



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina

Direttore: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

Unità di Ematologia e Immunologia Clinica

Direttore: Ch.mo Prof. Livio Trentin

TESI DI LAUREA

La splenectomia nel trattamento della trombocitopenia  
immune: studio retrospettivo multicentrico sui fattori  
predittivi di risposta

Relatore: Ch.mo Prof. Fabrizio Vianello

Correlatore: Dott. Simone Zoletto

Laureando: Andrea De Crescenzo

Anno accademico 2022/2023





UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
Corso di Laurea Magistrale in Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Medicina

Direttore: Ch.mo Prof. Roberto Vettor

Unità di Ematologia e Immunologia Clinica

Direttore: Ch.mo Prof. Livio Trentin

TESI DI LAUREA

La splenectomia nel trattamento della trombocitopenia  
immune: studio retrospettivo multicentrico sui fattori  
predittivi di risposta

Relatore: Ch.mo Prof. Fabrizio Vianello

Correlatore: Dott. Simone Zoletto

Laureando: Andrea De Crescenzo

Anno accademico 2022/2023



## INDICE

<b>LISTA DELLE ABBREVIAZIONI .....</b>	<b>I</b>
<b>RIASSUNTO .....</b>	<b>III</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>V</b>
<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>1</b>
1.1 Trombocitopenia Immune.....	1
1.1.1 Definizione e cenni storici.....	1
1.1.2 Epidemiologia dell'ITP.....	2
1.1.3 Etiologia dell'ITP .....	4
1.1.4 Fisiopatologia dell'ITP .....	6
1.1.4.1 Immunità innata .....	7
1.1.4.2 Immunità adattativa.....	10
1.1.4.3 La milza.....	13
1.1.4.4 Alterazioni della megacariocitopoiesi .....	15
1.1.5 Manifestazioni cliniche dell'ITP .....	15
1.1.5.1 ITP nel bambino, nell'adulto e in gravidanza.....	16
1.1.5.2 Sintomi emorragici.....	16
1.1.5.3 Affaticamento e qualità di vita.....	19
1.1.5.4 Rischio trombo-embolico .....	19
1.1.5.5 Mortalità nell'ITP .....	20
1.1.6 Percorso diagnostico nell'ITP .....	20
1.1.7 Trattamento dell'ITP.....	23
1.1.7.1 Terapie di prima linea .....	24
1.1.7.2 Successive linee terapeutiche.....	26
1.1.7.3 Splenectomia .....	29
<b>2. SCOPO DELLO STUDIO .....</b>	<b>33</b>
<b>3. MATERIALI E METODI .....</b>	<b>35</b>
3.1 Disegno dello studio e selezione dei casi.....	35
3.2 Valutazione istologica e morfometrica.....	36
3.3 Analisi immunoistochimiche .....	36
3.4 Elaborazione dei dati .....	37

<b>4. RISULTATI .....</b>	<b>39</b>
4.1 Caratteristiche clinico-epidemiologiche del discovery set .....	39
4.2 Caratteristiche istopatologiche delle milze del discovery set .....	41
4.3 Caratteristiche cliniche, istologiche e risposta alla splenectomia .....	43
4.4 Applicazione dello score clinico nel discovery set.....	45
4.5 Integrazione clinico-istologica nel discovery set .....	47
4.6 Validazione dei risultati .....	48
<b>5. DISCUSSIONE .....</b>	<b>53</b>
<b>6. CONCLUSIONI.....</b>	<b>61</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>63</b>

LISTA DELLE ABBREVIAZIONI

<b>ADCC</b>	Antibody-dependent cellular cytotoxicity
<b>ADCP</b>	Antibody-dependent cellular phagocytosis
<b>ANA</b>	Anticorpi anti-nucleo
<b>APC</b>	Antigen-presenting cells
<b>ASH</b>	American Society of Hematology
<b>BAFF</b>	B-cell activating factor
<b>CD</b>	Cellule dendritiche
<b>CDC</b>	Complement-mediated cytotoxicity
<b>CG</b>	Centri germinativi
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>CR</b>	Complete response, risposta completa
<b>EBV</b>	Virus di Epstein-Barr
<b>FcγR</b>	Recettore delle immunoglobuline di classe IgG
<b>FL</b>	Follicoli linfoidi
<b>GP</b>	Glicoproteina
<b>HBV</b>	Virus dell'epatite B
<b>HCV</b>	Virus dell'epatite C
<b>HIV</b>	Virus dell'immunodeficienza umana
<b>HPF</b>	High power field, campo ad alta potenza
<b>HRQoL</b>	Health Related Quality of Life, qualità di vita correlata allo stato di salute
<b>HWP</b>	Hyperplastic white pulp
<b>IDO-1</b>	Indolamina 2,3-diossigenasi 1
<b>IFN-γ</b>	Interferone γ
<b>ITP</b>	Immune thrombocytopenia, Trombocitopenia immune
<b>IVIg</b>	Intravenous immunoglobulin, immunoglobuline ad uso endovenoso
<b>IWG</b>	International Working Group
<b>LES</b>	Lupus eritematoso sistemico
<b>LR</b>	Loss of response, perdita di risposta
<b>MSC</b>	Cellule staminali mesenchimali
<b>nAWP</b>	Non-activated white pulp
<b>NK</b>	Cellule Natural Killer
<b>NR</b>	No response, nessuna risposta
<b>PCR</b>	Proteina C-reattiva
<b>RFS</b>	Relapse-free survival, sopravvivenza libera da recidiva
<b>RTX</b>	Rituximab
<b>Syk</b>	Spleen tyrosine kinase
<b>Tc1/Tc2</b>	Linfociti T citotossici 1 / Linfociti T citotossici 2
<b>Tfh</b>	T follicular helper cells, Linfociti T helper follicolari
<b>Th1/Th2</b>	Linfociti T helper 1 / Linfociti T helper 2

<b>TPO</b>	Trombopoietina
<b>TPO-RA</b>	Agonista del recettore della trombopoietina
<b>Treg</b>	Regulatory T cells, Linfociti T regolatori
<b>VZV</b>	Virus varicella-zoster
<b>WP</b>	White pulp, polpa bianca
<b>WPD</b>	White pulp depleted
<b>ZM</b>	Zona marginale



## RIASSUNTO

**Presupposti dello studio.** La trombocitopenia immune (ITP) è una rara malattia ematologica acquisita, caratterizzata dalla distruzione immuno-mediata delle piastrine. La fisiopatologia dell'ITP è complessa e comprende alterazioni dell'immunità innata, dell'immunità acquisita e della megacariocitopoiesi, con la milza che gioca un ruolo fondamentale nella distruzione piastrinica. Nelle forme croniche di ITP, la splenectomia rappresenta una efficace terapia di seconda linea, in grado di determinare remissione fino al 70% dei casi. Ad oggi, tuttavia, non sono noti fattori clinici o patologici che possano predire la risposta alla splenectomia, atto chirurgico che condiziona non trascurabili rischi infettivi a lungo termine.

