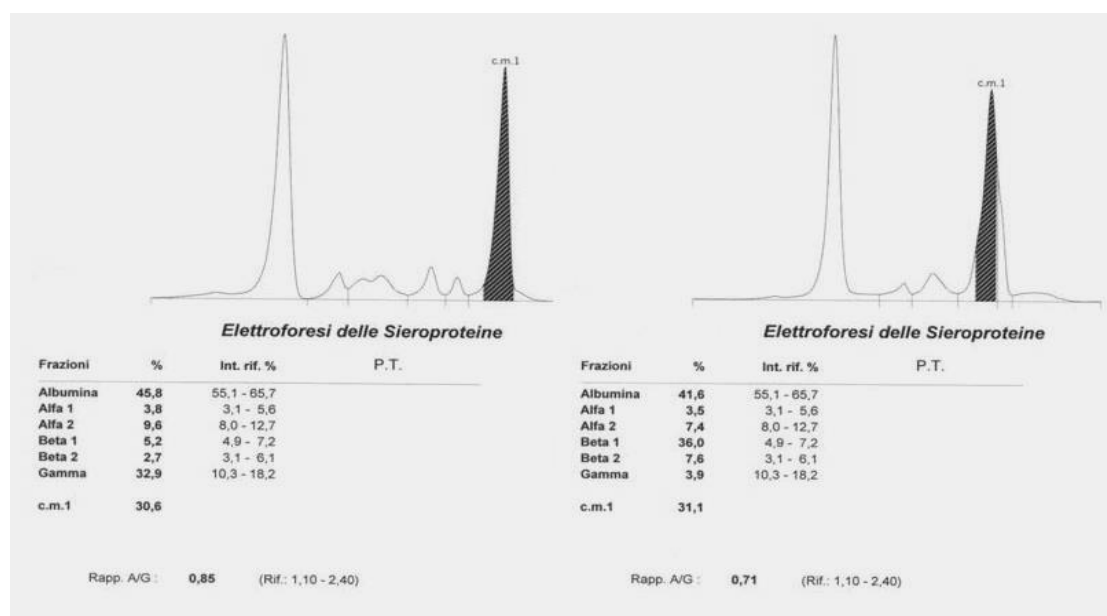


Figura 2.1: A sinistra: esempi di protidogramma in MM (a sinistra Mieloma IgG, a destra Mieloma IgA) e quantificazione della CM.

Comunque, è opportuno avvalersi anche della nefelometria per eseguire il dosaggio delle immunoglobuline sieriche e delle catene leggere. Si tratta di una tecnica

complementare all'elettroforesi e utile nel caso di bassi livelli di Ig, che tuttavia può sovrastimare la CM quando, invece, i livelli di Ig sono elevati. [12]

L'immunofissazione sierica (fig. 2.2) è l'esame di laboratorio che permette di identificare l'isotipo (cioè il tipo di immunoglobulina) e di confermare la restrizione per una delle due catene leggere. In casi particolari è possibile identificare due o più bande monoclonali, le quali possono essere dovute a: identico isotipo con due diverse catene leggere, oppure due isotipi diversi ognuno con la sua catena leggera. [6]

Di fronte al sospetto di MM (o comunque di una GM), l'immunofissazione deve essere eseguita anche quando il tracciato elettroforetico appare normale, in quanto essa consente di mettere in evidenza CM non rintracciabili dall'elettroforesi perché di lieve entità o perché co-migranti con altre proteine normalmente rappresentate.

Se l'immunofissazione risulta positiva per le sole catene leggere o è negativa per IgG, IgA e IgM (la tipizzazione standard utilizza antisieri anti κ , λ , μ , γ e α), è necessario che venga effettuata utilizzando anche gli antisieri anti δ e anti ϵ , per escludere la presenza di una rara gammopatia IgD o IgE. In generale, nel MM, la CM è di tipo IgG nel 60% dei casi ed IgA nel 20% (in meno dell'1% è dimostrabile una CM IgD o IgE). Nel 15% dei casi è diagnosticabile un MM micromolecolare in cui la CM è costituita da una delle catene leggere (κ o λ). Nel resto dei casi il MM non secerne CM (si parla di mieloma non secernente o mieloma né secernente né

produttore). [6]

Va ricordato che la tipizzazione deve essere ri-eseguita, durante il monitoraggio del paziente, tutte le volte che il tracciato elettroforetico sia morfologicamente diverso dai precedenti, e per confermare la scomparsa della CM al fine di definire la CR dopo trattamento. [13]

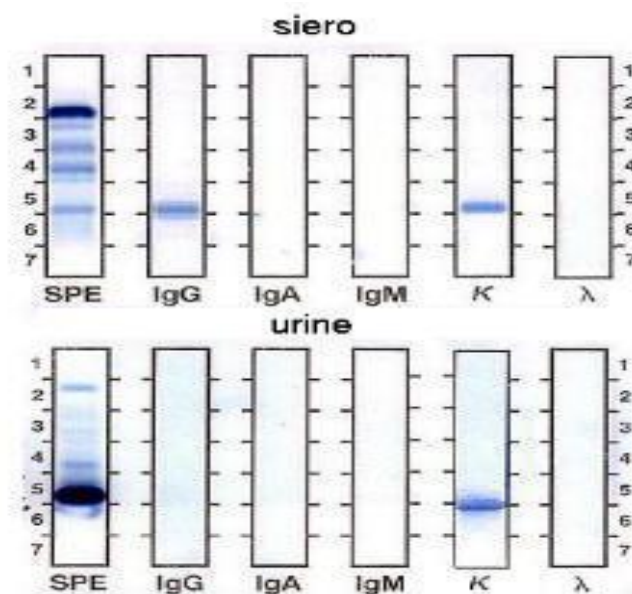


Figura 2.2: Esempio di immunofissazione sierica (sopra) e urinaria (sotto) in MM IgG kappa.

L'elettroforesi proteica e l'immunofissazione devono essere effettuate anche sulle urine raccolte nell'arco delle 24 ore. La concentrazione della proteina monoclonale viene calcolata sulla base delle dimensioni del picco all'elettroforesi e delle proteine totali presenti nel campione. L'immunofissazione va eseguita anche in assenza di proteinuria o di picco all'elettroforesi urinaria. In diversi casi una componente M micromolecolare è diagnosticabile proprio grazie all'immunofissazione urinaria, a patto che la sua concentrazione superi la capacità di riassorbimento

glomerulare. La presenza di catene leggere monoclonali nelle urine comporta positività per la cosiddetta proteinuria di Bence-Jones.

Il dosaggio delle proteine totali permette di verificare se la CM si accompagna ad incremento della quantità delle proteine plasmatiche.

La quantificazione dell'albumina sierica è imprescindibile per la stadiazione del mieloma; il metodo più accurato per misurarla è la nefelometria ma solitamente ci si avvale delle densitometria su tracciato elettroforetico, sebbene questa faccia sì che i livelli di CM influenzino il valore dell'albumina: se la CM è elevata, la concentrazione sierica dell'albumina viene sovrastimata.

Comunque, un recente studio ha indicato che tutti i metodi di misurazione dell'albumina sierica possono essere utilizzati nella prognosi secondo l'ISS. [12]

Altri esami ematochimici, funzionali allo staging e alla prognosi più che alla diagnosi, sono la determinazione della β 2-microglobulina, che stima la massa tumorale e costituisce il cardine dell'ISS, e la lattico-deidrogenasi sierica (LDH), che rappresenterebbe un indicatore prognostico indipendente in molti studi. La PCR (proteina c reattiva), invece, pur non avendo alcun ruolo nella prognosi, può essere utile in caso di sospetta infezione.

2.3 Ruolo della misura delle catene leggere libere (FLC)

Il test delle FLC sieriche consta di due esami separati: uno valuta le catene leggere libere k (v.n. 3,3-19,4mg/l), e l'altro le catene leggere libere λ (v.n. 5,7-26,3 mg/l).

Il test stabilisce la clonalità sulla base del rapporto K/λ (v.n 0,26-1,65).

Quando il rapporto è $<0,26$, si parla di FLC monoclonale λ , quando è $>1,65$ di FLC monoclonale k. In generale l'isotipo di FLC monoclonale viene anche detto "involved", e l'opposto "uninvolved".

Introdotta nel 2001, la misura immunochimica delle FLC nel siero ha tre funzioni principali. Innanzitutto, permette screening, diagnosi e monitoraggio di tutte le condizioni in cui la CM è assente (MM non secretorio) o difficilmente misurabile (MM oligosecretorio), e ovviamente, del MM micromolecolare.

Inoltre, rappresenta un indicatore prognostico di progressione nel MM, nel plasmocitoma solitario, nel SMM e nella MGUS. Ad esempio, per i pazienti con MGUS, lo schema di rischio proposto dai ricercatori della Mayo Clinic, richiede la misura della CM, la sua tipizzazione e il rapporto k/λ : i pazienti con CM IgG, concentrazione sierica $<15\text{gr/l}$ e normale rapporto k/λ , hanno rischio di progressione basso (5% in 20 anni), per cui essi possono essere affidati alle cure del medico di famiglia [13].

Infine, FLC riveste un ruolo molto importante nella valutazione del decorso della malattia e della risposta alla terapia, in quei pazienti che non hanno malattia misurabile nel siero (proteina M sierica $\geq 1\text{g}/100\text{ml}$ e proteina M urinaria $\geq 200\text{mg}/24\text{h}$), mieloma non secretorio compreso. In particolare, come già detto nel precedente capitolo, di recente l'IMWG ha raccomandato l'esecuzione del test nei pazienti che hanno ottenuto CR e immunofissazione sierica negativa, per la definizione della sCR.

Tuttavia, recentemente è stato aperto un nuovo dibattito sul ruolo del rapporto FLC nella sCR e sulla sua relazione con le bande oligoclonali.

Il 10-33% dei pazienti che ottengono CR dopo HDT-ASCT o allo-SCT, sviluppano bande oligoclonali (cioè immunofissazione sierica o urinaria differente dalla CM originale per catena pesante e/o leggera). Esse sono transitorie, anche se possono persistere per anni, ed indicano che il sistema immunitario è in ricostituzione, per cui sono associate ad outcome migliore (tasso di CR, PFS e OS più alti).

Uno studio del gruppo di Barcellona, però, ha dimostrato che esse si associano ad un rapporto FLC anormale (il 41,2% dei pazienti in CR dopo trapianto, presentava valori del rapporto FLC anormali, e di questi ben il 72,7% presentava anche le bande oligoclonali). Per questo, la definizione di sCR, che prevede invece un rapporto FLC normale, è stata messa in discussione [14] ed è stato aperto il dibattito sul suo valore prognostico, ancora non ben definito, sul ruolo del rapporto FLC nei pazienti con bande oligoclonali (nello studio definite come ASIP: atypical serum

IFE patterns) e sulla sua tempistica (precocemente o successivamente nel contesto della CR). [15]

2.4 Gli esami morfologici nel Mieloma

Dopo aver eseguito le indagini di screening, il paziente con sospetto MM deve essere sottoposto ad analisi morfologica del midollo emopoietico, eseguita attraverso due metodiche invasive e complementari: il mieloaspirato (MA) e la biopsia osteomidollare (BOM). La diagnosi è confermata quando è presente una infiltrazione midollare di plasmacellule clonali > 10%.

Con il MA (fig. 2.3) si ottiene sangue midollare mescolato a minuscoli frustoli rappresentativi del tessuto emopoietico aspirato. Questo tipo di indagine altera la normale struttura del midollo, ma permette comunque di valutare con ottima definizione la morfologia delle cellule che compongono la popolazione emopoietica.

In particolare, per quanto riguarda il mieloma, tra le anomalie morfologiche degne di nota si annoverano: i corpi di Russell (inclusi rotondeggianti citoplasmatici) che caratterizzano le cosiddette cellule di Mott, multinuclearità, asincronismi maturativi, inclusi nucleari noti come corpi di Dutcher. [6]

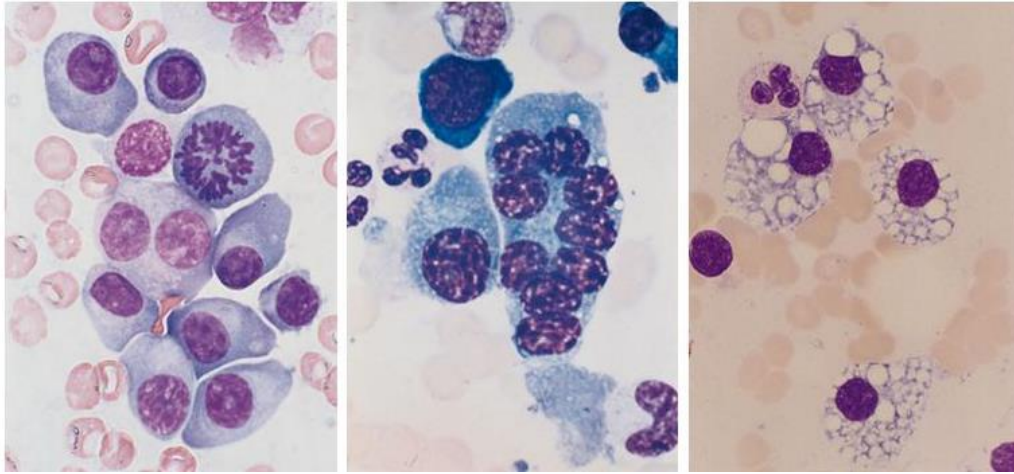


Figura 2.3: Mieloaspirato: plasmacellule di mieloma osservate al microscopio ottico. Le cellule neoplastiche mostrano anomalie morfologiche (multinuclearità, nucleoli prominenti, vacuoli). È visibile anche una figura mitotica. [6]

Le anomalie morfologiche possono rappresentare un interessante fattore prognostico. Le plasmacellule patologiche possono essere classificate, sulla base dei criteri morfologici, come: mature, intermedie, immature, plasmoblasti. Sulla base di questi aspetti, è possibile individuare quattro sottotipi morfologici di MM (tab. 2.1). [6]

TIPO DI MM	TIPOLOGIA DELLE PLASMACELLULE e %		
	MATURE	IMMATURE	PLASMOBLASTI
IMMATURO	> 10	< 13	< 2
MATURO	< 10	> 12	< 2
PLASMOBLASTICO			> 2
INTERMEDIO	Non classificabile negli altri sottotipi		

Tabella 2.1: Classificazione morfologica del MM (Greipp et al, 1985). [6]

Questa classificazione mostra valore prognostico ed il tipo plasmoblastico mostra un comportamento clinico particolarmente aggressivo. [6]

La biopsia osteomidollare (BOM), invece, permette di recuperare un frustolo integro di midollo circondato da lamelle ossee. Il campione biologico ottenuto con questa tecnica è altamente rappresentativo della struttura del tessuto e permette di valutare tutte le componenti cellulari e strutturali (vascolarizzazione, stroma, struttura ossea circostante) senza significativi artefatti. Solo la BOM consente di valutare la cellularità (percentuale di elementi nucleati rispetto allo spazio midollare totale presente nella sezione) e quindi l'entità dell'infiltrazione plasmacellulare e l'emopoiesi residua, la localizzazione preferenziale delle varie linee cellulari all'interno del tessuto emopoietico, e quindi il pattern infiltrativo, i rapporti tra popolazioni cellulari e componenti stromali (per esempio, i vasi), la quantità di fibre reticolari e l'eventuale rimaneggiamento osseo. [6]

Sebbene il MA consenta di osservare con miglior definizione la morfologia delle plasmacellule, non può essere considerato sufficiente per la diagnosi né sostituire l'indagine bioptica, in quanto la percentuale di plasmacellule calcolata mediante MA appare in genere inferiore a quella ottenuta con una BOM simultanea, soprattutto se l'infiltrazione è modesta. È stato infatti calcolato che il MA sottostima la percentuale di infiltrazione nel 45% circa dei casi e che la differenza media tra mieloaspirato e BOM supera il 20%. L'entità della discordanza tra i due test aumenta nei casi con infiltrazione modesta. [6]

Per quanto concerne la BOM, mediante colorazioni standard e tecniche immunocitochimiche essa permette di identificare le plasmacellule, mostrarne

eventuali atipie morfologiche, e ricercare i marcatori plasmacellulari: i più utili sono CD138 e CD38, ma possono essere rintracciati anche CD20, CD56 e ciclina-D1.

Mediante colorazione dell'immunoperossidasi o immunofluorescenza, è possibile dimostrare la restrizione clonale (tramite anticorpi, vengono identificate le catene leggere immunoglobuliniche nel citoplasma delle plasmacellule).

Alla BOM si osserva anche il pattern di infiltrazione da parte delle plasmacellule neoplastiche, che può essere: interstiziale, con o senza localizzazione paratrabecolare; nodulare con presenza di cordoni cellulari; diffuso o "packed". Nel pattern interstiziale, le plasmacellule sono disperse tra le cellule emopoietiche e gli spazi adiposi. Nel tipo "packed" la struttura del midollo è completamente sovvertita. L'angiogenesi è aumentata e nel 10% dei casi è visibile anche incremento della trama reticolinica, con tendenza alla fibrosi. Pattern diffuso e fibrosi sono criteri istologici prognostici sfavorevoli. [6]

2.5 Le indagini citogenetiche e la diagnosi molecolare nel MM

Nell'inquadramento iniziale del paziente con sospetto MM, deve essere inclusa anche l'analisi citogenetica.

La metodica più comune è costituita dalla citogenetica convenzionale mediante tecniche di bandeggio (generalmente bandeggio G). La sensibilità di questa tecnica non è molto elevata, soprattutto perché deve essere eseguita sulle cellule in metafase, tuttavia lo studio del cariotipo è in grado di fornire informazioni prognostiche utili, distinguendo le forme iperdiploidi dalle non-iperdiploidi ed evidenziando anomalie cromosomiche aggiuntive quali traslocazioni, guadagni e delezioni.

Un'altra metodica, più sensibile ma limitata ad un numero ristretto di anomalie, è la FISH (fluorescence in situ hybridization), in cui la disponibilità di sonde fluorescenti, è in grado di riconoscere specifiche anomalie cromosomiche quali del(17p13), t(4;14) e t(14;16), sempre a scopo prognostico. [12]

La sensibilità della FISH è superiore a quella del cariotipo convenzionale perché è eseguita sulle cellule in interfase. Si tratta, inoltre, di un test rapido, pronto anche in 5-6 ore, a dispetto delle 72-96 ore del cariotipo. [6]

Infine, è possibile impiegare tecniche di PCR per dimostrare la clonalità della popolazione plasmacellulare infiltrante e quindi fare "diagnosi molecolare" di MM.

In realtà, le metodiche di PCR per la dimostrazione della clonalità del gene IgH, sono piuttosto utili nel post-terapia e nella valutazione pre- e post-trapiantologica, cioè nelle fasi in cui i metodi istologici possono fallire nella individuazione delle cellule neoplastiche. Tra i diversi metodi di PCR si ricordano la "PCR fluorescente"

(Genescan PCR) e la "ASO-PCR" (PCR allele-specifica, la quale impiega primers clone-specifici). I metodi di PCR sono gravati da una discreta percentuale (fino al 30-45%) di falsi negativi, causati dall'elevata frequenza di mutazioni somatiche dei segmenti del gene IgH, con conseguente mancato allineamento dei primers utilizzati. In compenso, mostrano elevata sensibilità che può essere stimata intorno a $10^{-4}/10^{-5}$ nel caso della PCR fluorescente e intorno a $10^{-5}/10^{-6}$ nel caso della ASO-PCR. [6]

2.6 Diagnostica per immagini nella diagnosi di MM

Le linee guida diagnostiche più recenti suggeriscono di impiegare la radiografia tradizionale dello scheletro come prima indagine diagnostica poiché essa permette di studiare ampi campi ed individuare lesioni osteolitiche a rischio di frattura (ne individua nell'80% dei pazienti). Inoltre il suo uso è incentivato dal basso costo e dalla larga disponibilità. I distretti scheletrici che devono essere indagati alla diagnosi sono:

- coste (radiografia del torace in proiezione postero-anteriore),
- rachide (in proiezione antero-posteriore e latero-laterale),
- cranio (in proiezione antero-posteriore e latero-laterale; vedi figura [6])
- pelvi (in proiezione antero-posteriore);
- omeri e femori;
- ogni altra sede ossea sintomatica. [12]

I limiti della radiografia scheletrica sono rappresentati da: bassa sensibilità (è positiva solo quando la perdita ossea > 30%); bassa specificità (non consente di distinguere le lesioni osteoporotiche da quelle osteolitiche del mieloma), inadeguata valutabilità di alcune sedi (sterno, coste, scapole) e della risposta al trattamento.

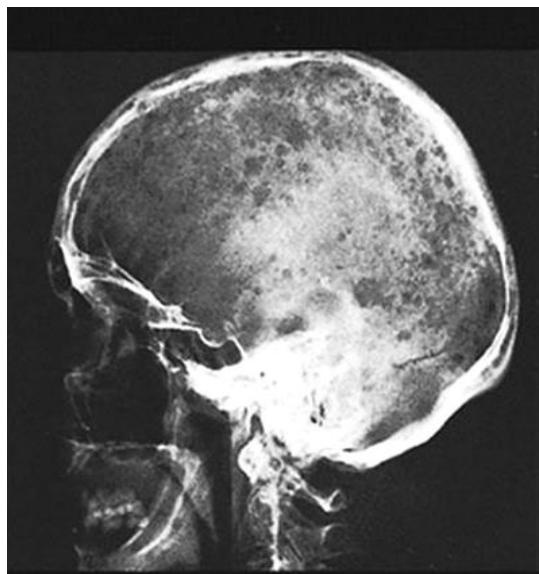


Figura 2.4: Osteolisi a carico del cranio

La MRI fornisce informazioni dettagliate sul coinvolgimento osseo, e sull'estensione e la natura di lesioni nei tessuti molli che si sviluppano dall'osso. Inoltre, può diagnosticare lesioni asintomatiche (le lesioni del MM sono più evidenti con l'impiego del gadolinio).

