

Università degli Studi di Milano

Scuola di Dottorato in Scienze Biomediche Cliniche e Sperimentali

Dipartimento di Scienze Biomediche

Corso di Dottorato in Ematologia Sperimentale – Ciclo XXIV

Tesi di Dottorato di Ricerca

**Studio prospettico di confronto tra la risonanza magnetica diffusion-weighted
e le tecniche standard di valutazione della malattia ossea nel mieloma multiplo:
valore prognostico della nuova metodica, correlazione con la risposta alla
terapia e con le caratteristiche biologiche di malattia**

Settore XV

Dottorando:

Dr. Francesco Spina

Matricola R08052

Tutor:

Prof. Paolo Corradini

Coordinatore del dottorato:

Prof. Paolo Corradini

Anno accademico 2010-2011

Indice

1. Introduzione e razionale	pag. 7
1.1. Background	pag. 7
1.2. La risonanza magnetica diffusion-weighted	pag. 10
1.3. Razionale dello studio	pag. 12
2. Metodi	pag. 14
2.1. Disegno dello studio	pag. 14
2.2. Obiettivi dello studio	pag. 15
2.3. Popolazione in studio	pag. 16
2.4. Procedure dello studio	pag. 18
2.5. Metodi radiologici	pag. 20
2.6. Esami di laboratorio	pag. 24
2.7. Metodi statistici	pag. 25
2.7.1. Dimensione del campione	pag. 25
2.7.2. Analisi dei risultati	pag. 26
2.7.3. Software e packages utilizzati	pag. 28
3. Risultati	pag. 30
3.1. Caratteristiche dei pazienti	pag. 30
3.2. Trattamento e risposta al trattamento	pag. 32
3.3. Confronto tra la DW-RMN e le metodiche standard	pag. 36

3.4. Sopravvivenza globale dei pazienti, sopravvivenza libera da progressione e da recidiva, incidenza di recidiva e di mortalità non legata a recidiva	pag. 39
3.5. Valore prognostico della RMN diffusion-weighted	pag. 43
3.6. Correlazione con la risposta alla terapia	pag. 47
3.7. Correlazione con le caratteristiche biologiche di malattia	pag. 52
3.8. Sottostudio: i pazienti asintomatici	pag. 56
4. Discussione	pag. 59
5. Bibliografia	pag. 73
6. Appendice	pag. 84
Appendice A1. La stadiazione Durie e Salmon	pag. 84
Appendice A2. La stadiazione International Staging System (ISS)	pag. 85
Appendice A3. Definizione di mieloma sintomatico, asintomatico e MGUS	pag. 86
Appendice A4. Criteri IMWG 2006 per il mieloma multiplo che richiede terapia sistemica	pag. 88
Appendice A5. Criteri IMWG 2006 di risposta del mieloma multiplo alla terapia	pag. 89

Appendice B1. La RMN diffusion-weighted: principi fisici e tecnici

pag. 91

B1.1. Principi fisici dell'imaging diffusion-weighted

pag. 91

B1.2. Misura della diffusione

pag. 92

B1.3. Il valore b

pag. 93

B1.4. Analisi qualitativa dell'imaging diffusion-weighted

pag. 94

B1.5. Analisi quantitativa dei risultati dell'imaging

diffusion-weighted e il valore ADC (coefficiente apparente

di diffusione)

pag. 95

7. Ringraziamenti

pag. 97

Table:

1. Tabella 1. Procedure dello studio pag. 19
2. Tabella 2. Caratteristiche dei pazienti pag. 31
3. Tabella 3. Trattamento alla diagnosi e alla recidiva pag. 34
4. Tabella 4. Risposta al trattamento pag. 35
5. Tabella 5. Correlazione della risposta clinica secondo i criteri IMWG con il numero di lesioni in DW-RMN dopo il termine del trattamento pag. 48
6. Tabella 6. Correlazione della risposta clinica secondo i criteri IMWG con il numero di lesioni in DW-RMN al follow-up dopo 6 mesi dal termine del trattamento pag. 50

Figure

1. Figura 1. Sopravvivenza globale pag. 39
2. Figura 2. Sopravvivenza libera da progressione pag. 40
3. Figura 3. Sopravvivenza libera da recidiva pag. 41
4. Figura 4. Incidenza di recidiva e mortalità non legata a recidiva pag. 42
5. Figura 5. Sopravvivenza globale in base al numero di lesioni in DW-RMN
pag. 43
6. Figura 6. Sopravvivenza libera da progressione in base al numero di lesioni
ossee in DW-RMN pag. 44
7. Figura 7. Sopravvivenza libera da recidiva in base al numero di lesioni ossee
in DW-RMN pag. 45
8. Figura 8. Incidenza di recidiva in base al numero di lesioni viste in DW-
RMN pag. 46

1. Introduzione e razionale

1.1. Background

Il mieloma multiplo è una neoplasia plasmacellulare responsabile di circa il 10% delle neoplasie ematologiche. La sua incidenza riportata in Europa è circa 3/100000 pazienti/anno, con un picco di incidenza intorno ai 70 anni. Fino a poco più di un decennio fa, la sopravvivenza mediana non superava i tre anni con la chemioterapia convenzionale. [1] Gli steroidi e il melphalan a basse dosi sono stati la terapia standard fin dagli anni 60, e sono ancora parte delle possibilità terapeutiche correnti. [2, 3] Nella scorsa decade la sopravvivenza media è cresciuta grazie all'introduzione di nuovi agenti terapeutici quali la thalidomide, il bortezomib, e la lenalidomide, e gli approcci di terapia ad alte dosi con trapianto autologo di cellule staminali emopoietiche, che hanno migliorato il controllo di malattia e la sopravvivenza. [2, 4-8]

Le lesioni ossee legate all'invasione midollare di malattia rappresentano una caratteristica distintiva del paziente con mieloma multiplo. La valutazione delle lesioni ossee è affidata alle metodiche di immagini. L'obiettivo delle metodiche di immagini nel mieloma include la rilevazione dell'estensione di malattia ossea alla presentazione di malattia, l'identificazione e caratterizzazione delle complicanze, e il monitoraggio dopo la terapia e nel follow-up per la diagnosi delle recidive. [9] L'approccio di valutazione della malattia ossea nel mieloma multiplo si è evoluto

molto meno rispetto a quello farmacologico negli ultimi decenni: la valutazione standard delle lesioni ossee nel mieloma multiplo è fatta con la radiografia dello scheletro. [10] La stadiazione classica del mieloma multiplo con il sistema Durie and Salmon (D&S, cfr. Appendice A1), presentato nel 1975 ma largamente utilizzato ancora oggi assieme al nuovo sistema International Staging System (ISS, cfr. Appendice A2), è basata sulle lesioni ossee viste con questa metodica convenzionale. [11, 12] La presenza di lesioni ossee rappresenta uno dei criteri per definire un mieloma sintomatico, e quindi per iniziare il trattamento secondo i criteri CRAB. [13, 14] Tuttavia, con la radiografia dello scheletro le piccole lesioni spesso non sono diagnosticate, così come l'infiltrazione diffusa del midollo osseo. La risonanza magnetica (RMN) e la tomografia a emissione di positroni (PET) rilevano una maggiore quantità di malattia della radiografia dello scheletro e hanno portato alla definizione del sistema di stadiazione Durie and Salmon plus. [15-19] La RMN può rilevare l'infiltrazione midollare di malattia, ed ha valore prognostico nel mieloma multiplo. [20-22] Essa può rilevare lesioni di dimensioni più piccole rispetto alla RX dello scheletro, come pure rileva il pattern di infiltrazione diffusa; inoltre, può rilevare i plasmocitomi dei tessuti molli. [23] La RMN ha poche controindicazioni e il grande vantaggio di non esporre il paziente a radiazioni. Essa viene spesso utilizzata alla diagnosi per la valutazione in urgenza di eventuale compressione del midollo spinale da fratture o cedimenti patologici del rachide.

Grazie all'alto potere risolutivo, al valore prognostico, e all'insostituibile utilizzo per la valutazione della compressione midollare, la RMN della colonna rappresenta attualmente uno standard da affiancare alla radiografia dello scheletro nel paziente affetto da mieloma multiplo alla diagnosi. [10]

La PET, ad oggi, non è una tecnica standard nel mieloma multiplo, e rappresenta una integrazione diagnostica. [24] Essa è complementare alla RMN, perché è una tecnica d'immagini whole-body che rileva la sede e l'attività delle lesioni ossee da mieloma e i plasmocitomi. [25] Ha inoltre valore prognostico nell'identificazione di mieloma multiplo ad alto rischio, ed è prognostica nei pazienti di nuova diagnosi sottoposti a trapianto autologo. [25, 26] Il principale problema correlato alla PET è il costo e l'alta esposizione alle radiazioni. [27]

La TAC ha un suo spazio nel mieloma multiplo soprattutto nell'utilizzo "ad hoc" per la valutazione di lesioni ossee, e per la valutazione chirurgica del loro trattamento. E' utilizzata, in modo mirato, anche nel follow-up per valutare la riparazione ossea, come pure sia in diagnosi che in follow-up nei pazienti che hanno plasmocitomi solitari. La TAC whole-body è stata usata con successo per la stadiazione e il monitoraggio della risposta del mieloma multiplo perché consente una rilevazione simultanea del coinvolgimento midollare, dell'osteolisi e della malattia extramidollare. [28]

La scintigrafia con Tecnezio-99m sestamibi è stata recentemente dimostrata essere sensibile e specifica per il mieloma multiplo, nonostante abbia capacità limitata nel rilevare le lesioni focali. [29, 30]

La RMN whole-body (WB-RMN) è una tecnica emergente per la valutazione del mieloma multiplo. [31] Può rilevare differenti pattern di infiltrazione del midollo, ed è superiore alla radiografia dello scheletro nel rilevare l'infiltrazione midollare dei pazienti con mieloma multiplo. [18] Inoltre, essa può rilevare la malattia extramidollare, ed è stata recentemente dimostrata essere una procedura estremamente sensibile per la stadiazione, la rilevazione della risposta e la diagnosi della recidiva nel mieloma. [32] Uno studio prospettico del 2008 ha mostrato che la WB-RMN è superiore alla TAC whole-body per la stadiazione del mieloma multiplo. [33] I vantaggi della WB-RMN sono il grande standard qualitativo delle immagini di tutta l'anatomia del corpo, che non è limitata alla colonna, e l'assenza di esposizione alle radiazioni. [34]

1.2. La risonanza magnetica diffusion-weighted

La risonanza magnetica diffusion-weighted (DW-RMN) è un avanzamento tecnologico della RMN: essa rileva la motilità delle particelle di acqua in differenti tessuti (capacità di diffusione e moto Browniano) per creare delle mappe di questi movimenti. [35, 36] La diffusione delle molecole di acqua nei tessuti dipende fondamentalmente dalla cellularità, e chiaramente dalle caratteristiche specifiche

del tessuto in esame.[35, 36] Una bassa cellularità crea un aumento della diffusione, e del coefficiente di diffusione apparente (ADC) che è rilevato dalla macchina; una maggiore cellularità riduce lo spazio di movimento e diffusione delle molecole di acqua tra le cellule, e genera un basso coefficiente di diffusione. [35, 36] Il concetto può essere letto anche come una misura della distanza tra le particelle di acqua nello spazio intercellulare: più breve è questa distanza, più chiara appare la regione considerata. [35, 36] Il segnale viene rilevato in tutte le regioni del corpo e in base all'intensità del segnale rilevato viene ricostruita una mappa di rilevazione della diffusione. [35, 36] Per un approfondimento ulteriore, in Appendice B1 sono stati esposti i principi fisici e tecnici della metodica. In campo oncologico, questa metodica può essere molto utile perché da una valutazione della cellularità del tessuto tumorale, che è diversa da quella del tessuto normale, e che si modifica grazie alla terapia. Le variazioni minime della diffusione d'acqua tra le cellule rendono infatti questa metodica estremamente promettente soprattutto per il valore funzionale di questo tipo di imaging. Infatti la diffusione del tessuto tumore è diversa da quella del tessuto normale per le diversità in termini di cellularità e quindi di diffusione. Inoltre, le variazioni della diffusione legate alla risposta o alla progressione alla terapia rendono questa tecnica in grado di valutare se vi sono ancora parti di tessuto in risposta che hanno ancora parti con le caratteristiche del tessuto tumorale.

1.3. Razionale dello studio

Studi preliminari hanno dimostrato una grande sensibilità della RMN whole-body diffusion-weighted (DW-RMN) nella diagnosi delle lesioni da mieloma e nel monitoraggio della risposta. [37, 38] L'esigenza di una nuova metodica di imaging nel mieloma multiplo nasce dalla spesso insoddisfacente risoluzione della radiografia dello scheletro, e dal limitato settore anatomico studiato con la RMN della colonna. Inoltre questa metodica innovativa ha il potenziale di essere una metodica funzionale, e quindi potrebbe rilevare i settori ossei di malattia attiva anche dopo il trattamento. Nel 2008 abbiamo disegnato un protocollo prospettico con l'obiettivo di valutare se la DW-RMN potesse rilevare un numero maggiore di lesioni ossee rispetto alla radiografia dello scheletro e la RMN della colonna. Abbiamo deciso di valutare i pazienti sintomatici prima dell'avvio del primo trattamento o i pazienti recidivati prima del trattamento della recidiva, per confrontare il valore del metodo sperimentare rispetto ai metodi standard sia alla diagnosi, sia alla ricaduta. Lo studio proponeva anche valutazioni laboratoristiche e biologiche per correlare l'imaging alle caratteristiche di malattia. Inoltre, per valutare il valore della nuova metodica nella valutazione della risposta, lo studio è stato disegnato per seguire i pazienti longitudinalmente nel tempo ripetendo le valutazioni al termine del trattamento e sei mesi dopo il termine del trattamento. Abbiamo inoltre deciso in via esplorativa di pianificare un sottostudio per rilevare

le lesioni dei pazienti asintomatici per capire il potenziale della WB-RMN nella stadiazione e nel follow-up dei pazienti con mieloma smouldering. [13, 14]

2. Metodi

2.1. Disegno dello studio

Lo studio è stato disegnato per comparare la DW-MRI con la radiografia dello scheletro e la RMN della colonna. La popolazione in studio consisteva in pazienti sintomatici alla diagnosi che richiedessero trattamento o pazienti in recidiva prima del trattamento della recidiva, e sono stati pianificati 3 esami radiologici longitudinali per paziente. I pazienti dovevano fare una radiografia dello scheletro completo, una RMN della colonna, una RMN whole-body, e una DW-RMN prima del trattamento, dopo il trattamento e sei mesi dopo la fine del trattamento. Nello stesso tempo degli esami radiologici, i pazienti dovevano eseguire gli esami biochimici e la biopsia del midollo osseo. Lo studio includeva anche un sottostudio per arruolare pazienti asintomatici a uno stadio precoce che non richiedessero trattamento e pianificava gli stessi esami radiologici, biochimici e istologici dello studio principale, da fare all'arruolamento, sei mesi dopo l'arruolamento e 12 mesi dopo l'arruolamento. Lo studio è stato disegnato per essere prospettico e monocentrico. Il motivo per cui lo studio è stato eseguito in modo prospettico è stato quello di poter eseguire delle correlazioni degli esami radiologici con le caratteristiche biologiche di malattia e la risposta ai trattamenti, cosa che poteva essere garantita solo da un disegno prospettico per ridurre i fattori di confondimento. Lo studio è stato disegnato per essere monocentrico perché la

metodica sperimentale era disponibile solo nel nostro centro ad alta specializzazione per la diagnosi e il trattamento del mieloma multiplo. Il centro in cui è stato eseguito lo studio è stato la Divisione di Ematologia e Trapianto di Midollo Osseo della Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano: in questa divisione sono stati reclutati i pazienti, sono state eseguite le valutazioni laboratoristiche e istologiche di malattia, è stata eseguita la raccolta e l'analisi dei dati. L'esecuzione degli esami radiologici è stato eseguito presso la la Divisione di Radiologia diagnostica 1 della stessa istituzione. Per la pianificazione statistica del campione da studiare è stato coinvolto il Dipartimento di Statistica del nostro Istituto. Lo studio è stato condotto in accordo con la Dichiarazione di Helsinki e l'International Conference of Harmonization (ICH) per la buona pratica clinica (Good Clinical Practice, GCP). Tutti i pazienti hanno firmato un consenso informato per prendere parte allo studio.

2.2. Obiettivi dello studio

L'obiettivo primario dello studio è stato quello di stabilire se la DW-RMN potesse rilevare un numero maggiore di lesioni ossee rispetto alla radiografia standard e alla RMN della colonna nei pazienti con mieloma multiplo sintomatici di stadio D&S I-III alla diagnosi prima dell'inizio del trattamento o alla recidiva di malattia.