**Scopo dello studio.** Il presente studio ha l'obiettivo di: (i) identificare possibili parametri predittivi di risposta alla splenectomia in pazienti affetti da ITP; (ii) proporre un semplice score per prevedere la risposta alla splenectomia.

**Materiali e metodi.** Questo studio retrospettivo multicentrico ha considerato dapprima una coorte (discovery set, n=25) di pazienti affetti da ITP primitiva, afferenti a un singolo centro (Azienda Ospedale-Università di Padova), sottoposti a splenectomia terapeutica (età alla splenectomia:  $\geq 16$ ). Per tutti i pazienti erano disponibili dati clinici e laboratoristici, campioni di milza per la valutazione istologica e informazioni in merito alla risposta all'intervento chirurgico. I dati clinici ed istologici sono stati correlati con la risposta alla splenectomia, per valutarne il ruolo predittivo dell'outcome chirurgico. I fattori che hanno dimostrato un'associazione statisticamente significativa ( $p < 0.05$ ), o un trend verso la significatività statistica ( $p < 0.1$ ), con l'esito della splenectomia, sono stati integrati in uno score clinico, uno score istologico e uno score clinico-istologico. I dati ottenuti sono stati successivamente validati in una seconda coorte di pazienti (validation set, n=39), afferenti a tre presidi ospedalieri italiani di secondo livello (Azienda Ospedale-Università di Padova; Ospedale San Bortolo di Vicenza; Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna Policlinico di Sant'Orsola).

**Risultati.** Nel discovery set, la recidiva di ITP post-splenectomia è risultata significativamente associata ( $p < 0.05$ ), o con un trend verso la significatività, a: (i)

età alla diagnosi  $\geq 49$  anni; (ii) età alla splenectomia  $\geq 40$  anni; (iii) presenza di comorbidità autoimmuni; (iv) dose di steroide pre-intervento  $\geq 37.5$ mg/die; (v) bassa densità di cellule T helper follicolari nei FL; (vi) atrofia delle zone marginali. La combinazione di alcuni parametri clinici in uno score integrato (1 punto per ogni fattore), ha permesso di identificare, nel discovery set, gruppi di pazienti con diverso rischio di recidiva in seguito a splenectomia (VPP=50.0%, VPN=100%; RFS a 1 anno: 53.2% vs 100% con score  $\geq 1$  vs score=0; follow up mediano: 28 mesi;  $p=0.0017$ ). I risultati dello score clinico sono stati confermati nel validation set (VPP=53.4%, VPN=82.6%; RFS a 1 anno: 57.1% vs 89.5% con score  $\geq 1$  vs score=0; follow up mediano: 28 mesi;  $p=0.011$ ).

**Conclusioni.** Un set integrato di parametri clinici (età alla diagnosi; comorbidità autoimmuni; alta dose di steroide pre-intervento) ha dimostrato una buona accuratezza nel predire la risposta alla splenectomia nell'ITP. La valutazione istologica delle milze ha fornito pattern istologici correlati ad alto rischio di recidiva post-splenectomia, potenzialmente utili in futuri studi rivolti alla identificazione di meccanismi immunologici implicati nella patogenesi dell'ITP.

## ABSTRACT

**Background.** Immune thrombocytopenia (ITP) is a rare acquired haematological disease characterised by immune-mediated destruction of platelets. The pathophysiology of ITP is complex, and includes alterations in both innate and acquired immunity and megakaryocytopoiesis, with the spleen playing a key role in platelet destruction. In chronic forms of ITP, splenectomy is an effective second-line therapy, capable of causing remission in up to 70% of cases. However, to this day, there are no known clinical or pathological factors that can predict the response to splenectomy, a surgical act that carries non-negligible long-term infectious risks.

**Study aims.** The present study aims to: (i) identify possible predictive parameters of response to splenectomy in patients with ITP; (ii) propose a simple score to predict response to splenectomy.

**Materials & Methods.** This retrospective multicentric study considered at first a cohort (discovery set, n=25) of patients with primary ITP, referred to a single centre (University Hospital of Padua), undergoing therapeutic splenectomy (age at splenectomy:  $\geq 16$ ). Clinical and laboratory data, spleen samples for histological evaluation and information on response to surgery, were available for all patients. Clinical and histological data were correlated with response to splenectomy, to assess their predictive role on surgical outcome. Factors that demonstrated, with the outcome of splenectomy, a statistically significant association ( $p < 0.05$ ), or a trend towards statistical significance ( $p < 0.1$ ), were integrated into a clinical score, a histological score and a clinical-histological score. The resulting data were subsequently validated in a second cohort of patients (validation set, n=39), from three Italian second-level hospitals (University Hospital of Padua; San Bortolo Hospital of Vicenza; University Hospital of Bologna Sant'Orsola Polyclinic).

**Results.** In the discovery set, post-splenectomy ITP recurrence was significantly associated ( $p < 0.05$ ), or trending towards significance, with: (i) age at diagnosis  $\geq 49$  years; (ii) age at splenectomy  $\geq 40$  years; (iii) presence of autoimmune comorbidities; (iv) pre-intervention steroid dose  $\geq 37.5$  mg/day; (v) low density of follicular T helper cells in FLs; (vi) marginal zone atrophy. The combination of

some clinical parameters into an integrated score (1 point for each factor), made it possible to identify, in the discovery set, groups of patients with different risk of recurrence after splenectomy (PPV=50.0%, NPV=100%; 1-year RFS: 53.2% vs 100% with score  $\geq 1$  vs score=0; median follow-up: 28 months;  $p=0.0017$ ). The clinical score results were confirmed in the validation set (PPV=53.4%, NPV=82.6%; 1-year RFS: 57.1% vs 89.5% with score  $\geq 1$  vs score=0; median follow-up: 28 months;  $p=0.011$ ).

**Conclusions.** An integrated set of clinical parameters (age at diagnosis; autoimmune comorbidities; high preoperative steroid dose) demonstrated good accuracy in predicting response to splenectomy in ITP. Histological evaluation of spleens provided histological patterns correlated with high risk of post-splenectomy recurrence, potentially useful in future studies aimed at identifying immunological mechanisms involved in the pathogenesis of ITP.