Il coinvolgimento del midollo osseo può apparire normale, focale, diffuso o variegato: ciascun pattern ha valore prognostico e predittivo di risposta al trattamento.

L'esecuzione della MRI di rachide e pelvi è obbligatoria in caso di sospetto plasmocitoma solitario e in caso di mieloma sintomatico, soprattutto se non secernente.

Nel mieloma sintomatico, la MRI ha diverse finalità. Innanzitutto, è il test di scelta nel caso di compressione spinale (accertata o sospetta), situazione in cui consente di valutare livello ed estensione della compressione sul midollo spinale o sulle radici nervose, dimensioni della massa e grado di interessamento dello spazio epidurale.

Gioca un ruolo fondamentale anche nelle fratture vertebrali, molto dolorose, in cui consente di distinguere, eventualmente, tra eziologia osteoporotica ed eziologia mielomatosa. Talvolta, è necessaria l'esecuzione di una biopsia TC-guidata della vertebra collassata per fare la diagnosi differenziale. [12]

La MRI, infine, permette di valutare il rischio di frattura della singola lesione osteolitica (sebbene non sia in grado di predire il punto in cui la frattura potrebbe avvenire) e di stimare il rischio di frattura in generale per un paziente, in base al numero di lesioni osservate. [6]

L'esecuzione di una MRI andrebbe considerata anche nel SMM, in quanto potrebbe evidenziare lesioni occulte e, qualora fosse positiva, predire la progressione a mieloma sintomatico.

La specificità dell'esame può essere ridotta da alcuni fattori interferenti (depositi di ferro, depositi di amiloide, zone di iperplasia midollare reattiva).

In caso di impossibilità all'esecuzione della RMI (ad esempio per via di lesioni oculari, protesi metalliche, pace-maker impiantato) o di pazienti sintomatici ma negativi alla RX standard e/o alla RMI, è consigliato l'esame TC. Quest'esame è utile anche in caso di lesione sospetta nei tessuti molli perché dà la possibilità di eseguire biopsia mirata TC-guidata. I vantaggi dell'esame TC sono soprattutto: possibilità di diagnosticare lesioni mielomatose molto piccole e/o extra-ossee espansive e di studiare i settori ossei mal valutati dalla Rx standard (coste, sterno, scapole). [6]

Infine, è possibile eseguire una PET-TC, indagine che attualmente non viene considerata come un esame diagnostico di routine perché non in grado di individuare lesioni subcentimetriche e gravata dai falsi positivi (lesioni infettive, radioterapia nei 2-3 mesi precedenti, chemioterapia nelle 4 settimane precedenti).

Tuttavia, essa può trovare indicazione in casi selezionati come ad esempio in caso di malattia extramidollare, elevati livelli di LDH, malattia a progressione rapida o ripresa rapida di malattia, lesioni costali. [12]

Ultimamente, inoltre, è emerso il suo possibile ruolo come tecnica elettiva per predire la risposta al trattamento nel mieloma sintomatico: una PET-TC negativa sia prima che dopo HDT-ASCT, predice una migliore prognosi.[16]

Considerando quanto detto, può essere proposto un algoritmo diagnostico all'esordio di un MM (fig.2.5). [6]

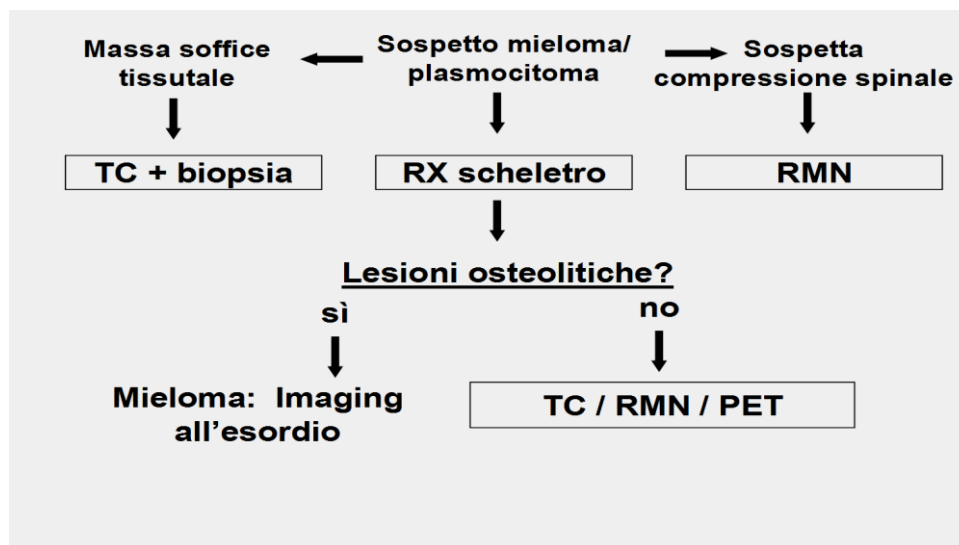


Figura 2.5: Imaging nel mieloma multiplo

2.7 Il follow up

Dopo il trattamento, è necessario, in base al risultato ottenuto, seguire il paziente in maniera adeguata. Nei pazienti con malattia misurabile, si raccomanda sia l'elettroforesi sierica che il dosaggio delle Ig al fine di verificare la risposta, sebbene l'elettroforesi sia il metodo preferito per monitorare la componente monoclonale.

In diversi casi, soprattutto nei mielomi IgA o IgD, è necessaria anche la quantificazione nefelometrica delle Ig sieriche. Nel mieloma micromolecolare, si raccomanda sempre la raccolta delle urine/24h, il dosaggio delle proteine totali e l'elettroforesi urinaria, per poter quantificare la proteinuria di Bence Jones.

Nel mieloma oligosecretorio o non secretorio, devono essere eseguiti in serie i dosaggi delle FLC.

In generale, è buona norma utilizzare sempre lo stesso metodo per seguire l'andamento della malattia di un determinato paziente.

In molti casi, non è necessario rieseguire gli esami morfologici dal momento che la malattia può essere ben monitorata anche solo con gli esami sieroematici ed urinari. Per valutare la CR, invece, MA e/o BOM sono essenziali, mentre non è necessario ripetere le indagini citogenetiche (cariotipo e FISH) o lo studio citofluorimetrico.

Se il paziente sta rispondendo alla terapia e non ha sviluppato nuovi sintomi ossei, non è necessaria neppure una nuova valutazione scheletrica.

In caso di ricaduta, sono raccomandate la maggior parte delle indagini impiegate per la diagnosi. L'esame morfologico va ripetuto in caso di sospetta progressione o quando una citopenia indichi la presenza di una sindrome mielodisplastica. Il cariotipo e/o la FISH vanno ripetuti solo se erano normali (e se non erano stati eseguiti già in prima istanza, vanno effettuati), mentre, nei pazienti in cui tali indagini avevano già evidenziato una malattia ad alto rischio, non è necessaria la ripetizione.

E' indicata anche una rivalutazione scheletrica per stimare il rischio di fratture.

Altre indagini radiologiche per la ricerca di masse nei tessuti molli a partenza dall'osso o di malattia extramidollare, andranno prese in considerazione in base

alle circostanze cliniche. [12]

3. La citofluorimetria: nuovo strumento per diagnosi e follow up del paziente con MM

3.1 Identificazione e caratterizzazione delle plasmacellule mediante MFC

Nel contesto di una popolazione midollare, le plasmacellule possono essere identificate attraverso la dimostrazione di elevata espressione di CD38 e CD138, in congiunzione ai parametri fisici delle cellule. Sebbene CD38 sia espresso anche da altre cellule, l'intensità della fluorescenza per CD38 è una peculiarità plasmacellulare, e questo non ha consentito l'impiego routinario per l'identificazione di queste cellule. E' anche vero che talvolta le plasmacellule anormali possono avere ridotta densità superficiale di CD38 e quindi essere più simili ai precursori delle cellule B (ematogoni) o ai linfociti T reattivi. [17]

Comunque l'analisi simultanea di CD138 aumenta enormemente la sensibilità dell'indagine, nonostante pure questo marcatore possa avere espressione eterogenea nelle plasmacellule.

L'espressione di CD45 e CD19 può affinare ulteriormente l'individuazione plasmacellulare, perché normalmente le plasmacellule sono positive per questi due antigeni (tab. 3.1). [20]

L'EMN raccomanda l'uso di MFC a 4 o più colori per identificare le plasmacellule e

consiglia l'analisi simultanea di CD38, CD138, CD45 e dei parametri fisici (SSC e FSC) almeno in un tubo. Quindi, si procederà per gate sequenziali, comprendendo nel primo gate elettronico tutti gli eventi a basso SSC, caratteristica delle plasmacellule, e, successivamente includendo quelli con co-espressione di CD38 e CD138. [18]

Affinché l'enumerazione sia adeguata, devono essere esaminati almeno 1×10^5 eventi. Se la popolazione plasmacellulare nel campione è $<1\%$ va fatta una seconda acquisizione ("double-step acquisition") e qualora il campione fosse emodiluito e/o ipocellulato, seguendo le più recenti indicazioni dell'EMN, devono essere acquisite informazioni di minimo 100 plasmacellule neoplastiche. [19]

Il passo successivo all'enumerazione della popolazione di plasmacellule, è la distinzione tra plasmacellule normali e patologiche: diversi studi multicentrici hanno chiaramente dimostrato che le caratteristiche fenotipiche, sotto forma di espressione antigenica tra le due popolazioni, sono differenti.

Se si prendono in considerazione i marker più rilevanti ed utili ai fini diagnostici, le plasmacellule normali mostrano il seguente immunofenotipo: CD38+++, CD138+, CD45+, CD19+, CD27+.

Le plasmacellule patologiche, invece, sono in prevalenza CD45-/dim; CD38++, CD138++, CD19-, CD27-/+, quindi presentano assente/bassa espressione del CD19, del CD27 e/o del CD45 ed espressione relativamente più bassa di CD38 (tab. 3.2).

MARKERS	NORMALE	MIELOMA
CD138	+	++
CD38	+++	++
CD28	-/+	+/-
CD19	+ /++	-
CD56	-	+
CD27	+	-/+
CD45	+	-/+
CD221	-	- /+ /++ /+++
CD81	+	-

Tabella 3.1: Markers plasmacellulari nella normalità e nel MM. [6]

MARKERS	FREQUENZA (%)
CD56	60-70
CD28	30-40
CD117	25-30
CD13/CD33	25-30
CD20	2-25
CD22	20-30

Tabella 3.2: Frequenza dei principali markers patologici nel MM. [6]

Inoltre, le plasmacellule patologiche possono iperesprimere CD28, CD33 e CD56 e avere espressione asincrona del CD20 e del CD117. Quindi, queste cellule possono esprimere anche antigeni dei linfociti B (CD20, CD22) e antigeni ritrovabili su cellule di altra derivazione, come molecole tipiche dei linfociti NK (CD56) e addirittura delle cellule mieloidi a diverso stadio di maturazione (CD13, CD33,

CD117). [20]

La MFC a 4 colori o più, basata sulla ricerca combinata di CD38, CD56, CD19 e CD45, è un mezzo affidabile per la ricerca delle plasmacellule clonali in >90% dei casi. Solo in meno del <10% dei casi è necessario allargare il pannello antigenico includendo le catene leggere immunoglobuliniche citoplasmatiche e altri marker aberranti (CD117, CD81, CD27, CD20). [18]

Tutte le plasmacellule esprimono catene leggere intracitoplasmatiche: il rapporto tra catene k e catene lambda è bilanciato in una popolazione plasmacellulare normale (policlonale), mentre è sbilanciato (restrizione clonale) nel caso del mieloma.

Le catene leggere sono individuabili solo mediante immunofluorescenza intracitoplasmatica, in cellule precedentemente permeabilizzate e fissate, perché le plasmacellule non esprimono Ig di membrana. In alcune circostanze, la dimostrazione di restrizione clonale può essere ardua a causa dell'esiguo numero di cellule patologiche o della bassa espressione delle catene leggere citoplasmatiche o quando la patologia è biclonale. [20]

Nelle figure successive viene mostrato un "flow-chart" citofluorimetrico per l'identificazione delle plasmacellule clonali.

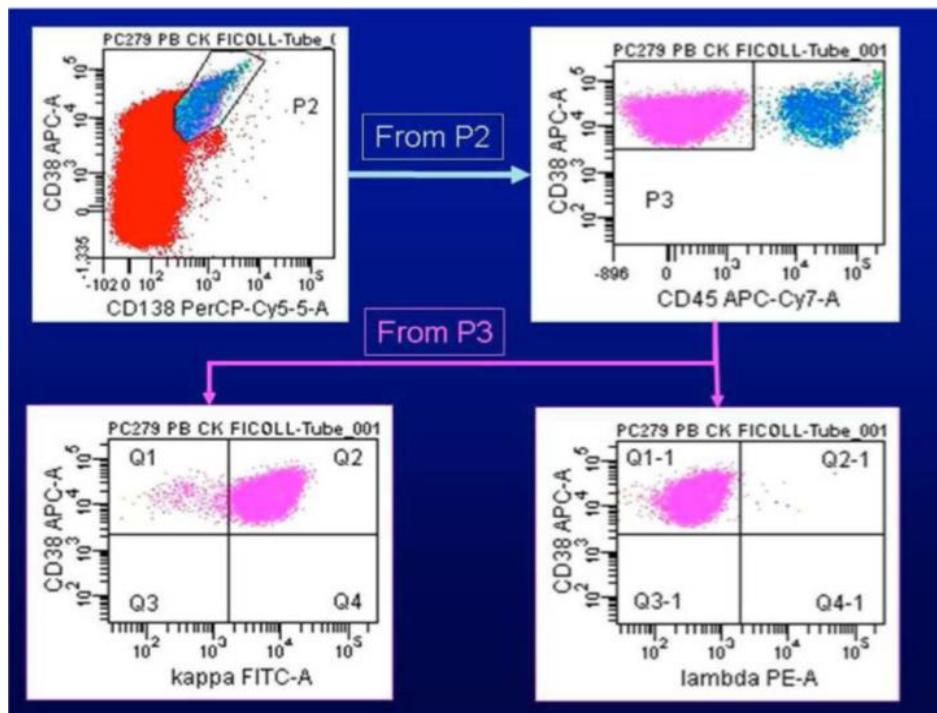


Figura 3.1: In alto a sinistra, il gating CD38/CD138 consente di individuare le plasmacellule (P2). In alto a destra, l'espressione del CD45, evidenzia una popolazione CD45- (P3). In basso, lo studio delle catene leggere citoplasmatiche mostra restrizione clonale per le catene kappa. [20]

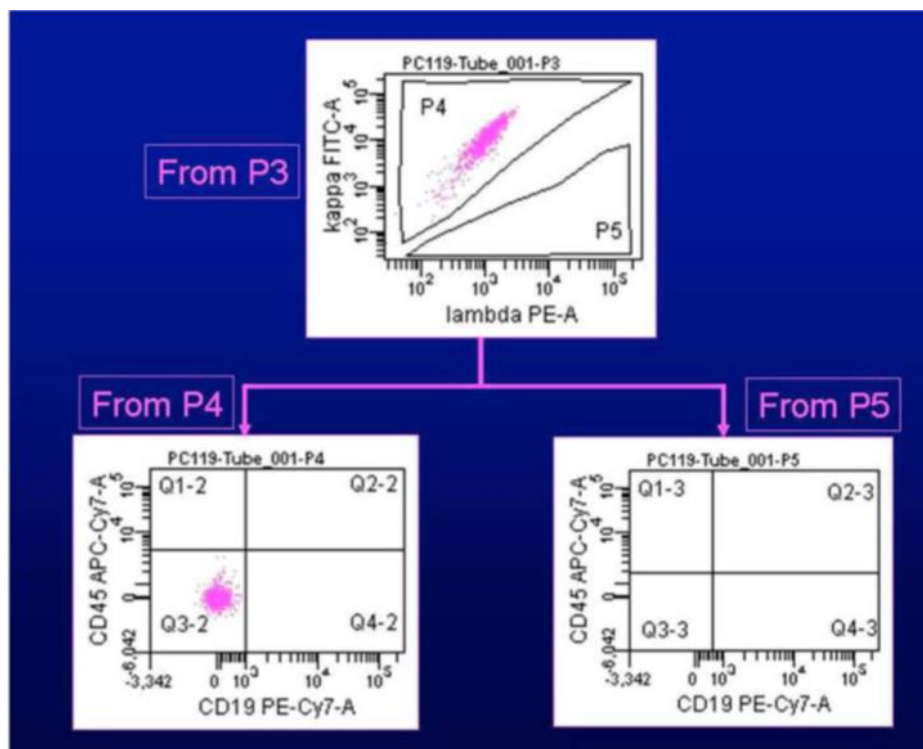


Figura 3.2: In alto, il gating kappa/lambda mostra ulteriormente la restrizione clonale della popolazione in esame. In basso, l'analisi selettiva delle cellule K-ristrette mostra la perdita di positività sia per CD19 che per CD45. Nessuna plasmacellula esprime catene leggere lambda (P5). [20]

Plasmacellule anomale non necessariamente definiscono una condizione di MM, in quanto possono essere presenti anche in caso di MGUS. In passato, sono stati suggeriti cut-off variabili per distinguere MGUS e MM (3-5% di plasmacellule ancora normali identificano MGUS), ma L'EMN ha stabilito, dopo diverse osservazioni, che la discriminazione tra MM e MGUS in MFC può essere fatta se sono presenti >3% di plasmacellule normali. In tal caso si parlerà di MGUS; quando invece questo valore è <3% e dunque più del 97% delle plasmacellule risultano anomale, verrà identificato il mieloma. [18]

Di recente sono stati sviluppati modelli statistici che correlano l'immunofenotipo plasmacellulare con la diagnosi di MM. Ad esempio l'Università di Pisa, in collaborazione con l'Università Federico II di Napoli e l'Harvard Medical School di Boston, ha sviluppato un modello statistico per studiare l'associazione tra diversi antigeni plasmacellulari e frequenza della diagnosi di MM, in accordo con i criteri diagnostici istologici. Il lavoro è stato effettuato su 192 campioni di midollo osseo (di cui 15 di controllo) e per ogni campione sono state analizzate almeno 100 plasmacellule. La MFC è stata eseguita con metodica a 7 o 8 colori, utilizzando un FacsCanto II a 3 laser della BD, ed ha sondato l'espressione di ben 16 antigeni (CD38, CD138, CD81, CD200, CD221, CD45, CD28, CD19, CD27, CD117, CD33, CD20, CD56 e CD10, catene leggere κ e λ). Tra tutti, CD19 e CD27 hanno dimostrato la concordanza maggiore con l'istologia, ovvero essi sarebbero i più

utili nel permettere la distinzione tra presenza/assenza di malattia. Questo modello statistico fornirebbe un valore percentuale di probabilità che ci sia o meno malattia, immettendo semplicemente i valori di due variabili ossia le espressioni rispettivamente di CD19 e CD27 (la loro assenza correla con la presenza di malattia) e accettando una differenza di 0,2 come cut-off di concordanza con l'istologia. Il modello, inoltre, potrebbe essere applicato per definire la risposta al trattamento e per la ricerca della malattia minima residua. [21].

La ricerca di nuovi possibili marcatori, finalizzata ad una più precisa caratterizzazione delle plasmacellule patologiche, comunque non si ferma.

Si pensi, ad esempio a CD229, membro della famiglia recettoriale SLAM (9 membri, coinvolti nell'attivazione dei linfociti T e cellule NK, nonché nel funzionamento dei linfociti B). In un recentissimo studio, tipizzando i campioni midollari di 54 pazienti con MGUS O MM (alla diagnosi o post-terapia), Carulli et al. hanno riscontrato CD229 nel 100% sia delle plasmacellule normali che patologiche. In particolare è stata riscontrata una bassa fluorescenza rispetto ad altri marker come CD38 e CD138, ma senza differenze significative tra le due popolazioni cellulari o tra i sottogruppi di pazienti, se non tra le plasmacellule normali dei pazienti con MM alla diagnosi vs in pazienti in PR dopo trattamento ($p = 0.035$).