Gli obiettivi secondari erano:

- 1) rilevare se il cambiamento nel numero di lesioni rilevate con la DW-RMN al follow-up correlassero con la risposta di malattia alla terapia;
- 2) rilevare se il numero delle lesioni rilevate con la DW-RMN al follow-up correlassero la progressione di malattia;
- 3) valutare se la DW-RMN potesse rilevare un numero più elevato di lesioni ossee rispetto alla WB-RMN.

L'obiettivo esplorativo del sottostudio era di valutare se la DW-RMN potesse rilevare più lesioni ossee rispetto alle procedure d'imaging standard nei pazienti con mieloma multiplo asintomatici in stadio I Durie e Salmon che non richiedessero trattamento, e di osservare il potenziale valore di questo nel follow-up.

Lo studio, in concomitanza con gli obiettivi clinici, si proponeva inoltre di correlare i dati rilevati dalla tecnica sperimentale di imaging con le caratteristiche biologiche di malattia rilevate mediante gli esami biochimici e istologici eseguiti in concomitanza con gli esami radiologici, allo scopo di ricercare quali caratteristiche avessero i pazienti con lesioni ossee rilevate con tecnica DW-RMN.

Per la risposta al quesito posto dall'obiettivo primario, dal terzo obiettivo secondario e dell'obiettivo esplorativo, sono stati comparati il numero totale di segmenti ossei con lesioni focali visti con ogni metodica radiologica. Per soddisfare gli obiettivi secondari, è stata eseguita una correlazione tra il numero delle lesioni e la risposta di malattia alla terapia, e con la sopravvivenza libera da progressione. I

cambiamenti del numero delle lesioni dopo trattamento sono stati valutati dai radiologi, e correlati con la risposta valutata secondo i criteri internazionali di risposta (International Uniform Response Criteria). [39, 40]

2.3. Popolazione in studio

Lo studio ha incluso pazienti consecutivi di età ≥ 18 anni e < 80 anni con mieloma multiplo, sintomatici, di stadio I-III di Durie-Salmon all'inizio del trattamento di prima linea oppure alla recidiva dopo una risposta di malattia (risposta completa [CR] o parziale [PR]) alla terapia di durata minima di sei mesi, prima dell'avvio del trattamento della recidiva. Per i pazienti che avevano fatto la diagnosi in altri centri, l'istologia è stata rivista alla Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori di Milano. Il sottostudio ha incluso pazienti con mieloma multiplo asintomatico di stadio I (Durie-Salmon) alla diagnosi che non richiedevano trattamento. Tutti i pazienti per essere arruolati dovevano firmare il consenso informato.

I criteri di esclusione erano:

- 1) gravidanza o periodo di allattamento;
- 2) seconda malattia oncologica attiva;
- 3) ipersensibilità di tipi I o reazioni anafilattiche al Gadolinio;
- 4) disturbi mentali includenti la claustrofobia (ICD 10, F 40.2);
- 5) impianti ad attivazione elettronica, magnetica o meccanica;

- 6) devices attivi con operatività ferromagnetica o elettrica (ad es. defibrillatori/cardioversori automatici);
- 7) pacemaker cardiaci;
- 8) residui metallici negli occhi;
- 9) clips emostatiche ferromagnetiche nel corpo o nel sistema nervoso centrale;
- 10) impianti stapediali o cocleari;
- 11) pompe insuliniche e stimolatori neurali;
- 12) protesi valvolari cardiache.

2.4. Procedure dello studio

Lo studio pianificava una DW-RMN, una RMN whole-body, una RMN della colonna e una radiografia dello scheletro con valutazioni cliniche e laboratoristiche ai tre punti temporali previsti dallo studio (vedi Tabella 1).

I pazienti al trattamento di prima linea dovevano fare le valutazioni di studio entro 15 giorni prima dell'inizio del trattamento, entro un mese dalla fine del trattamento, e sei mesi dopo il termine del trattamento. I pazienti in recidiva dopo una risposta di malattia (CR o PR) che fosse durata almeno sei mesi dovevano eseguire gli stessi esami alla recidiva, entro un mese dopo la fine del trattamento della recidiva, e sei mesi dopo la fine del trattamento di prima linea. Nel caso la metodica sperimentale rilevasse un numero di lesioni superiore rispetto alle metodiche standard, era consigliata una PET per valutare l'eventuale attività delle lesioni.

Tabella 1. Procedure dello studio

Procedure	Arruolamento	Termine del trattamento¹	Sei mesi dopo il termine del trattamento¹
Esami di laboratorio: elettroforesi delle proteine sieriche; IgA, IgG, IgM, immunofissazione sierica, Freelite, proteinuria delle 24 ore, proteinuria di Bence-Jones 24h, immunofissazione urinaria, β 2-microglobulina	X	X	X
RMN diffusion-weighted (DW-RMN)	X	X	X
RMN whole-body	X	X	X
RMN della colonna cervicale, dorsale e lombosacrale	X	X	X
Radiografia dello scheletro: RX del cranio, rachide cervicale, dorsale, lombosacrale, bacino, sterno, omeri e femori bilaterali, emicostati bilaterali	X	X	X
Biopsia osteomidollare e aspirato midollare	X	X	X
Analisi FISH per del(13), t(4:14), t(11:14), t(14:16), del(17) su plasmacellule selezionate	X	-	-

Abbreviazioni: FISH=fluorescence in situ hybridization

Note: 1. I pazienti del sottostudio non erano sottoposti ad alcun trattamento, ed eseguivano gli esami all'arruolamento, 6 mesi dopo e 12 mesi dopo l'arruolamento.

2.5. Metodi radiologici

L'esame di risonanza magnetica standard nei pazienti con mieloma multiplo è un esame sagittale in T1W1 e in T2W1 della colonna. Gli scanner di risonanza multicanale con bobine "phase-array" multiple che coprono l'intero corpo rendono attualmente possibile l'imaging dell'intero sistema scheletrico. L'acquisizione d'immagini parallela con movimenti liberi del tavolo e le nuove sequenze TSE T2 SPACE (SPAIR) e T1 TSE con brevi tempi d'esame e alta risoluzione spaziale rendono possibile l'esecuzione della WB-RMN. L'imaging diffusion-weighted, che produce immagini simili alla PET, è usato sempre più frequentemente con valori b elevati grazie agli avanzamenti nella tecnologia dei gradienti e lo sviluppo di tecniche diffusion-weighted a tre dimensioni con soppressione del segnale di sottofondo. [41, 42] Per rispondere alle domande dello studio, sono stati applicati 5 metodi radiologici:

- 1) radiografia del rachide in toto;
- 2) RMN della colonna sagittale;
- 3) RMN whole-body coronale;
- 4) RMN diffusion-weighted;
- 5) immagini di "fusione" composte dalla RMN whole-body coronale e RMN diffusion-weighted.

La radiografia del rachide in toto consisteva in radiografie del cranio, rachide cervicale, dorsale, lombosacrale, bacino, femore destro e sinistro, omero destro e sinistro, sterno, coste bilaterali (cfr. Tabella 1).

Le immagini sagittali della colonna sono state acquisite con sequenze 2D TSE T2WI (fat sat) SPAIR (TR, TE, 5020/108, ETL 20, ET/sezione 14, IPAT 2, grandezza di Voxel 1,4x0,8x3,5 mm; spessore della sezione 3,5 mm, matrice [risoluzione base] 448; media 2; FOV 400, AT 2,26 min) e con sequenze 2D TSE T1WI (TR, TE, 524/11, ETL 2, ET/sezione 154, IPAT 2, grandezza di Voxel 1,3x0,8x3,5 mm, spessore della sezione 3,5 mm, matrice [risoluzione base] 512, media 2, FOV 400, AT 2,42 min).

Gli esami di RMN whole-body coprivano 6 consecutive posizioni di tavolo: testa/collo, torace, addome, pelvi, arti superiori e inferiori. La RMN whole-body consisteva in sezioni coronali a 5 fasi TSE T1 WI (TR,TE, 550/9.5;ETL 153; IPAT 2; grandezza di Voxel 1,5x1,5x5 mm; 1 media; spessore di sezione 5 mm; FOV 500, matrice [risoluzione base] 448; AT 2,51 min) e sequenze T2 STIR (TR,TE, TI, 4000/368/150; ETL; IPAT 2; grandezza di Voxel 1,3x1,3x4 mm; spessore di sezione 4 mm; FOV 500, matrice [risoluzione base] 384; AT 1,36 min): le immagini whole-body sono state valutate sia in modalità segmentale, sia nella modalità di “fusione” con le immagini composte.

La RMN diffusion-weighted consisteva in sequenze eco-planari (SPAIR-EPI) a impulso singolo T2 SPAIR in modalità Diffusion-Weighted assiale (TR,TE, 4800/70; fattore EPI 138; IPAT 2; dimensione di Voxel 3,6x2,9x5 mm; media 2; spessore di sezione 6 mm; FOV 500, matrice [risoluzione base] 172; AT 2,10 min) con valori b a 50, 400, 800, 1000 s/mm² in 3 dimensioni (TRACE). Le immagini assiali contigue sono state acquisite dall'apice della testa all'articolazione tibio-tarsica, a respirazione libera, in 6 o 7 fasi a seconda dell'altezza del paziente. Le immagini dalla testa alla punta dei piedi sono state viste in modalità segmentale con le immagini sorgente assiali, come immagini whole-body, e come immagini di fusione. Le immagini a proiezione massima d'intensità (MIP) di tutte le stazioni così come le immagini di fusione sono state ricostruite e mostrate come viste anteroposteriori e laterali nella modalità ad inversione della scala di grigi.

Le immagini di fusione sono state fatte mediante la sovrapposizione della T1W1 coronale e della diffusion-weighted a valori di b=1000, per produrre un imaging simile alla PET-TAC.

La RMN dell'intera colonna sagittale, la RMN whole-body e la DW-RMN sono state acquisite in un esame singolo di 45 minuti senza riposizionare il paziente.

Lo scanner utilizzato per tutti gli esami di risonanza è stato il Siemens (Erlangen, Germany) Avanto 1,5 Tesla MRI. L'analisi delle immagini e la visualizzazione sono state fatte con il software Siemens Syngo V15.

Per quanto concerne l'interpretazione delle immagini, gli esami sono stati letti da 2 radiologi in cieco, ovvero ogni radiologo non sapeva la refertazione per singolo esame dell'altro. I casi di discordanza nel numero delle lesioni sono stati risolti mediante consenso. Visto che la RMN diffusion-weighted aveva 2 modalità di lettura diverse (radiologica e informatica o numerica basata sul coefficiente apparente di diffusione), è stato deciso di seguire il criterio radiologico. Il criterio radiologico considerava come standard le lesioni visibili in RMN convenzionale. Sulla base dello standard, venivano definite le lesioni in DW-RMN che anatomicamente corrispondevano alle lesioni attive viste in RMN della colonna. In base all'aspetto rilevato in DW-RMN sulle lesioni validate da RMN convenzionale, venivano cercate anche le altre lesioni che avevano le stesse caratteristiche delle lesioni note. Le lesioni venivano quindi contate per osso interessato. L'attribuzione della natura delle lesioni apprezzabili solo in DW-RMN ma non in RMN convenzionale è stata effettuata secondo i seguenti criteri: 1) primo criterio evolutivo: se si osservava la trasformazione di una lesione apprezzabile solo in DW-RMN in una lesione apprezzabile in RMN convenzionale, la lesione veniva considerata malattia; 2) secondo criterio evolutivo: se le lesioni si comportavano analogamente a quelle "certe" in caso di risposta di malattia (scomparsa) o di progressione di malattia (evoluzione), le lesioni venivano considerate malattia; 3)

criterio istologico: confronto tra l'immagine in DW-RMN con il quadro istologico, qualora possibile.

2.6. Esami di laboratorio

Tutti i pazienti hanno eseguito questi esami laboratoristici all'arruolamento (vedi Tabella 1):

- emocromo con formula;
- esami ematici (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, BUN, creatinina, LDH, PCRq, uricemia, AST, ALT, GGT, ALP, bilirubina (totale e diretta/indiretta), albumina, elettroforesi proteica, IgA, IgG, IgM, immunofissazione sierica, catene leggere sieriche "Freelite", β₂-microglobulina; esami virologici (HIV-Ab, HBsAg, HCV-Ab), e test di gravidanza per donne in età fertile;
- Esami urinari: proteinuria 24h proteinuria, proteinuria Bence-Jones 24h proteinuria, immunofissazione urinaria;
- Biopsia osteomidollare e aspirato midollare per esame morfologico e analisi FISH.

La FISH è stata fatta su cellule selezionate positivamente CD138+ per del(13q14) e del(17p13.1), e le traslocazioni del 14p32 [t(4;14)(p16;q32), t(14;16)(q32;q23), e t(11;14)(q13;q32)].

In via esplorativa e per un numero limitato di pazienti, è stato anche eseguito il dosaggio del telopeptide carbossiterminale del collagene tipo I (ICTP), associando

anche il dosaggio dei parametri del metabolismo calcico (idrossivitamina D3, ormone paratiroideo [PTH], calcemia, calciuria, fosfaturia) per fare diagnosi differenziale, in caso di valori elevati, con altre patologie del metabolismo osseo.

2.7. Metodi statistici

2.7.1. Dimensione del campione

Lo studio è stato disegnato per dimostrare un incremento del 30% del numero di lesioni ossee rilevate dalla DW-RMN (metodo sperimentale) in confronto con la radiografia dello scheletro e la RMN della colonna (metodi standard). Sulla base delle lesioni focali rilevate dai metodi standard in 72 pazienti con mieloma di stadio I-III in fase di disegno dello studio, è stato calcolato un effect size (rapporto del delta alla deviazione standard) del 58.8%, un valore a metà tra effect size ampio (80%) e medio (50%) in accordo con la classificazione di Cohen. Per rilevare un effect size di questa dimensione con un test t di Student a una coda con il 5% di significatività e il 90% di potenza, dovevano essere arruolati 27 pazienti nello studio. Poiché ci aspettavamo un drop-out stimato intorno al 10% dei pazienti arruolati a causa della lunga durata dell'esame di RMN o per altri motivi clinici, è stato previsto di arruolare un totale minimo di 30 pazienti nello studio principale. E' stata inoltre pianificata una rivalutazione di metà studio del campione dopo l'arruolamento dei primi 20 pazienti secondo l'approccio proposto da Proschan, Liu & Hunsberger (2003). [43] I dati di interim sono stati usati per decidere se

mantenere o aumentare la dimensione del campione, a seconda che l'effect size stimato fosse allineato o no con i valori anticipati, e considerando un effect size del 37.4% sufficiente per essere rilevato. Questa analisi di metà termine è stata eseguita nel settembre del 2009 e la dimensione del campione originale di 30 pazienti è stata confermata. E' stato deciso di arruolare nel sottostudio esplorativo un campione minimo di 10 pazienti come risultato di consenso tra gli ematologi, i radiologi e gli statistici.

2.7.2. Analisi dei risultati

La sopravvivenza globale ("overall survival", OS) è stata calcolata dal primo esame alla data di decesso. La sopravvivenza libera da progressione ("progressione free survival", PFS) è stata calcolata dal primo esame alla data della progressione o del decesso per qualunque causa. La sopravvivenza libera da recidiva ("relapse free survival", RFS) è stata calcolata dal primo esame alla data della progressione o recidiva considerando censorizzati i decessi per mortalità non correlata a recidiva ("non-relapse mortality", NRM). L'incidenza di recidiva ("relapse incidence", RI) è stata calcolata dal primo esame alla prima recidiva o al decesso per NRM considerando i due eventi competitivi tra loro. Le curve di sopravvivenza sono state calcolate con il metodo di Kaplan-Meier e le differenze calcolate con il metodo log-rank. Le curve d'incidenza cumulativa sono state calcolate con il metodo dell'Incidenza Cumulativa con rischi competitivi, e le differenze calcolate con il

test di Gray. [44, 45] Le differenze d'incidenza nelle tabelle di contingenza sono state calcolate con il test di Fisher oppure con il test chi-square di Pearson con correzione della continuità di Yates; è stato utilizzato anche il test per il trend di Armitage. Per il calcolo della correlazione è stata utilizzata, a seconda della distribuzione del campione in analisi, la correlazione lineare o non parametrica con il metodo di correlazione lineare di Pearson o quello con i rank di Spearman, rispettivamente. Per la costruzione delle curve di correlazione, qualora vi fossero significatività nei test, è stato utilizzato il modello di regressione lineare generalizzata. Per la correlazione lineare del numero delle lesioni ossee con il rapporto Freelite è stata eseguita una trasformazione del rapporto, visto che il valore normale del rapporto è compreso tra 0.25 e 1.65mg/L. È stato deciso di considerare il modulo del logaritmo naturale del rapporto Freelite. Il logaritmo naturale è stato scelto con il rationale di valutare l'andamento esponenziale delle Freelite in correlazione con la quantità di malattia; il modulo è stato scelto poiché era necessario trasformare i valori negativi in positivi, e, poiché l'esponenziale rifletteva comunque una quantità di malattia (κ o λ), la essa poteva essere quantificata in positivo e correlata con le lesioni viste in RMN. Per il confronto tra medie (sia appaiate che non) è stato utilizzato il test T di Student. Per il confronto tra la DW-RMN e le metodiche convenzionali sono stati eseguiti tre tipi di test: 1) metodica sperimentale vs radiografia dello scheletro; 2) DW-RMN vs RMN della

colonna; 3) DW-RMN vs radiografia dello scheletro + RMN della colonna. Poiché la metodica sperimentale rilevava moltissime lesioni microscopiche, il confronto è stato fatto per ossa interessate correlando anatomicamente lesione per lesione e osso per osso. Per quanto concerne il confronto al punto 3, la somma delle lesioni (RX scheletro + RMN della colonna) è stata fatta in modo pesato e con questo criterio: per quanto concerne il rachide, sono state contate una sola volta le lesioni viste in RX scheletro e RMN della colonna nella stessa sede; le lesioni positive in RMN della colonna e negative in RX scheletro sono state considerate malattia; le lesioni positive in RX scheletro e negative alla RMN della colonna sono state riviste singolarmente e valutate caso per caso interpretandole o come malattia o come falso positivo (nel qual caso non erano considerate nel calcolo generale e nei confronti). Per il resto dello scheletro, ogni lesione focale vista in RX scheletro è stata considerata valida per l'analisi. Non sono state considerate le lesioni focali da esito di interventi precedenti (ad es. craniotomia decompressiva, o, più frequentemente, lesioni litiche da biopsia osteomidollare). Tutti i test sono stati eseguiti a 2 code. Il valore di significatività è stato definito come $p < 0.05$.