## 1. INTRODUZIONE

### **1.1 Trombocitopenia Immune**

#### 1.1.1 Definizione e cenni storici

La trombocitopenia immune (ITP) è una patologia acquisita caratterizzata dalla distruzione immuno-mediata delle piastrine (i.e. conta piastrinica  $< 100 \times 10^9/L$ ), cui si può associare un difetto della megacariocitopoiesi (1).

La definizione di ITP negli scorsi decenni è stata oggetto di dibattito in ambito medico-scientifico, non solo per la complessità biologica della malattia, ma anche per l'assenza di una soglia condivisa per la definizione dello stato di trombocitopenia. In una revisione della letteratura relativa agli anni 2000-2006, Ruggeri et al. hanno evidenziato ampie discrepanze in merito ai criteri usati per la diagnosi di ITP e la valutazione della sua severità, ai criteri per l'inizio del trattamento e alle definizioni di risposta e refrattarietà alle terapie (2). Le linee guida della British Society for Haematology del 2003 definivano l'ITP "un disordine autoimmune, caratterizzato da trombocitopenia persistente (i.e. conta piastrinica su sangue periferico  $< 150 \times 10^9/L$ ) dovuta al legame di autoanticorpi ad antigeni piastrinici, responsabili della prematura distruzione delle piastrine da parte del sistema reticoloendoteliale (RES), in particolare nella milza" (3). Questa definizione ha rappresentato un passo in avanti nell'armonizzazione della terminologia per la gestione dell'ITP, ma presentava una serie di limiti, quali: (i) la bassa specificità del cut-off piastrinico considerato, a causa della variabilità della conta piastrinica osservata nella popolazione generale (4–7), in particolare per valori tra 100 e  $150 \times 10^9/L$ , cui si associava un basso rischio di progressione verso forme clinicamente manifeste (8); (ii) la bassa sensibilità dei test per la ricerca di anticorpi anti-piastrine (9). In merito al primo punto infatti, uno studio prospettico condotto da Stasi et al. ha evidenziato che in soggetti con conta piastrinica compresa tra  $100 \times 10^9/L$  e  $150 \times 10^9/L$ , soltanto il 6.9% dei casi sviluppa una forma di trombocitopenia persistentemente  $< 100 \times 10^9/L$  (8).

Nel 2009 un International Working Group (IWG), sotto l'egida dell'European Hematology Association (EHA), ha rivisto le definizioni, la nomenclatura e le misure di outcome per l'ITP. La dicitura "porpora

trombocitopenica idiopatica” è stata abbandonata in favore di “trombocitopenia immune”, per sottolineare la natura immuno-mediata della patologia e perché i sintomi emorragici sono assenti in una larga parte degli affetti. Il cutoff piastrinico per la diagnosi di ITP è stato abbassato a  $100 \times 10^9/L$ . L’IWG suggerisce di distinguere l’ITP in primaria e secondaria, specificando per quest’ultima la patologia associata o l’esposizione farmacologica o tossica responsabile della trombocitopenia. La classificazione dell’IWG prevede 3 possibili fasi di malattia: (i) ITP di nuova diagnosi (i.e. ITP di durata <3 mesi), (ii) ITP persistente (i.e. ITP di durata tra 3 e 12 mesi), (iii) ITP cronica (i.e. ITP di durata >12 mesi). Il termine “severa” va riferito all’ITP caratterizzata da sintomi emorragici tali da imporre l’inizio di un trattamento, o dalla comparsa di nuove manifestazioni emorragiche che richiedano una terapia addizionale a quella già in atto. L’IWG definisce “refrattaria” l’ITP che recidiva o resiste alla splenectomia e che rispetta i criteri per l’ITP severa o che presenta un rischio di sanguinamento tale da richiedere un trattamento (10). Le definizioni e la classificazione dell’IWG sono state adottate dalle linee guida dell’American Society of Hematology (ASH) del 2011 e del 2019. L’ASH sottolinea però che le definizioni delle fasi di malattia riportate dall’IWG non sono state adeguatamente validate e potrebbero risultare imprecise, specialmente nelle forme secondarie di ITP. Nonostante questo, il tentativo di standardizzazione dell’IWG rappresenta una pietra miliare per lo sviluppo di una terminologia condivisa nell’ITP, utile soprattutto nel contesto degli studi clinici e nell’armonizzazione della letteratura (11).

### 1.1.2 Epidemiologia dell’ITP

Come riportato dai principali studi in letteratura, l’incidenza di ITP varia da 1.1 a 5.8/100,000/anno in età pediatrica e da 1.6 a 3.9/100,000/anno nell’adulto (12); in quest’ultima categoria, l’incidenza aumenta all’aumentare dell’età (13,14). Uno studio epidemiologico condotto da Schoonen et al. riporta, per il Regno Unito, un’incidenza di ITP pari a 4.4/100,000 nel sesso femminile e 3.4/100,000 nel sesso maschile, compatibile con altri studi in cui si riporta un’incidenza superiore nelle donne (12,15). Nella donna l’incidenza è costante fino ai 60 anni, oltre i quali vi è un aumento progressivo dell’incidenza (15). La differenza di incidenza nei sessi è

marcata nella fascia di età 18-64 anni, mentre per età >60 anni si attenua. Nel sesso maschile l'incidenza ha un andamento bimodale, con un picco in individui di età compresa tra 1-4 anni e un secondo picco nella fascia 75-84 anni. Nell'adulto l'incidenza di ITP varia ciclicamente nel corso dell'anno, con il picco nel mese di gennaio e il nadir nei mesi estivi. In gravidanza è riportata un'incidenza di ITP pari 1-10/10000 gravidanze (16,17). L'ITP rappresenta la forma più comune di trombocitopenia nel primo trimestre di gestazione e nella prima parte del secondo (18), mentre rende conto di solo il 3% delle trombocitopenie riscontrate al momento del parto (19). Per l'ITP infantile si riporta un picco di incidenza in primavera, probabilmente legato alla stagionalità delle infezioni virali (20). Alla diagnosi, si riscontrano comorbidità nel 3.9% dei bambini e nel 30% degli adulti (maggiore prevalenza negli adulti di diabete, disturbi gastrointestinali, ipertensione arteriosa e tireopatie), mentre la familiarità per trombocitopenia si riscontra in percentuali simili (i.e. 2-3%) (21).

La prevalenza puntuale di ITP cronica nella popolazione generale negli Stati Uniti varia tra 9.5 e 11.2/100,000, risultando superiore nell'età adulta rispetto all'età pediatrica (12.1/100,000 vs 8.1/100,000) (22,23). Bennett et al. riportano, per il Regno Unito, una prevalenza di ITP pari a 50.3/100,000, con un aumento della prevalenza con l'età (30.1/100,000 tra i 18 e i 49 anni; 58.2/100,000 tra i 50 e i 64 anni; 93.8/100,000 per età >64 anni) (24).