Dunque, CD229 potrebbe essere utilizzato per selezionare la popolazione

plasmacellulare, in associazione a CD138, sebbene la sua scarsa espressione non aggiunga un reale beneficio a questo scopo. Tuttavia, pur non essendo adatto neppure alla diagnosi differenziale tra MGUS e MM né a diversificare diverse fasi di malattia, secondo recenti studi preclinici, potrebbe rappresentare un target di elotuzumab (MoAB umanizzato specifico per CS1, altro membro della famiglia SLAM) nel trattamento del MM. [22]

3.2 Utilità della citofluorimetria nella diagnosi differenziale del MM

Il particolare immunofenotipo della plasmacellule del mieloma consente alle tecniche citofluorimetriche, soprattutto quelle multiparametriche, di porre una sicura diagnosi differenziale tra il MM e le altre gammopatie monoclonali nel 95% circa dei casi. Abbiamo già considerato nel paragrafo precedente, come sia la quantità percentuale di plasmacellule normali a permettere di distinguere tra MGUS e MM, mentre l'immunofenotipo patologico è sostanzialmente lo stesso nella MGUS, nel MM e nella leucemia plasmacellulare. Quest'ultima condizione è caratterizzata da plasmacellule neoplastiche circolanti e può insorgere de novo (PCL primaria) o manifestarsi alla ricaduta di un MM precedentemente diagnosticato (PCL secondaria). Il clone della PCL tende ad esprimere più

frequentemente CD20, mentre è più spesso negativo per CD56, CD117 e HLA-DR. [20]

Le differenze principali tra MGUS, MM e PCL, riguardano per lo più le molecole coinvolte nell'interazione tra plasmacellula e microambiente midollare. [19]

Discorso a parte, invece, per la Macroglobulinemia di Waldenstrom, in cui cellule linfoplasmocitoidi secernono una IgM monoclonale e mostrano un immunofenotipo diverso da quello delle plasmacellule del mieloma, intermedio tra questo e quello dei linfociti B clonali, in quanto risultano tipicamente CD38+ e CD138^{dim} e sempre CD45+, CD19+, CD56-. Inoltre, nell'80% dei casi esprimono una catena leggera kappa di superficie (sIg+). [19] [20]

I markers CD19, CD45 e CD56, sono molto utili anche per distinguere le plasmacellule mielomatose da quelle clonali, tipiche di un linfoma non-Hodgkin B. [19].

3.3 Identificazione della malattia minima residua (MRD) tramite MFC

I miglioramenti in campo terapeutico dipendono irrimediabilmente dalla sensibilità dei test usati allo scopo di rintracciare la malattia minima residua, che determina il reale impatto dei nuovi farmaci e dei regimi terapeutici. Nel MM, la

MRD è un importante fattore predittivo nei pazienti sottoposti a trattamenti aggressivi: coloro che dimostrano plasmacellule fenotipicamente normali dopo i trattamenti, vanno incontro a un periodo PFS significativamente più lungo e ottengono OS maggiore. Sia il metodo convenzionale per identificare MRD (la ricerca della paraproteina mediante immunofissazione) che i nuovi criteri IMWG di sCR hanno un impatto prognostico veramente limitato se paragonati sia alle indagini molecolari (ASO-qPCR) che alla citofluorimetria multiparametrica, entrambi strumenti che hanno dimostrato maggiore sensibilità. [19] [21]

L'ASO-qPCR, tuttavia, nonostante l'altissima sensibilità (10^{-5} - 10^{-7}), è molto dispendiosa sia in termini di tempo che di costi, ed ha limitata applicabilità (75% dei pazienti circa). Al contrario, la MFC citofluorimetria è applicabile nel 90-95% dei casi di MM, è più rapida, economica ed ha una sensibilità di una cellula su 10.000 analizzate.

Molti studi hanno supportato l'importanza della "remissione immunofenotipica", in particolare Paiva et al hanno dimostrato, in una serie di 295 pazienti con MM, trattati con HDT+ASCT, come la remissione immunofenotipica sia il più rilevante e indipendente fattore prognostico, giacché i pazienti MRD-/IF- e quelli MRD -/ IF + avevano lo stesso decorso favorevole, e il loro outcome è stato significativamente migliore rispetto a quelli MRD+/IF-. La rilevanza di questo ed altri lavori, ha portato recentemente ad un aggiornamento della definizione IMWG di sCR, che adesso richiede, insieme ai criteri di CR e al normale rapporto di FLC sieriche,

anche l'assenza di plasmacellule aberranti all'analisi citofluorimetrica multiparametrica, con ≥ 4 colori. [19]

3.4 Valore prognostico dell'analisi dell'immunofenotipo

Oltre all'inconfutabile ruolo prognostico della remissione immunofenotipica, ci sono evidenze anche sul valore prognostico di determinati immunofenotipi; tra l'altro, determinati pattern di espressione antigenica sarebbero correlati anche a delle anomalie genetiche, comunemente riscontrate nel mieloma.

Innanzitutto, riveste valore prognostico l'immunofenotipo normale o meglio la presenza di plasmacellule normali.

L'Università di Salamanca, infatti, ha identificato nuovi criteri per predire il rischio di progressione di MGUS e SMM in mieloma sintomatico, partendo proprio dalla MFC. Tali discrasie plasmacellulari hanno un rischio di progredire, rispettivamente dell'1% e del 10% all'anno. Lo studio ha esaminato 407 casi di MGUS e 93 di SMM e ha dimostrato che, a 5 anni, il rischio di progressione era rispettivamente del 25% e del 64% nei casi in cui le plasmacellule normali erano $< 5\%$ (e quindi le clonali $\geq 95\%$), e del 5% e dell'8% in quelli con percentuale di plasmacellule normali più elevata. Inoltre, in aggiunta alla variabile "immunofenotipo"

(plasmacellule anomale $\geq 95\%$), sono stati presi in considerazione l'aneuploidia del Dna per la MGUS e la presenza di immunoparesi per il SMM, per stratificare i pazienti, per entrambe le patologie, in tre categorie di rischio, a seconda che avessero nessuna, una o due variabili. Il rischio di progressione a 5 anni è risultato rispettivamente per MGUS, del 2%, 10% e 46%, e per SMM 4%, 46% e 72%.

La conclusione di questo studio è stata l'innegabile utilità della MFC per predire il rischio di progressione di MGUS e SMM: attualmente, per i pazienti che ne sono affetti non è previsto alcun trattamento, tuttavia, alla luce dei risultati ottenuti, sarebbe opportuno stratificare il rischio e riservare il follow-up ai pazienti che probabilmente non progrediranno se non dopo un lungo periodo, mentre nuove strategie terapeutiche, non citotossiche, potrebbero essere approvate per le categorie a maggior rischio di progressione. [23]

Per quanto concerne il potenziale impatto prognostico degli immunofenotipi patologici, è significativo il lavoro condotto dal gruppo di studio PETHEMA/GEM.

In esso, sono stati analizzati tramite MFC gli immunofenotipi di ben 685 pazienti con nuova diagnosi di MM, uniformemente trattati con HDT+ ASCT (protocollo GEM 2000). I risultati hanno mostrato che, tra tutti i marker vagliati, tre sono in grado di fornire informazioni prognostiche: CD19, CD28; CD117.

L'antigene più influente sul decorso della malattia si è dimostrato CD28, costimolatore coinvolto nell'attivazione dei linfociti T ed importante per l'interazione tra plasmacellule e cellule dendritiche dello stroma midollare, e

quindi per la sopravvivenza del clone neoplastico (utilizzando anticorpi anti CD28 in colture plasmacellulari, esse vanno incontro ad apoptosi). Nello stesso studio, si è visto come CD28 correla, oltre che con una maggiore proliferazione neoplastica e con la resistenza ai trattamenti, anche con un cariotipo non-iperdiploide, che è anch'esso un fattore prognostico negativo, nonché, per la prima volta anche con la t(4;14) e la del(17p).

CD117, invece, è il recettore tirosinchiansico di c-kit, coinvolto nella crescita cellulare, assente sulle plasmacellule normali, e riscontrabile in 1/3 dei casi di MM. Sebbene in precedenza esso sia stato definito come un fattore prognostico negativo, lo studio ha dimostrato palesemente che la sua espressione correla con OS e PFS significativamente più elevate. Di fatti, la perdita della sua espressione si associa ad una maggiore infiltrazione midollare e ad una compromissione clinica importante (grave anemia ed insufficienza renale), e dal punto di vista citogenetico, si associa anch'essa a MM non-iperdiploide, t(4;14) e del(13q).

La combinazione di CD28 e CD117 ha consentito di stratificare i pazienti in 3 categorie di rischio: la prima, a prognosi sfavorevole (CD28+/CD117 -), la seconda, a rischio intermedio (CD28-/CD117), e la terza, a miglior prognosi (CD28-/CD117+). In realtà, è stata identificata anche una quarta categoria di pazienti che non ha beneficiato affatto del trattamento e per la quale è stato proposto un regime terapeutico con nuovi agenti farmacologici.

CD19, antigene acquisito molto precocemente nella differenziazione delle cellule

B ed espresso dalla maggior parte delle plasmacellule normali, è espresso in <5% dei pazienti con MM. In realtà, la sua espressione si associa a prognosi più sfavorevole (PFS e OS sono rispettivamente di 1 e 2 anni più brevi rispetto a quelle dei pazienti cD19-). Inoltre la maggioranza dei casi che lo esprimono, mancano anche di CD117, caratteristica che, come prima visto, conferisce prognosi peggiore.

Altri antigeni messi al vaglio nello studio sopracitato sono stati CD56 e CD45, per i quali vi sono risultati discordanti rispetto ad altri lavori.

L'assenza/ downregulation di CD56 (NCAM), adesina che ancora le plasmacellule allo stroma midollare, è stata associata, nel suddetto studio, a malattia più aggressiva, diffusione extramidollare, espressione leucemica e prognosi sfavorevole, mentre in altri, ad un numero minore di lesioni osteolitiche.

Similmente, l'assenza di CD45, che controllerebbe l'attività dei recettori di IL-6 e IGF-1, identificherebbe secondo il gruppo PETHEMA/GEM una malattia ad alto rischio di progressione, ma tale osservazione sarebbe in contrasto con quella di Robillard et al, secondo cui il comparto proliferativo plasmacellulare, teoricamente coinvolto nella progressione, risulta essere parte delle plasmacellule CD45+ bright. Per tanto, allo stato attuale, il ruolo prognostico di CD45, va ulteriormente chiarito. Dunque, in conclusione, questo studio, ha dimostrato che l'immunofenotipo CD28+/CD117-, come anche l'espressione del CD19, consentono di identificare i pazienti affetti da MM con maggior rischio di

progressione e sopravvivenza più breve. [24]

Per quanto riguarda le associazioni immunofenotipo-genotipo, oltre a quelle già citate, sono state riscontrate anche quelle tra t(11,14) e CD20+ o con CD56-. Comunque, tutte le associazioni, non sono abbastanza forti da poter considerare la MFC uno strumento rapido di screening delle anomalie genetiche del MM, al punto da poter sostituire la citogenetica. [19]

3.5 Ulteriori applicazioni della citofluorimetria multiparametrica

Negli ultimi dieci anni, particolare attenzione è stata rivolta al ruolo giocato dal microambiente midollare nella malattia, nella sua progressione e aggressività. L'adesione delle plasmacellule mielomatose allo stroma midollare, infatti, conferirebbe, mediante la secrezione di citochine, una resistenza farmacologica adesione-indotta e favorirebbe crescita, sopravvivenza, osteoclastogenesi e neoangiogenesi. Per questo, la caratterizzazione immunofenotipica per mezzo della MFC, avrebbe un ruolo cruciale, in quanto consentirebbe di identificare sia i marker coinvolti nell'interazione neoplasia-stroma midollare, come CD54 (ICAM-1), CD44, VLA-4, sia potenziali target terapeutici espressi sulle cellule mielomatose, permettendo lo sviluppo di terapie "su misura", a base di anticorpi

monoclonali. [19]

Infatti, di recente, è stato intrapreso il primo studio clinico su uno di essi: CD69, una proteina membranale, il cui ligando e la cui funzione immunologica restano ancora misteriosi. Si tratterebbe di un marker di attivazione, espresso rapidamente dai linfociti T dopo attivazione del TCR, ma che potrebbe avere un ruolo anche nel MM. Infatti pare che cellule tumorali murine, con le stesse caratteristiche di resistenza al bortezomib di certe plasmacellule mielomatose, abbiano dimostrato di avere immunofenotipo simile a quello dei linfociti B dei centri germinativi, inclusa una bassa/assente espressione di CD69. Probabilmente, l'attivazione di CD69 inibisce la sfingosina 1-fosfato (S1P), lisofosfolipide bioattivo per il quale le cellule di MM esprimono tre recettori S1P (1,2,3) il legame tra S1P e i suoi recettori fornisce protezione dall'apoptosi desammetazione indotta. Di conseguenza, la perdita del CD69, costituirebbe una base biologica di farmacoresistenza. Queste ipotesi è stata confermata nel suddetto studio, ad opera di Buda et al, che nel 2014 hanno analizzato l'espressione di CD69 sulle plasmacellule patologiche di 43 pazienti, di cui 22 con MM resistente/refrattario ad almeno due regimi chemioterapici includenti bortezomib, e 21 con SMM o MM in VGPR dopo trattamento di prima linea. CD69 è stato riscontrato in 19 pazienti su 43 (44%), e in particolare, 6 (27%) appartenenti al gruppo dei MM refrattari/resistenti e 13 (62%) al secondo gruppo. Questi dati preliminari suggeriscono che il marker CD69 possa avere un ruolo importante come fattore

prognostico nei pazienti affetti da MM, sottoposti alle più moderne terapie. [25]

Infine, la MFC ha trovato un crescente interesse anche nella determinazione del tasso di proliferazione della popolazione neoplastica (labeling index), determinato solitamente con immunisto chimica (ricerca di ki67), marcatura dei nuclei in replicazione con 5-bromo-2'-deossiuridina (BrdU) o timidina, ricerca delle cellule nella fase S del ciclo cellulare attraverso semplici colorazioni per il DNA.

In MFC, le cellule devono essere fissate e marcate con un colorante che lega stechiometricamente il Dna, come lo ioduro di propidio, rosso fluorescente, o il 4',6'-diamino-2'-fenilindolo (DAPI), blu fluorescente; è disponibile un software sofisticato, in grado di determinare la frazione di cellule in fase S. [20].

4. Correlazione tra dati istologici e profili immunofenotipici nel Mieloma Multiplo, post-terapia

Nell'ultimo ventennio, l'utilizzo della citofluorimetria nella gestione dei disordini plasmacellulari ha incontrato non poca riluttanza, e, storicamente, tale diffidenza va attribuita alla mancanza di marker plasmacellulari specifici e alle basse percentuali di plasmacellule rintracciabili con l'indagine citofluorimetrica. L'esame, infatti, che predilige la parte fluida dei campioni, va condotto su sangue midollare, ottenuto da mieloaspirato e comporta un'enumerazione delle plasmacellule che è costantemente inferiore a quella dell'esame microscopico. Questo fenomeno è spiegato da due particolari aspetti: la tendenza delle plasmacellule a clusterizzare e la loro caratteristica associazione alla componente adiposa del midollo.

Le difficoltà che la citofluorimetria ha incontrato nell'affermarsi sono state provocate anche dall'eventuale eccessiva emodiluizione dei campioni (quando il volume aspirato > 1ml). Attualmente, molti progressi sono stati fatti e la MFC ha avuto una crescente approvazione. Le ragioni sono diverse: la rapidità di analisi di grandi quantità di cellule e la capacità di discriminare chiaramente tra plasmacellule normali e patologiche, anche quando presenti in maniera esigua nel

campione, ne fanno un mezzo più vantaggioso rispetto agli approcci morfologici, immunoistochimici convenzionali e molecolari (che rintracciano specifici marker genetici e non la singola cellula), soprattutto nella definizione della risposta al trattamento e nella ricerca della malattia minima residua.

Le abilità della citofluorimetria sono state riconosciute, già a partire dal 2008, dall'EMN [18], e successivamente, ampiamente confermate in diversi studi.

Carulli et al hanno valutato anche il possibile uso della MFC nel predire la diagnosi differenziale tra MGUS e MM, in uno studio a doppio cieco, condotto su cento pazienti alla loro prima valutazione per gammopatia monoclonale. L'analisi citofluorimetrica a 5- 6 colori è stata condotta secondo le raccomandazioni dell'EMN, considerando il cut-off del 3% di plasmacellule normali per differenziare MGUS da MM. Il risultato ottenuto dalla MFC è stato confrontato con la diagnosi clinica finale, stabilita secondo i criteri dell'IMWG [7], in cui l'analisi citofluorimetrica non è contemplata: un'errata diagnosi si è verificata solo nel 4% dei casi, valore percentuale peraltro vicino a quello dei casi per cui la biopsia non è stata dirimente (3,8%). [26]

Inoltre, tra gli altri vantaggi della MFC, vi sono certamente la capacità di predire il rischio di progressione di una MGUS in MM [23], di procurare informazioni prognostiche e di valutare la presenza di malattia residua[24], in tempi decisamente rapidi. Inoltre, in futuro, le sue potenzialità potranno ulteriormente essere sfruttate, si pensi, ad esempio, al suo utilizzo come mezzo di ricerca per

nuove strategie terapeutiche o di calcolo del labeling index [19] [20].

Per tanto, non sorprende che L'EMN abbia deciso di emanare delle raccomandazioni sull'utilizzo della MFC nelle gammopatie monoclonali e su come applicarla di routine nella diagnostica di laboratorio.

Per contro, è altrettanto vero che la MFC ha dei limiti quantitativi nella valutazione dei campioni midollari, conseguenti, come già ribadito, sia alla perdita fisica, inevitabile, delle plasmacellule che alla diluizione con sangue periferico. Per di più, un attenta revisione della letteratura ha mostrato discrepanze nella definizione dell'immunofenotipo normale vs patologico delle plasmacellule, una controversia che probabilmente trova spiegazione nella mancanza di standardizzazione del metodo che ha portato a discrepanze nei risultati tra laboratorio e laboratorio (differenti strategie di gating, nei differenti anticorpi monoclonali e/o fluorocromi utilizzati, nelle analisi multiparametriche vs dei singoli parametri etc.)

In effetti, l'introduzione nella gestione delle gammopatie monoclonali della MFC non ha sicuramente comportato che l'esame morfologico convenzionale venisse in qualche modo accantonato, di fatti resta il gold standard diagnostico, né tanto meno che venisse messa in discussione la sua utilità nella definizione della risposta ai trattamenti e il suo ruolo prognostico. [8]

Ad esempio, nei pazienti con diagnosi di MM, in CR dopo trapianto autologo di cellule staminali, il numero di plasmacellule definito dalla valutazione microscopica convenzionale, rappresenta il primo passo per identificare malattia

residua e costituisce un importante fattore predittivo di progressione. [27]

Alla luce di queste premesse, un confronto tra MFC e istologia risulta utile ed è, per certi versi doveroso, dal momento che, ad oggi, esse si sono dimostrate complementari: la prima pecca quantitativamente, la seconda, qualitativamente, nel riconoscimento e nella discriminazione delle plasmacellule. Se in futuro, col miglioramento della tecnica, MFC si dovesse dimostrare migliore o comunque sovrapponibile all'istologia a scopo sia diagnostico che prognostico, indubbiamente essa comporterebbe una maggiore rapidità di gestione delle gammopatie monoclonali, specie del MM, ed anche una minore invasività per il paziente.

In questo lavoro di tesi, sono stati messi a confronto i profili immunofenotipici e i referti istologici di 78 pazienti affetti da Mieloma Multiplo, osservati presso l'U.O Ematologia dell'Ospedale Santa Chiara di Pisa, nel corso degli anni 2013 e 2014, in almeno un'occasione dopo la fine del trattamento.

La comparazione tra i due esami, eseguiti nello stesso periodo di osservazione del paziente, è stata effettuata con lo scopo di stabilirne l'eventuale concordanza o discordanza nella valutazione della risposta al trattamento.

4.1 Materiali e metodi

I pazienti

Al fine di verificare la relazione tra metodica citofluorimetrica ed esame istologico nella definizione della risposta terapeutica, sono stati esclusi tutti i pazienti con diagnosi di MGUS, Smouldering Myeloma, gammopatia IgM, malattia di Waldstrom, Amiloidosi AL, linfoma linfoplasmocitico, nonché tutti i casi di MM alla diagnosi. Dunque, l'analisi ha coinvolto 78 pazienti con diagnosi di MM, 43 maschi (55,15%) e 35 femmine (44,85%) di età compresa tra i 45 e gli 84 anni.

In base all'isotipo di diagnosi, in questi 78 pazienti si identificano 35 casi di MM IgG kappa, 19 casi di MM IgG lambda, 5 casi di MM IgA kappa, 7 casi di MM IgA lambda, 6 casi di MM micromolecolare lambda, 3 di MM micromolecolare kappa, 1 caso di MM IgD kappa, 1 MM con localizzazione ossea e 1 MM non secernente.

Alcuni pazienti dispongono di più di un controllo, per un numero globale di controlli pari a 92.

Questi, ai fini dell'analisi, sono stati suddivisi in 3 gruppi in base al trattamento ricevuto dai rispettivi pazienti ovvero la sola chemioterapia (Gruppo CT), la chemioterapia ad alte dosi seguita da trapianto autologo di cellule staminali (Gruppo HDT-ASCT *High Dose Therapy-Autologous Stem Cell Transplant*), ed infine il trapianto di cellule staminali eterologhe o trapianto allogenico, da donatore HLA-compatibile (Gruppo Allo-SCT *Allogenic Stem Cell transplant*). Per ogni

gruppo il numero dei controlli è superiore al numero dei pazienti, poiché per alcuni di essi è disponibile anche un secondo controllo.