2.7.3. Software e packages utilizzati

Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software R [46] versione 2.14.1. Per le funzioni di correlazione e per le tabelle di contingenza sono stati utilizzati i

pacchetti built-in. Sono stati utilizzati per la sopravvivenza i packages “survival” e “cmprsk”. [47, 48]

3. Risultati

I pazienti arruolati nello studio sono stati 50 tra il 2008 e il 2010. Di questi, 36 pazienti erano affetti da mieloma multiplo ed erano sintomatici, questi sono stati arruolati nello studio principale. 14 pazienti asintomatici sono stati arruolati nel sottostudio.

3.1. Caratteristiche dei pazienti

I pazienti con esami completamente valutabili sono stati 35 poiché un paziente non ha potuto fare il primo esame di RMN dopo aver firmato il consenso poiché disпноico in posizione supina. Le caratteristiche dei pazienti sono riportate in Tabella 2. L'età mediana dei pazienti dello studio principale era 65 anni (range, 33-81 anni). Lo stage Durie e Salmon era I per 17 pazienti (48.6%) , II per 2 pazienti (5.7%) e III per 16 pazienti (45.7%). La maggior parte dei pazienti era affetta da un mieloma in stadio I (71.4%) secondo l'ISS. Venti pazienti avevano un mieloma IgG (57.4%), 9 pazienti avevano un mieloma IgA (25.7%), 3 (8.6%) avevano un mieloma non secernente, 3 (8.6%) avevano un mieloma micromolecolare. Quindici pazienti erano affetti da mieloma sintomatico alla diagnosi (42.9%), 20 pazienti avevano mieloma ricaduto (57.1%) dopo almeno 6 mesi di risposta dalla terapia precedente. L'infiltrazione di malattia alla biopsia osteomidollare alla diagnosi era del 30%.

Tabella 2. Caratteristiche dei pazienti

Caratteristica	Valore	Range/%
Età (anni)	65	(33-81)
Stadio Durie e Salmon		
I	17	48.6%
II	2	5.7%
III	16	45.7%
Stadio International Staging System		
I	25	71.4%
II	6	17.1%
III	4	11.4%
Isotipo		
IgG	20	57.4%
IgA	9	25.7%
Micromolecolare	3	8.6%
Non-secernente	3	8.6%
Stato di malattia		
Alla diagnosi	15	42.9%
Ricaduta di malattia	20	57.1%
Infiltrazione midollare di plasmacellule	30%	2-99%
FISH su plasmacellule selezionate		
- Non eseguita per motivi tecnici (basso numero di plasmacellule)	2	5.7%
- Normale	10	28.6%
- del (13) or -13	15	42.9%
- t(11;14)	8	22.9%
- t(4;14)	3	8.6%
- t(14;16)	2	5.7%
- del(17)	2	5.7%
- del(1)	1	2.9%

Abbreviazioni: FISH=Fluorescence In-situ Hybridization

L'esame FISH su plasmacellule selezionate mostrava una FISH normale nel 28.6% dei pazienti, un 42.9% di essi aveva una del(13) o una monosomia del cromosoma 13, il 22.9% una t(11;14); i pazienti con t(4;14) e con del(17) erano rispettivamente 3 (8.6%) e 2 (5.7%).

3.2. Trattamento e risposta al trattamento

Il tipo di trattamento e la relativa risposta sono esposti in dettaglio in Tabella 3 e Tabella 4. Dopo il primo esame radiologico e le prime valutazioni di malattia, i pazienti hanno ricevuto un trattamento di prima linea o per la recidiva. Tra i 35 pazienti valutabili, 34 hanno eseguito terapia nel nostro centro. Tutti i 34 pazienti trattati nel nostro centro hanno fatto terapia con farmaci di nuova generazione: in particolare, 12 pazienti (35.3%) sono stati trattati con lenalidomide, 8 pazienti (23.5%) con thalidomide, 16 pazienti (47.0%) con bortezomib; i pazienti trattati con combinazioni di questi farmaci innovativi sono stati 5 (14.7%). Quattordici (40.0%) pazienti alla diagnosi sono stati trattati nel nostro centro: di questi, 6 pazienti (42.8%) hanno ricevuto un trattamento con thalidomide, 6 (42.8%) un trattamento con lenalidomide, e 4 pazienti (28.6%) sono stati trattati con bortezomib. Due pazienti (14.3%) erano trattati con una combinazione di bortezomib e thalidomide. I pazienti alla recidiva (20 in totale) hanno ricevuto in prevalenza bortezomib (15 pazienti, 75.0%), in minor misura lenalidomide (6 pazienti, 30.0%) e thalidomide (2 pazienti, 10.0%); i pazienti trattati con combinazioni di questi farmaci erano 3

(15.0%). Trentatré pazienti dei 34 trattati nel nostro centro (97.0%) hanno ricevuto un trattamento steroideo con desametasone o metilprednisone in concomitanza con l'uso dei nuovi farmaci. Nove pazienti (26.5%) hanno ricevuto un trapianto autologo, 2 pazienti (5.9%) un trapianto allogenico, di cui 1 dopo l'autologo. Dei 14 pazienti alla diagnosi trattati nel nostro centro, 4 (28.6%) hanno ricevuto il trapianto autologo, gli altri 10 (71.4%) hanno ricevuto solo i nuovi farmaci. Dei 20 pazienti in recidiva, 5 (25.0%) sono stati trattati con il trapianto autologo e 2 (10.0%) con il trapianto allogenico; un paziente ha ricevuto sia autologo che allogenico.

Al termine del trattamento di prima linea o della ricaduta, 29 pazienti sono stati valutabili per la risposta (85.4%) dato che 5 pazienti sono deceduti dopo trattamento per progressione di malattia (14.7%), e 1 paziente (2.9%) ha cambiato centro. I 29 pazienti valutabili per la risposta hanno ottenuto 3 sCR (10.3%), 7 VGPR (24.1%), 11 PR (37.9%); 3 pazienti sono rimasti stabili (SD, 10.3%), 5 pazienti sono andati in progressione (PD, 17.2%). Tra il 2° e il 3° esame radiologico nei pazienti valutabili rimasti (25 totali, 73.5%) lo stato di risposta era di 2 sCR (8.0%), 9 VGPR (36.0%), 7 PR (28.0%), 5 SD (20.0%) e 2 PD (8.0%).

Tabella 3. Trattamento alla diagnosi e alla recidiva

Caratteristica	Numero pazienti	% - range
Pazienti trattati nel nostro centro	34	-
Farmaci di nuova generazione:		
- Lenalidomide	12	35.3%
- Thalidomide	8	23.5%
- Bortezomib	16	47.0%
Steroidi (desamatesone o metliprednisone)	33	97.0%
Trapianto autologo	9	26.5%
Trapianto allogenico	2	5.9%
Pazienti alla diagnosi: trattamento	14	41.2% (100%)
- Lenalidomide		
- Thalidomide	6	(42.8%)
- Bortezomib	6	(42.8%)
- Trapianto autologo	4	(28.6%)
	4	(28.6%)
Pazienti in recidiva: trattamento	20	58.8% (100%)
- Lenalidomide	6	(30.0%)
- Thalidomide	2	(10.0%)
- Bortezomib	15	(75.0%)
- Trapianto autologo	5	(25.0%)
- Trapianto allogenico	2	(10.0%)

Tabella 4. Risposta al trattamento

Caratteristica	Numero pazienti	% - range
Pazienti trattati nel nostro centro	34	-
Pazienti valutabili per la risposta dopo trattamento	29	85.3% (100%)
Risposta di malattia dopo trattamento		
- sCR	3	(10.3%)
- CR	0	(0.0%)
- VGPR	7	(24.1%)
- PR	11	(37.9%)
- SD	3	(10.3%)
- PD	5	(17.2%)
Pazienti valutabili 6 mesi dopo il termine del trattamento	25	73.5% (100%)
Stato di risposta dopo 6 mesi di follow-up		
- sCR	2	(8.0%)
- CR	0	(0.0%)
- VGPR	9	(36.0%)
- PR	7	(28.0%)
- SD	5	(20.0%)
- PD	2	(8.0%)

Abbreviazioni: sCR= stringent complete response; CR= complete response; VGPR=very

good partial response; PR=partial response; SD=stable disease; PD=progressive disease.

3.3. Confronto tra la DW-RMN e le metodiche standard

Prima del trattamento, l'infiltrazione mediana midollare da plasmacellule era del 30% (range, 2-99%), la mediana del rapporto Freelite (kappa/lambda) era 3.09 (range, 0.01-265.00), la β 2-microglobulina mediana era 2.62 mg/L (range, 1.66-18.89 mg/L) e la mediana di componente monoclonale era 1610 mg/dl (range, 0-4870 mg/dl). Prima di iniziare il trattamento per mieloma sintomatico alla diagnosi, o per il mieloma recidivato, la radiografia dello scheletro ha rilevato una mediana di 1 segmento interessato da lesioni focali (range, 0-10 lesioni). La RMN della colonna ha rilevato una mediana di 0.0 segmenti ossei/paziente (range, 0.0-4.0 lesioni). L'associazione di RX dello scheletro e della RMN della colonna (somma pesata) ha mostrato una mediana di 2.0 lesioni focali per paziente (range, 0.0-10.0 lesioni). La RMN whole-body ha mostrato una mediana di 2.0 lesioni per paziente (range, 0.0-18.0 lesioni), che è stato significativamente superiore rispetto alla radiografia dello scheletro e della RMN della colonna ($p=0.03$). La DW-RMN ha mostrato una mediana di 5.8 segmenti ossei con lesioni focali (range, 0.0-18.0 lesioni), che era significativamente superiore dei metodi standard ($p<0.0001$).

Dopo il termine del trattamento, 29 pazienti (82.9%) sono stati valutati con tutti gli esami radiologici previsti. Tra il 1° e il 2° esame previsto dallo studio, 6 pazienti sono stati persi (17.1%): di questi, 5 pazienti sono morti per progressione di malattia (83.3%), 1 paziente ha cambiato il centro di trattamento e non ha potuto

più essere sottoposto agli esami previsti (17.7%). Lo stato di malattia prima del secondo esame del termine del trattamento era: 3 sCR (10.3%), 7 VGPR (24.1%), 11 PR (37.9%), 3 SD (10.3%), e 5 PD (17.2%). L'infiltrazione midollare mediana di plasmacellule era del 10% (range, 0-80%), il rapporto Freelite mediano era di 2.39 (range, 0.02-15.00), la componente monoclonale mediana era di 558 mg/dl (range, 0-3439 mg/dl), e la β 2-microglobulina mediana era 3.77 mg/L (range, 1.59-32.22 mg/L). La radiografia dello scheletro ha mostrato la mediana di 1 lesione focale (range, 0-8 lesioni), e la RMN della colonna ha mostrato una mediana di 0 lesioni (range, 0-5 lesioni). Entrambi i metodi standard sommati hanno mostrato una mediana globale di 1 lesione/paziente (range, 0-10 lesioni). La RMN whole-body ha mostrato una mediana di 0 lesioni (range, 0-4 lesioni) a paziente, che non è stata significativamente differente rispetto alle metodiche standard ($p=0.22$). La DW-RMN ha mostrato una mediana di 0 lesioni (range, 0-14 lesioni), che non era significativamente differente rispetto alle metodiche standard ($p=0.29$).

Dopo sei mesi di follow-up successivi al termine del trattamento di prima linea o della ricaduta, 25 pazienti erano valutabili poiché sono stati persi 4 pazienti tra il 2° e il 3° esame: 3 pazienti sono deceduti (1 di progressione e 2 di NRM), 1 paziente in progressione ha cambiato centro di trattamento e non si è sottoposto al 3° esame. Lo stato di malattia dei 25 pazienti era: 2 sCR (8.0%), 9 VGPR (36.0%), 7 PR (28.0%), 5 SD (20.0%) e 2 PD (8.0%). L'infiltrazione mediana midollare era del

15% (range, 0-60%). Il rapporto mediano di Freelite era 1.15 (range, 0.02-67.31), la mediana della componente monoclonale era 130 mg/dl (range, 0-2040), e la mediana del valore di β 2-microglobulina era 2.36 mg/L (range, 1.26-8.47 mg/L). In questi pazienti, l'RX dello scheletro ha mostrato una mediana di 0 lesioni (range, 0-7 lesioni), e la RMN della colonna ha mostrato la mediana di 0 lesioni (range, 0-3 lesioni). Associate, la RMN della colonna e la radiografia dello scheletro hanno mostrato una mediana di 1 lesione per paziente (range, 0-9 lesioni). La RMN whole-body ha mostrato 0 lesioni per paziente (range, 0-11 lesioni), e tale valore non è stato significativamente differente dalle metodiche standard ($p=0.40$). La DW-RMN ha mostrato una mediana di 1 lesione a paziente (range, 0-7 lesioni), non significativamente differente rispetto alle metodiche convenzionali ($p=0.21$).

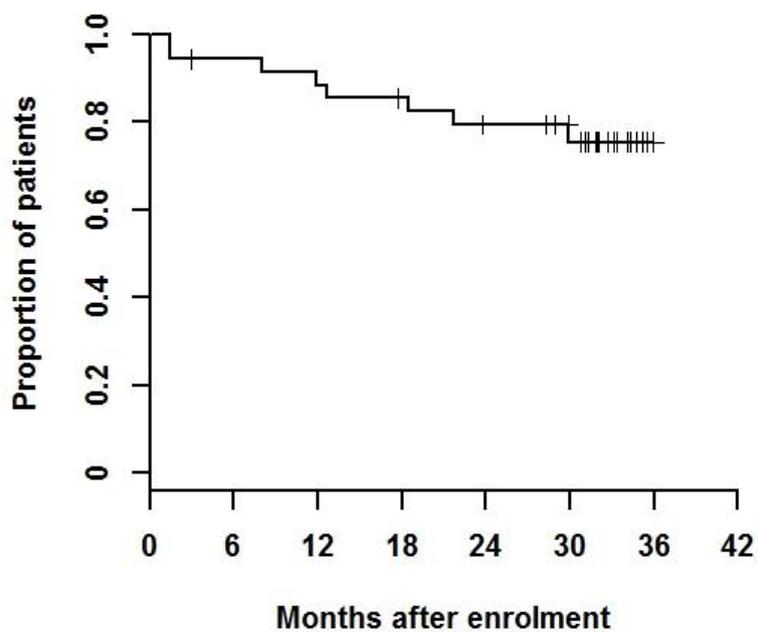
Per quanto concerne l'obiettivo esplorativo di eseguire il confronto della DW-RMN con la RMN whole-body, nel primo esame eseguito la DW-RMN ha osservato una media di 1.6 lesioni in più rispetto alla RMN whole-body (5.7 vs 4.1 lesioni, $p=0.006$). Nell'esame dopo trattamento si è mantenuta una superiorità della nuova metodica (media di 2.9 vs 1.4 lesioni, differenza media 1.5 lesioni, $p=0.001$), e così anche nel terzo esame di follow-up c'è stata una superiorità della DW-RMN rispetto alla RMN whole-body (media di 2.6 vs 1.4 lesioni, differenza media 1.2 lesioni, $p=0.002$).