Anche per la continua revisione della definizione di ITP cui si è assistito nel corso degli anni, le diagnosi sono progressivamente aumentate (14,15,24). I motivi di ciò possono essere ricondotti al perfezionamento del cut-off di piastrinopenia, al miglioramento delle pratiche diagnostiche, che ha consentito di escludere altre patologie (poi vedremo che la diagnosi di ITP è una diagnosi di esclusione), alla maggiore attenzione posta verso alcuni studi, che includevano solamente dati provenienti da pazienti ospedalizzati, escludendo nel conteggio le ITP diagnosticate al di fuori delle strutture ospedaliere (25).

### 1.1.3 Etiologia dell'ITP

L'ITP può essere distinta in forma primaria o secondaria (10).

L'ITP primaria è un disordine acquisito, in cui la trombocitopenia è conseguente a processi autoimmunitari che causano la distruzione delle piastrine e/o alterano la megacariocitopoiesi, in assenza di cause identificabili (1).

L'ITP secondaria è una piastrinopenia, anch'essa su base immunologica, determinata da cause identificabili (Tabella I) (26,27).

Tabella I. Cause di ITP secondaria

ITP secondaria	
Malattie autoimmuni	Artrite reumatoide Lupus eritematoso sistemico (LES) Malattie infiammatorie croniche intestinali Sclerosi sistemica Sindrome autoimmune linfoproliferativa Sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi Sindrome di Evans Sindrome di Sjögren
Immunodeficienze	Immunodeficienza comune variabile Sindrome dell'immunodeficienza umana acquisita (AIDS) Deficit di IgA
Infezioni	Helicobacter pylori Citomegalovirus (CMV) Virus dell'epatite B (HBV) Virus dell'epatite C (HCV) Virus di Epstein-Barr (EBV) Virus dell'immunodeficienza umana (HIV) Virus varicella-zoster (VZV)
Neoplasie	Linfomi non-Hodgkin <sup>a</sup> Linfoma di Hodgkin Neoplasie plasmacellulari <sup>b</sup>
Farmaci e vaccini	Alemtuzumab Ipilimumab Nivolumab Pembrolizumab Post vaccino MPR <sup>c</sup>
Altre cause	Post trapianto di midollo emopoietico Post trapianto di organo solido

Note. (a) In particolare la leucemia linfatica cronica/linfoma a piccoli linfociti. (b) Mieloma multiplo, macroglobulinemia di Waldenström. (c) Morbillo-parotite-rosolia.



Uno studio di popolazione condotto in Francia ha evidenziato come l'incidenza di ITP secondaria aumenti con l'età, rappresentando il 2.4% delle forme pediatriche e il 18% delle forme dell'adulto, con un picco in individui di età >70 anni (21.2% di ITP secondarie). Le cause principali di ITP secondaria nell'età pediatrica sono: (i) immunodeficienze primitive, (ii) lupus eritematoso sistemico, (iii) neoplasie ematologiche, (iv) HIV. Nell'adulto l'ITP secondaria è riconducibile a neoplasie maligne (10.9%, di cui 6.8% neoplasie ematologiche), connettiviti (2.5%), sindromi mielodisplastiche (2.3%), immunodeficienze (1.7%), HIV (0.9%), sarcoidosi (0.6%), artrite reumatoide (0.4%), sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi (0.3%), infezione da HCV o HBV (0.3%) (20).

Le disfunzioni immunitarie responsabili dello sviluppo di ITP sono verosimilmente da ricondurre a una combinazione di fattori genetici e ambientali (28). Numerosi polimorfismi genici sono associati allo sviluppo di ITP e, alcuni di questi, sono associati all'andamento temporale della malattia (acuto o cronico) e alla risposta alla terapia. I geni maggiormente coinvolti codificano per il complesso maggiore di istocompatibilità (HLA, MICA), il recettore delle immunoglobuline di classe G (geni: FCGR2A, FCGR2B, FCGR2C, FCGR3A, FCGR3B; FcγR), fattori di trascrizione (T-bet), chemochine (SDF1), citochine anti-infiammatorie (IL-10, TGF-β), citochine pro-infiammatorie (IL-4, IFN-γ, TNF-α, IL-17, IL-2, BAFF [B-cell activating factor]), recettori per le citochine (IL1-RA, IL-23R), proteine implicate nella trasduzione del segnale (PTPN22, BAFF, LT-α), antigeni esposti sulla superficie piastrinica (HPA-2a, HPA-5b). Molte di queste associazioni hanno tuttavia una scarsa rilevanza poiché sono state identificate in piccole coorti di pazienti e in sottogruppi etnici specifici. Inoltre questi polimorfismi sono spesso riscontrati in altre malattie autoimmuni, pertanto di scarsa specificità per l'ITP (26,28).

In soggetti affetti da ITP, sono state riscontrate anomalie rispetto a controlli sani nei livelli di 22 differenti microRNA (i.e. piccoli RNA non codificanti che regolano l'espressione post trascrizionale di altri geni, determinando la degradazione degli RNA messaggeri o bloccandone la traduzione). In particolare, la ridotta espressione di MIR130A è associata a down-regolazione di TGF-β e up-regolazione di IL-18, mentre la ridotta espressione di MIR409-3p è associata ad up-regolazione di IFN-

$\gamma$ , con sviluppo di una disregolazione citochinica favorente processi autoimmuni (29–31).

Nel contesto dei fattori ambientali associati a ITP, le infezioni sono l'elemento con un ruolo patogenetico maggiormente definito. Alti livelli di omologia di sequenza sono presenti tra la glicoproteina piastrinica umana IIb/IIIa e peptidi virali appartenenti a Herpes Simplex Virus, VZV, EBV, Adenovirus, CMV, Paramyxovirus, Rubulavirus, Rubella Virus; questi risultati suggeriscono un possibile ruolo del mimetismo molecolare nella patogenesi di ITP (32). Fenomeni di mimetismo molecolare tra antigeni virali o batterici e glicoproteine piastriniche sono stati dimostrati anche in soggetti con ITP associata ad HIV (33), HCV (34), nelle ITP neonatali secondarie da CMV ed EBV (26), in alcuni casi di ITP secondaria a infezione da *Helicobacter pylori* (35). Musaji et al. hanno inoltre dimostrato che in corso di infezione virale vi è un aumento del processo di fagocitosi piastrinica da parte dei macrofagi, mediato dall'aumentata produzione di IFN- $\gamma$ , a sostegno di un meccanismo comune nella distruzione piastrinica in corso di infezione da patogeni differenti (36). Vi sono inoltre altri meccanismi patogenetici specifici del singolo agente infettivo, come nel caso dell'*Helicobacter pylori*, in grado di downregolare l'espressione del recettore inibitorio Fc $\gamma$ RIIb sui monociti, oppure del CMV e HIV e della loro inibizione diretta della megacariocitopoiesi. Ancora, l'infezione cronica da HCV induce la formazione di immunocomplessi in grado di legarsi alle piastrine in modo aspecifico, accelerandone la clearance (26).