Quindi, rispettivamente, il primo gruppo, "CT", consta di 38 controlli appartenenti a 31 pazienti, 15 maschi e 16 femmine di età compresa tra i 54-84 anni; il secondo gruppo, "HDT-ASCT", comprende 49 controlli, nello specifico 43 pazienti, 26 maschi e 17 femmine, tra i 45 e i 73 anni; infine, l'ultimo gruppo, "Allo-SCT", è costituito da soli 5 controlli, inerenti 4 pazienti, 2 maschi e 2 femmine, tra i 55 e i 67 anni. Tutti i pazienti hanno eseguito simultaneamente un aspirato midollare per effettuare l'analisi dell'immunofenotipo, e una biopsia osteomidollare per l'esame morfologico.

Per quanto riguarda le strategie terapeutiche, nel gruppo CT, la strategia chemioterapica effettuata prima di ogni controllo è stata: in 21 casi VTD (Velcade®, Thalidomide, Desametasone), in 3 casi VD (Velcade®, Desametasone), in 2 casi VMP (Velcade®, Melphalan, Prednisone), in 2 VDM (Velcade®, Desametasone, Melphalan), in 2 RMD (Revlimid®, Melphalan, Desametasone), in 2 Cybordex o VDC (Velcade®,Desametasone, Ciclofosfamide), e in 1 caso rispettivamente è stata VAD (Velcade®, Adriamicina, Desametasone), o BVD (Bendamustina, Velcade®, Desametasone), o VDT- PACE (Cisplatino, Adriamicina, Ciclofosfamide, Etoposide), o LD (Lenalidomide, Desametasone), o MPT (Melphalan, Prednisone, Thalidomide), o Bortezomib con LBH (Panobinostat).

Nel gruppo dei pazienti sottoposti a trapianto autologo, esso è stato preceduto in

26 casi da VTD, in 10 casi da RMD, in 5 da VDM, in 2 da TADEx (Thalidomide, Desametasone), in 2 da LD, in 2 da DAV e in 1 caso o da VM o da VTD-PACE.

Nel gruppo dei pazienti sottoposti a trapianto allogenico, questo è stato preceduto in 2 casi da RMD, in 1 caso da DAV e in un altro caso da TADEx. Non sono disponibili dati circa il regime chemioterapico pre-trapianto ricevuto da uno dei pazienti di questo gruppo, in quanto è stato effettuato in altra sede.

Per ogni gruppo è stato stimato il lasso di tempo intercorrente tra la fine dei trattamenti e i controlli (“timing”), al fine di definire o rivalutare la risposta ad essi.

Il timing è risultato in media di 6 mesi e 12 giorni per il gruppo “CT”, di 20 mesi e 11 giorni per il gruppo “HDT-ASCT”, e di 51 mesi e 18 giorni per il gruppo “Allo-SCT”. Considerando tutti i gruppi, il timing medio stimato è di 16 mesi e 9 giorni.

Le caratteristiche dei pazienti coinvolti nell’analisi e il timing sono riassunti in tabella 4.1, mentre le terapie da essi effettuate sono riassunti in tabella 4.2.

	Gruppo CT	Gruppo HDT-ASCT	Gruppo Allo-SCT	Totale
<i>Numero di controlli</i>	38 (41,3)	49 (53,3)	5 (5,4)	92
<i>Numero di pazienti</i>	31 (39,7)	43 (55,15)	4 (5,15)	78
<i>Sesso</i>	15 ♂ (49) 16 ♀ (51)	26♂ (60,5) 17♀ (39,5)	2♂ (50) 2♀ (50)	43♂ (55,15) 35♀ (44,85)
<i>Età al controllo, in anni (range)</i>	54-84	45-73	55-67	45-84
<i>“Timing” (media)</i>	6 mesi, 12gg	20 mesi, 11gg	51 mesi, 18gg	16 mesi, 9gg

Tabella 4.1: Controlli e caratteristiche dei pazienti di ciascun gruppo. Tra parentesi sono indicate le percentuali.

STRATEGIA CHEMIOTERAPICA	Gruppo "CT"	Gruppo "HDT-ASCT"	Gruppo "Allo-SCT"
VTD	21	26	0
VD	3	0	0
VMP	2	0	0
VDM	2	5	0
RMD	2	10	2
CyBorDex	2	0	0
VAD	1	2	1
BVD	1	0	0
VDT-PACE	1	1	0
LD	1	2	0
MPT	1	0	0
Bortezomib + LBH	1	0	0
VM	0	1	0
TADEX	0	2	1
ND (altra sede)	–	–	1
Totale	38	49	5

Tabella 4.2: Ultima strategia chemioterapica intrapresa dai pazienti dei tre gruppi, prima dell'osservazione. Nel primo gruppo si tratta dell'unica terapia eseguita, negli altri due ha preceduto rispettivamente autotrapianto e trapianto allogenico. V Velcade®, T Thalidomide, D Desametasone, M Melphalan, P Prednisone, R Revlimid®, B Bendamustina, CyBorDex Ciclofosfamide, Bortezomib, Desametasone, A Adriamicina, PACE CisPlatino Adriamicina Ciclofosfamide Etoposide, L Lenalidomide, TADEX Talidomide Desametasone, LBH Panobinostat.

Biopsia osteomidollare

I campioni ottenuti dalla biopsia osteomidollare sono stati fissati con il reagente A Myelodec® (Bio-Optica) per 2 ore, e decalcificati in EDTA per 2 giorni, quindi, inclusi in paraffina e tagliati in sezioni di 3-5 µm. La valutazione morfologica è stata effettuata su sezioni colorate con ematossilina-eosina, Geimsa e colorazioni per la trama reticolinica. Le indagini immunohistochimiche sono state eseguite in tutti i casi con un sistema a base di perossidasi, utilizzando anticorpi specifici per CD138, MUM1/IRF4, CD20, PAX5, ciclina D1 e catene leggere intracitoplasmatiche k e λ.

L'esame istologico consente di definire la risposta al trattamento come indicato

inizialmente dai criteri EBMT (in cui la risposta completa, CR, include negatività dell'immunofissazione sierica e urinaria, e una percentuale di plasmacellule midollari <5%) e successivamente dall'IMWG (fig. 1.11), che ha introdotto la risposta completa stringente, sCR, la quale richiede di escludere anche la natura clonale delle plasmacellule midollari. [8]

Tipizzazione citofluorimetrica dei campioni di mieloaspirato

Lo studio citofluorimetrico è stato eseguito mediante un citofluorimetro FacsCanto II, equipaggiato con tre laser (405, 408 e 633 nm) e assistito dal software FacsDiva, applicando un metodo a cinque o sei colori.

I campioni di sangue midollare sono stati ottenuti mediante mieloaspirato e raccolti in provette "vacuum" contenenti EDTA.

Aliquote (50 µl) del sangue midollare sono state incubate in provette contenenti miscele di anticorpi monoclonali o policlonali, specifici per gli antigeni espressi dalle plasmacellule e per le catene leggere delle immunoglobuline (catene leggere intracitoplasmatiche K e λ ; cyK e cy λ). Successivamente sono stati coniugati con fluorocromi compatibili con il citofluorimetro impiegato.

Le combinazioni di anticorpi sono state designate per distinguere tra plasmacellule normali e patologiche, per mezzo sia dell'espressione aberrante di certi marker (espressione asincrona del CD19, CD20 e/o CD45) sia dell'espressione di altri marker ad elevati livelli (iperespressione di CD56 e/o CD117).

Per gli antigeni di membrane sono stati impiegati anticorpi monoclonali (Becton and Dickinson). Per le catene leggere intracitoplasmatiche, κ e λ , sono stati impiegati anticorpi policlonali "fabbrati" [F(ab')₂] di coniglio, prodotti dalla Dako.

Pertanto, sono stati allestiti 4 tubi contenenti i seguenti pannelli anticorpali:

tubo 1: CD45/APC-Cy.7, CD19/PE-Cy.7, CD138/FITC, CD38/PE, CD27/APC;

tubo 2: CD45/APC-Cy.7, CD19/PE-Cy.7, CD138/FITC, CD38/PE, CD20/PerCP-Cy5.5, CD117/APC;

tubo 3: CD45/APC-Cy.7, CD19/PE-Cy.7, CD138/FITC, CD38/PE, CD56/APC;

tubo 4: CD45/APC-Cy.7, CD19/PE-Cy.7, CD138/PerCP.Cy5.5, CD38/APC, cyK/FITC, cy λ /PE.

Per quanto riguarda i primi tre tubi, è stata impiegata una metodica lyse-no-wash, al fine di eliminare le emazie. Dopo incubazione per 20 minuti al buio, è stata eseguita la lisi degli eritrociti mediante NH₄Cl (5 minuti a 4°C), quindi si è proceduto con l'acquisizione al citofluorimetro. Per il tubo 4 è stato necessario procedere con una metodica di marcatura intracitoplasmatica ed è stato usato il kit Fix & Perm, seguendo le istruzioni del produttore: dopo la marcatura degli antigeni di membrana (CD19, CD45, CD138, CD38), si è impiegato il fissativo del kit e sono stati eseguiti due lavaggi con PBS. Il pellet ottenuto è stato trattato con l'agente permeabilizzante e con gli anticorpi policlonali diretti contro le catene leggere intracitoplasmatiche κ e λ .

Dopo le procedure di marcatura e lisi eritrocitaria, i campioni sono stati processati

acquisendo 500.000 eventi per tubo. E' stato considerato come tecnicamente valido un cluster di plasmacellule ≥ 50 eventi/tubo. Pertanto, la sensibilità del metodo è risultata pari a 10^{-4} (ovvero una plasmacellule su 10.000 eventi).

L'analisi dei campioni ha previsto una strategia di gate sequenziale.

Il primo gate elettronico ha compreso tutti gli eventi con bassi valori di SSC, come previsto per le plasmacellule (fig. 4.1 A). Il secondo gate è stato posizionato per includere tutti gli eventi identificabili come plasmacellule, in quanto capaci di co-esprimere CD138 e CD38 (fig. 4.1 B).

Le plasmacellule sono state definite come normali dal punto di vista immunofenotipico quando positive per CD19 e CD45 (fig. 4.1 C), e policlonali (fig. 4.1 E), ovvero con rapporto $cyK/cy\lambda$ compreso nel range 1-2.5. Esse, inoltre, risultano anche CD27+ (fig. 4.1D), CD56-, CD117- CD20- o iposespresso.

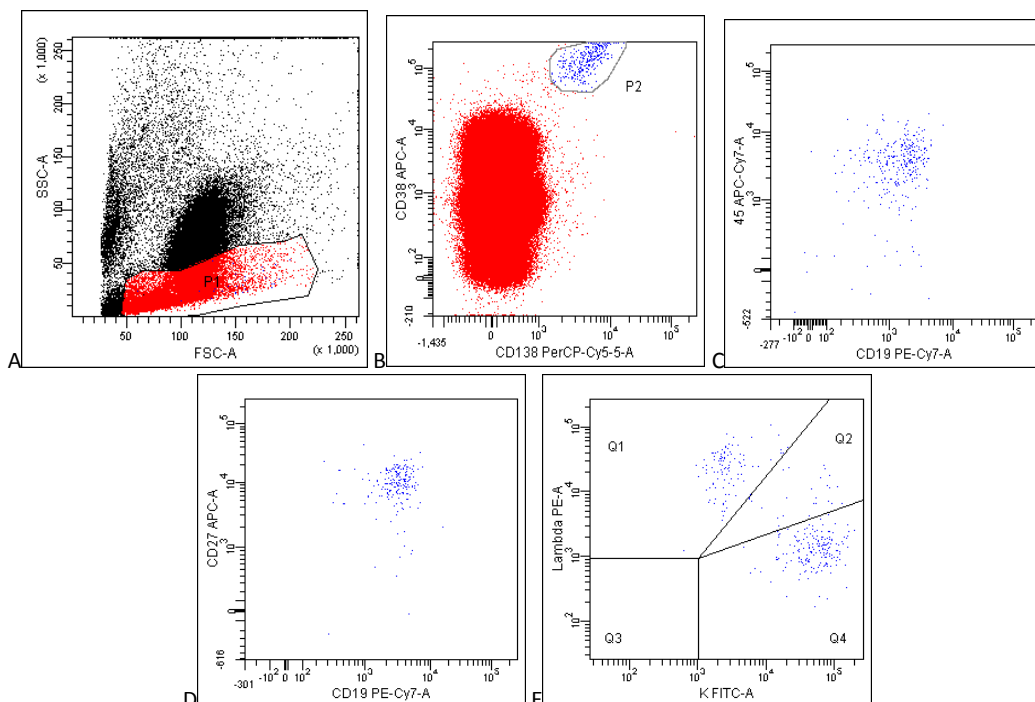


Figura 4.1: Esempio di campione con plasmacellule immunofenotipicamente normali. Rapporto $cyK/cy\lambda$: 1.7.

Le plasmacellule sono state definite come immunofenotipicamente anomale quando hanno manifestato un eccesso clonale (ovvero con rapporto $cyK/cy\lambda < 1$ o > 2.5) oppure una completa restrizione per una delle due catene leggere intracitoplasmatiche, indipendentemente dall'espressione dei marcatori aggiuntivi (fig. 4.2 C e D). Quindi, campioni con una popolazione plasmacellulare costituita esclusivamente da plasmacellule con fenotipo normale sono stati considerati come campioni privi di localizzazione midollare di malattia. Al contrario, la presenza di cloni plasmacellulari con eccesso clonale o con restrizione clonale è stata considerata come localizzazione di malattia (fig. 4.2 C e fig. 4.3).

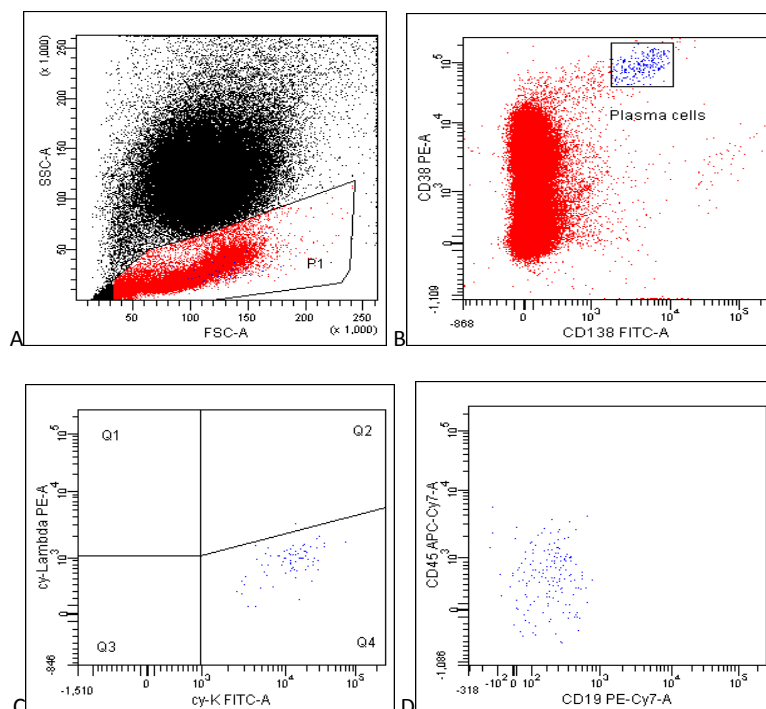


Figura: 4.2 Esempio di plasmacellule con restrizione clonale. Minima infiltrazione (0.044%) da parte di plasmacellule con restrizione clonale K.

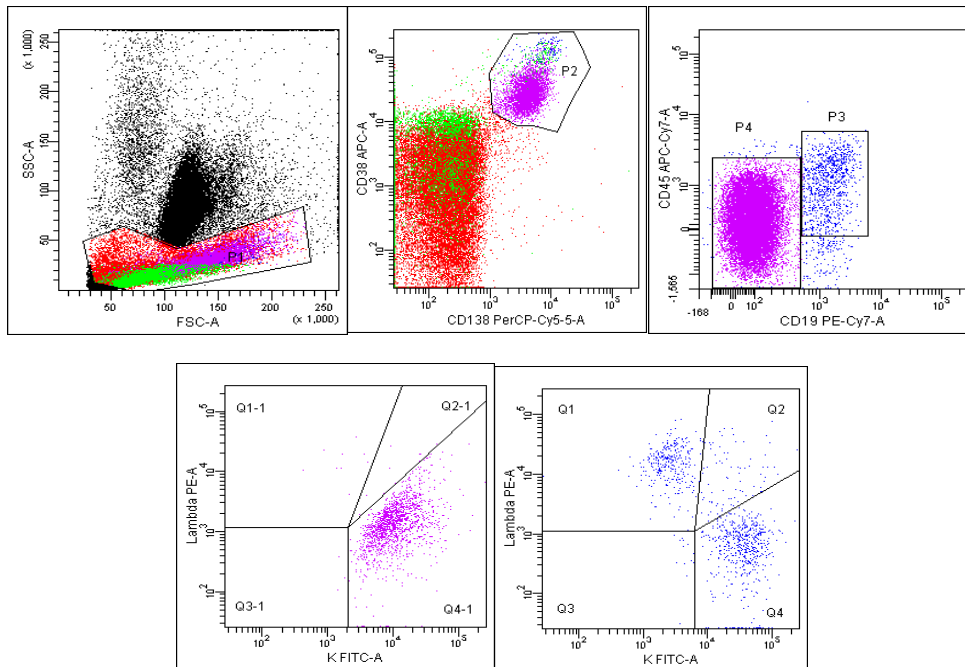


Figura 4.3: Un caso di mieloma con presenza di una popolazione di plasmacellule normali (P3) con rapporto k/λ 1:8, e di un clone patologico con restrizione clonale K (P4).

4.2 Valutazione della risposta al trattamento

La fase successiva del lavoro è consistita nel definire la risposta al trattamento per ogni controllo disponibile, nel rispetto dei criteri standard dell'IMWG. [7] [8]

In generale, stando ad essi, sono state ottenute 21 RC, 19 VGPR, 14 PR, 10 SD, 5PD e 23 recidive.

In tabella 4.3 sono mostrate nel dettaglio le risposte ottenute nei tre gruppi di trattamento.

Per quanto riguarda, invece, l'analisi citofluorimetrica, la CR è stata definita quando la percentuale di plasmacellule patologiche è risultata $< 0,01\%$ ovvero una popolazione plasmacellulare completamente policlonale, mentre, è stata identificata

la persistenza di malattia, indipendentemente dalla risposta clinica, ogni qualvolta l'analisi ha riscontrato la presenza di una popolazione plasmacellulare con fenotipo anomalo e restrizione clonale, enumerabile cioè > 0,01% (compresenza di un clone patologico e di un clone normale) fino al 100% (intera popolazione plasmacellulare patologica).

	Gruppo "CT"	Gruppo "HDT-ASCT"	Gruppo "Allo-SCT"
CR	7 (18,4)	13 (26,5)	1 (20)
VGPR	6 (15,8)	10 (20,4)	3 (60)
PR	8 (21,1)	6 (12,2)	—
SD	9 (23,7)	1 (2,1)	—
PD	1 (2,6)	4 (8,2)	—
Relapsed MM	7 (18,4)	15 (30,6)	1 (20)
Totale	38	49	5

Tabella 4.3: Risposte ottenute nei singoli gruppi di trattamento. Tra parentesi è indicato il valore percentuale (RR).

4.3 Analisi dei dati istologici e immunofenotipici

Innanzitutto, è stata confrontata la % di infiltrazione plasmacellulare alla biopsia osteomidollare con la % di plasmacellule totali rilevata mediante citofluorimetria.

Nel gruppo di 38 controlli appartenenti ai pazienti a cui è stato riservato esclusi-

vamente un trattamento chemioterapico (gruppo CT), la biopsia osteomidollare ha riscontrato una infiltrazione plasmacellulare media del 15,24% (SD= 17,88) (fig 4.4), mentre la citometria ha rintracciato una percentuale media di plasmacellule pari al 3,04% (SD= 5,54) (fig. 4.5).

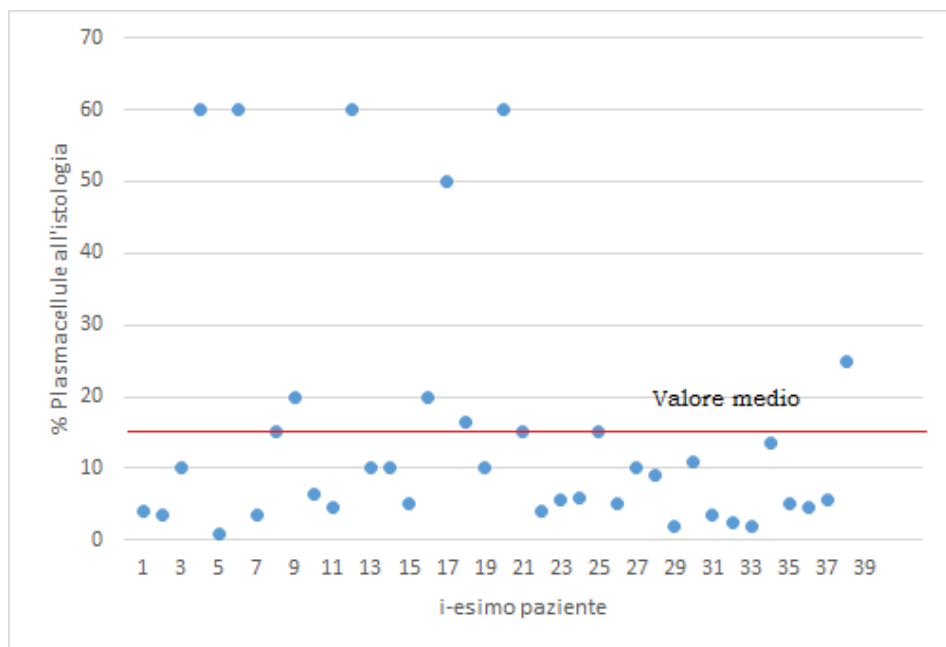


Figura 4.4: Percentuale di infiltrazione midollare, stabilita dall'esame istologico, per ciascuno dei controlli appartenenti ai pazienti del gruppo CT. La linea rossa indica il valore medio.