3.4. Sopravvivenza globale dei pazienti, sopravvivenza libera da progressione e da recidiva, incidenza di recidiva e di mortalità non legata a recidiva

La sopravvivenza globale dei 35 pazienti arruolati nello studio è stata dell'88.4% (IC 95% 78.3%-99.8%) a 1 anno dal primo esame eseguito in studio, del 79.3% (IC 95% 66.8%-94.2%) a 2 anni, e 75.4% (IC95% 61.8%-92.0%) a 3 anni di follow-up.

La mediana di sopravvivenza globale non è stata raggiunta all'ultimo follow-up. La curva di sopravvivenza globale è mostrata in Figura 1.

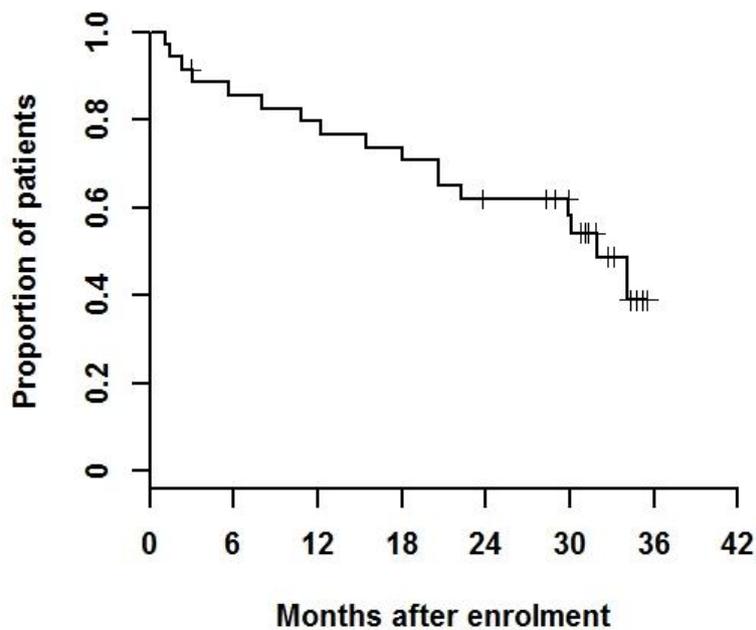
Figura 1. Sopravvivenza globale



Dei 34 pazienti trattati e valutabili al follow-up, 8 (23.5% incidenza cruda) sono deceduti all'ultimo follow-up, 5 pazienti sono deceduti per malattia, 3 pazienti sono morti per infezione correlata al trattamento: un paziente è morto di polmonite durante il primo trattamento, un paziente è deceduto per graft-versus-host disease dopo trapianto allogenico, un paziente è deceduto di infarto miocardico.

La sopravvivenza libera da progressione o morte è stata del 76.7% (IC95% 63.7%-92.2%) a un anno dall'arruolamento, del 61.9% (IC95% 47.6%-80.6%) a due anni, e del 39.0% (IC95% 21.8%-69.8%) dopo 3 anni di follow-up.

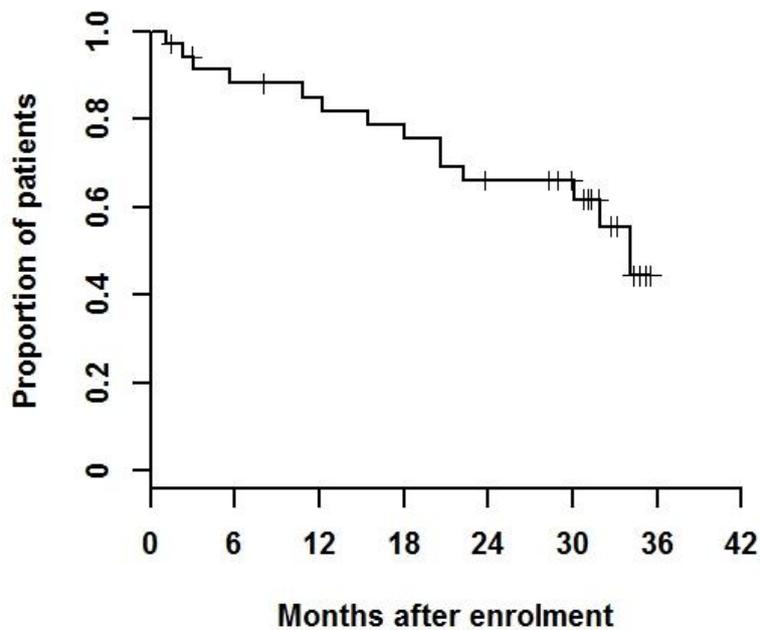
Figura 2. Sopravvivenza libera da progressione



La mediana di sopravvivenza libera da progressione è stata di 30.1 mesi. In totale, 14 pazienti sono andati in progressione a una mediana di 16.7 mesi (range, 1.1-34.1 mesi) dall'arruolamento. La sopravvivenza libera da progressione o morte è mostrata in Figura 2.

La sopravvivenza libera da recidiva è stata dell'81.8% (IC95% 69.6%-96.1%) a 1 anno, del 66.1% (IC95% 51.6%-84.6%) a 2 anni, del 44.4% (IC95% 25.4%-77.8%) a 3 anni di follow-up. La mediana di sopravvivenza libera da recidiva è stata di 31.9 mesi. La sopravvivenza libera da recidiva è mostrata in Figura 3.

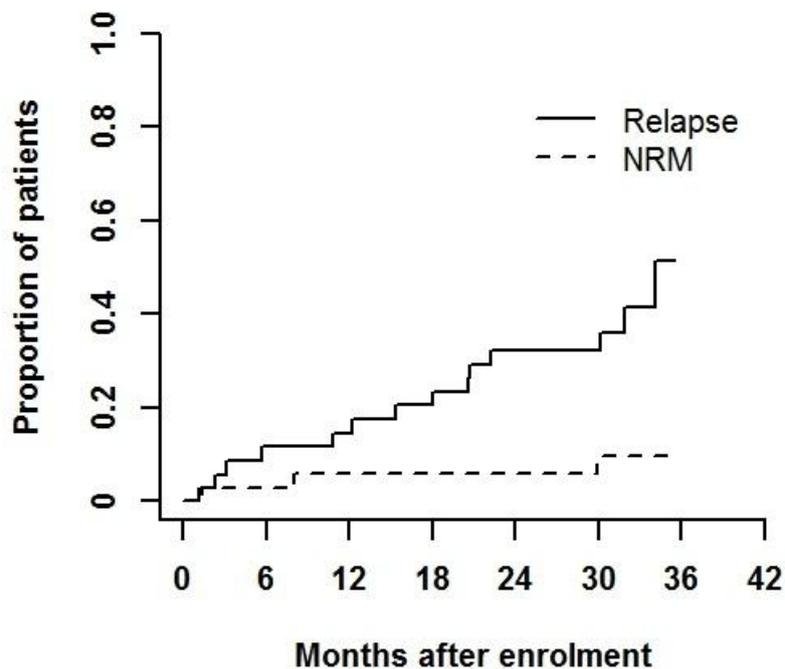
Figura 3. Sopravvivenza libera da recidiva



L'incidenza cumulativa di recidiva è stata del 14.6% a un anno, del 32.2% a 2 anni, e del 51.3% a 3 anni di follow-up.

L'incidenza di mortalità non legata a recidiva è stata del 2.8% a 6 mesi, del 5.8% a un anno e 2 anni, e del 9.7% a 3 anni di follow-up. La curva di incidenza di recidiva e di incidenza di mortalità non legata a recidiva è mostrata in Figura 4.

Figura 4. Incidenza di recidiva e mortalità non legata a recidiva

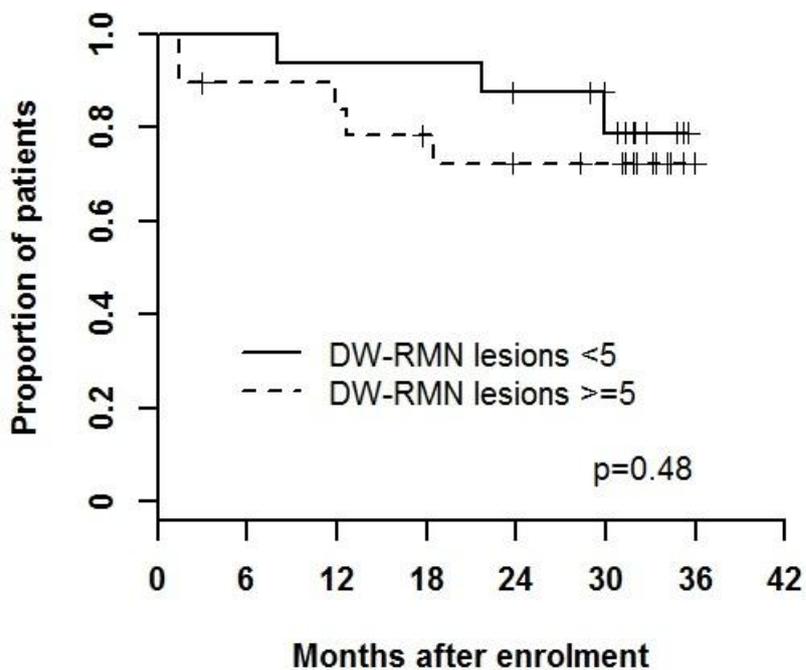


3.5. Valore prognostico della RMN diffusion-weighted

Dato che la mediana di lesioni ossee/paziente rilevate alla DW-RMN al primo esame è stata di 5.8 lesioni/paziente, abbiamo deciso di stratificare i pazienti in base alla presenza di ≥ 5 lesioni in confronto con quelli con < 5 lesioni. I gruppi erano composti rispettivamente da 19 e da 16 pazienti.

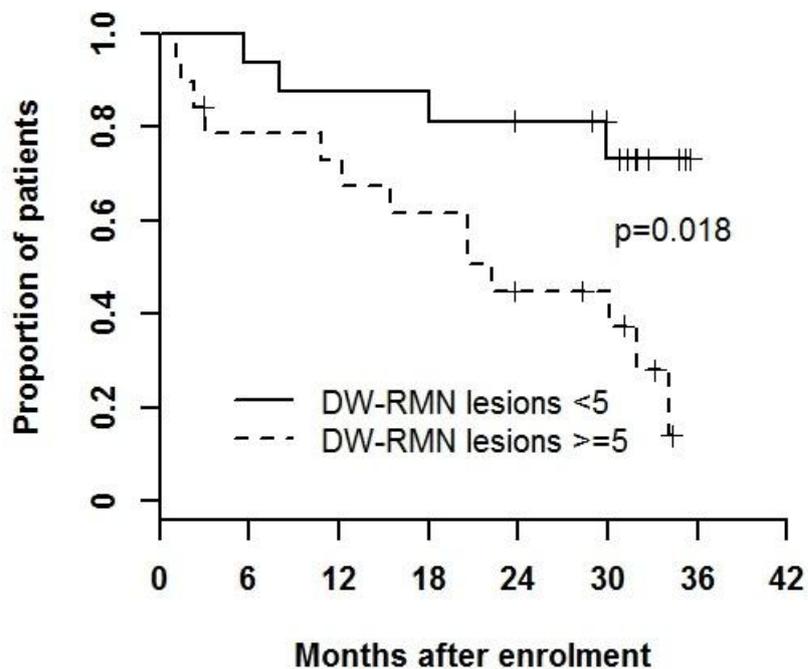
I pazienti con < 5 lesioni in confronto a quelli con ≥ 5 lesioni hanno avuto rispettivamente il 93.8% e l'83.9% di OS a un anno, l'87.5% e il 72.3% a 2 anni, e il 78.7% e il 72.3% a 3 anni, rispettivamente ($p=0.48$, Figura 5).

Figura 5. Sopravvivenza globale in base al numero di lesioni in DW-RMN



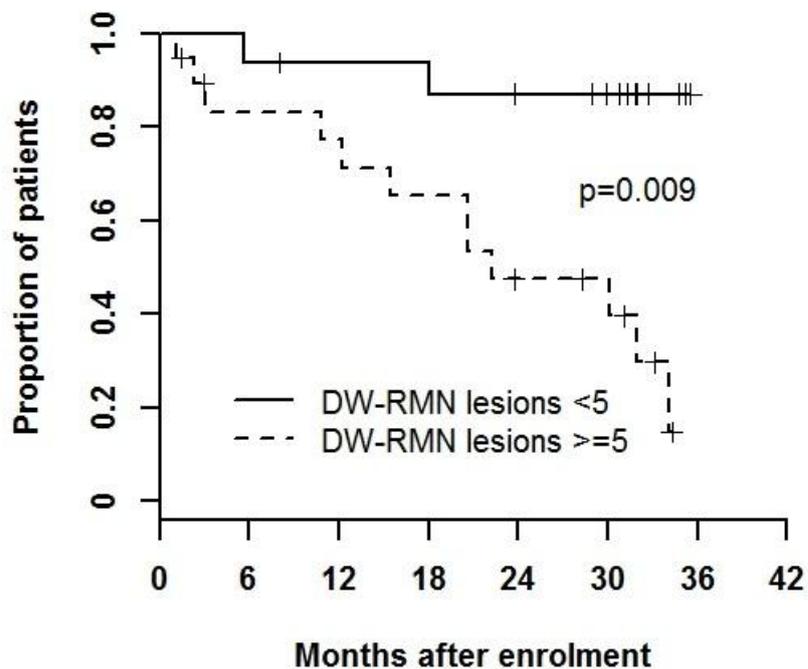
I pazienti con <5 lesioni rilevate alla DW-RMN hanno avuto una PFS dell'87.5% a 1 anno, dell'81.2% a 2 anni e del 73.1% a 3 anni, che è stata significativamente superiore ($p=0.018$) rispetto ai pazienti con ≥ 5 lesioni ossee, che hanno avuto PFS del 73.0%, del 44.9% e del 14.0% a 1, 2, e 3 anni di follow-up, rispettivamente. In Figura 6 è presente il confronto tra le curve di PFS.

Figura 6. Sopravvivenza libera da progressione in base al numero di lesioni ossee in DW-RMN



I pazienti con <5 lesioni hanno avuto sopravvivenze libere da recidiva del 93.8% a un anno, e dell'87.1% a 2 e 3 anni di follow-up, che sono state significativamente superiori ($p=0.009$) rispetto ai pazienti con ≥ 5 lesioni, che hanno avuto RFS del 77.3% a 1 anno, del 47.6% a 2 anni e del 14.3% a 3 anni di follow-up (cfr. Figura 7).

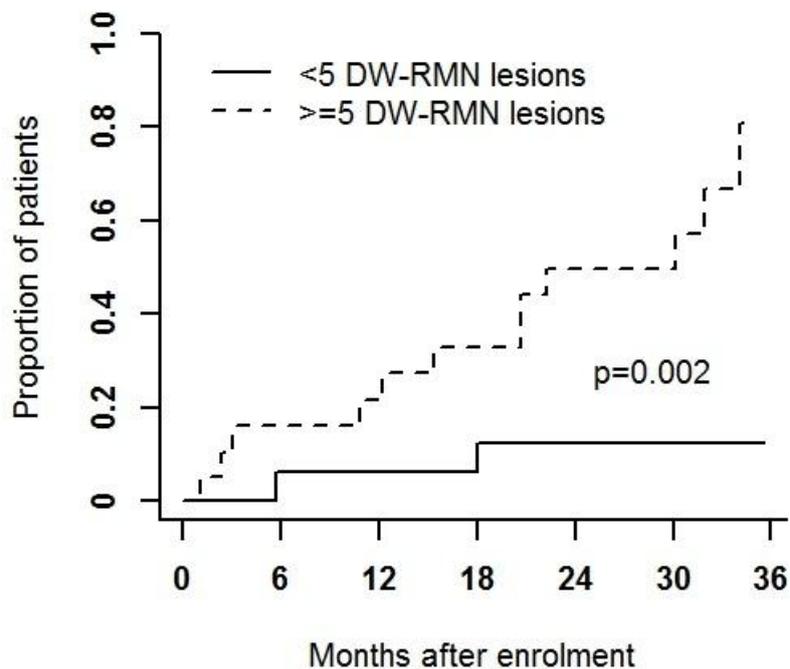
Figura 7. Sopravvivenza libera da recidiva in base al numero di lesioni ossee in DW-RMN



L'incidenza di recidiva nell'analisi d'incidenza cumulativa con rischi competitivi è stata per i pazienti con ≥ 5 lesioni in WB-RMN del 21.8% a un anno, del 49.8% al

2° anno e del 67.0% al 3° anno di follow-up, mentre i pazienti con <5 lesioni hanno avuto rispettivamente il 6.3% di RI a un anno, e il 12.5% a due e tre anni di follow-up ($p=0.002$). L'incidenza di mortalità legata al trattamento dei due gruppi è stata del 6.3% per i pazienti con <5 lesioni e del 5.3% nei pazienti con ≥ 5 lesioni, non significativamente differente ($p=0.50$). Il confronto delle incidenze di recidiva è mostrato in Figura 8.