#### 1.1.4 Fisiopatologia dell'ITP

L'ITP è una rara malattia autoimmune, il cui sviluppo deriva dalla combinazione tra l'esposizione di antigeni piastrinici criptici al sistema immunitario e la perdita della tolleranza immunologica. L'esposizione degli antigeni piastrinici deriverebbe da un evento trigger (e.g. infezione, infiammazione, farmaci, mimetismo molecolare), il quale, insieme all'eventuale predisposizione genetica, determinerebbe il tipo di risposta autoimmunitaria (37). Un meccanismo patogenetico chiave comprende lo stimolo dei linfociti T helper follicolari (T follicular helper cells; Tfh) verso i linfociti B auto-reattivi, in grado di produrre

anticorpi anti-piastrina. I macrofagi contribuiscono al perpetuarsi della risposta autoimmunitaria, agendo da cellule presentanti l'antigene (Antigen-Presenting Cells; APC). Altri meccanismi sono implicati nella patogenesi dell'ITP, quali: (i) la lisi delle piastrine indotta da linfociti T CD8<sup>+</sup> auto-reattivi, (ii) la clearance epatica delle piastrine attraverso il recettore di Ashwell-Morell (iii) un'alterata trombocitopoiesi midollare, (iv) la riduzione dei livelli di trombopoietina (TPO) (26,38). Le evidenze attuali suggeriscono che l'ITP sia una sindrome clinica, i cui meccanismi patogenetici possono essere diversi da paziente a paziente, rendendo conto, almeno in parte, dell'eterogenea risposta alle terapie (26,27). L'immunità innata, quella adattativa, l'immunità splenica e le disfunzioni della megacariocitopoiesi sono i principali ambiti che svolgono un ruolo patogenetico di rilievo nell'ITP.

#### *1.1.4.1 Immunità innata*

Il sistema immunitario innato partecipa con diversi effettori allo sviluppo dell'ITP. I macrofagi hanno un duplice ruolo: da un lato contribuiscono alla distruzione piastrinica, in quanto cellule effettrici, dall'altro stimolano la risposta immunitaria adattativa, in qualità di APC (26). Quest'ultimo contributo è fondamentale nel mantenimento della risposta autoimmunitaria (39). La fagocitosi cellulare anticorpo-mediata (antibody-dependent cellular phagocytosis; ADCP) è guidata principalmente dal sistema dei recettori Fc $\gamma$  (i.e. recettori delle IgG), in particolare dal bilancio del segnale tra recettori attivatori ed inibitori. Nell'ITP, l'ADCP è determinata dai recettori Fc $\gamma$ RI e Fc $\gamma$ RIII espressi sui macrofagi splenici, in grado di legare le piastrine opsonizzate da anticorpi anti glicoproteina (GP) IIb/IIIa (40). In corso di ITP inoltre, i monociti presentano un'aumentata espressione di Fc $\gamma$ RI (recettore con funzione attivatoria) e un aumento del rapporto Fc $\gamma$ RIIIa/Fc $\gamma$ RIIb (recettori con funzione rispettivamente attivatoria e inibitoria); questo profilo recettoriale pro-infiammatorio si associa a un aumento della capacità fagocitica e regredisce in seguito a terapia steroidea (41). Oltre all'ADCP, i macrofagi vestono il ruolo di principale APC in corso di ITP. Macrofagi splenici isolati, provenienti da pazienti affetti da ITP, in seguito al riconoscimento di piastrine opsonizzate sono in grado di stimolare la proliferazione di linfociti T auto-reattivi (i.e. cloni di

linfociti T anti GPIIb/IIIa). I macrofagi splenici, tramite i recettori Fc $\gamma$ , fagocitano ampie quantità di piastrine opsonizzate e concentrano in maniera efficiente epitopi criptici provenienti dalle GP piastriniche. Il segnale mediato dai recettori Fc $\gamma$  permette, nei macrofagi, di aumentare l'esposizione di molecole di adesione e di molecole co-stimolatorie e di potenziare l'apparato di processamento degli antigeni. L'insieme di questi processi permette di rivelare epitopi criptici a partire da GPIIb/IIIa, rendendo possibile l'attivazione di cloni di linfociti B e T auto-reattivi (42–45). A conferma del ruolo di principale APC in corso di ITP, i macrofagi splenici presentano elevata espressione di molecole MHC di classe II e di CD86 (molecola co-stimolatoria) (46). È stato dimostrato sperimentalmente che altre APC (e.g. cellule dendritiche [CD], linfociti B), in vitro, riescono ad attivare i linfociti T auto-reattivi soltanto se gli vengono forniti peptidi piastrinici già processati (45).

Le CD partecipano attivamente alla risposta autoimmune in corso di ITP. Studi in vitro hanno dimostrato che le CD, in pazienti affetti da ITP, sono in grado di stimolare la proliferazione di linfociti T in maniera più efficiente rispetto ai controlli e di fagocitare le piastrine apoptotiche, in misura però non superiore ai controlli (47). Questi rilievi sono compatibili con l'aumentata espressione delle molecole co-stimolatorie CD80 e CD86 e l'aumentata produzione di IL-12 da parte delle CD dei pazienti ITP rispetto a pazienti sani (47,48). Tuttavia, come sopra accennato, CD spleniche isolate non sono in grado di agire spontaneamente da APC e indurre la proliferazione dei linfociti T, a differenza dei macrofagi (45). Le CD sono implicate nel mantenimento della tolleranza immunologica, ma queste funzioni sono alterate in corso di ITP. Le anomalie principali comprendono: (i) ridotta espressione dell'enzima indolamina 2,3-diossigenasi 1 (IDO1) da parte delle CD, in grado di produrre metaboliti pro-apoptotici per i linfociti T a partire dal triptofano; (ii) ridotto differenziamento dei linfociti CD4<sup>+</sup> naïve in linfociti T regolatori (Treg), favorito normalmente da IDO1; (iii) ridotta secrezione dell'inibitore tissutale della metalloproteinasi 3 (TIMP3) da parte delle CD, con conseguente aumentata espressione di CD86 sulle CD e polarizzazione dei linfociti T verso forme Th1(47,49–51). È stato inoltre dimostrato che la ridotta espressione di IDO1 aumenta l'espressione di CD86 sulle CD, potenziando l'attivazione dei linfociti T (52).