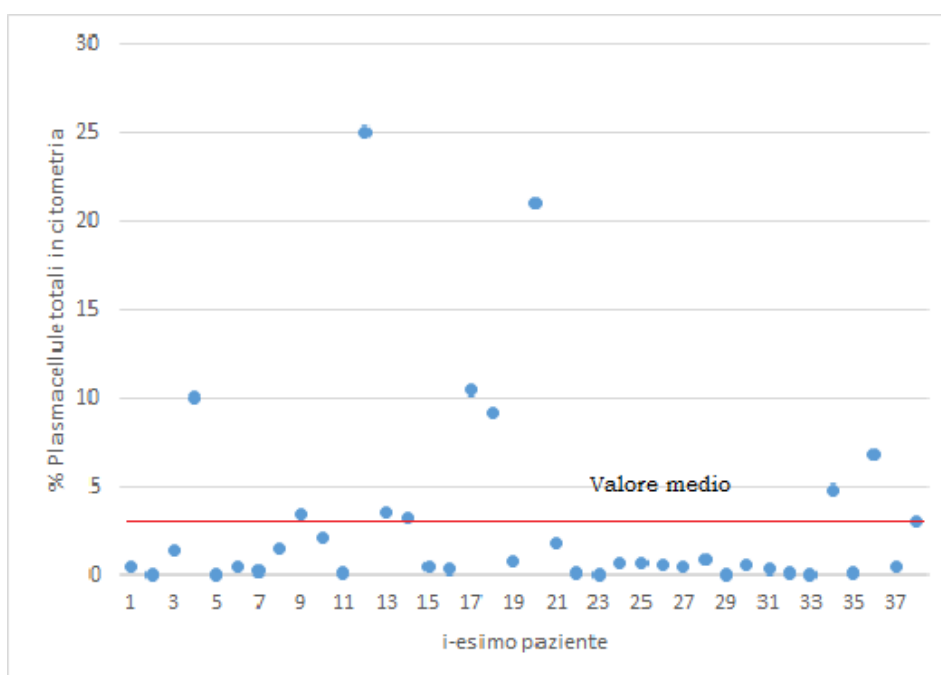


Figura 4.5: Percentuali di plasmacellule rintracciate dall'analisi citofluorimetrica per ciascuno dei controlli appartenenti ai pazienti del gruppo CT. La linea rossa indica il valore medio.

Nel secondo gruppo, di 49 controlli, in cui sono stati annoverati i pazienti sottoposti a trapianto autologo di cellule staminali (gruppo HDT-ASCT), la percentuale media di infiltrazione midollare riscontrata all'esame istologico è del 14,91% (SD= 21,38) (fig. 4.6). L'analisi citofluorimetrica, invece, ha rintracciato in media il 2,33% di plasmacellule (SD= 3,87) (fig. 4.7).

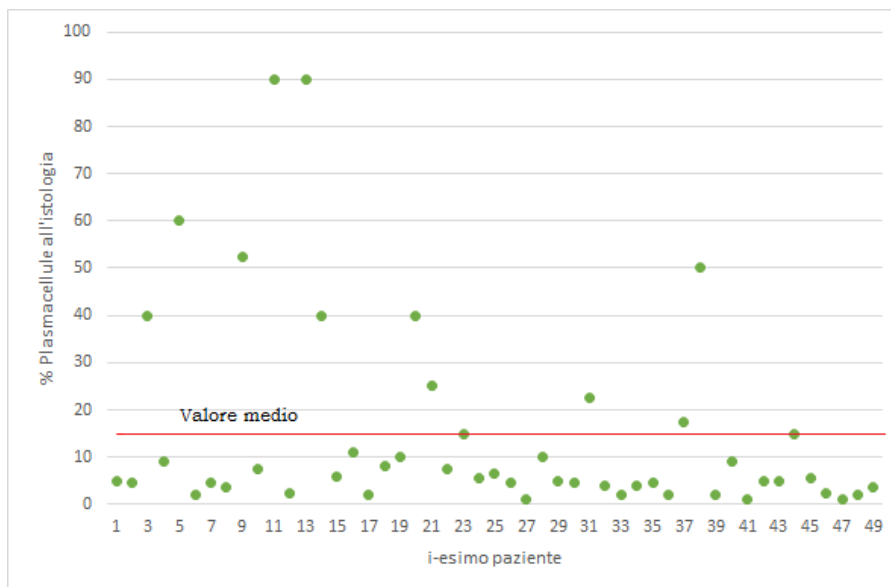


Figura 4.6: Percentuale di infiltrazione midollare all'istologia per ciascuno dei controlli appartenenti ai pazienti del gruppo HDT-ASCT. La linea rossa indica il valore medio.

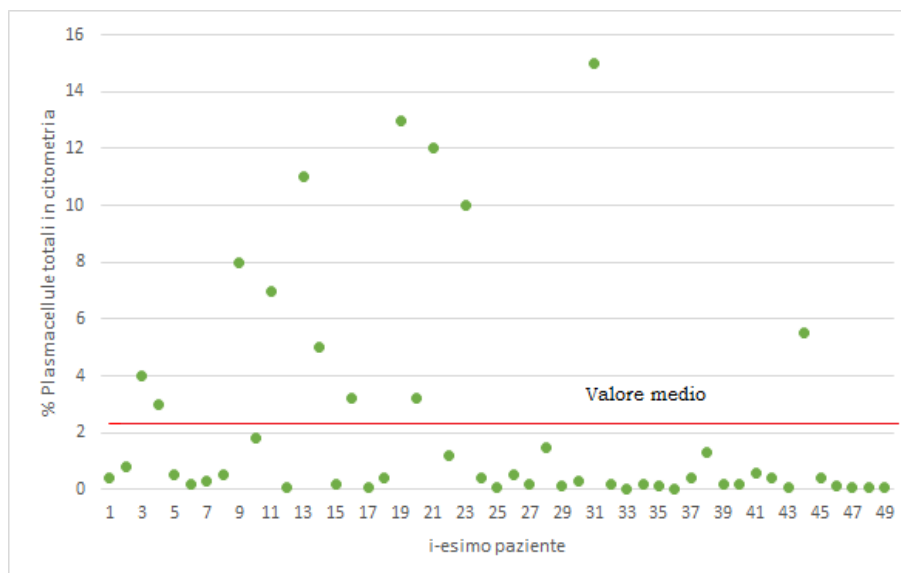


Figura 4.7: Percentuali di plasmacellule rintracciate dall'analisi citofluorimetrica per ciascuno dei controlli appartenenti ai pazienti del gruppo HDT-ASCT. La linea rossa indica il valore medio.

Infine, nell'ultimo gruppo di controlli, riguardante i pazienti sottoposti a trapianto allogenico (gruppo Allo-SCT), la biopsia osteomidollare ha riportato una percentuale media di infiltrazione midollare del 5,4% (SD= 3,45) (fig. 4.8), mentre la citometria ha individuato una percentuale media di plasmacellule pari al 1,07% (SD= 1,35) (fig. 4.9).

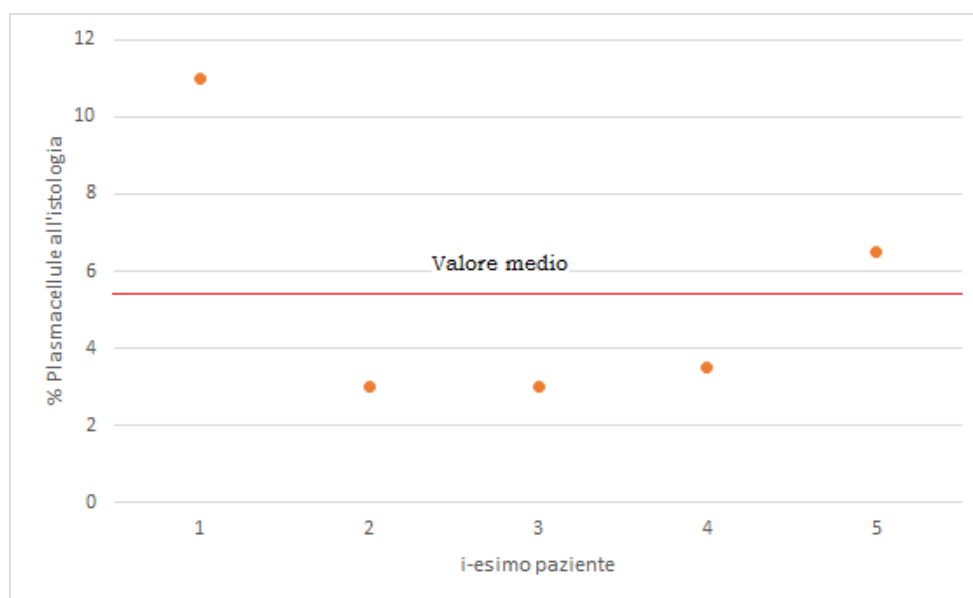


Figura 4.8: Percentuali di infiltrazione midollare secondo l'istologia per ciascuno dei controlli appartenenti a pazienti del gruppo Allo-SCT. In rosso il valore medio.

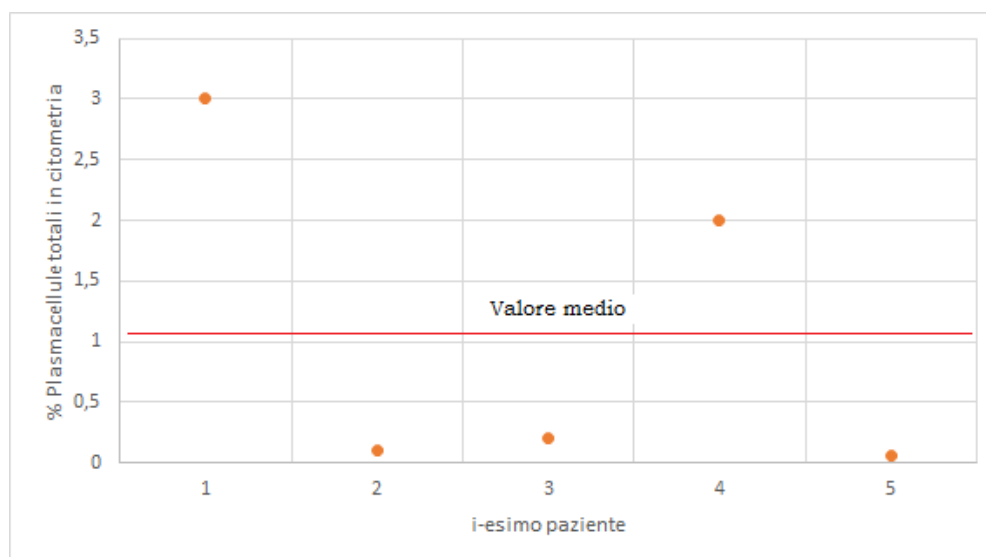


Figura 4.9: Percentuali di plasmacellule rintracciate dalla citofluorimetria per ciascuno dei controlli appartenenti ai pazienti del gruppo Allo-SCT. In rosso il valore medio.

In tabella 4.4 sono riassunti i valori medi, con deviazione standard “SD”, delle % di plasmacellule identificate in istologia e di quelle enumerate in citometria, in base al gruppo di trattamento.

Gruppo di pazienti	% Plasmacellule alla BOM		% Plasmacellule in citometria	
	MEDIA	SD	MEDIA	SD
“CT”	15,24%	17,88	3,04%	5,54
“HDT-ASCT”	14,91%	21,38	2,33%	3,87
“Allo-SCT”	5,4%	3,45	1,07%	1,35

Tabella 4.4 Valore medio (in percentuale) di plasmacellule alla biopsia e in citometria, con rispettive deviazioni standard “SD”, per ciascuno dei tre gruppi di trattamento.

Sebbene i valori della percentuale media di plasmacellule, enumerate con l’una o l’altra tecnica, si mostrino molto diversi in virtù della disparità del materiale biologico adoperato (biopsia vs mieloaspirato), è possibile constatare che entrambe le tecniche sono in accordo nell’attribuire una percentuale di plasmacellule maggiore (15,24% e 3,04%) al gruppo “CT”, intermedia al gruppo “HDT-ASCT” (14,91% e 2,33%) e minore al gruppo “Allo-SCT” (5,4% e 1,07%).

Successivamente, sono state calcolate le medie con deviazione standard, delle percentuali di plasmacellule anomale enumerate dalla citofluorimetria nei controlli in cui non è stata ottenuta una risposta clinica completa (in cui tale percentuale è pari a zero), suddividendoli per tipologia della risposta (VGPR, PR, SD, PD, relapsed myeloma) (tab 4.5, 4.6, 4.7, 4.8).

TIPO E NUMERO DELLE RISPOSTE DIVERSE DA CR OTTENUTE NEL GRUPPO "CT"		% MEDIA DI PLASMACELELLE CON FENOTIPO ANOMALO IN CITOMETRIA	DEVIATION STANDARD
VGPR	6	0,0026%	0,0065
PR	8	89,5%	9,81
SD	9	99,72%	0,6
PD	1	99%	–
Relapsed MM	7	96,75%	3,18

Tabella 4.5: Controlli del gruppo CT che non hanno ottenuto CR. Media e SD delle plasmacellule anomale in citometria per tutte le risposte diverse da CR.

TIPO E NUMERO DELLE RISPOSTE DIVERSE DA CR OTTENUTE NEL GRUPPO "HDT-ASCT"		% MEDIA DI PLASMACELELLE CON FENOTIPO ANOMALO IN CITOMETRIA	DEVIATION STANDARD
VGPR	10	19,9%	34,7
PR	6	70,5%	25,45
SD	1	100%	–
PD	4	98%	4
Relapsed MM	15	97,6%	7,74

Tabella 4.6: Controlli del gruppo HDT-ASCT che non hanno ottenuto CR. Media e SD delle plasmacellule anomale in citometria per tutte le risposte diverse da CR.

TIPO E NUMERO DELLE RISPOSTE DIVERSE DA CR OTTENUTE NEL GRUPPO "ALLO-SCT"		% MEDIA DI PLASMACELELLE CON FENOTIPO ANOMALO IN CITOMETRIA	DEVIATION STANDARD
VGPR	3	0%	0
Relapsed MM	1	65%	–

Tabella 4.7: Controlli del gruppo Allo-SCT che non hanno ottenuto CR. Media e SD delle plasmacellule anomale in citometria per tutte le risposte diverse da CR.

TIPO E NUMERO DELLE RISPOSTE DIVERSE DA CR OTTENUTE		% MEDIA DI PLASMACELELLE CON FENOTIPO ANOMALO IN CITOMETRIA	DEVIATION STANDARD
VGPR	19	10,47%	26,58
PR	14	81,36%	19,9
SD	10	99,75%	0,63
PD	5	98,2%	3,49
Relapsed MM	23	95,92%	9,30

Tabella 4.8: Tutti i controlli che non hanno ottenuto CR. Media e SD delle plasmacellule anomale in citometria per tutte le risposte cliniche diverse da CR.

Si nota come, in tutti e tre i gruppi di trattamento, la citometria individui percentuali di plasmacellule patologiche tali da distinguere nettamente la VGPR dalle altre risposte cliniche (PR, SD, PD, Relapsed MM) le cui percentuali, invece sono molto più alte. Questa osservazione evidenzia, come già detto nel capitolo 3, come la citometria sia in grado di discernere in maniera precisa, grazie alla sua notevole sensibilità, l'assenza dalla persistenza di malattia, e, in quest'ultimo caso senza fare discriminazione alcuna tra le risposte cliniche (diverse dalla CR), se non per la VGPR in cui quantifica un numero minore di plasmacellule patologiche.

Quindi, sono stati esaminati i pattern citofluorimetrici ottenuti per i controlli di ciascun gruppo.

Tali pattern possono essere distinti in 3 categorie: pattern con fenotipo plasmacellulare normale (100% delle plasmacellule enumerate normale), pattern con fenotipo plasmacellulare anomalo (100% delle plasmacellule enumerate anomalo) e pattern con fenotipo plasmacellulare misto per la persistenza di un clone cellulare anomalo e di un clone normale.

Nel gruppo dei pazienti trattati esclusivamente con chemioterapia, l'analisi dell'immunofenotipo ha identificato 12 pattern con fenotipo normale, 12 con fenotipo anomalo e 14 con fenotipo misto (fig.4.12).

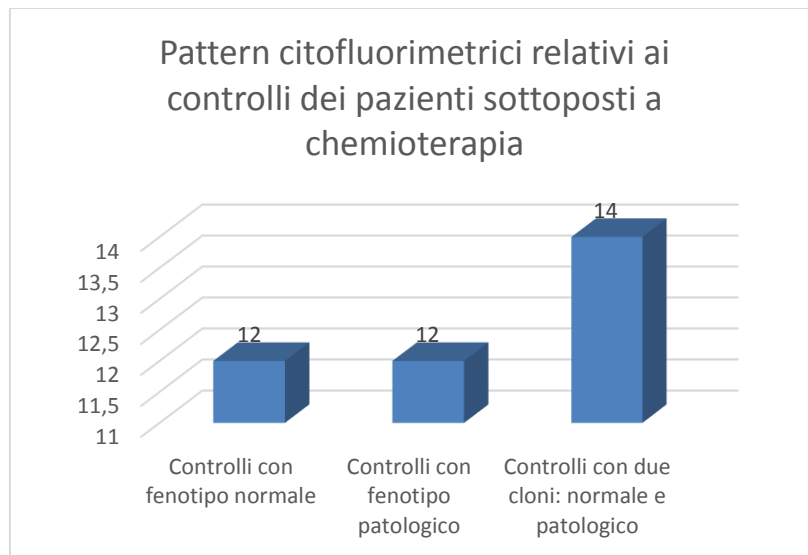


Figura 4.10: Pattern citofluorimetrici del gruppo CT

Nel gruppo dei pazienti sottoposti a trapianto autologo, l'analisi ha individuato 18 pattern con fenotipo normale, 18 con fenotipo anomalo e 13 con fenotipo misto (fig. 4.13).

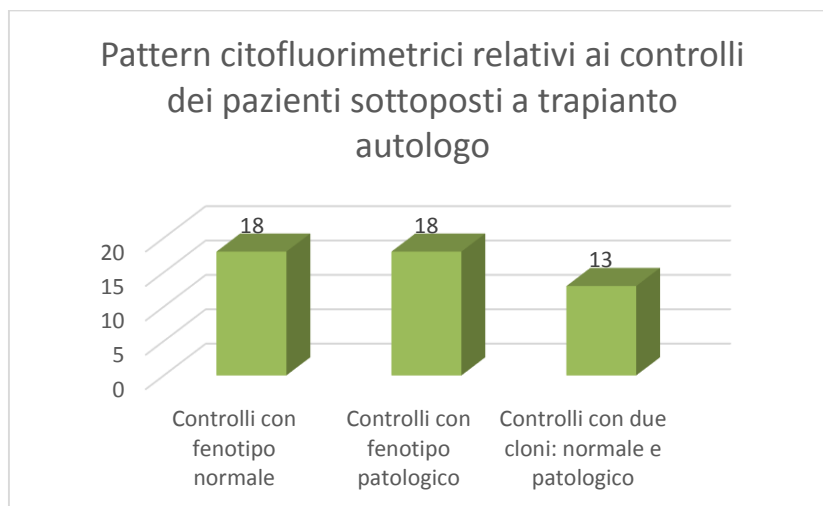


Figura 4.11: Pattern citofluorimetrici del gruppo HDT-ASCT.

Infine, nel gruppo dei pazienti sottoposti a trapianto allogenico sono stati ottenuti 3 pattern immunofenotipici normali, 2 misti e nessun pattern con fenotipo

anomalo (fig. 4.12).

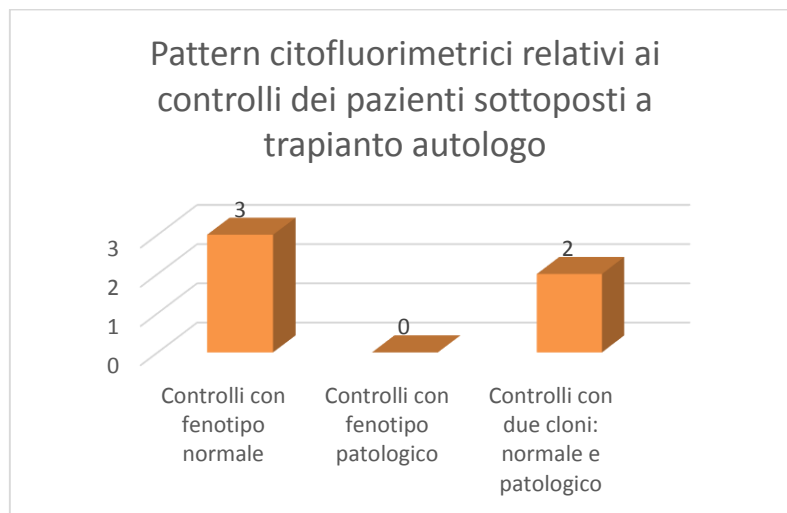


Figura 4.12: Pattern citofluorimetrici del gruppo allo-SCT.