Figura 8. Incidenza di recidiva in base al numero di lesioni viste in DW-RMN



3.6. Correlazione con la risposta alla terapia

Al termine del trattamento di prima linea del mieloma alla diagnosi o della ricaduta i 29 pazienti valutabili per la risposta hanno ottenuto 3 sCR (10.3%), 7 VGPR (24.1%), 11 PR (37.9%), 3 SD (10.3%), e 5 PD (17.2%). Tra il 2° e il 3° esame radiologico nei pazienti valutabili rimasti (25) si sono verificate 2 sCR (8.0%), 9 VGPR (36.0%), 7 PR (28.0%), 5 SD (20.0%) e 2 PD (8.0%).

Al termine del trattamento (vedi Tabella 5), i pazienti in CR valutati con DW-RMN hanno avuto una mediana di 0 lesioni (range, 0-2 lesioni), quelli in VGPR 2.0 lesioni (range, 0-6 lesioni), in PR 3 lesioni (range, 0-10 lesioni), e i pazienti in SD e in PD rispettivamente 2 e 3 lesioni (range 2-8 e 0-14 lesioni, rispettivamente). La media delle lesioni è andata progressivamente crescendo da 0.7 lesioni/paziente nei pazienti in CR a 4.8 nei pazienti in PD dopo la prima terapia. Le metodiche classiche, ossia RX scheletro e RMN della colonna, in confronto alla DW-RMN, hanno mostrato di rilevare una mediana tra 0 e 2 lesioni in meno a seconda della risposta (0 in CR, 2 in PD), e una media variabile da 0 a 3 lesioni in meno a seconda della risposta. Questo indica che nei pazienti che sono andati in CR la DW-RMN ha rilevato meno numero di lesioni attive, tali da avvicinarsi al numero rilevato dalle metodiche standard; nei pazienti che sono andati in progressione o in SD essa ha invece rilevato più lesioni rispetto alle metodiche standard, correlando con l'andamento clinico.

Tabella 5. Correlazione della risposta clinica secondo i criteri IMWG con il numero di lesioni in DW-RMN dopo il termine del trattamento

DW-RMN					
Risposta	N° pazienti	Media	Mediana	Minimo	Massimo
CR (sCR)	3	0.7	0.0	0.0	2.0
VGPR	7	2.4	2.0	0.0	6.0
PR	11	2.7	3.0	0.0	10.0
SD	3	4.0	2.0	2.0	8.0
PD	5	4.8	3.0	0.0	14.0
Differenza DW-RMN – metodiche standard (RX scheletro e RMN della colonna)					
CR (sCR)	3	0.0	0.0	-1.0	1.0
VGPR	7	-0.7	-1.0	-6.0	5.0
PR	11	1.2	0.0	-7.0	10.0
SD	3	3.0	1.0	0.0	8.0
PD	5	1.4	2.0	-3.0	4.0

Abbreviazioni: DW-RMN= risonanza magnetica diffusion-weighted; sCR= stringent complete response; CR= complete response; VGPR=very good partial response; PR=partial response; SD=stable disease; PD=progressive disease.

Nella valutazione dello stato di risposta a 6 mesi dal termine del trattamento in relazione alle lesioni viste in DW-RMN, lo stesso tipo di analisi ha mostrato che la DW-RMN rilevava una mediana di 0 lesioni nei pazienti in CR (sCR), 1 nei pazienti in VGPR, 4 nei pazienti in PR, 2 nei pazienti in SD, e 5 nei pazienti in PD (media crescente da 0 a 5 da CR a PD). Nel confronto con la RX scheletro e RMN della colonna, la DW-RMN ha segnalato una differenza di lesioni da negativa nei pazienti in CR (mediana) fino a 5 lesioni in più nei pazienti in PD, e una media da -2.5 nei pazienti in CR fino a 5 lesioni in più nei pazienti in PD. Questo segnala che la nuova metodica coerentemente con la risposta rilevata con i parametri biologici secondo i criteri IMWG ha segnalato meno lesioni delle metodiche standard quando il paziente era in remissione, e più lesioni nei pazienti in progressione di malattia. La correlazione dello stato di risposta dopo 6 mesi dal termine del trattamento è mostrata in Tabella 6.

Tabella 6. Correlazione della risposta clinica secondo i criteri IMWG con il numero di lesioni in DW-RMN al follow-up dopo 6 mesi dal termine del trattamento

DW-RMN					
Risposta	N° pazienti	Media	Mediana	Minimo	Massimo
CR (sCR)	2	0.0	0.0	0.0	0.0
VGPR	9	1.8	1.0	0.0	9.0
PR	7	3.6	4.0	0.0	11.0
SD	5	2.8	2.0	0.0	7.0
PD	2	5.0	5.0	2.0	8.0
Differenza DW-RMN – metodiche standard (RX scheletro e RMN della colonna)					
CR (sCR)	2	-2.5	-2.5	-4.0	-1.0
VGPR	9	0.1	0.0	-5.0	7.0
PR	7	1.1	2.0	-2.0	4.0
SD	5	2.8	2.0	0.0	7.0
PD	2	5.0	5.0	2.0	8.0

Abbreviazioni: DW-RMN= risonanza magnetica diffusion-weighted; sCR= stringent complete response; CR= complete response; VGPR=very good partial response; PR=partial response; SD=stable disease; PD=progressive disease.

Per valutare la correlazione della DW-RMN con la risposta alla terapia abbiamo anche eseguito il test t di Student per valutare se vi fosse una differenza significativa nel numero di lesioni viste dai medesimi esami radiologici longitudinalmente. Ci attendevamo infatti che la DW-RMN, essendo una metodica funzionale, avesse una riduzione significativa del numero delle lesioni nell'esame al termine del trattamento e nel follow-up, considerando che la maggior parte dei pazienti era in risposta al primo controllo. Dato invece che la radiologia convenzionale con RX scheletro non è funzionale, ci attendevamo una sostanziale stazionarietà delle lesioni nel tempo rilevate con questa metodica. Per quanto concerne la valutazione tra il 2° e il 3° esame, visto che lo stato di malattia non ha avuto variazioni significative tra il 2° e il 3° controllo per la maggior parte dei pazienti valutabili, ci aspettavamo una assenza di significatività nel confronto tra il 2° e 3° esame, sia per le valutazioni convenzionali, che per la metodica sperimentale.

I risultati hanno confermato le ipotesi, perché il t-test longitudinale con dati appaiati ha mostrato che tra il 1° e il 2° esame non c'è stata una differenza significativa nel numero di lesioni rilevate in RX scheletro ($p=1.00$, media delle differenze=0, IC95% (-)0.98-(+)0.89); il test ha mostrato un risultato simile anche tra il 2° esame

e il follow-up ($p=0.12$, media della differenza 0.44, IC95% (-)0.13-(+)1.01). Anche il numero delle lesioni rilevato sommando in modo ponderato la radiografia dello scheletro e la RMN della colonna ha mostrato differenze non significative sia tra il 1° e il 2° esame ($p=0.27$, media delle differenze 0.48, IC95% (-)0.40-(+)1.37), che tra il 2° esame e il follow-up 6 mesi dopo ($p=0.10$, media delle differenze 0.44, IC95% (-)0.10-(+)0.98). La metodica sperimentale ha invece mostrato tra il 1° e il 2° esame una differenza significativa nella rilevazione del numero delle lesioni: il 2° esame ha infatti rilevato una media di differenza di 1.55 lesioni (CI95% 0.06-3.03) in meno rispetto al primo esame ($p=0.04$), coerentemente con il verificarsi di una risposta di malattia tra il 1° e il 2° esame di DW-RMN. Il confronto tra la 2° e la 3° DW-RMN ha mostrato un'assenza di differenza significative, con una media di differenza di 0.56 (CI95% (-)0.35-(+)1.47) lesioni in meno rispetto al 2° esame ($p=0.21$), anche questo coerentemente con il fatto che tra il 2° e il 3° esame ci sono stati pochi cambiamenti nello stato di malattia (cfr. anche le tabelle 5 e 6).

3.7. Correlazione con le caratteristiche biologiche di malattia

La correlazione con le caratteristiche biologiche di malattia è stata eseguita prendendo in considerazione sia gli accertamenti su sangue periferico, che su sangue midollare, che istologici.

Per quanto concerne l'isotipo, è stato osservato un trend per i mielomi con IgA ad avere più lesioni in DW-RMN rispetto ai mielomi IgG. L'87.5% dei pazienti con

IgA avevano >5 lesioni in DW-RMN, rispetto al 50.0% dei mielomi IgG ($p=0.15$). Né la quantità di immunoglobuline IgG o IgA, né la componente monoclonale hanno avuto una correlazione con il numero di lesioni: in particolare per quest'ultima l'indice di correlazione è stato pari a 0.0 (range, (-)0.37-(+)0.35). Il tipo di catena leggera non ha comportato differenze significative nel numero di lesioni ($p=0.61$). Non vi sono state differenze significative tra i pazienti con catene leggere k vs lambda. Abbiamo rilevato un trend verso la significatività per i pazienti con proteinuria di Bence-Jones positiva rispetto a coloro senza Bence-Jones. I primi hanno avuto un'incidenza del 60.0% di lesioni alla DW-RMN, in confronto al 21.4% di coloro con Bence-Jones negativa ($p=0.06$). Il dato si è confermato anche nei pazienti con immunofissazione urinaria: coloro con IFU positiva hanno avuto un 63.3% di WB-RMN con ≥ 5 lesioni in confronto al 30.0% dei pazienti IFU negativi ($p=0.15$).

Abbiamo cercato di valutare l'eventuale correlazione tra il rapporto Freelite e le lesioni viste in DW-RMN. Tale correlazione è stata fatta tra il numero di lesioni viste in RMN-DWI e il modulo del logaritmo naturale del rapporto Freelite. Questo metodo, spiegato in dettaglio nei metodi statistici, centente la normalizzazione del rapporto Freelite trasformandolo in valore quantitativo positivo. Considerando i segmenti ossei, l'indice di correlazione è stato dello 0.29 (range (-)0.07-(+)0.58, $p=0.11$). Dato che le Freelite sono un indice molto sensibile, abbiamo eseguito la

stessa correlazione con il numero di singole lesioni anche microscopiche, e abbiamo rilevato un aumento della correlazione, pari a 0.33 (CI95% (-)0.02-(+)0.61), e un trend verso la significatività ($p=0.06$). Per sondare il metodo abbiamo eseguito la stessa analisi effettuando variazioni del logaritmo (base 4 e in base 10), tuttavia il trend verso la significatività si è mantenuto invariato.

Lo stato di malattia al momento dell'esame ha comportato una differenza del numero di lesioni viste alla DW-RMN. I pazienti alla diagnosi hanno avuto un'incidenza del 45.4% nel numero di lesioni ≥ 5 in DW-RMN, rispetto al 75.0% dei pazienti in recidiva ($p=0.21$). Non c'è stata una differenza significativa tra i pazienti D&S 1-2 e i pazienti D&S=3 nel numero di lesioni viste in DW-RMN ($p=0.57$), benché ci sia stata una tendenza dei pazienti a più alto stadio D&S ad avere più lesioni (52.6% vs 37.5%). Per quanto concerne la stadiazione ISS, non abbiamo osservato differenza significative.

All'esame del midollo, non abbiamo visto una correlazione tra l'infiltrato midollare con il numero di lesioni viste in DW-RMN. Per quanto concerne le caratteristiche citogenetiche in FISH della malattia, la quantità limitata di pazienti e le numerose categorie di citogenetica hanno limitato la significatività delle analisi. Raggruppando i pazienti in base al rischio citogenetico secondo le categorie di rischio della Mayo Clinic [49, 50] (alto rischio vs rischio standard) abbiamo rilevato che i pazienti con alto rischio citogenetico avevano un maggior numero di lesioni in

DW-RMN (73.6%) rispetto a quelli a rischio standard (45.4%, $p=0.24$). Il basso numero di casi e la presenza di 2 pazienti con impossibilità ad eseguire la FISH per motivi tecnici (scarsità di cellule selezionate per la FISH), è probabilmente responsabile della non-significatività statistica. Analizzando il dato nel dettaglio, abbiamo rilevato che tutti i 3 pazienti con t(4;14) avevano un elevato numero di lesioni (≥ 5) in DW-RMN. L'incidenza di del(13), del(17) e di t(14;16) è stata di pari proporzione (50.0% per gruppo) nei gruppi (≥ 5 lesioni, < 5 lesioni) considerati. I pazienti con nessuna lesione in FISH hanno avuto un basso numero di lesioni (70.0% < 5 vs 30.0% ≥ 5 lesioni), mentre quelli con t(11;14) hanno avuto in maggioranza ≥ 5 lesioni (62.5%).

Il numero di lesioni visto in DW-RMN ha mostrato una correlazione significativa con il valore di LDH prima del trattamento. L'indice di correlazione è stato 0.44 (CI95% 0.12-0.67), con una elevata significatività statistica ($p=0.008$). Per quanto concerne gli altri esami ematici, non sono state rilevate differenze significative né correlazioni con i valori di emoglobina, di calcemia, di creatinina (e quindi con il sottostadio A-B D&S), né di con la $\beta 2$ -microglobulina. Il dosaggio di ICTP ha mostrato un trend ad essere correlato con le lesioni ossee: i pazienti con valore di ICTP anormale (> 4.5) hanno avuto ≥ 5 lesioni in DW-RMN, rispetto ai pazienti con ICTP normale ($p=0.19$).

3.8. Sottostudio: i pazienti asintomatici

Quattordici pazienti sono stati arruolati nel sottostudio: 12 sono stati valutabili poiché 2 pazienti hanno rifiutato di eseguire gli esami completi dopo la firma del consenso. L'età mediana era di 62 anni (range, 43-73 anni), erano tutti pazienti asintomatici con mieloma di stadio I (D&S) con isotipo IgG (6 pazienti, 50.0%), IgA (5 pazienti, 41.7%), o micromolecolare (1 paziente, 8.3%).

All'arruolamento, l'infiltrazione mediana era del 35% (range, 15-60%), il rapporto mediano di Freelite era 2.85 (range, 0.01-33.43), la componente monoclonale mediana era 1396 mg/dl (range, 520-2120 mg/dl) e la β 2-microglobulina era 2.48 mg/L (range, 1.45-5.39 mg/L). La FISH non è risultata eseguibile in 4 pazienti a causa della scarsa infiltrazione midollare da plasmacellule; 4 (30.0%) pazienti avevano una FISH normale, e 4 pazienti (30.0%) una traslocazione t(11;14).

Il primo set di valutazioni ha mostrato una mediana di 0 lesioni (range, 0-2 lesioni) alla radiografia dello scheletro, 0 lesioni alla RMN della colonna (range, 0-3 lesioni) e 1 lesione (range, 0-3 lesioni) sommando in modo pesato le due metodiche.

La RMN whole-body ha mostrato una mediana di 0.5 lesioni/paziente (range, 0-6 lesioni), non significativamente differenti rispetto agli esami standard ($p=0.81$), la DW-RMN ha mostrato una mediana di 2.5 lesioni/paziente (range, 0-8 lesioni), significativamente superiore rispetto alle metodiche standard ($p=0.04$).

Dopo 6 mesi di follow-up, 11 pazienti erano valutabili poiché un paziente ha cambiato il centro di trattamento. L'infiltrazione mediana midollare di malattia era del 30% (range, 0-70%), il rapporto Freelite mediano era 2.12 (range, 0.01-27.15), la componente monoclonale mediana era 1134 mg/dl (range, 20-2610 mg/dl) e la β 2-microglobulina mediana era 2.08 mg/L (range, 1.30-3-80 mg/L). La radiografia dello scheletro ha mostrato una mediana di 0 lesioni (range, 0-3 lesioni), così come la RMN della colonna (0 lesioni, range 0-3); le metodiche sommate hanno segnalato in mediana 0 lesioni (range, 0-4 lesioni). La RMN whole-body ha mostrato 0.0 lesioni (range, 0-3), non significativamente differente se comparata con gli standard ($p=0.67$); la DW-RMN ha mostrato una mediana di 1.0 lesioni (range, 0-8 lesioni) con una minima superiorità rispetto alle metodiche standard ($p=0.17$).

A un anno di follow-up, 11 pazienti sono rimasti valutabili. L'infiltrazione plasma cellulare mediana era del 40% (range, 2-60%), la mediana di rapporto Freelite era 1.73 (range, 0.01-47.57), la mediana di componente monoclonale era 1089 mg/dl (range, 0-2380 mg/dl) e la β 2-microglobulina era 2.09 mg/L (range, 1.56-4.18 mg/L). La radiografia dello scheletro ha mostrato 0 lesioni/paziente in mediana (range, 0-3 lesioni), la RMN della colonna 0 lesioni (range, 0-3 lesioni). La RMN whole-body ha mostrato 0.0 lesioni (range, 0-3 lesioni), non significativamente diverso dallo standard ($p=0.62$). La DW-RMN diffusion-weighted ha mostrato una

mediana di 1.0 lesione (range, 0-5 lesioni), lievemente superiore ma non significativamente differente dagli standard ($p=0.22$).