La quota di cellule natural killer (NK) circolanti in corso di ITP rientra nel range di normalità, ma la produzione di IFN $\gamma$  da parte delle NK attivate risulta ridotta (53,54). La citotossicità cellulare anticorpo-mediata (antibody-dependent cellular cytotoxicity; ADCC) delle cellule NK in pazienti affetti da ITP risulta preservata nel sangue periferico e aumentata nel tessuto splenico, suggerendo come la localizzazione delle cellule NK abbia un ruolo nel determinarne il contributo nelle malattie autoimmuni (54). Ulteriori studi sono necessari per chiarire il ruolo delle cellule NK nella patogenesi dell'ITP (38), in particolare per verificare se queste possono avere un ruolo nel modulare la produzione piastrinica (26).

Il ruolo del complemento nell'ITP è stato ipotizzato oltre tre decenni fa (55), ed è oggi supportato da una serie di riscontri, tra i quali: (i) l'incremento del complesso solubile C5b-C9 (sC5b-C9) in fase attiva di ITP; (ii) la correlazione inversa tra sC5b-C9 e la conta piastrinica; (iii) la correlazione diretta tra sC5b-C9 e la presenza di anticorpi anti-piastrine (56). L'attivazione della via classica del complemento si riscontra complessivamente nel 50-60% dei pazienti, ed è maggiore in presenza degli anticorpi diretti verso GPIIb/IIIa rispetto agli anti-GPIb/IX. La via classica del complemento è in grado di indurre sia citotossicità complemento-mediata (complement-mediated cytotoxicity; CDC), tramite il complesso di attacco alla membrana (membrane attack complex; MAC), sia l'ADCP mediata dai macrofagi, tramite i recettori Fc $\gamma$  (57). Sembra inoltre esserci una correlazione inversa tra l'attivazione della via classica del complemento e le piastrine immature circolanti, indicativa di una possibile CDC diretta verso i megacariociti (58,59).

Recenti riscontri indicano come la proteina C-reattiva (PCR) sia in grado di potenziare l'ADCP, spiegando in parte il peggioramento aspecifico della trombocitopenia in corso di infezione. Gli autoanticorpi, legando le piastrine, ne aumentano lo stress ossidativo, favorendo l'esposizione di fosforilcolina. La PCR è in grado di legare la fosforilcolina e può essere a sua volta legata dai recettori Fc $\gamma$  e Fc $\alpha$ RI presenti sui fagociti (60).

#### *1.1.4.2 Immunità adattativa*

Il sistema immunitario adattativo risulta centrale in corso di ITP per quanto riguarda la perdita della tolleranza verso gli antigeni self, la produzione di anticorpi anti-piastrina e i meccanismi effettori diretti sulle piastrine (26).

La prima dimostrazione del coinvolgimento di fattori umorali (e.g. autoanticorpi) in corso di ITP risale al 1951: Harrington et al. hanno dimostrato che l'infusione di siero proveniente da pazienti con ITP è in grado di indurre una profonda trombocitopenia in volontari sani (61). In relazione alle casistiche, dal 60% all'85% dei pazienti affetti da ITP presenta positività ai test per gli anticorpi anti-piastrine (62,63). Questi ultimi sono prodotti da cloni di linfociti B andati incontro a switch isotipico e ipermutazione somatica dei geni delle immunoglobuline, elementi distintivi del transito dei linfociti B attraverso il centro germinativo (CG) (64). In accordo con questi riscontri, diversi studi hanno riportato un'espansione dei CG nella milza di alcuni pazienti con ITP e delle cellule Tfh spleniche (65,66). Plasmacellule attive nella produzione di autoanticorpi sono riscontrabili nel sangue periferico (67), mentre un'ampia quota di plasmacellule a lunga emivita popola la milza, il maggior sito di produzione degli anticorpi anti-piastrina (39,65). La maggior parte degli anticorpi patogenetici in corso di ITP sono di classe IgG, anche se altri isotipi (IgA e IgM), pur in quota minore, possono essere rilevati (68,69). Gli anticorpi anti-piastrina sono diretti verso GP o complessi di GP (soprattutto GPIIb/IIIa e GPIb/IX/V, meno frequentemente GPIa/IIa, GPIV, GPV, GPVI) presenti sulla superficie piastrinica (69–71). Questi autoanticorpi, una volta legati sulle piastrine, sono in grado di: (i) fissare il complemento e attivarne la via classica (57,72), (ii) mediare l'ADCP dei macrofagi, che esprimono i recettori Fc $\gamma$  e il recettore 1 del complemento (40,55), (iii) aumentare la clearance epatica delle piastrine, mediata dal recettore di Ashwell-Morell (73,74), (iv) favorirne l'apoptosi (75). Nei pazienti con positività per anticorpi anti-piastrine, è comune riscontrare anche anticorpi diretti verso proteine citosoliche, indicativi di processazione di antigeni piastrinici da parte delle APC e successiva presentazione ai linfociti T (63,76). Le piastrine stesse, nell'ITP, possono agire come stimolatori per i linfociti B auto-reattivi, grazie all'aumentata espressione di CD154, ligando del recettore CD40 sui linfociti B (77).

Le citochine BAFF e APRIL sono i fattori principali coinvolti nella sopravvivenza, maturazione e stimolazione dei linfociti B, con un possibile ruolo nello sviluppo dell'autoimmunità (78). I livelli sierici di BAFF sono aumentati in corso di ITP, in maniera correlata all'attività di malattia (79,80). BAFF agisce come stimolatore degli istiociti splenici e aumenta la sopravvivenza delle plasmacellule, in vivo e in vitro (79), con un possibile contributo alla resistenza a terapie B-depletive (e.g. Rituximab [RTX]) (26,81).

Una piccola quota di linfociti B, definiti Breg, possiede proprietà immunomodulatrici, in parte mediate da IL-10 (82–84). I Breg risultano ridotti in pazienti con ITP attiva non sottoposti a splenectomia (85), determinando un aumento della proliferazione dei linfociti T, l'aumento del differenziamento in senso Th1 e una riduzione della produzione di Treg.