Dunque, globalmente, sono stati ottenuti dall'analisi dell'immunofenotipo 33 pattern con fenotipo normale, 30, con fenotipo patologico e 29 con fenotipo misto (fig. 4.13).

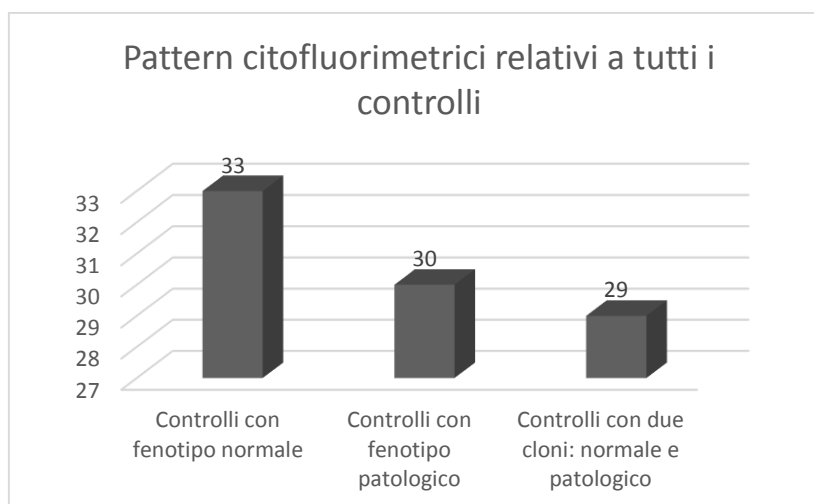


Figura 4.13: Pattern citofluorimetrici di tutte e tre i gruppi di trattamento.

A questo punto, è stata calcolata la % media di plasmacellule patologiche identificate in citometria per i controlli con immunofenotipo misto (29).

Per il gruppo “CT” essa è risultata del 84,98% (SD:25,62), per il gruppo “HDT-ASCT” del 67,54% (SD:29,93), infine per il gruppo “Allo-SCT” dell’81% (SD:22,63).

Considerando tutti i controlli con fenotipo misto e prescindendo dal gruppo di trattamento, la % media di plasmacellule anomale in citometria è risultata del 76,89% (SD:27,96) (fig. 4.14).

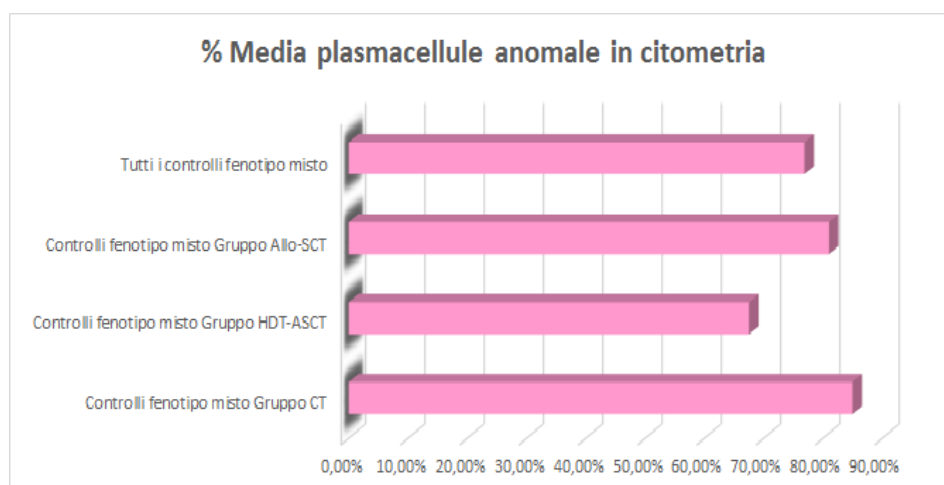


Figura 4.14: Percentuale media di plasmacellule patologiche in citometria per i controlli con fenotipo misto, dei singoli gruppi e globali.

In ultima analisi, è stata valutata la presenza di correlazione lineare tra dati istologici (% plasmacellule enumerate in istologia) e immunofenotipici (% plasmacellule totali enumerate in citometria), calcolando per ogni gruppo il coefficiente di correlazione di Pearson o “r”. Questo coefficiente esprime la forza della relazione lineare tra due variabili. Assume sempre valori compresi tra -1 e 1:

quando è > 0 , le variabili sono “direttamente correlate”, quando è < 0 le variabili sono “inversamente correlate”, se invece è pari a 0 le variabili si dicono “incorrelate” ossia esse sono indipendenti. In pratica quanto più r è vicino a 1, tanto più le due variabili sono direttamente correlate e, inoltre, in tal caso, “ r ” compreso tra 0 e 0,3 indica una correlazione debole, “ r ” compreso tra 0,3 e 0,7 indica una correlazione moderata, mentre “ r ” superiore a 0,7 indica una correlazione forte.

In tutti e tre i gruppi “ r ” si è dimostrato > 0 e nello specifico, rispettivamente, pari a 0,7543 nel gruppo “CT” (fig.4.14), a 0,5187 nel gruppo “HDT-ASCT” (fig. 4.15) e a 0,6612 nel gruppo “Allo-SCT” (fig. 4.16), dimostrando così che le suddette variabili correlano direttamente tra loro, e la loro relazione di linearità è forte nel primo gruppo, moderata negli altri due.

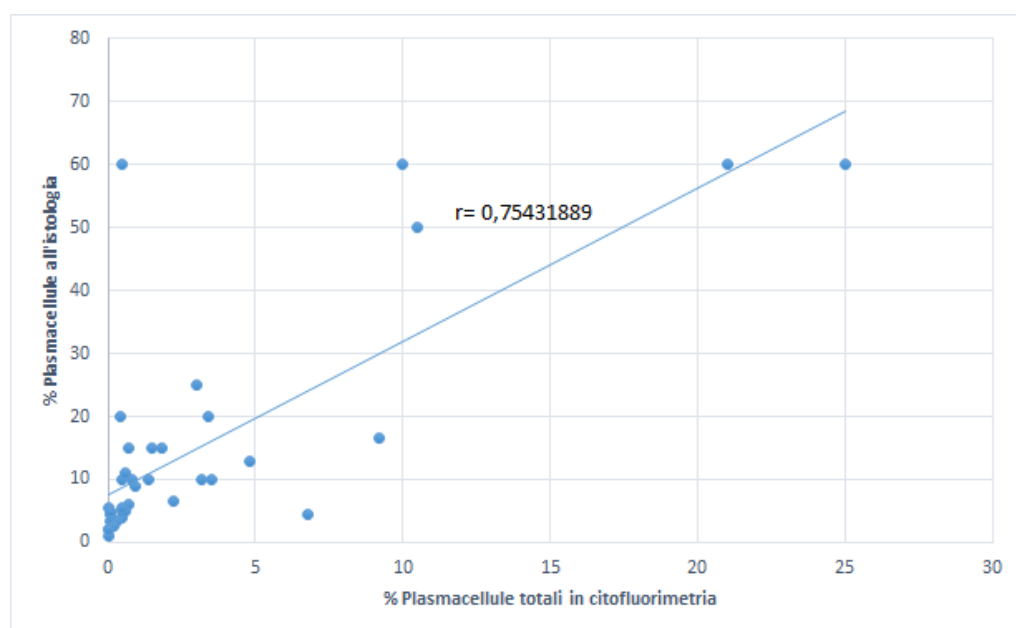


Figura 4.15: Correlazione diretta forte ($r > 0,7$) tra % delle plasmacellule enumerate all'istologia e % delle plasmacellule enumerate in citometria, gruppo CT.

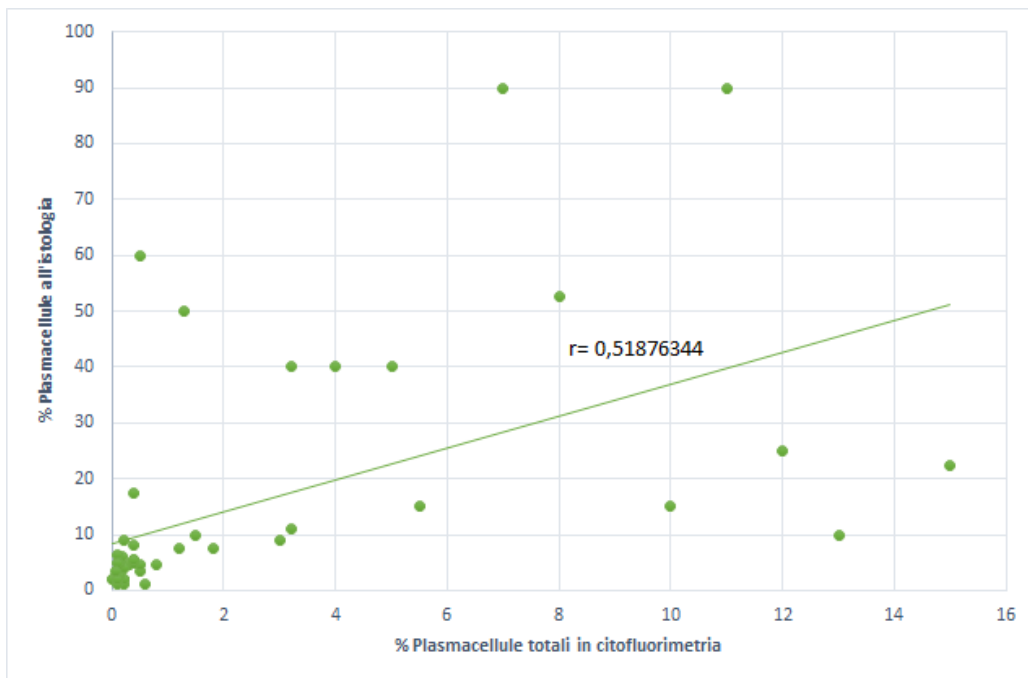


Figura 4.16: Correlazione lineare diretta moderata ($0,3 < r < 0,7$) tra % delle plasmacellule enumerate all'istologia e % delle plasmacellule enumerate in citometria, gruppo HDT-ASCT.

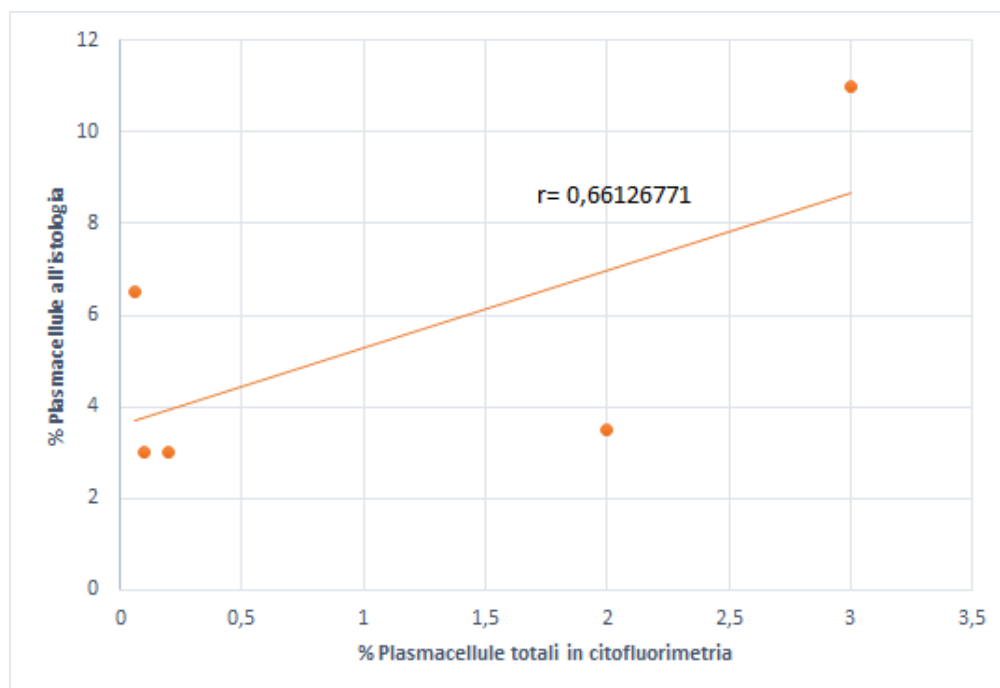


Figura 4.17: Correlazione lineare diretta moderata ($0,3 < r < 0,7$) tra % delle plasmacellule enumerate all'istologia e % delle plasmacellule enumerate in citometria, gruppo Allo-SCT.

4.4 Confronto tra dati istologici e immunofenotipici nei tre gruppi “terapeutici”: risultati

Riassumendo, dall'analisi dei dati raccolti si evince che l'istologia e la citofluorimetria confermano di essere due indagini molto diverse nella qualificazione della risposta al trattamento: la prima permette, assieme alle altre indagini previste dai criteri dell'IMWG, di stratificare le risposte terapeutiche ottenute che a loro volta condizioneranno il follow up e gli eventuali successivi trattamenti del paziente; la seconda, invece, distingue in maniera drastica l'assenza (immunofenotipo normale) dalla persistenza di malattia (immunofenotipo patologico e misto), senza sfumature intermedie, ma con una sensibilità incontrovertibilmente maggiore.

Nonostante tali differenze, si tratta di due indagini direttamente correlate, tra cui è lecito effettuare un confronto.

Pertanto il lavoro di tesi si è concentrato sulla comparazione tra profilo istologico e immunofenotipico, al fine di stabilire una relazione di concordanza o discordanza nella definizione di risposta tra morfologia e citofluorimetria, in primis per ogni controllo, ed infine, in generale per ognuno dei tre gruppi di trattamento.

Dunque, sono stati ottenuti i seguenti risultati: nel primo gruppo di pazienti, sottoposti esclusivamente a chemioterapia, le due metodiche hanno dimostrato

una concordanza del 100%, cioè in tutti e 38 i controlli la risposta terapeutica, desunta sia dall'istologia che dal profilo immunofenotipico, è risultata identica (risposta completa o persistenza di malattia).

Nel gruppo più numeroso, quello dei pazienti trattati con HDT-ASCT, la concordanza è risultata dell'89,9%, in quanto l'esito dei due esami è risultato discordante in 5 controlli su 49.

In particolare, in 3 casi (pazienti BS, CF, ZP), l'istologia depone per assenza di malattia (tabella 4.9) laddove l'analisi citofluorimetrica mostra persistenza di malattia (fig. 4.18)

Mentre, in 2 casi (pazienti BM e GI, tabella 4.10) si verifica il contrario (fig.4.19).

Caso (gruppo HDT-ASCT)	Periodo controllo	Timing	Esito istologia
BS	Febbraio 2013	3 mesi	4-5% policlonali
CF	Febbraio 2013	28 mesi	3-4% policlonali
ZP	Aprile 2014	4 mesi	Modeste plasmacellule

Tabella 4.9: Casi del gruppo HDT-ASCT in cui l'istologia non riscontra malattia persistente

Caso (gruppo HDT-ASCT)	Periodo controllo	Timing	Esito istologia
BM	Agosto 2014	4 mesi	5% monoclonali λ
GI	Novembre 2013	2,5 mesi	6%

Tabella 4.10: Casi del gruppo HDT-ASCT in cui l'istologia riscontra malattia persistente.

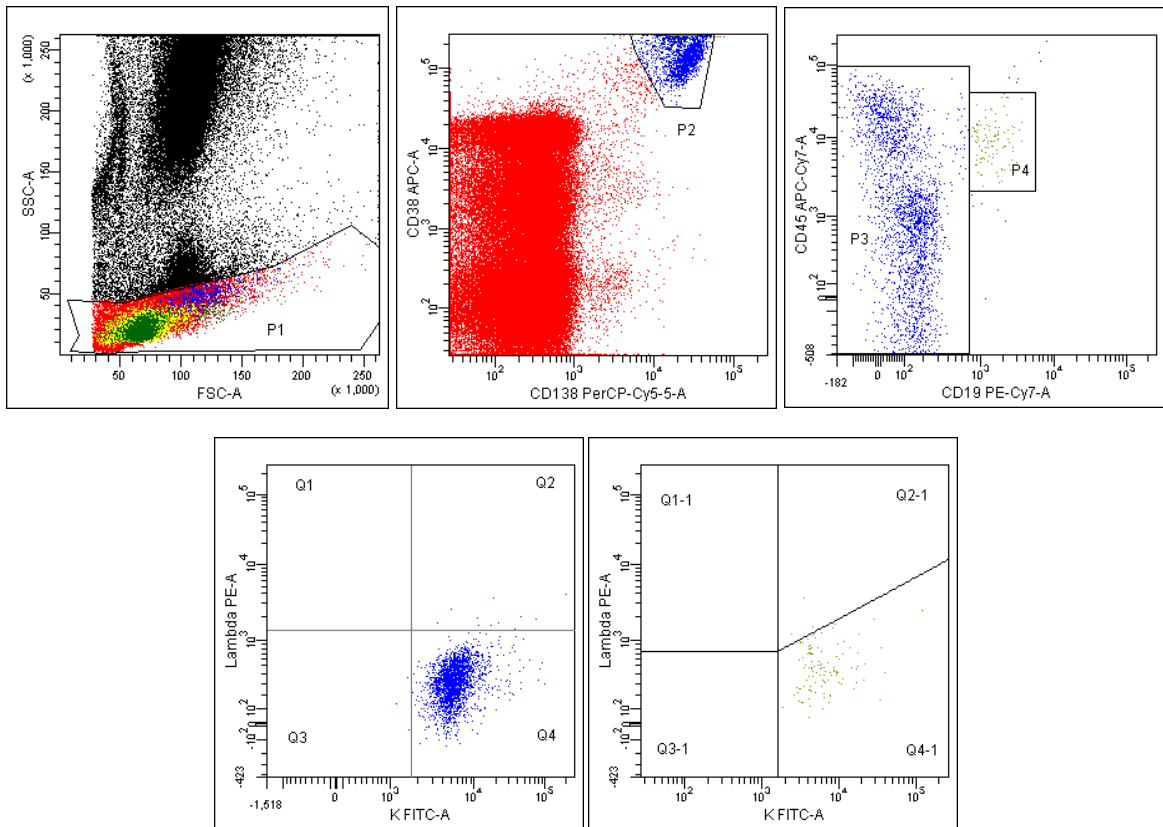


Figura 4.18: Controllo citofluorimetrico, caso ZP, aprile 2014, tutte le plasmacellule enumerate sono patologiche e con restrizione clonale k, anche quelle CD19+ e CD45+ (P4).

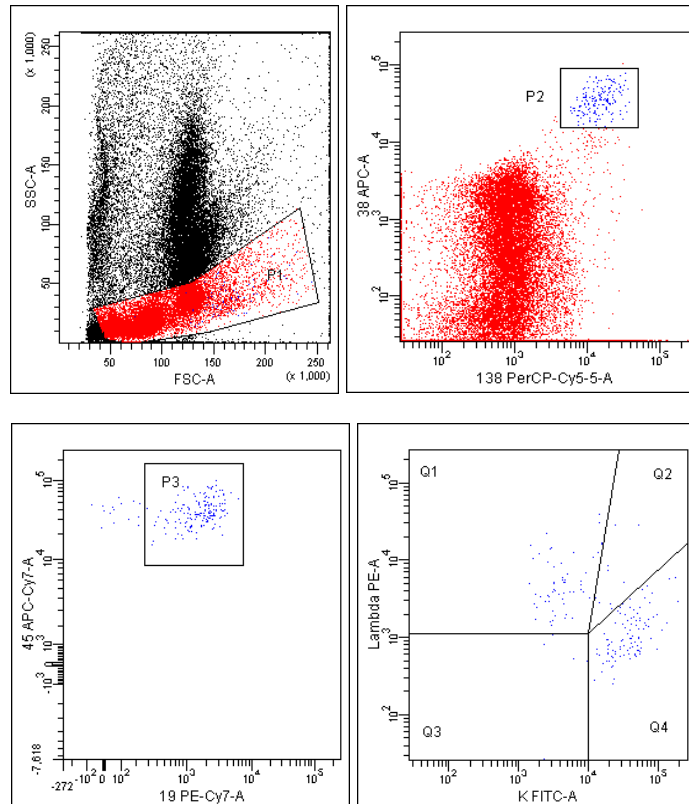


Figura 4.19: Controllo citofluorimetrico, caso GI, gennaio 2013, si tratta di una risposta completa, in quanto tutte le plasmacellule (P2) presentano normale fenotipo (P3) e sono policlonali.

Infine, nell'ultimo ed esiguo gruppo di controlli, inerente pazienti sottoposti a trapianto allogenico, la concordanza stimata è dell'80%, essendoci un solo caso su 5 (paziente LP) in cui l'istologia è normale (3-4% plasmacellule policlonali a 18 mesi dal trattamento), mentre la citofluorimetria apprezza un 97% di cellule patologiche (fig.4.20).