4. Discussione

Questo è il primo studio che ha eseguito una valutazione prospettica della RMN diffusion-weighted nel mieloma multiplo e pertanto non ci sono studi precedenti con cui i nostri risultati possono essere confrontati.

La radiografia dello scheletro è lo standard per la valutazione delle lesioni da mieloma multiplo. La RMN della colonna si è affiancata a questa metodica nell'ultimo decennio allo scopo di aumentare la potenza diagnostica essendo un esame più sensibile ed avendo rilevanza prognostica. [21-23] Le metodiche di imaging whole-body (TAC multi detector whole-body e RMN whole-body), sono state testate più di recente per la valutazione del mieloma multiplo ottenendo ottimi risultati in termini di sensibilità e specificità. [18, 28] Le altre metodiche di imaging (PET e scintigrafia) sono state studiate meno estensivamente e, benché alcuni gruppi abbiano dimostrato una buona sensibilità e specificità, restano metodiche non standardizzate. [24, 25, 26, 29]

Attualmente non esiste uno standard internazionalmente riconosciuto di imaging ad alta risoluzione whole-body, benché ci sia un consenso riconosciuto sull'utilità e il valore prognostico della RMN. Studi recenti hanno dimostrato una superiorità della RMN whole-body nei confronti della radiografia dello scheletro, [32] e nei confronti della TAC multi-detector. [33] Con questo studio abbiamo valutato una metodica innovativa whole-body, la RMN diffusion-weighted, in confronto agli

standard attuali. La novità rispetto agli studi di confronto eseguiti finora è stata quella di considerare due metodiche per il confronto, cioè la RX dello scheletro e la RMN della colonna, che rappresentano le opzioni più utilizzate nella pratica clinica per la valutazione del mieloma.

Lo studio è stato disegnato in modo da essere prospettico longitudinale, per valutare il valore prognostico della nuova metodica e il suo valore nel follow-up. E' stata inoltre fatta la scelta di valutare i pazienti pre- e post-trattamento, per vedere l'effetto della terapia sulle immagini. Questa scelta è motivata essenzialmente dal fatto che la metodica diffusion è una metodica essenzialmente funzionale, e quindi la nostra ipotesi era che il trattamento avrebbe ridotto il numero di lesioni viste in RMN diffusion. La scelta di valutare longitudinalmente i pazienti in modo sistematico rappresenta una novità assoluta nel panorama degli studi di confronto delle metodiche di immagini del mieloma multiplo.

Come popolazione, oltre ai pazienti con mieloma alla diagnosi, abbiamo scelto di valutare anche i mielomi ricaduti poiché l'utilizzo della radiografia convenzionale e la valutazione RMN della colonna sono standard della pratica clinica anche nel paziente ricaduto, e quindi la nuova metodica andava messa a confronto in tutto l'ambito di utilizzo delle metodiche convenzionali.

Abbiamo deciso, per confrontare le metodiche, di fare riferimento alle lesioni focali, e questo per 4 motivi: 1) le lesioni focali sono numerabili, il che consente un

confronto valido e statisticamente calcolabile; 2) la radiologia convenzionale con RX dello scheletro valuta principalmente le lesioni focali (e in misura minore, le rarefazioni o l'osteoporosi), e quindi questo tipo di lesioni si prestano al confronto tra metodiche vecchie e nuove; 3) le lesioni focali rientrano nei criteri CRAB per iniziare il trattamento [51]; 4) in base alla classificazione Durie e Salmon, il numero delle lesioni focali serviva per stadiare il mieloma.

Vista la limitata risoluzione della radiologia convenzionale e la superiorità della RMN nello studio della colonna, per il confronto della DW-RMN con le metodiche standard abbiamo considerato la somma pesata delle lesioni viste in RX scheletro più quelle viste in RMN della colonna.

I pazienti arruolati avevano caratteristiche comuni ai pazienti che avviano il trattamento per il mieloma, essendo in mediana 65enni affetti prevalentemente da mieloma IgG. La maggioranza di essi è stata arruolata prima del trattamento per la ricaduta. I trattamenti

ricevuti dai pazienti consistevano nei nuovi farmaci da soli in associazione, spesso seguiti da consolidamento con trapianto autologo. Come atteso, il tasso di risposta ai trattamenti è stato molto elevato. Come ci si poteva attendere, lo stato di malattia al primo esame ha comportato una differenza nel numero delle lesioni rilevato in DW-RMN: i pazienti alla diagnosi hanno avuto meno lesioni rispetto ai pazienti in

recidiva. Questo è dovuto molto probabilmente all'accumulo di nuove lesioni ossee nei pazienti man mano che ricadono.

Il risultato principale dello studio è stato che la nuova metodica ha mostrato una superiorità significativa rispetto alle metodiche standard nel rilevare le lesioni focali prima del trattamento. Le metodiche convenzionali (RX scheletro e RMN colonna) hanno rilevato in mediana 1 e 0 lesioni (1 lesione in totale, se associate), mentre la nuova metodica ha rilevato una mediana di 5.8 lesioni focali. La metodica in studio ha quindi avuto una sensibilità superiore rispetto alle metodiche convenzionali, anche quando valutate in associazione. Questo porta alla conclusione che le metodiche convenzionali sottostimano il danno osseo del mieloma multiplo, e che esiste una tecnica più accurata per determinarlo. La conseguenza di un uso al di fuori dello studio della DW-RMN sarebbe di aumentare la rilevazione del danno osseo nel mieloma multiplo, con l'effetto di aumentare il numero di pazienti con il criterio "osso" (B) tra i criteri CRAB per il trattamento, oltre che a un aumento del livello di stadio Durie e Salmon (e quindi del rischio di mortalità associato) rispetto alla sola stadiazione mediante RX scheletro associato a RMN della colonna. Poiché tutti i nostri pazienti in studio avevano i criteri CRAB per essere trattati, non possiamo in realtà stabilire se l'uso di questa metodica potrebbe portare a un anticipo del trattamento, e, in quel caso, con quale beneficio.

Tra il secondo e terzo esame dello studio c'è stato un calo della dimensione del campione, dovuto principalmente alla mortalità per malattia. Nel secondo e terzo esame c'è stata una perdita della significatività del confronto tra DW-RMN e metodiche convenzionali. Questo risultato si può interpretare alla luce della correlazione della DW-RMN con la risposta di malattia, che in sostanza riflette la natura funzionale della DW-RMN. Molti pazienti hanno risposto al trattamento, e quindi la metodica funzionale ha visto meno lesioni attive in questi pazienti. Di conseguenza, il numero di lesioni in DW-RMN è calato fino ad avvicinarsi al numero di lesioni viste in radiologia convenzionale, al punto da perdere significatività. Eseguendo il t-test tra gli esami pre- e post- trattamento abbiamo visto che il numero di lesioni in DW-RMN si è ridotto significativamente, mentre nella radiologia convenzionale dello scheletro associata a RMN della colonna non c'è stata una variazione significativa tra il primo e il secondo esame radiologico. Questa assenza di variazione delle metodiche convenzionali è legata soprattutto alla sostanziale stazionarietà del numero delle lesioni focali viste in RX scheletro, mentre considerando solo i dati della RMN della colonna abbiamo visto una riduzione del numero di lesioni con la risposta di malattia, coerentemente con quanto osservato in altri studi. [52] Al terzo esame, eseguito 6 mesi dopo il termine del trattamento, il numero di lesioni in DW-RMN è stato simile a quello visto in radiologia convenzionale, perché la gran parte dei pazienti nell'intervallo libero da

trattamento di soli sei mesi ha mantenuto il proprio “status” di risposta, e quindi il basso numero di lesioni visto in DW-RMN. Il disegno dello studio prevedeva il 3° esame a 6 mesi dal termine del trattamento, periodo che si situa entro il tempo mediano alla recidiva dei pazienti (sia recidivati che in prima linea), che vengono trattati con i nuovi farmaci. Nella nostra casistica, ad es, la sopravvivenza mediana libera da recidiva è stata intorno ai 31 mesi.

La DW-RMN ha mostrato anche di avere valore prognostico per sopravvivenza libera da progressione, per quella libera da recidiva, e per l’incidenza di recidiva. I pazienti con <5 lesioni alla DW-RMN avevano performance superiori in termini di sopravvivenza rispetto ai pazienti con più lesioni ossee. Questo dato si è confermato anche nel calcolo della incidenza di recidiva con i rischi competitivi, che elimina i possibili fattori di confondimento legati alla NRM. Il valore prognostico della DW-RMN indica che essa ha un potenziale di utilizzo come tecnica di stadiazione per la stratificazione prognostica sia alla diagnosi, che in recidiva. Tale risultato assume maggior valore se consideriamo il tempo mediano molto lungo di PFS e RFS su cui è stato fatto il confronto. La DW-RMN si pone, in questo ambito, nel solco della tradizione tracciato dalla RX dello scheletro (usata per stratificare la prognosi nel sistema D&S [15]) e dalla RMN della colonna, di cui è stato mostrato il valore prognostico a fine anni ‘90. [22] Per quanto concerne la sopravvivenza globale, come ci attendevamo, la nuova metodica non ha avuto un valore prognostico

significativo alla diagnosi, probabilmente perché la sopravvivenza globale dei pazienti con mieloma si è estremamente allungata con l'applicazione sequenziale dei nuovi farmaci. Anche i trattamenti delle recidive dopo la seconda linea garantiscono risposte e sopravvivenze a lungo termine, [53] per cui vedere delle differenze di sopravvivenza è estremamente difficile, anche in studi clinici ampi. E' possibile che il dato dovrà essere rivalutato in futuro con l'allungamento del follow-up.

Un obiettivo secondario dello studio era di valutare la correlazione della DW-RMN con la risposta della malattia. Abbiamo già visto che, poiché la DW-RMN è una metodica funzionale, c'è stata una riduzione significativa del numero di lesioni tra il primo e il secondo esame, e una stabilità delle lesioni tra il secondo e il terzo esame. La spiegazione di ciò è che la maggior parte dei pazienti ha risposto al trattamento e ha poi mantenuto la risposta, e quindi la metodica funzionale ha visto un calo delle lesioni seguito da una stabilità. Nell'analisi approfondita del numero di lesioni, c'è stata una correlazione molto stretta tra la variazione del numero di lesioni e la risposta di malattia secondo i criteri IMWG. Abbiamo visto un incremento pressoché lineare del numero di lesioni in DW-RMN ad ogni gradino di incremento di malattia secondo i criteri IMWG. Questo comportamento non si è visto invece con le metodiche convenzionali, in particolare la RX dello scheletro è rimasta invariata rispetto ai controlli pre-trattamento, al contrario della RMN della colonna

che ha rilevato la risoluzione delle lesioni. La RMN infatti ha questo potenziale di correlazione con la risposta, come già visto e confermato da ampi studi. [52] Lo stesso pattern di correlazione lesioni/risposta si è osservato nel terzo esame di follow-up: la differenza tra il numero di lesioni in DW-RMN e quelle rilevate dalle metodiche convenzionali è cresciuta man mano che lo stato di malattia aumentava, espressione del fatto che la nuova metodica rileva man mano più lesioni al crescere della malattia, laddove invece le metodiche di radiologia convenzionale restano invariate. Questi risultati ci dicono che la nuova metodica si comporta in modo coerente con gli standard di risposta IMWG, e può essere utilizzata come esame integrativo per valutare la risposta clinica ai trattamenti.

Abbiamo inoltre studiato se le lesioni osservate con la DW-RMN correlassero con le caratteristiche biologiche di malattia. Abbiamo osservato un trend per i mielomi IgA ad avere più lesioni litiche rilevate con la DW-RMN rispetto ai mielomi IgG. L'isotipo IgA rientra tra i fattori che definiscono un mieloma ad alto rischio, assieme alla citogenetica, secondo la stratificazione del rischio della Mayo clinic, che definisce una diversa strategia di trattamento a seconda del rischio citogenetico e clinico. [50] L'isotipo IgA è stato associato a una più rapida progressione da mieloma asintomatico a sintomatico, assieme alla quantità di componente monoclonale, alla proteinuria di Bence-Jones; [54] nei pazienti con uno di questi fattori, anche la positività in RMN conferiva un rischio elevato di sviluppare un

mieloma conclamato. [54] Nel nostro studio abbiamo anche osservato che i pazienti con proteinuria di Bence-Jones positiva, e quelli con immunofissazione urinaria positiva, avevano una tendenza ad avere più lesioni litiche viste in DW-RMN. Questi dati concordano nel delineare una tipologia di mieloma a prognosi negativa poiché caratterizzato da proteinuria di Bence-Jones, che conferisce uno svantaggio di sopravvivenza. [55]

Per quanto concerne le caratteristiche citogenetiche di malattia, l'eterogeneità delle lesioni citogenetiche riscontrate in così pochi pazienti ha reso estremamente difficile vedere delle correlazioni significative, anche considerando il fatto che in 2 pazienti è stato impossibile eseguire la FISH per scarso numero di plasmacellule selezionate nell'aspirato midollare. Abbiamo tuttavia osservato che i pazienti con citogenetica sfavorevole hanno una tendenza ad avere più lesioni in DW-RMN: questo può riflettere sia l'aggressività di malattia, sia il più elevato rischio di ricaduta e quindi lo sviluppo di nuove lesioni ossee alla ricaduta. [49] Tra i pazienti ad alto rischio, in particolare abbiamo rilevato che tutti i pazienti con t(4;14) avevano ≥ 5 lesioni in DW-RMN. Nelle citogenetiche a rischio standard, abbiamo visto che i pazienti con citogenetica normale avevano una tendenza ad avere meno lesioni ossee in DW-RMN rispetto ai pazienti con t(14;16).

Per quanto concerne gli indici sierici di malattia, il numero di lesioni in DW-RMN è stato correlato con il rapporto FreeLite. Quest'ultimo è principalmente utilizzato in

clinica per definire il livello di risposta completa: nel nostro studio, esso è stato correlato in modo quasi lineare con la quantità di malattia vista in DW-RMN. Nel nostro studio il numero elevato di lesioni in DW-RMN ha comportato uno svantaggio di sopravvivenza; la correlazione con la quantità di Freelite potrebbe indicare una linearità con la quantità di malattia. Inoltre, questo risultato suggerisce che la DW-RMN potrebbe essere utile come esame integrativo per valutare la malattia minima residua nel mieloma multiplo, e, soprattutto, per diagnosticare precocemente la recidiva.

Inoltre, abbiamo osservato è stato una correlazione pressoché lineare del valore di LDH sierico con il numero di lesioni viste in DW-RMN. L'LDH è un fattore riconosciuto di mieloma multiplo ad alto rischio, [56, 57] e i nostri dati lo confermano, dal momento che abbiamo visto una correlazione tra l'LDH e il numero di lesioni ossee in DW-RMN, che nella nostra casistica è stato prognosticamente sfavorevole. La correlazione del numero di lesioni viste in RMN con il valore di LDH è stata anche rilevata in un recente lavoro in cui sono state confrontate le lesioni ossee viste in RMN con quelle viste in RX scheletro: [52] anche in questo lavoro il numero di lesioni ha avuto un ruolo prognostico.

Infine, per quanto concerne le valutazioni biochimiche di malattia ossea, abbiamo rilevato anche qui un trend della nuova metodica a rilevare più lesioni ossee nei

pazienti con ICTP elevato: infatti tutti i pazienti con ICTP abnorme sono risultati avere più di 5 lesioni in DW-RMN.

A testimoniare l'eterogeneità del mieloma così come viene rilevato agli esami ematici e midollari, non abbiamo osservato correlazioni significative con il valore di Ig, con il valore di β 2-microglobulina, né con l'infiltrazione in BOM da malattia.

Questo suggerisce la DW-RMN dev'essere usata in modo complementare alle valutazioni biochimiche di malattia, perché può rilevare malattia ossea attiva anche in pazienti con poca invasione midollare o con bassa componente monoclonale.

Inoltre, come ci attendevamo, la correlazione con il sistema Durie e Salmon è stata incostante, anche se abbiamo osservato un trend verso la correlazione: la nuova metodica si è rivelata superiore all'RX scheletro, che è il criterio con cui viene stadato il mieloma nel sistema Durie e Salmon. La nostra metodica si propone come un metodo integrativo, o, idealmente, sostitutivo della RX dello scheletro nella valutazione della malattia ossea alla diagnosi o alla recidiva. In questo contesto, di estremo interesse è stato anche il confronto con la RMN whole-body, che era un obiettivo secondario dello studio. La RMN whole-body non è lo standard nel mieloma multiplo, ma essendo una tecnica whole-body, era un buon comparatore per la nuova metodica. La DW-RMN si è dimostrata superiore a questa tecnica nel rilevare le lesioni focali nel nostro studio. Tale superiorità si è confermata in tutte le tre tempistiche in esame. Questo risultato valida ulteriormente

la DW-RMN come metodica ultra sensibile per lo studio del danno osseo da mieloma, dal momento che la RMN whole-body è la tecnica che ha mostrato superiorità nella rilevazione del danno osseo sia in confronto alla RX scheletro, che nei confronti della TAC. [32, 33]

Il sottostudio ha mostrato una significatività della nuova metodica nel rilevare le lesioni litiche rispetto alle metodiche tradizionali. Questo dato è stato significativo al primo esame ($p=0.04$), successivamente la differenza è risultata non significativa. La perdita di significatività è più probabilmente dovuta al fatto che c'è stato un paziente valutabile in meno nel 2° e 3° esame. Non abbiamo osservato evolutività nei pazienti asintomatici; sarà utile proseguire il follow-up negli anni futuri per sapere se la DW-RMN può avere un ruolo predittivo per l'evoluzione in mieloma sintomatico.