Vi sono sostanziali evidenze in letteratura a favore di un coinvolgimento linfocitario T nella patogenesi dell'ITP, con disfunzioni nelle loro attività regolatorie ed effettrici. Gli antigeni riconosciuti dai linfociti T in corso di ITP derivano dalle GP piastriniche, in particolare dalla porzione amino-terminale delle GPIIb e GPIIIa (86,87).

Per quanto riguarda i linfociti T helper (Th), nell'ITP vi è una polarizzazione in senso Th1, con aumento del rapporto Th1/Th2 nel sangue periferico e nella milza (88–90), come dimostrato dall'incremento dei livelli sierici di citochine Th1 correlate (e.g. IFN- $\gamma$  e IL-2) e dalle misurazioni dei livelli di mRNA e IFN- $\gamma$  nei linfociti T (89,91). La polarizzazione Th1 risulta più marcata in pazienti refrattari al RTX, associata a un aumento delle cellule T CD8<sup>+</sup> (92), mentre tende a regredire in individui responsivi (93). La polarizzazione in senso Th1 promuove l'attivazione dei macrofagi e la produzione di immunoglobuline, centrali nella patogenesi dell'ITP (89). I linfociti T CD4<sup>+</sup> auto-reattivi presenti nell'ITP riconoscono epitopi della glicoproteina GPIIb/IIIa (86), evidenza quindi della loro natura auto-reattiva verso epitopi criptici dell'antigene piastrinico (86,94). I linfociti Tfh sono centrali nella biologia del CG e nella patogenesi di ITP (26). In corso di ITP infatti, è stata dimostrata la loro espansione nei CG dei follicoli splenici (66), correlando positivamente con la percentuale di cellule B e plasmacellule (26) e mediando

l'attivazione dei linfociti B auto-reattivi e la produzione di anticorpi anti-piastrine tramite l'interazione CD40L/CD40 e la secrezione di IL-21 (66).

I linfociti Treg sono un sottotipo di linfociti T con proprietà immuno-regolatorie, in grado di inibire le cellule effettrici (linfociti T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, linfociti B) e stimolare la produzione delle CD tollerogeniche, svolgendo pertanto un ruolo centrale nel mantenimento della tolleranza periferica (95). In corso di ITP vi è un deficit quantitativo e/o funzionale dei linfociti Treg. Molti studi hanno infatti evidenziato una riduzione dei Treg circolanti (96–99), anche se questi riscontri non sono confermati in tutte le casistiche (100–102). La funzionalità dei Treg circolanti in corso di ITP risulta ridotta, in termini di (i) minore capacità di inibire la proliferazione dei linfociti T dopo stimolazione policlonale in vitro (99,100,102), (ii) diminuita secrezione di citochine antinfiammatorie (i.e. IL-10 e IL-35) (103,104). La riduzione dei Treg si riscontra anche nella milza (associata a ridotto funzionamento) (97,101) e nel midollo dei pazienti affetti da ITP (105). Ad ulteriore conferma del ruolo dei Treg nell'ITP, vi sono evidenze di una loro normalizzazione quantitativa e funzionale nei pazienti responsivi a terapia con corticosteroidi, RTX o TPO mimetici (93,102,106), a supporto del ruolo centrale svolto dalla perdita della tolleranza nella patogenesi dell'ITP. Non è ancora chiaro se il ripristino dei Treg in seguito alla terapia sia determinante nella remissione dell'ITP o se sia semplicemente un marker del ripristino dell'immunosoppressione (37).

Oltre alle CD, già menzionate, anche le cellule staminali mesenchimali (MSC) hanno un ruolo nella regolazione della funzione dei Treg. Le MSC sono cellule immature, ottenibili dal sangue cordonale o dal midollo osseo, con proprietà immunoregolatorie (107). In corso di ITP, le MSC midollari mostrano anomalie morfologiche e funzionali, con ridotto indice proliferativo e maggiore propensione all'apoptosi, ridotta capacità di indurre il differenziamento dei Treg e di stimolarne la secrezione di IL-10 (108,109).

Anche i linfociti T citotossici CD8<sup>+</sup> (Tc) sembra possano essere coinvolti nella distruzione periferica delle piastrine e nell'alterata trombocitopoiesi midollare dei pazienti con ITP. Rispetto a soggetti di controllo, i linfociti Tc dei pazienti con ITP presentano una maggiore espressione di proteine citotossiche (e.g. perforina, granzima A e B) (110,111) con un aumento della quota plasmatica (112). Va



tuttavia sottolineato che negli studi disponibili, l'attività dei linfociti Tc è stata riscontrata in vitro dopo stimolazione e non ci sono evidenze dell'esistenza di Tc auto-reattivi piastrino-specifici. Ulteriori studi dovranno approfondire questi aspetti (113). In maniera simile a quanto osservato per i Th, il rapporto Tc1/Tc2 è aumentato nel sangue periferico (93) e nella milza (90) dei pazienti affetti da ITP. La polarizzazione in senso Tc1 a livello splenico è particolarmente pronunciata nei pazienti refrattari al Rituximab e si associa a un aumento di linfociti CD8<sup>+</sup> di memoria. Questi dati sostengono l'ipotesi di un coinvolgimento dei linfociti T CD8<sup>+</sup> nella citotossicità cellulo-mediata verso le piastrine in corso di ITP e potrebbero, in alcuni pazienti, spiegare il fallimento delle terapie B-depletive (92). Altri sottotipi di cellule T (e.g. Th17, Th22) hanno un ruolo ancora poco chiaro nella patogenesi dell'ITP. I Th17 sono riconosciuti come centrali nello sviluppo dell'autoimmunità (114), ma vi sono risultati discordanti in merito alla quota di questo sottotipo linfocitario in corso di ITP (115–118). Per quanto riguarda i Th22, risultano aumentati in corso di ITP insieme alle citochine da essi prodotte (IL-22, IL-26, IL-13) (119,120). L'IL-22 in particolare, può avere un'azione sia protettiva che patogenetica nello sviluppo di malattie autoimmuni o infiammatorie, in relazione alla natura del tessuto target e al microambiente citochinico in cui agisce (121).