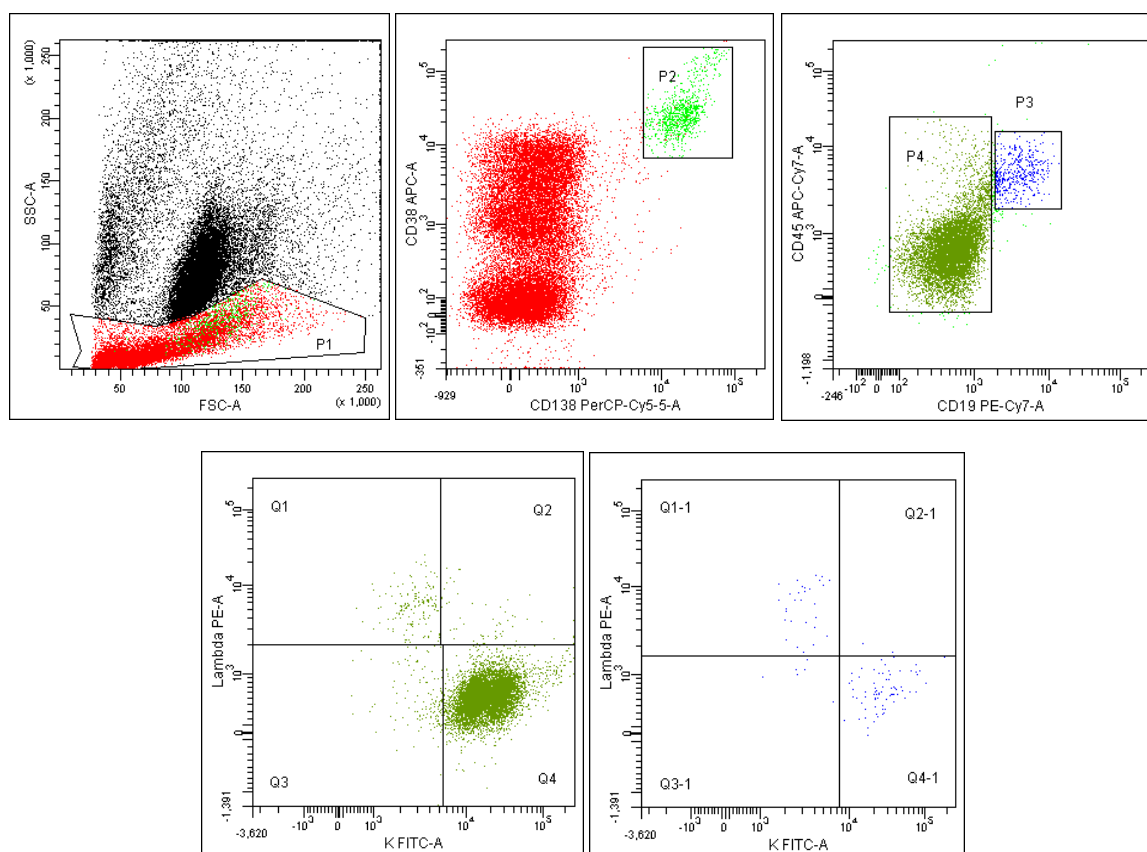


Figura 4.20: Controllo citofluorimetrico, caso LP, maggio 2013. Il dot-plot D mostra effettivamente come la maggior parte delle plasmacellule (97%) abbia fenotipo anomalo e restrizione clonale K (P4).

Tutti i risultati ottenuti sono riassunti in tabella 4.10. In tabella 4.11 sono riassunte le caratteristiche dei controlli discordanti.

GRUPPO DI TRATTAMENTO	% CONCORDANZA TRA REFERTO ISTOLOGICO E PROFILO IMMUNOFENOTIPICO
CT	100%
HDT-ASCT	89,9%
Allo-SCT	80%

Tabella 4.10: Percentuale di concordanza tra istologia e citofluorimetria nella definizione della risposta terapeutica, per ciascun gruppo di trattamento.

C A S O Periodo Controllo mm/aa	G R U P P O	T I M I N G Mesi	R I S P O S T A	IMMUNOFENOTIPO				I S T O L O G I A	P R O T E I N E g/dl	I F	C M
				% PC	% aPC	R E S T R I Z I O N E	k/ λ				
BS (2/13)	HDT- ASCT	3	VGPR	0,3	50	λ	1,5	4-5% poli	8	+ IgG λ	Si
CF (2/13)	HDT- ASCT	28	VGPR	0,5	50	k	3	3-4% poli	8,2	+ IgGk	Si
GI (1/13)	HDT- ASCT	2,5	RC	0,1 8	0	N D	2	6%,	7,4	B.O.	No
BM (8/14)	HDT- ASCT	4	RC	0,1 2	0	N D	2,4	5% λ	7,4	B.O	Lieve
ZP (4/14)	HDT- ASCT	4	RC	0,6	100	k	ND	Modeste	/	Lieve + λ	Lieve
LP (5/13)	Allo- SCT	18	RC	2	97	k	1,5	3-4% poli	7,1	-	No

Tabella 4.11. Caratteristiche dei controlli discordanti tra istologia e citofluorimetria. PC, plasmacellule, aPC plasmacellule anormali, poli polipitiche, IF immunofissazione, CM componente monoclonale.

Nei casi motivo di disaccordo, si è ipotizzato sulle ragioni della discordanza, avvalendosi anche del contributo fornito dall'esito di altri esami laboratoristici, contemporanei o successivi, inclusi nei criteri dell'IMWG per la definizione della

risposta al trattamento.

Nello specifico, nei 3 casi del gruppo “HDT-ASCT”, BS, CF, ZP, successive indagini quali l’elettroforesi sieroproteica, il dosaggio della componente monoclonale, l’immunofissazione sierica o un nuovo controllo citofluorimetrico, sostengono il risultato della prima analisi citofluorimetrica che aveva già apprezzato la persistenza di malattia, a fronte di un referto istologico normale (fig. 4.21).

In particolare, nel caso ZP, un nuovo controllo, ad 11 mesi dal trattamento, dimostra come l’analisi immunofenotipica abbia “anticipato” la risposta stabilita successivamente con il follow up del paziente (da CR a PR) (fig. 4.22).

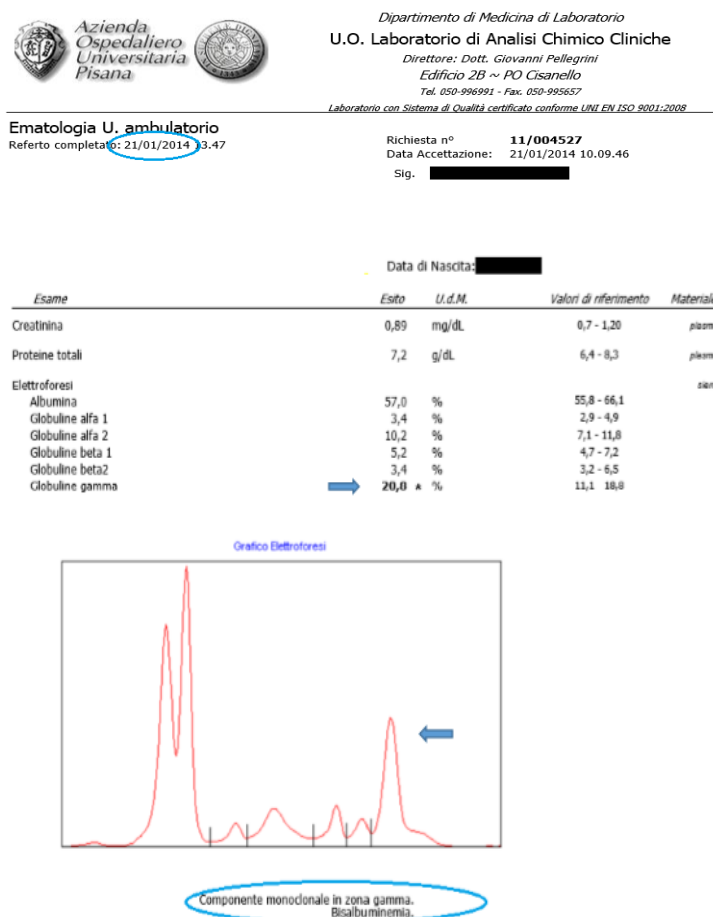


Figura 4.21: Caso BS, tracciato elettroforetico successivo (gennaio 2014) al primo controllo (febbraio 2013) che mostra persistenza di una CM (freccette), e quindi di malattia, in accordo con l’esame citofluorimetrico. Reperto incidentale di bisalbuminemia.

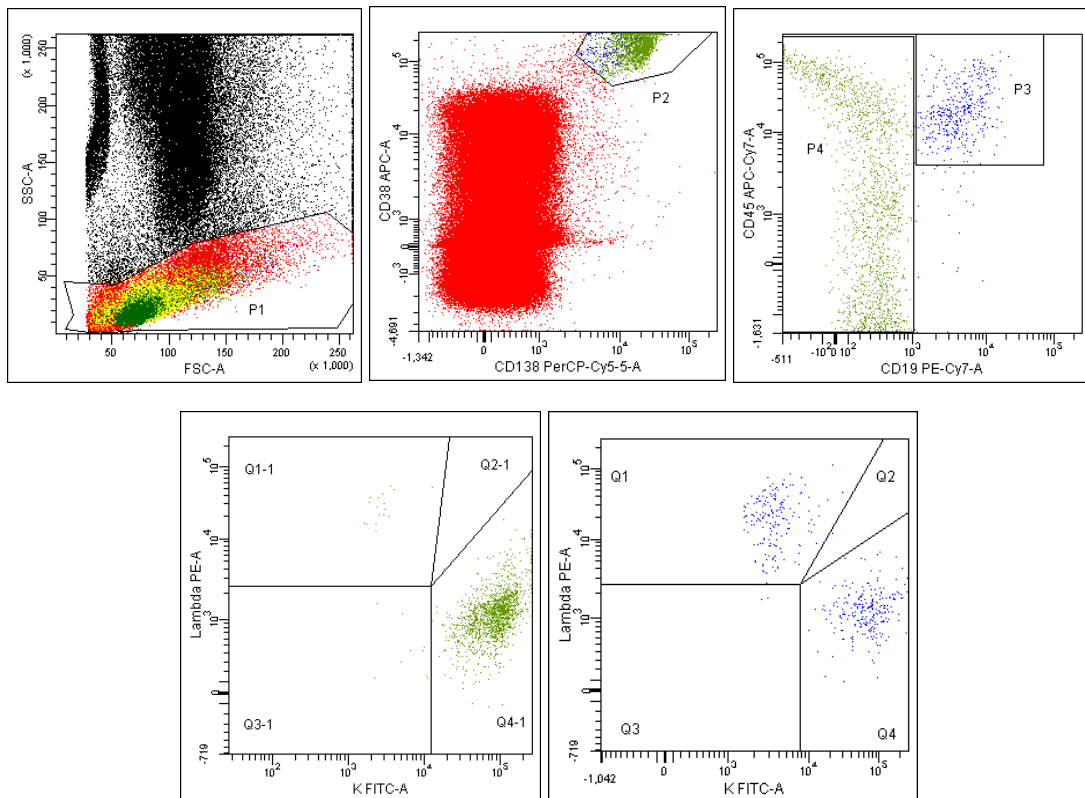


Figura 4.22: Caso ZP, controllo citofluorimetrico successivo (novembre 2014) che mostra un pattern diverso: è comparsa una popolazione policlonale (P3) ma la maggior parte delle plasmacellule (62,5%) è clonale, kappa (P4).

Alla luce di questo, la discordanza tra le metodiche per i suddetti casi potrebbe essere attribuita alla bassa sensibilità dell'esame istologico (10^{-2} versus 10^{-4} della MFC) nell'identificare e discriminare le plasmacellule, normali e patologiche, sui campioni osteomidollari.

I controlli istologico e immunofenotipico, disponibili per uno di questi tre casi (ZP), supportano questa ipotesi e dimostrano l'adeguamento della risposta istologica a quella citofluorimetrica nel follow up del paziente. (tab. 4.5).

Negli altri 2 casi del gruppo "HDT-ASCT" (pazienti GI e BM), l'analisi citofluorimetrica non indica presenza di plasmacellule patologiche, al contrario, l'esame istologico depone per una quota di plasmacellule, seppur esigua, ancora

clonale. Tuttavia, in entrambi i casi, la risposta ottenuta dai pazienti, a seguito del trapianto autologo, è una CR.

L'immunofissazione fornirebbe una giustificazione a questa risposta, quindi in favore del risultato citofluorimetrico, e al 'mismatch' istologico.

Infatti, in tutti e due i casi, essa mostra la presenza di bande oligoclonali ovvero una positività differente dalla componente monoclonale originale per catena pesante e/o leggera (fig 4.23).

Le bande oligoclonali sono un reperto incostante, tipico dei pazienti osservati a distanza temporale ravvicinata da trapianto autologo o allogenico, possono essere considerate come manifestazione di attivazione immunitaria aspecifica, nonché della ricostituzione del sistema immunitario dopo il trapianto stesso.

Questo fenomeno, di cui le bande oligoclonali all'immunofissazione sono un surrogato, potrebbe rappresentare il motivo per cui l'esame istologico, in alcuni casi, può apprezzare ancora una quota di plasmacellule clonali.

Ulteriori conferme della veridicità del controllo citofluorimetrico provengono anche dall'IF e dal tracciato elettroforetico eseguiti dopo 6 mesi, nel caso BM (fig. 4.24).

Ematologia U. ambulatorio
Referto completato: 03/09/2014 14.55

Richiesta n° **11/055877**
Data Accettazione: **27/08/2014** 9:36.21
Sig. [REDACTED]

Data di Nascita [REDACTED]

Esame	Esito	U.d.M.	Valori di riferimento	Materiale
Immunofissazione siero	Evidenza di bande oligoclonali tra le catene pesanti di classe A e tra le catene leggere di tipo kappa.		assenti	siero
Immunofissazione urine	Assenza di componenti monoclonali urinarie.		assenti	urine
Immunoglobuline IgA	107	mg/dL	70 - 400	plasma
Immunoglobuline IgG	973	mg/dL	700 - 1.600	plasma
Immunoglobuline IgM	21 *	mg/dL	40 - 230	plasma
Catene leggere K/L				plasma
Catene leggere Kappa	210,0	mg/dL	170 - 370	
Catene leggere Lambda	134,0	mg/dL	90 - 210	
Rapporto Kappa/Lambda	1,57			

Figura 4.23: Esito di una immunofissazione (caso BM, agosto 2014) simultanea ai controlli istologico e citofluorimetrico, con riscontro di bande oligoclonali.

Ematologia U. ambulatorio
Referto completato: 03/04/2015 16.23

Richiesta n° **11/012036**
Data Accettazione: **23/02/2015** 12:00.53
Sig. [REDACTED]

Data di Nascita [REDACTED]

Esame	Esito	U.d.M.	Valori di riferimento	Materiale
Proteinuria Bence Jones	Assenza di proteinuria di Bence Jones.		assente	urine
Immunofissazione siero	Assenza di componenti monoclonali.		assenti	siero
Immunofissazione urine	Assenza di componenti monoclonali urinarie.		assenti	urine

Richiesta: [REDACTED] **23/02/2015** 12:00.53 - Sig. [REDACTED] - Ematologia U. ambulatorio

Esame	Esito	U.d.M.	Valori di riferimento	Materiale
Elettroforesi				siero
Albumina	60,1	%	55,8 - 66,1	
Globuline alfa 1	3,9	%	2,9 - 4,9	
Globuline alfa 2	10,3	%	7,1 - 11,8	
Globuline beta 1	5,7	%	4,7 - 7,2	
Globuline beta2	4,6	%	3,2 - 6,5	
Globuline gamma	15,4	%	11,1 - 18,8	

Grafico Elettroforesi

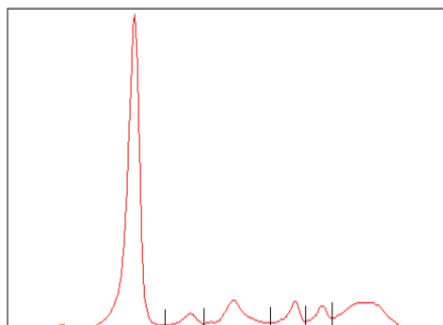


Figura 4.24: Immunofissazione ed elettroforesi sieroproteica che avvalorano, dopo 6 mesi, l'esito ottenuto dall'analisi immunofenotipica (caso BM).

L'ultimo controllo (paziente LP), appartenente al gruppo "Allo-SCT", rappresenta l'unico caso in questo lavoro, tra quelli discordanti, in cui è l'analisi immunofenotipica (fig.4.20) a discostarsi dalla risposta ottenuta (97% di cellule patologiche versus CR) mentre l'esito dell'istologico si accorda con essa (3-4% di plasmacellule politipiche).

Tuttavia, nel controllo successivo disponibile per questo paziente, anche l'esame citofluorimetrico si adegua alla risposta ottenuta.

È probabile che l'iniziale disaccordo vada attribuito ad un'eccessiva emodiluizione del campione che ha impedito al citofluorimetro di enumerare un numero sufficiente di eventi.

In tabella 4.12 sono riassunti i casi dai controlli discordanti, e le ipotetiche ragioni della discordanza tra gli esiti delle due indagini. Per due di essi, sono riportati anche i controlli successivi, in cui la concordanza tra istologia e immunofenotipo è stata ristabilita.

P A Z I E N T E (Periodo controllo)	G R U P P O	T I M I N G Mesi	R I S P O S T A	IMMUNOFENOTIPO				I S T O L G I A	Probabile Motivazione Della Discordanza
				% PC	% aP C	R E S T R I Z I O N E	k/λ		
BS 2/13	HDT- ASCT	3	VGPR	0,3	50	λ	1,5	4-5% policlonali	Bassa sensibilità dell'esame istologico
CF 2/13	HDT- ASCT	28	VGPR	0,5	50	K	3	3-4% policlonali	Bassa sensibilità dell'esame istologico
GI 1/13	HDT- ASCT	2,5	RC	0,1 8	0	ND	2	6% k/λ 1:2	Presenza di bande oligoclonali
BM 8/14	HDT- ASCT	4	RC	0,1 2	0	ND	2,4	5% λ	Presenza di bande oligoclonali
ZP 4/14	HDT- ASCT	4	RC	0,6	10 0	K	ND	Modeste	Bassa sensibilità dell'esame istologico
ZP 11/14	HDT- ASCT	11	RP	0,4	78	K	1,5	5% k	—
LP 5/13	Allo- SCT	18	RC	2	97	K	1,5	3-4% policlonali	Emodiluizione del campione (mieloaspirato)
LP 10/14	Allo- SCT	36	VGPR	0,0 6	0	ND	1,7	Normale	—

Tabella 4.12: Ipotesi sulla discordanza tra profilo immunofenotipico e referto istologico nei casi individuati. In verde, controlli successivi in cui la concordanza si è ripristinata.

5. Conclusioni

Questo lavoro ha confrontato i profili immunofenotipici e i referti istologici simultanei di pazienti affetti da Mieloma Multiplo, osservati almeno una volta dopo la fine del trattamento, allo scopo di stabilirne la concordanza o la discordanza nella definizione della risposta terapeutica.

Lo studio ha coinvolto 78 pazienti, alcuni dei quali osservati più di una volta dopo la terapia, per un totale di 92 controlli. Questi sono stati suddivisi in 3 gruppi in base al trattamento ricevuto dai rispettivi pazienti: chemioterapia esclusiva (Gruppo CT di 38 controlli), chemioterapia ad alte dosi seguita da trapianto autologo (Gruppo HDT-ASCT di 49 controlli), e il trapianto allogenico, da donatore HLA-compatibile (Gruppo Allo-SCT di 5 controlli).

La risposta clinica è stata definita nel rispetto dei criteri dell'IMWG, pertanto sono state definite, tra i nostri 78 pazienti, 21 RC, 19 VGPR, 14 PR, 10 SD, 5PD e 23 recidive. Considerando, invece, solo l'immunofenotipo stabilito mediante citofluorimetria multiparametrica, la CR è stata definita come una percentuale di plasmacellule patologiche $< 0,01\%$. Al contrario una percentuale di plasmacellule con fenotipo anomalo e restrizione clonale $> 0,01\%$, ha definito la persistenza di malattia ossia di malattia minima residua (MRD).

I pattern citofluorimetrici ottenuti sono stati i seguenti: 33 pattern con fenotipo

normale (100% cellule normali), 30 con fenotipo patologico (100% cellule anomale) e 29 con fenotipo misto (persistenza di due cloni cellulari, normale e patologico).

Nonostante istologia e citometria abbiano enumerato percentuali di plasmacellule molto diverse, a causa del differente materiale biologico adoperato, entrambe hanno enumerato una quantità maggiore di plasmacellule totali nel gruppo CT (15,24% e 3,04% rispettivamente), e a seguire nel gruppo HDT-ASCT (14,91% e 2,33%) e nel gruppo Allo-SCT (5,4% e 1,07%).

La citometria ha identificato, nei controlli di tutti e tre i gruppi che non hanno ottenuto la CR, percentuali medie di plasmacellule patologiche più elevate in caso di PR, SD e PD (rispettivamente 81,36%, 99,75%, 98,2%, 95,92%) rispetto ai casi di VGPR (10,47%), confermando di essere in grado di distinguere precisamente tra assenza e presenza di malattia, pur non stratificando in quest'ultimo caso la risposta.

Infine è stata dimostrata l'esistenza di una correlazione diretta tra dati istologici (% plasmacellule enumerate in istologia) e immunofenotipici (% plasmacellule totali enumerate in citometria), ottenendo per ogni gruppo un coefficiente di correlazione " r " > 0 (rispettivamente pari a 0,7543 nel gruppo "CT", a 0,5187 nel gruppo "HDT-ASCT" e a 0,6612 nel gruppo "Allo-SCT").