La nuova metodica si è dimostrata fattibile, perché ha richiesto l'utilizzo di una macchina di risonanza standard a 1.5 Tesla, come viene utilizzata di routine in molti centri. Non ci sono stati pazienti che hanno rifiutato l'esame. L'unico paziente che non ha potuto fare la DW-RMN perché dispnoico in posizione supina presentava, per lo stesso motivo, controindicazione anche alla RMN standard della colonna. Nessun paziente ha avuto complicanze nel corso dell'esecuzione dell'esame, né ha sospeso l'esame in corso. Queste considerazioni dimostrano che la DW-RMN è tollerata alla pari di una risonanza magnetica standard del rachide. I pazienti hanno

spesso lamentato la lunga durata dell'esame (45 minuti): è possibile che l'utilizzo di macchine a 3 Tesla possa ridurre il tempo d'esame. Un limite alla fattibilità dell'esame è rappresentato dal costo dell'acquisto delle sequenze specifiche per l'esame, e dal maggior costo per esame legato alla maggiore estensione anatomica della rilevazione, al maggiore impegno del personale e della macchina. La ricostruzione delle immagini ha richiesto una elevata esperienza in bioingegneria e bioinformatica: è stato necessario il supporto di un bioingegnere. Per l'interpretazione dei risultati, sono stati utilizzati due radiologi con esperienza nel mieloma multiplo. Benché in mano a radiologi esperti in mieloma multiplo, l'interpretazione dei risultati della DW-RMN è stata più dispendiosa in termini di impegno e tempo rispetto alla RMN e alla radiologia convenzionale. Queste considerazioni inducono a considerare questa metodica fattibile in centri di riferimento per la diagnosi e il trattamento del mieloma multiplo, provvisti di personale specializzato e delle strutture e macchine necessarie.

In conclusione, questo studio ha dimostrato che esiste una nuova metodica funzionale, la DW-RMN, per la valutazione della malattia ossea nel mieloma multiplo. La DW-RMN è superiore alle metodiche convenzionali per valutare il numero di lesioni focali. Essa rileva la malattia attiva, e può essere utilizzata in modo complementare rispetto alle valutazioni standard. Essa correla con la risposta dopo trattamento, correla anche con alcune caratteristiche biologiche di malattia, ed

ha valore prognostico. Infine, essa è una tecnica sicura e fattibile in un contesto ad alta specializzazione per la diagnosi e il trattamento del mieloma.

5. Bibliografia

1. Myeloma Trialists' Collaborative Group. Combination chemotherapy versus melphalan plus prednisone as treatment for MM: an overview of 6.633 patients from 27 randomized trials. *J Clin Onc* 1998; 16:3882-42.
2. Salmon SC, Shadduck RK, Shilling A. Intermittent high dose prednisone therapy for multiple myeloma. *Cancer Chemoter Rep*. 1967; 51:179-87.
3. Alexanian R, Dimopoulos MA et al. Primary dexamethasone treatment of multiple myeloma. *Blood* 1992;80:887-90.
4. Weber D, Rankin K et al. Thalidomide alone or with dexamethasone for previously untreated multiple myeloma. *J Clin Oncol*. 2002;21:16-19.
5. Hideshima T, Richardson P et al. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001; 61:3071-76.
6. Richardson PG, Sonneveld P et al. Bortezomib vs. dexamethasone in relapsed multiple myeloma: a phase 3 randomized study. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2004; 23:558.

7. Child JA, Morgan GJ, et al. Medical Research Council Adult Leukemia Working Party. High-dose chemotherapy with hematopoietic stem cell rescue for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 2003; 348:1875-83.
8. Alyea EP, Anderson KC. Allotransplantation for Multiple Myeloma. *Cancer J*. 2001; 28:725-735.
9. D'Sa S, Abildgaard N, Tighe J et al. Guidelines for the use of imaging in the management of myeloma. *BJH*, 137, 49-63.
10. Dimopoulos M, Kyle R, Fermand JP, et al. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood*. 2011 May 5;117(18):4701-5. Epub 2011 Feb 3.
11. Durie BG, Salmon SE (1975). "A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival". *Cancer* 36 (3): 842-54.
12. Greipp PR, San Miguel J, Durie BG, et al. International staging system for multiple myeloma". *J. Clin. Oncol.*2005; 23 (15): 3412-20.

13. International Myeloma Working Group (2003). Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *Br. J. Haematol.* 121 (5): 749–57.
14. Kyle RA, Rajkumar SV. Criteria for diagnosis, staging, risk stratification and response assessment of multiple myeloma. *Leukemia* 2009; 23 (1): 3–9.
15. Durie BGM, Salmon SE. A clinical staging system for multiple myeloma: correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 1975; 36:842-854.
16. Laroche M, Assoun J, Sixou L, Attal M. Comparison of MRI and computed tomography in the various stages of plasma cell disorders: correlations with biological and histological findings. Myélome-Midi-Pyrénées Group. *Clin Exp Rheumatol.* 1996;14(2):171-6.
17. Dimopoulos MA, Moulopoulos LA, Datselis I, et al. Imaging of myeloma bone disease--implications for staging, prognosis and follow-up. *Acta Oncol.* 2000;39(7):823-7. Review.
18. Weininger M, Lauterbach B, Knop S et al. Whole-body MRI of multiple myeloma: Comparison of different MRI sequences in

- assessment of different growth patterns. *Eur J Radiol.* 2009;69(2):339-45. Epub 2007 Dec 21.
19. Durie BG. The role of anatomic and functional staging in myeloma: description of Durie/Salmon plus staging system. *Eur J Cancer* 2006;42:1539-1543.
20. Steinbach LS. MRI in the Detection of Malignant Infiltration of Bone Marrow. A Commentary *AJR* 2007; 188: 1143-1145.
21. Walker R, Barlogie B, Haessler J et al. Magnetic Resonance Imaging in Multiple Myeloma: Diagnostic and Clinical Implications. *JCO* 2007; 25 (9): 1121-1128.
22. Lecouvet FE, VAnde Berg BC, Michaux L et al. Stage III Multiple Myeloma: Clinical and Prognostic Value of spinal Bone Marrow MR Imaging. *Radiology* 1998; 209:653-660.
23. Baur-Melnyk A, Buhmann S et al. Role of MRI for the diagnosis and prognosis of multiple myeloma. *Eur J Radiol* 2005; 55: 56-63.
24. M Dimopoulos, E Terpos, RL Comenzo, et al. International myeloma working group consensus statement and guidelines regarding the current role of imaging techniques in the diagnosis and monitoring of multiple Myeloma. *Leukemia* 2009; 23: 1545–1556

25. Zamagni E, Patriarca F, Nanni C, 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):5989-95.
26. Durie BGM, Waxman AD, D'Agnolo A et al. Whole-Body 18F-FDG PET identifies high-risk myeloma. *J Nucl Med* 2002; 43:1457-1463.
27. Hart D, Wall BF. Radiation exposure of the UK population from medical and dental X-ray examinations. National Radiological Protection Board report NRPB-W4. National Radiological Protection Board, Didcot, Oxon, UK.
28. Horger M, Kanz L, Denecke B et al. The benefit of using whole-body, low dose, nonenhanced, multidetector computed tomography for follow-up and therapy response monitoring in patients with Multiple Myeloma. *Cancer* 2007; 109(8): 1617-1626.
29. Mele A, Offidani M, Visani G et al. Technetium-99m sestamibi scintigraphy is sensitive and specific for the staging and the follow-up of patients with multiple myeloma: a multicentre study on 397 scans. *BJH* 2007; 136:729-735.

30. Fonti R, Salvatore B, Quantarelli M et al. 18FDG PET/CT, 99mTc-MIBI, and MRI in evaluation of patients with Multiple Myeloma. *Journ Nucl Med* 2008; 49(2):195-200.
31. Lin C, Luciani A, Itti E et al. Whole body MRI and PET/CT in haematological malignancies. *Cancer Imaging* 2007; 7: S88-S93.
32. Ghanem N, Lohrmann C, Engelhardt M et al. Whole body MRI in the detection of bone marrow infiltration in patients with plasma cell neoplasms in comparison to the radiological skeletal survey. *Eur Radiol* 2006; 16: 1005-1014.
33. Baur-Melnyk A, Buhmann S, Becker C et al. Whole-Body MRI Versus Whole-Body MDCT for Staging of Multiple Myeloma. *AJR* 2008; 190:1097-1104.
34. Schmidt GP, Reiser MF, Baur-Melnyk A. Whole-body imaging of the musculoskeletal system: the value of MR imaging. *Skeletal Radiol* 2007; 36:1109–1119.
35. Malayeri AA, El Khouli RH, Zaheer A, et al. Principles and applications of diffusion-weighted imaging in cancer detection, staging, and treatment follow-up. *Radiographics* 2011;31(6):1773-91.

36. Quayyum A. Diffusion-weighted imaging in the abdomen and pelvis: concepts and applications. *Radiographics* 2009;29(6):1797-810.
37. Pans S, De Keyzer F, Vandecaveye V, Delforge M. whole-body diffusion weighted imaging in multiple myeloma patients: a new tool for treatment response? *Cancer Imaging* 2007; 7:S112.
38. Pans S, De Keyzer F, Vandecaveye V, Delforge M. Whole-body diffusion weighted imaging by 3T MR in multiple myeloma patients: preliminary results. *Cancer Imaging* 2007; 7:S111-112.
39. Darlup-Link H, Henning T, Link TM. MR imaging of therapy-induced changes of bone marrow. *Eur Radiol* 2007; 17: 743–761.
40. Durie DB, Harousseau JL et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia* 2006; 20(9):1467-73.
41. Martz P, Kraumacher C, Traber F et al. Diffusion-weighted whole-body MR imaging with background body signal suppression: a feasibility study at 3.0 Tesla. *Eur Radiol.* 2007;17(12):3031-7.
42. Nakanishi K, Kobayashi M, Nakaguchi K et al. Whole-body MRI for detecting metastatic bone tumor: diagnostic value of diffusion-weighted images. *Magn Reson Med Sci.* 2007;6(3):147-55.

43. Prochan MA, Liu Q, Hunsberger S. Practical midcourse sample size modification in clinical trials. *Control Clin Trials* 2003;24(1):4-15.
44. Gray RJ. A class of K-sample tests for comparing the cumulative incidence of a competing risk, *Ann. Stat.* 1988;16:1141-1154
45. Fine JP and Gray RJ. A proportional hazards model for the subdistribution of a competing risk. *JASA* 1999; 94:496-509.
46. R Development Core Team (2011). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
47. Terry Therneau and original Splus->R port by Thomas Lumley (2011). survival: Survival analysis, including penalised likelihood. R package version 2.36-10. <http://CRAN.R-project.org/package=survival>
48. Bob Gray (2011). cmprsk: Subdistribution Analysis of Competing Risks. R package version 2.2-2. <http://CRAN.R-project.org/package=cmprsk>
49. Kapoor P, Rajkumar SV. Update on risk stratification and treatment of newly diagnosed multiple myeloma. *Int J Hematol.* 2011;94(4):310-20. Epub 2011 Oct 18.

50. Dispenzieri A, Rajkumar SV, Gertz MA, et al. Treatment of newly diagnosed multiple myeloma based on Mayo Stratification of Myeloma and Risk-adapted Therapy (mSMART): consensus statement. *Mayo Clin Proc.* 2007;82(3):323-41.
51. Durie BG, Harousseau JL, Miguel JS, et al. International uniform response criteria for multiple myeloma. *Leukemia.* 2006;20(9):1467-73. Epub 2006 Jul 20. Erratum in: *Leukemia.* 2006 Dec;20(12):2220. *Leukemia.* 2007 May;21(5):1134.
52. Walker R, Barlogie B, Haessler J, et al. Magnetic resonance imaging in multiple myeloma: diagnostic and clinical implications. *J Clin Oncol.* 2007;25(9):1121-8. Epub 2007 Feb 12.
53. Spina F, Montefusco V, Crippa C, et al. Lenalidomide Can Induce Long-term Responses in Patients With Multiple Myeloma Relapsing After Multiple Chemotherapy Lines, In Particular After Allogeneic Transplant. *Leuk Lymphoma.* 2011;52(7):1262-70.
54. Weber DM, Dimopoulos MA, Moulopoulos LA, et al. Prognostic features of asymptomatic multiple myeloma. *Br J Haematol.* 1997;97(4):810-4.
55. Sirohi B, Powles R, Kulkarni S, et al. Comparison of new patients with Bence-Jones, IgG and IgA myeloma receiving sequential

- therapy: the need to regard these immunologic subtypes as separate disease entities with specific prognostic criteria. *Bone Marrow Transplant.* 2001;28(1):29-37.
56. Palumbo A., Anderson K. Multiple myeloma. *N Engl J Med.* 2011;364(11):1046-60.
57. Dimopoulos MA, Barlogie B, Smith TL, Alexanian R. High serum lactate dehydrogenase level as a marker for drug resistance and short survival in multiple myeloma. *Ann Intern Med* 1991;115(12):931-935.
58. Koh DM, Collins DJ Diffusion-weighted MRI in the body: applications and challenges in oncology. *AJR Am J Roentgenol* 2007;188(6):1622–1635.
59. Stejskal EO, Tanner JE. Spin diffusion measurements: spin-echo in the presence of a time dependent field gradient. *J Chem Phys* 1965;42:288–292.
60. Patterson DM, Padhani AR, Collins DJ Technology insight: water diffusion MRI—a potential new biomarker of response to cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 2008;5(4):220–233.
61. Neil JJ. Measurement of water motion (apparent diffusion) in biological systems. *Concepts Magn Reson* 1997;9:385–401.

62. Pagani E, Bizzi A, Di Salle F, et al. Basic concepts of advanced MRI techniques. *Neurol Sci* 2008;29(suppl 3):290–295.
63. Yoshikawa K, Nakata Y, Yamada K, Nakagawa M. Early pathological changes in the parkinsonian brain demonstrated by diffusion tensor MRI. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004;75(3):481–484.
64. Eastwood JD, Lev MH, Wintermark M, et al. Correlation of early dynamic CT perfusion imaging with whole-brain MR diffusion and perfusion imaging in acute hemispheric stroke. *AJNR Am J Neuroradiol* 2003;24(9):1869–1875
65. Thoeny HC, De Keyzer F. Extracranial applications of diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Eur Radiol* 2007;17(6):1385–1393.

6. Appendice.

Appendice A1. La stadiazione Durie e Salmon (1975) [11]

Stadio I	Tutti i criteri tra i seguenti: <ul style="list-style-type: none">- Hb >10 g/dl- Calcemia normale o ≤ 12 mg/dl- Radiografia dello scheletro: normale, singola lesione litica o osteoporosi- Componente monoclonale sierica <5 g/dl se IgG, <3 g/dl se IgA- Proteinuria di Bence Jones <4 g/24h
Stadio II	Non soddisfa i criteri per rientrare in I né in III
Stadio III	Uno o più criteri tra i seguenti: <ul style="list-style-type: none">- Hb <8.5 g/dl- Calcemia >12 mg/dl- Radiografia dello scheletro: 3 o più lesioni litiche ossee- Componente monoclonale >7 g/dl se IgG, >5 g/dl se IgA- Proteinuria di Bence Jones >12 g/24 h
Sottostadio	<ul style="list-style-type: none">- A: creatinina sierica <2 mg/dl (<177umol/L)- B: creatinina sierica >2 mg/dl (>177umol/L)

Appendice A2. La stadiazione International Staging System (ISS) [12]

- **Stadio I:** β 2-microglobulina (β 2M) < 3.5 mg/L, albumina ≥ 3.5 g/dl
- **Stadio II:** β 2M < 3.5 mg/L e albumina < 3.5 g/dl; o β 2M ≥ 3.5 mg/L -
5.5 mg/L indipendentemente dall'albumina sierica
- **Stadio III:** β 2M ≥ 5.5 mg/L

Appendice A3. Definizione di mieloma sintomatico, asintomatico e MGUS [13, 14]

- **Mieloma sintomatico:**

1. Plasmacellule clonali >10% sulla biopsia osteomidollare o (in qualsiasi quantità) in qualunque biopsia da altri tessuti (plasmocitoma);
2. Componente monoclonale (paraproteina) nel siero o nelle urine (eccetto nei casi di mieloma non-secerne confermato);
3. Evidenza di danno d'organo correlato alla malattia plasmacellulare (acronimo "CRAB"):
 - IperCalcemia (calcio corretto >2.75 mmol/L);
 - Insufficienza **R**enale attribuibile al mieloma;
 - Anemia(Emoglobina <10 g/dl)
 - Lesioni ossee (**B**one) (lesioni litiche o osteoporosi con fratture compressive).