A questo punto, è stato legittimato, nonostante le note differenze tra le due tecniche, il confronto tra dato istologico e profilo immunofenotipo nella

definizione della risposta al trattamento, per ogni controllo e poi per ognuno dei tre gruppi.

I risultati ottenuti sono stati i seguenti: nel gruppo CT, istologia e citometria hanno dimostrato una concordanza del 100% (in tutti i controlli la risposta al trattamento, definita sia dall'istologia che dall' immunofenotipo, è risultata identica: risposta completa o persistenza di malattia). Nel gruppo HDT-ASCT, la concordanza è risultata dell'89,9%, con discordanza in 5 controlli su 49. Nel gruppo Allo-SCT è risultata dell'80%, con discordanza in un solo controllo su 5.

Sono stati esaminati, quindi, i 6 casi discordanti, ipotizzando anche su possibili giustificazioni ad essi.

In 3 casi su 5 tra quelli discordanti del gruppo HDT-ASCT, l'analisi immunofenotipica ha identificato la persistenza di malattia a fronte di un referto istologico normale e indicativo di CR. Ulteriori indagini laboratoristiche (elettroforesi sieroproteica, dosaggio della componente monoclonale, immunofissazione sierica) o un successivo controllo immunofenotipico disponibile, hanno sostenuto il risultato dell'analisi immunofenotipica e, in particolare in un caso, il nuovo controllo ha dimostrato come già quello precedente avesse "anticipato" la nuova risposta determinata col follow up del paziente (da CR a PR).

Negli altri 2 casi del gruppo "HDT-ASCT" l'analisi dell'immunofenotipo non ha indicato presenza di plasmacellule patologiche, al contrario, l'esame istologico ha

ottenuto una piccola quota di plasmacellule ancora clonale. Anche in questi due casi, è stato confermato il risultato citofluorimetrico (infatti per entrambi la risposta ottenuta dopo il trapianto è stata una CR) sia dai tracciati elettroforetici che dall'immunofissazione. In particolare, quest'ultima ha prodotto bande oligoclonali, reperto tipico dei pazienti osservati a ridosso del trapianto e indice di un'attivazione immunitaria aspecifica che può fuorviare l'esame istologico.

Infine, nell'ultimo caso di discordanza, del gruppo Allo-SCT, l'esame istologico è risultato nella norma, mentre la citofluorimetria ha individuato ben un 97% di cellule patologiche. Si è trattato dell'unico caso in cui l'immunofenotipo si è discostato dalla risposta reale ottenuta (CR). Comunque, al controllo successivo, esso si è accordato con l'esame istologico e quindi con la risposta conseguita.

Dunque, la discordanza nei casi individuati da questo lavoro è ascrivibile a due motivi, già noti in letteratura: da una parte, in riferimento ai 5 casi del gruppo HDT-ASCT, la bassa sensibilità dell'esame istologico (10^{-2}), dall'altra, considerando l'ultimo caso discordante, l'eccessiva emodiluizione del campione di mieloaspirato (specie quando il volume aspirato è >1ml) che impedisce al citofluorimetro di enumerare un numero sufficiente di plasmacellule.

L'esame, infatti, utilizza già di suo campioni di sangue midollare, meno concentrato rispetto al frustolo osteomidollare, ottenuto con la biopsia e adoperato dall'esame microscopico (le plasmacellule tendono a clusterizzare e ad associarsi caratteristicamente alla componente adiposa del midollo).

Per contro, la rapidità di analisi di ingenti quantità di cellule e la notevole sensibilità (10^{-4}) che gli consente di discriminare chiaramente tra plasmacellule normali e patologiche, fanno della citofluorimetria multiparametrica uno strumento molto valido da impiegare nella definizione della risposta al trattamento e quindi nella ricerca della MRD.

Numerosi studi internazionali, più e meno recenti, danno man forte alle osservazioni e ai risultati ottenuti in questo lavoro, sottolineando l'importanza clinica e prognostica della MFC nella ricerca della MRD, sia nei pazienti di nuova diagnosi candidabili a trapianto che nei pazienti più anziani trattati con i nuovi agenti farmacologici.

Già nel 2007, De Tute et al. hanno promosso la ricerca della MRD dopo terapia di induzione oppure durante o subito dopo la fine di HDT, mediante l'utilizzo dell'analisi citofluorimetrica a sei colori(ponendo il cut off dello 0,01% di plasmacellule patologiche) piuttosto che con la RQ-ASO IgH PCR.[28]

Successivi studi hanno poi mostrato come i pazienti con MRD dopo un anno dal conseguimento della CR dopo HDT-ASCT abbiano una prognosi peggiore, pertanto la loro identificazione è diventata essenziale. In una serie di 241 pazienti in CR a 100 giorni dal trapianto autologo, Paiva et al. hanno constatato una prognosi peggiore in 29 pazienti in cui si era verificata perdita della CR, stabilendo come la presenza di caratteristiche citogenetiche ad alto rischio alla FISH e la persistenza di MRD all'analisi citofluorimetrica, fossero gli unici fattori indipendenti in grado di

prevedere questo evento e dunque a consentire l'identificazione dei suddetti pazienti, candidabili pertanto a terapia con nuovi agenti farmacologici. [29]

Inoltre, è stato ipotizzato di poter sfruttare una finestra terapeutica nei pazienti con MRD già a 7 giorni da HDM (High dose melphalan)-ASCT, allo scopo di eliminare le plasmacellule mielomatose superstiti, cellule che in un midollo "desertificato" dalla HDM, beneficerebbero più di altre dei fattori di crescita presenti. [30]

Come accennato anche in questo lavoro di tesi, dovrà essere approfondito il ruolo delle bande oligoclonali. Il gruppo giapponese di Fujisawa et al. le ha ricercate in ben 163 pazienti sottoposti a chemioterapia o ASCT, tra Gennaio 2006 e Maggio 2014, riscontrandone percentuali differenti tra pazienti in CR (51,8%), in VGPR (36,3%) e in PR (0%). Ciò costituisce un'ulteriore conferma all'ipotesi che il loro reperto sia indice di minore o del tutto assente MRD, e che possa influenzare i criteri della sCR (di fatti, in questo lavoro ha appoggiato la superiorità della MFC rispetto all'istologia nel prevedere la CR in 2 controlli discordanti del gruppo HDT-ASCT), sebbene non influenzi né OS né PFS. [31]

Sono in corso diversi studi per sondare il ruolo della MRD anche nella ricaduta e nel MM refrattario. In uno studio del gruppo spagnolo è stata ricercata MRD con MFC a 4 colori in 52 pazienti che, dopo ricaduta, avrebbero ottenuto una CR grazie alle terapie di salvataggio. Di questi pazienti, 31 sono stati sottoposti a chemioterapia con nuovi agenti farmacologici, seguita o meno da ASCT, e 21,

invece hanno ricevuto Allo-SCT.

A 32 mesi dalla CR, nel primo gruppo, la MRD si presentava nel 58% dei casi, nel secondo gruppo, nel 48% dei casi. Mentre nel primo gruppo, la presenza (MRD+) o l'assenza (MRD-) della MRD sembra aver decisamente influenzato la progressione (TTP: 14 mesi versus 75 mesi), nel secondo gruppo, invece, non si è avuta alcuna differenza significativa in termini di progressione tra pazienti MRD+ e MRD-.

Sostanzialmente lo studio ha mostrato quanto sia eterogeneo il gruppo dei pazienti in CR dopo terapia di salvataggio, con circa la metà dei casi MRD+ e ricaduta precoce, e l'altra metà MRD- e TTP più prolungato. [32]

Infine, ad oggi, risulta di grande interesse il dibattito sulla revisione dei criteri di sCR, proprio in virtù del ruolo chiave svolto dalla MFC. Non è ancora del tutto chiaro se, per definire quanto profonda sia la CR, sia più opportuno perseverare con il rapporto tra le catene leggere libere sieriche (sFLC ratio, vn: 0,26-1,65) oppure se sia preferibile determinare la clonalità per mezzo della MFC. Infatti, nei criteri aggiornati dell'IMWG del 2011, la sCR è definita in base ad un sFLC ratio normale e all'assenza di plasmacellule clonali nel midollo, stabilita per mezzo dell'immunoistochimica, o in alternativa con MFC a 2 colori. Tuttavia, vige ancora molta confusione su come vada valutata la clonalità midollare e su quale sia il reale ruolo del sFLC ratio.

In un recentissimo studio della scuola spagnola, si è cercato di fare chiarezza, esaminando il contributo prognostico del sFLC ratio, della clonalità stabilita con

MFC a 2 colori e della MRD individuata con MFC a 4 colori, in 94 casi di CR, di cui 69 (73%) con sCR. I risultati hanno mostrato come sFLC ratio non riesca a “diversificare” il rischio nei casi di CR, perché non è in grado di distinguere tra catene leggere monoclonali e policlonali (inoltre talvolta il rapporto k/λ può essere alterato dalle bande oligoclonali), per contro la MFC a 2 colori ha identificato un piccolo numero di pazienti in CR (5) con outcome peggiore perché con massa tumorale residua maggiore. Addirittura la MFC a 4 colori ha rintracciato la MRD nel 36% dei casi (anche questi con outcome meno favorevole rispetto a quelli MRD-), e ha permesso di stratificare i pazienti ad alto rischio in 3 categorie a rischio crescente in base al livello di MRD (0.1%, 0.1-0.01% e 0.01%), dimostrando i limiti dell’immunoistochimica, specie quando le plasmacellule clonali sono esigue e mascherate dalla popolazione policlonale.

Tirando le somme, riscontrare sCR così come definita allo stato attuale dall’IMWG, non conferirebbe nessun vantaggio in termini di outcome ai pazienti in CR, perché, da una parte, sFLC ratio non permette di stratificare i pazienti, e dall’altra la MFC riscontra ancora della MRD in un sottogruppo, che conseguentemente ha ottenuto un outcome peggiore in termini di PFS e OS. [33]

In conclusione, alla luce dei risultati degli studi internazionali, il lavoro di tesi si dimostra in linea con il pensiero dell’attuale comunità scientifica in merito al ruolo della MFC nella gestione del MM in fase post-diagnostica.

È assolutamente necessario un approccio pragmatico che:

- definisca un algoritmo per la ricerca della MRD personalizzato, in base alla stratificazione del rischio del singolo paziente e nei tempi adeguati;
- riveda i criteri per la definizione della sCR;
- stabilisca se l'assenza di MRD nei pazienti con ricaduta/MM refrattario possa divenire un obiettivo raggiungibile con nuovi farmaci e quali possano essere le sue conseguenze in termini di outcome.

Se questo verrà fatto, il ruolo ancillare della citofluorimetria multiparametrica nella gestione del Mieloma Multiplo, potrà essere mutato in un ruolo diagnostico-prognostico d'imprescindibilità.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Blade J, Cibeira M.T, Fernández de Larrea C, Rosin L. Multiple Myeloma symposium article, *Annals of Oncology* 21 (Supplement 7): vii313–vii319, 2010
- [2] Bladé J, Kyle RA, Greipp PR. Presenting features and prognosis in 72 patients with multiple myeloma who were younger than 40 years. *Br J Haematol* 1996; 93: 345-351
- [3] Ludwig H, Bolejack V, Crowley J et al. Survival and years of life lost in different age cohorts of patients with multiple myeloma. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1599–1605.
- [4] M. A. Dimopoulos, E. Terpos. Multiple Myeloma, symposium article. *Annals of Oncology* 21 (Supplement 7); vii 143-vii 150, 2010.
- [5] Takaaki Chou, Multiple Myeloma: recent progress in diagnosis and treatment, *J Clin Exp Hematopathol* Vol. 52, No. 3, Dec 2012.
- [6] Carulli G., Manuale di ematologia per gli studenti di medicina. *ECIG Universitas* 2009; 44: 517.
- [7] International Myeloma Working Group. 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: 749-757.
- [8] Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia.* 2009 23, 3-9.
- [9] Buda, Orciuolo, Carulli, Galimberti, Ghio, Cervetti, Pelosini, Petrini. VTD versus TAD as Induction Therapy in Previously Untreated MM Patients. *Acta Haematologica* 2013; 129:35–39
- [10] Kenneth C. Anderson et all. Multiple Myeloma, Version 1.2013, NCCN

Guidelines Insights. *JNCCN* 2013; 11: 11-17.

[11] Harousseau J-L, Attal M, Avet-Loiseau H. The role of complete response in multiple myeloma. *Blood* 2009; 114: 3139-3146.

[12] Dimopoulos et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood* 2011; 117, number 18.

[13] Cialdini et al. *Il contributo della diagnostica proteica nella gestione delle gammopatie monoclonali.*

[14] Fernanández de Larrea et al. Abnormal serum free light chain ratio in patients with multiple myeloma in complete remission has strong association with the presence of oligoclonal bands: implications for stringent complete remission definition. *Blood* 2009; 114: 4954-4956.

[15] Kröger et al. Questionable role of free light chain assay ratio to determinate stringent complete remission in multiple myeloma patients. *Blood* 2010; 115: 3413-3414.

[16] Zamagni et al. Prognostic relevance of 18-F FDG PET/CT in newly diagnosed multiple myeloma patients treated with up-front autologous transplantation. *Blood* 2011; 118 (23): 5989-5995. Bartel et al. F18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the context of other imaging techniques and prognostic factors in multiple myeloma. *Blood* 2009, 114(10):2068-2076

[17] Carulli G. Corso introduttivo alla citofluorimetria. *SEU Pisa*, Aprile 2010.

[18] Rawstron A.C et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica* 2008; 93 (3).

- [19] Paiva B, Almeida J, Pérez- Andrés M, Mateo G, Lopez A, Rasillo A, Vidriales M-B, Lopez-Berges M-C, San Miguel JF, Orfao A. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry Part B* 2010; 78B: 239-252.
- [20] Kumar S, Kimlinger T, Morice W. Immunophenotyping in multiple myeloma and related plasma-cell disorders. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2010 September; 23 (3); 433-451.
- [21] Cannizzo E, Carulli G, Del Vecchio L, Ottaviano V, Bellio E, Zenari E, Azzarà A, Petrini M, Preffer F. The role of CD19 and CD27 in the diagnosis of multiple myeloma by flow cytometry. A new statistical model. *Am J Clin Pathol* 2012; 137: 377-386.
- [22] Carulli G, Buda G, Azzarà A, Ciancia EM, Sammuri P, Domenichini C, Guerri V, Petrini M. CD229 Expression on Bone Marrow Plasma Cells from Patients with Multiple Myeloma and Monoclonal Gammopathies of Uncertain Significance. *Acta Haematol.* 2015 Aug 15;135(1):11-14
- [23] Pérez-Persona et al. New criteria to identify risk progression in monoclonal gammopathy of uncertain significance and smolderin multiple myeloma based on MFC analysis of bone marrow plasma cells. *Blood*, October 2007;110: 2586-2592.
- [24] Mateo et al. Prognostic value of immunophenotyping in multiple myeloma: a study by the PETHEMA/GEM cooperative study groups on patients uniformly treated with high-dose therapy. *J Clin Oncol* 2008; 26:2737-2744.
- [25] Buda G, Carulli G, Orciuolo E, Sammuri P, Campa D, Galimberti S, Petrini M. CD69, a New Potential Clinical Marker in Multiple Myeloma. December 6, 2014; *Blood*: 124 (21): 2027-2027
- [26] Carulli G, Ottaviano V, Cannizzo E, Giuntini S, Manetti C, Ciancia M.E, Azzarà A. Multiparameter immunophenotyping by flow cytometry as a diagnostic

tool in multiple myeloma and monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Clin Ter* 2012; 163 (5): 387-392.

[27] De Larrea CF, Tovar N, Rozman M, Rosiñol L, Arostegui JI, Cibeira T, Rovira M, Yagüe J, Bladé J. Multiple Myeloma in serological complete remission after autologous stem cell transplantation: Impact of bone marrow plasma cell assessment by conventional morphology on disease progression. *J. BBMT* 2010.12.707.

[28] De Tute et al. A single-tube six-colour flow cytometry screening assay for the detection of minimal residual disease in myeloma. *Leukemia* 2007, 1-4.

[29] Paiva et al. High-risk cytogenetics and persistent minimal residual disease by multiparameter flow cytometry predict unsustained complete response after autologous stemcell transplantation in multiple myeloma. *Blood* 2012, 119; 3: 687-691.

[30] Craux et al. Residual Malignant and normal plasma cells shortly after high dose melphalan and stem cell transplantation. Highlight of a putative therapeutic window in Multiple Myeloma. *Oncotarget* 2012; 3: 1335-1347.

[31] Fujisawa et al. Oligoclonal bands in patients with multiple myeloma: Its emergence per se could not be translated to improved survival. *Cancer Sci* 2014, Vol. 105; 11: 1442-1446.

[32] Paiva et al. The prognostic value of multiparameter flow cytometry minimal residual disease assessment in relapsed multiple myeloma. *Haematologica* 2015, 100: e54.

[33] Martínez-Lopez, Paiva et al. Critical analysis of the stringent complete response in multiple myeloma: contribution of sFLC and bone marrow clonality. *Blood* 2015; 126, 7: 858-862.

Ringraziamenti

La realizzazione di questo lavoro di tesi non sarebbe stata possibile senza il Dottor Giovanni Carulli, mio relatore, a cui va il mio primo ringraziamento. La sua professionalità, la dedizione per il nobile lavoro che svolge quotidianamente nonostante le difficoltà, la propensione alla ricerca e al continuo miglioramento di sé e la sua grande umanità, mi siano sempre di esempio negli anni a venire, come lo sono stati in questi da studentessa.

Un ringraziamento sentito anche ai colleghi della U.O. Anatomia Patologica II, il cui prezioso lavoro è stato fondamentale ai fini della mia tesi, al Dottor Gabriele Buda per avermi dedicato un po' del suo tempo per la revisione del lavoro, al Dottor Lorenzo Iovino e alle Dottoresse Virginia Ottaviano, Claudia Baratè, Martina Rousseau, Paola Sammuri e a Mario Baldeschi, per la gentilezza e la disponibilità, per non avermi mai negato un sorriso e/o un supporto.

Desidero ringraziare di cuore tutti gli amici che mi hanno accolta nelle loro vite e che tanto mi hanno dato in questi faticosi ma bellissimi anni. Silvia, sei stata il primo volto amico, e, anche se non riusciamo più a trascorrere del tempo insieme, conservi sempre un posto speciale nel mio cuore. Francesca, perché sai dar valore al nostro rapporto e ho scoperto in te prima una coinquilina impeccabile e poi, cosa ben più importante, un'amica indispensabile. Serena, su cui ho sempre la certezza di poter contare, riesci sempre a farmi vedere soluzioni lì dove sembra non ve ne siano, grazie per le tue attenzioni e il tuo affetto. Laia, perché con la tua spontaneità hai riempito di simpatia e ironia le tante domeniche tediose, come una ventata di aria fresca in una stanza chiusa troppo a lungo. Michele, per il tuo realismo e la tua schiettezza, Tiziano per le tue battute e il tuo equilibrio, grazie ad entrambi perché non mi avete mai fatta sentire a disagio, nonostante la vostra riservatezza. Alessia, perché siamo molto diverse e questo rende il nostro rapporto unico, mi chiami scherzosamente "Mamma Giusy" e per me vale più di mille parole. Lina, abbiamo condiviso solo un anno sotto lo stesso tetto ma mi sembra di conoscerti da sempre, grazie per il tuo esempio di dolcezza e di forza. Franceschina, la ragazza della porta accanto, grazie per la tua amicizia che resiste ai chilometri. Elena, perché sei la gioia fatta persona e mi hai insegnato che le risate di cuore tra amiche non sono mai fuori luogo. Daiana, perché la condivisione materiale e spirituale di questo percorso

ti rendono speciale nella mia vita, grazie perché “tieni un capo del filo, con l’altro capo in mano io correrò nel mondo. E se dovessi perdermi, tu tira”.

Simone, dovessi scrivere tutto quello che hai fatto e fai per me, non basterebbe un libro intero. Credi in me più di quanto faccia io stessa. Grazie per la tua pazienza, per i tuoi incoraggiamenti e soprattutto grazie per il tuo grande amore.

Voglio e devo ringraziare, tutta quanta la mia famiglia senza la quale non avrei mai potuto realizzare questo sogno. In particolare, grazie ai miei nonni Luigi e Gino e alle mie nonne Giuseppina e Filomena, le fondamenta solide su cui erigere il futuro.

Grazie a Luigi, mio fratello, perché hai colmato la mia assenza in casa, con la semplicità e la bontà che ti contraddistinguono, e perché pur privandoti degli anni più belli che un fratello e una sorella dovrebbero passare insieme, non me ne fai una colpa ed io te ne sarò grata per sempre.

Infine, il più grande ringraziamento va ai miei genitori, cui questa tesi è dedicata. Mai vi ho sentiti lontani. Che la conclusione di questo mio percorso possa, seppure in piccola parte, ripagarvi di tutto i sacrifici e le privazioni, affettive e materiali. Senza il vostro amore incondizionato e il vostro esempio queste pagine non sarebbero mai state scritte.

“Yes, there are two paths you can go by, but in the long run there’s still time to change the road you’re on...to be a rock and not to roll”