Nota: Le infezioni ricorrenti da sole in un paziente che non ha nessuno dei criteri CRAB non sono sufficienti per la diagnosi di mieloma. I pazienti senza criteri CRAB ma con evidenza di amiloidosi dovrebbero essere considerati come amiloidosi e non mieloma. Anormalità simili ai criteri CRAB sono comuni a numerose malattie, e quindi è imperativo che queste anomalie siano direttamente attribuibili alla malattia plasmacellulare e bisognerebbe fare ogni tentativo per escludere qualsiasi altra causa di anemia, insufficienza renale ed altre condizioni CRAB.

- **Mieloma asintomatico:**

1. Paraproteina sierica >30 g/L E/O
2. Plasmacellule clonali >10% sulla biopsia osteomidollare E
3. NESSUN danno a livello d'organo o tessuto correlato al mieloma.

- **Gammopatia monoclonale di significato indeterminate (Monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS):**

1. Paraproteina sierica <30 g/L E
2. Plasmacellule clonali <10% sulla biopsia osteomidollare E
3. NESSUN danno a livello d'organo o tessuto correlato al mieloma.

Appendice A4. Criteri IMWG 2006 per il mieloma multiplo che richiede terapia sistemica [51]

- Presenza di componente M¹ nel siero e/o nelle urine più plasmacellule clonali nel midollo osseo e/o un plasmocitoma clonale documentato
- PIU' uno o più tra i seguenti criteri²:
 - Calcio elevato (>11.5 mg/dl) [>2.65 mmol/l];
 - Insufficienza renale (creatinina >2 mg/dl) [177 mmol/l or more]
 - Anemia (emoglobina <10 g/dl o 2 g/dl <normale) (emoglobina <12.5 mmol/l³ o 1.25 mmol/l <normale);
 - Malattia ossea (lesioni litiche o osteopenia)
- Note:
 - 1) In pazienti senza componente monoclonale, un rapporto della FreeLite sieriche anormale può sostituire e soddisfare questo criterio. Per i pazienti senza componente M urinaria o sierica e rapporto FreeLite normale, il midollo osseo al baseline deve avere >=10% di plasmacellule clonali; questi pazienti vengono definiti come mieloma non-secerne. I pazienti con una amiloidosi confermata dalla biopsia e/o malattia da deposizione di catene leggere sistemica (LCDD) dovrebbero essere classificati come “mieloma con amiloidosi documentata” e/o “mieloma con LCDD documentata”, rispettivamente se hanno >=30% di plasmacellule e/o malattia ossea correlata al mieloma;
 - 2) Deve essere attribuibile alla malattia plasmacellulare sottostante;
 - 3) L'Hb a 10g/dl è 12.5mmol/l [o 100g/l].

Appendice A5. Criteri IMWG 2006 di risposta del mieloma multiplo alla

terapia [adattato da ref. 51]

Categoria di risposta	Criterio di risposta ¹
sCR	CR come definita sotto più: <ul style="list-style-type: none"> - rapporto Freelite normale E - assenza di cellule clonali nel midollo² in immunistochemica o immunofluorescenza³
CR	<ul style="list-style-type: none"> - Immunofissazione negativa sul siero e sulle urine E - Scomparsa di qualunque plasmocitoma dei tessuti molli E - <=5% di plasmacellule nel midollo osseo²
VGPR	Componente monoclonale rilevabile nel siero e nelle urine all'immunofissazione ma non all'elettroforesi o riduzione >=90% nella componente più componente urinaria <100mg/24h
PR	Riduzione >=50% della componente monoclonale sierica e riduzione della componente monoclonale urinaria >=90% o fino a <200mg/24h <ul style="list-style-type: none"> - Se la componente sierica e urinaria non sono misurabili, è richiesta una riduzione >=50% della differenza tra la catena leggera Freelite coinvolta e non coinvolta. - Se la componente sierica e urinaria non sono misurabili e le Freelite non sono misurabili, è richiesta una riduzione >=50% delle plasmacellule midollari, a patto che l'infiltrazione al baseline fosse >=30%. - In aggiunta ai criteri di cui sopra, è richiesta una riduzione della dimensione dei plasmocitomi dei tessuti molli >=50% se erano presenti al baseline
SD	Non soddisfa i criteri per CR, VGPR, PR o progressione
PD ⁴	Progressione di malattia: richiede almeno un criterio tra i seguenti: <ul style="list-style-type: none"> - Aumento >=25% del valore basale di: <ul style="list-style-type: none"> o Componente monoclonale sierica e/o (l'aumento assoluto dev'essere >=0.5g/dl)⁵; o Componente monoclonale urinaria e/o (aumento assoluto >=200mg/24h); o Solo nei pazienti senza componente misurabile nel siero e nelle urine: la differenza tra i livelli di Freelite coinvolte e non coinvolte. L'aumento assoluto dev'essere >10mg/dl; o Percentuale di plasmacellule nel midollo: l'incremento assoluto dev'essere >=10%⁶; o Nuove lesioni ossee confermate o plasmocitomi dei tessuti molli o aumento confermato della dimensione delle lesioni ossee o dei plasmocitomi dei tessuti molli esistenti; o Ipercalcemia (calcio sierico corretto >11.5mg/dl o 2.65mmol/l) che può essere attribuito solo al disordine proliferativo plasmacellulare

Abbreviazioni: sCR=stringent CR; CR=complete response; VGPR=very good partial response; PR=partial response; SD=stable disease; PD=progressive disease

Note:

1. Tutte le categorie di risposta richiedono due esami consecutivi fatti in ogni momento prima dell'istituzione di una nuova terapia; tutte le categorie richiedono inoltre nessuna nota evidenza di lesioni ossee progressive o nuove se erano stati eseguiti gli studi radiografici. Gli studi radiografici non sono richiesti per soddisfare questi criteri di risposta.
2. Non è necessaria la ripetizione della biopsia per conferma
3. La presenza/assenza di cellule clonali è basata sul rapporto Freelite kappa/lambda. Un rapporto anormale all'immunoistochimica o all'immunofluorescenza richiede almeno 100 plasmacellule da analizzare. Un rapporto anormale k/l è $>4:1$ e $<1:2$
4. Le categorie di recidiva richiedono due controlli consecutivi fatti a qualsiasi tempo prima della definizione di recidiva o progression e/o l'istituzione di una nuova terapia. Il criterio di progressione deve essere usato per il calcolo del tempo alla progressione e gli endpoint di sopravvivenza libera da progressione per tutti i pazienti inclusi quelli in CR (include la progressione primaria e la progressione sia durante che in assenza di terapia).
5. Per la malattia progressiva, aumenti della component monoclonale ≥ 1 g/dl sono sufficienti a definire la recidiva se la componente di partenza era ≥ 5 g/dl.
6. La recidiva dalla CR ha il cutoff al 5% a differenza delle altre categorie di risposta.

Appendice B1. La RMN diffusion-weighted: principi fisici e tecnici

B1.1. Principi fisici dell'imaging diffusion-weighted

L'imaging diffusion-weighted sfrutta il movimento casuale delle molecole d'acqua.

[35, 36] In un ambiente completamente libero, il movimento dell'acqua è completamente casuale, un fenomeno altrimenti noto come moto Browniano o diffusione libera. [58] All'interno dei tessuti biologici, il movimento dell'acqua non è completamente casuale, ma è impedito dalla interazione con i compartimenti tissutali, le membrane cellulari, e gli organelli intracellulari. A scopo semplificativo, il movimento dell'acqua nei tessuti può essere categorizzato come intravascolare, intracellulare, o extracellulare. [59, 60] L'estensione della cellularità tissutale e la presenza di membrane cellulari intatte aiutano a determinare l'impedenza della diffusione delle molecole di acqua. I tipi di tessuto che sono stati riportati essere associati a impedimento della diffusione includono il tessuto tumorale, l'edema citotossico, gli ascessi, e la fibrosi. I tessuti a bassa cellularità o che consistono di cellule con membrane danneggiate permettono un movimento maggiore delle molecole d'acqua. Il concetto che l'imaging diffusion-weighted rifletta il movimento dell'acqua a livello cellulare è supportato dal fatto che il diametro medio delle cellule umane è approssimativamente 10 μm e la radice quadrata media calcolata dello spostamento delle molecole d'acqua durante l'imaging diffusion-weighted è riportata essere 8 μm . [61, 62]

B1.2. Misura della diffusione

Una sequenza diffusion-weighted è stata inizialmente descritta da Stejskal and Tanner in 1965 [59] come adattamento di una sequenza T2-pesata. La sequenza clinica usata comunemente è una sequenza ultrarapida ecoplanare spin-echo T2-pesata con imaging parallelo. Per oltre 20 anni, questa tecnica è stata utilizzata per l'imaging del cervello. Nelle ultime due decadi si sono inoltre applicate nuove metodiche con lo sviluppo di bobine di superficie phase-array, alte ampiezze di gradiente, e tecniche di immagini rapide (imaging ecoplanare e imaging parallelo). [58, 63, 64] La sequenza T2-weighted spin-echo consiste in un impulso radiofrequenza (RF) a 90° seguito da un impulso RF a 180°, con il decadimento T2 correlato al rilassamento trasverso. La misura della diffusione dell'acqua è possibile con l'applicazione di un gradiente che disturba la fase (detto gradiente di sensitizzazione alla diffusione) prima dell'impulso RF a 180°. Dopo l'impulso RF a 180°, viene applicato un gradiente simmetrico che ristabilisce la fase. [36] Le molecole d'acqua all'interno di un ambiente ristretto non si muovono a lunga distanza e acquisiscono cambiamenti di fase durante l'applicazione del primo gradiente, che vengono cancellati dai cambiamenti di fase acquisiti durante il secondo gradiente opposto al primo. Quindi, non risulta globalmente una perdita del segnale, al di là del normale e atteso decadimento T2. Questo effetto si verifica nei tessuti in cui il movimento dell'acqua è limitato o impedito, come ad esempio i

tessuti ad alta cellularità dei tumori. Quindi, in questi casi c'è un modesto impatto sul decadimento T2, e il segnale T2 del tessuto viene mantenuto. Nei tessuti in cui il movimento delle molecole d'acqua non è impedito (tessuti a bassa cellularità o ambiente meno ristretto), le molecole d'acqua si possono muovere a una distanza considerevole. Quindi queste molecole acquisiscono la fase dal primo gradiente, ma a causa del loro movimento, il loro segnale non riacquisisce la fase completamente durante il secondo gradiente simmetrico correttivo: il risultato è una globale perdita della intensità di segnale in aggiunta al normale decadimento T2. Quindi, il movimento delle molecole d'acqua è rappresentato da una riduzione dell'intensità del segnale nelle immagini diffusion-weighted ed è proporzionale al grado di perdita del segnale.

B1.3. Il valore b

Il valore b è la forza del gradiente di sensibilizzazione alla diffusione. Il valore b è proporzionale all'ampiezza del gradiente, la durata del gradiente applicato, e l'intervallo di tempo tra i gradienti appaiati; esso è misurato in secondi per millimetro quadrato. [65] La sensibilità della sequenza di diffusione è aggiustata a seconda delle variazioni del valore b, che in genere viene variato alterando l'ampiezza del gradiente. [58] Essendo la forza del gradiente di sensibilizzazione alla diffusione, un valore $b=0 \text{ sec/mm}^2$ (cioè nessun gradiente di sensitizzazione alla diffusione) implica che le molecole di acqua libere abbiano un'alta intensità di

segnale determinata dalla sequenza T2. Bassi valori b (50-100 sec/mm²) risultano in una perdita di segnale in molecole d'acqua molto mobile come quelle all'interno dei vasi. Questo avviene perché le molecole d'acqua si muovono velocemente su distanze relativamente ampie tra il primo e il secondo gradiente correttivo, e quindi non riacquisiscono la loro fase originaria all'applicazione del secondo gradiente. Le immagini risultanti vengono chiamate "sangue nero" ("black blood") perché c'è una perdita di segnale nel sangue che si muove a elevate velocità nei vasi. [58, 60] Dato che il movimento delle molecole d'acqua in tessuti ad alta cellularità è ristretto, le molecole d'acqua all'interno di questi tessuti mantengono il loro segnale anche ad alti valori b (500-1000 sec/mm²). Questo spiega perché in tessuti ad alta cellularità come i tumori, tessuto neurologico (cervello, midollo spinale), tessuto linfatico normale, mucosa intestinale, e l'endometrio normale, appaiono persistentemente chiari nelle immagini diffusion-weighted, anche ad alti valori b . [60]

B1.4. Analisi qualitativa dell'imaging diffusion-weighted

In genere l'imaging diffusion-weighted viene eseguito con almeno 2 valori b , includendo un valore 0 sec/mm² e un valore elevato a 500-1000 sec/mm² a seconda della regione del corpo o l'organo interessato. Il decadimento del segnale nei tessuti a differenti valori b è in genere bi-esponenziale. [60] La prima componente di decadimento del segnale è la perdita del segnale dovuto allo scorrimento del sangue (le molecole d'acqua che si muovono velocemente perdono la fase ma non la

riacquistano subito e perdono il segnale anche a bassi valori b). La seconda componente è dovuta al movimento dell'acqua negli spazi intra ed extracellulari. Una regione ad elevata intensità di segnale ad un alto valore b nelle sequenze diffusion-weighted suggerisce che la diffusione è ristretta e quindi la presenza di un tessuto ad alta cellularità (molecole d'acqua "impaccate" tra le cellule vengono subito riportate alla fase originaria dal gradiente correttivo di restituzione di fase⁹). La perdita di segnale nelle molecole d'acqua a differenti valori b può essere usato per la rilevazione delle lesioni o la loro caratterizzazione.

B1.5. Analisi quantitativa dei risultati dell'imaging diffusion-weighted e il valore ADC (coefficiente apparente di diffusione)

L'ADC rappresenta la pendenza di una linea che riporta la forza del segnale sulla Y, e il valore b sulla X. È un metodo per rendere lineare la funzione di decadimento del segnale in RMN, che è in genere esponenziale. L'analisi quantitativa dell'imaging diffusion-weighted può essere fatta solo se vengono usati almeno 2 valori b . Il valore ottimale per la caratterizzazione del tessuto dipende dal tessuto o organo in valutazione. Benché debbano essere usati almeno 2 valori b per l'analisi delle immagini in diffusione, l'applicazione di un maggior numero di valori b aumenta l'accuratezza dell'ADC calcolata. Lo svantaggio nell'usare molti valori b è un associato aumento del tempo d'esame. L'analisi dell'ADC è un metodo automatico che è disponibile come applicazione in molti scanner o in una

workstation. Il calcolo dell'ADC è indipendente dalla forza del campo magnetico e viene fatto per ogni pixel dell'immagine. L'ADC può essere quindi mostrato come una mappa parametrica e essenzialmente riflette le differenze nella diffusività del tessuto a differenti valori b . Le misure ADC sono quindi registrate per ogni regione disegnando le regioni di interesse sulla mappa ADC.

7. Ringraziamenti

Ringrazio il Professor Paolo Corradini per l'importante e costante aiuto e il supporto durante tutto il periodo di lavoro, ricerca e studio nella sua Divisione.

Ringrazio i colleghi dell'Ematologia-Trapianto di Midollo Osseo dell'Istituto Nazionale dei Tumori di Milano per il supporto in ogni attività clinica e scientifica.

Ringrazio il dr. Paolo Potepan (Radiologia, Istituto Nazionale dei Tumori di Milano), e il dr. Eros Montin (Ingegneria Biomedica, Politecnico di Milano) per il lavoro di lettura e interpretazione delle risonanze, e il dr. Luigi Mariani (Statistica, Istituto Nazionale dei Tumori di Milano) per il supporto statistico.

Ringrazio il dr. Renato Maggi per avermi offerto da studente una inestimabile opportunità di crescita facendomi lavorare allo studio CNR sul carcinoma endometriale. Ringrazio il dr. Paolo Casali per la fiducia che mi ha mostrato offrendomi, appena laureato, una opportunità di lavoro in Istituto dei Tumori.

Ringrazio i miei genitori per l'educazione, le opportunità e la formazione che mi hanno garantito, e per tutto l'aiuto in questi anni di studio e lavoro. Ringrazio la mia ragazza per la sua pazienza e il suo inestimabile e costante supporto. Ringrazio mio fratello per la sua vicinanza anche ad oceani e anni di distanza, ed i miei amici "di chitarra" per la loro amicizia.