#### *1.1.4.3 La milza*

Nel 1916, l'esecuzione di una splenectomia in un soggetto affetto da ITP ha permesso di ottenere la normalizzazione della conta piastrinica del paziente stesso. Questo riscontro ha, per primo, sottolineato il ruolo critico della milza nello sviluppo della malattia (122), confermato dagli attuali alti tassi di risposta duratura in seguito a splenectomia (123). Nel 1975 Tavassoli e McMillan descrivevano l'istologia della milza in corso di ITP, identificandone il ruolo centrale nella patogenesi. Tra le caratteristiche peculiari identificate figurano: (i) la polpa bianca (white pulp; WP) ricca di follicoli secondari, con CG evidenti, indicativi di una spiccata attivazione, (ii) ampia quota di plasmacellule perivascolari, (iii) macrofagi contenenti detriti piastrinici, nella zona marginale (ZM) e nei cordoni della polpa rossa, (iv) istiociti schiumosi (i.e. macrofagi contenenti materiale lipidico), (v)

l'infiltrazione di granulociti neutrofili, (vi) la presenza di focolai di ematopoiesi extra-midollare nella polpa rossa (124). Studi successivi hanno solo in parte confermato questi riscontri, evidenziando una maggiore eterogeneità della milza in corso di ITP (125–127), da ricondurre alla varietà di meccanismi patogenetici che possono essere responsabili della malattia (26). Un recente studio ha identificato tre pattern morfologici nella milza di pazienti affetti da ITP: (i) polpa bianca iperplastica (hyperplastic white pulp; HWP), ricca di follicoli linfatici secondari con CG, ampie cuffie perivascolari di linfociti T e abbondanti Tfh nei CG; (ii) polpa bianca non attivata (non-activated white pulp; nAWP), con numerosi follicoli linfatici ma senza evidenza di CG, con scarsi Tfh intrafollicolari; (iii) polpa bianca depleta (white pulp-depleted; WPD), con atrofia linfoide. Nella varietà di meccanismi immunologici che possono essere implicati nello sviluppo dell'ITP, i pattern WPD e nAWP suggeriscono reazioni indipendenti dal CG (e.g. lisi piastrinica da parte dei Tc delle guaine linfoidi perivascolari, meccanismi patogenetici extra-splenici), mentre il pattern HWP suggerisce una risposta anticorpo-mediata (128).

Nella maggior parte dei pazienti affetti da ITP, la milza rappresenta il sito primario della clearance piastrinica e della produzione degli anticorpi anti-piastrine (123). La polpa rossa è il sito principale della distruzione piastrinica, diretta dai macrofagi splenici (46,129). Questi ultimi sono in grado di processare in maniera efficiente gli antigeni piastrinici, agendo da principali APC in corso di ITP e sostenendo linfociti T e B auto-reattivi (45), come precedentemente esposto. L'interazione dei linfociti T perivascolari con le APC ne induce l'attivazione e il differenziamento a Tfh, con conseguente migrazione all'interno dei CG. I Tfh sostengono l'attivazione dei linfociti B all'interno dei CG, grazie alla produzione di IL-21 e l'espressione di CD154. I linfociti B attivati differenziano a plasmacellule produttrici anticorpi anti-piastrine e cellule B della memoria, a breve e lunga emivita (45,64,66,130–133). Il processo viene mantenuto in cronico grazie all'interazione tra cellule B e T della memoria circolanti, una volta che queste raggiungono la milza, con le APC della polpa rossa (131).

La milza può inoltre rappresentare il reservoir per plasmacellule a lunga sopravvivenza, produttrici anticorpi anti-piastrine. Queste possono rendere conto

della recidiva di malattia in pazienti sottoposti a terapie B-depletive (e.g. RTX) (65).

#### *1.1.4.4 Alterazioni della megacariocitopoiesi*

In aggiunta alla distruzione periferica delle piastrine, in corso di ITP è presente un'alterata produzione delle stesse, con diversi possibili meccanismi implicati (26). I livelli plasmatici di TPO nell'ITP sono insufficienti per un'adeguata stimolazione dei megacariociti. Questo accade perché la massa di megacariociti è soltanto lievemente ridotta in corso di ITP; ne consegue che la TPO epatica viene in larga parte legata dalle piastrine, immesse in circolo in alte quantità, ma con breve emivita (134).

Gli anticorpi anti-piastrine possono legare i megacariociti, i quali esprimono sulla superficie GPIIb/IIIa e GPIb/IX (135). Studi in vivo hanno dimostrato un aumento dei megacariociti immaturi nel midollo, alterazioni nella produzione piastrinica, aspetti degenerativi e aumento dell'apoptosi megacariocitica (136). Queste alterazioni sono riproducibili in vitro, aggiungendo plasma di pazienti affetti da ITP a megacariociti sani (136,137). Il riscontro istologico di rosette di macrofagi intorno ai megacariociti supporta il ruolo dell'ADCP midollare in corso di ITP (136). L'alterata maturazione dei megacariociti è determinata anche da una risposta cellulare, supportata dal riscontro di un aumentato reclutamento di Tc nel midollo in corso di ITP (105). Nell'uomo i Tc determinano una ridotta apoptosi dei megacariociti, con conseguente riduzione della produzione piastrinica (138).

Inoltre, in alcuni pazienti affetti da ITP privi di anticorpi anti-piastrine, sono stati riscontrati difetti intrinseci nelle fasi tardive della maturazione dei megacariociti (139).

#### 1.1.5 Manifestazioni cliniche dell'ITP

La trombocitopenia è il reperto diagnostico fondamentale di ITP (10) e, nel 16-24% dei pazienti, può rappresentare l'unico elemento indicativo di malattia alla diagnosi (21,140). Fino al 67% dei pazienti sviluppa tuttavia una forma cronica della patologia, con manifestazioni emorragiche di entità variabile (20). Altre

manifestazioni cliniche di ITP sono l'affaticamento, il deterioramento della qualità di vita, l'aumento del rischio tromboembolico nelle forme croniche (12,141).

#### *1.1.5.1 ITP nel bambino, nell'adulto e in gravidanza*

Nel bambino, la piastrinopenia alla diagnosi di ITP è frequentemente di grado severo ( $<20 \times 10^9/L$  nel 79% dei pazienti) (21). La maggior parte delle ITP pediatriche va incontro a remissione spontanea entro 6 mesi dalla diagnosi (67%) o tra 6 e 12 mesi (142), mentre il 20-30% dei bambini evolve a ITP cronica (142–146). In letteratura sono stati identificati una serie di fattori predittivi dello sviluppo di ITP cronica nel bambino, quali: (i) sesso femminile; (ii) età  $\geq 8$  anni (OR 2.97, CI 1.42-6.21); (iii) trombocitopenia non severa (e.g.  $>20 \times 10^9/L$ ); (iv) assenza di un trigger identificabile (e.g. vaccinazione o infezione recenti); (v) esordio insidioso (i.e. sintomi emorragici persistenti per  $>14$  giorni prima di giungere a diagnosi); (vi) positività agli anticorpi anti-nucleo (ANA); (vii) conta linfocitaria  $<3.05 \times 10^9/L$  (147–150).

Nell'adulto, alla diagnosi, si riscontra trombocitopenia severa nel 58% dei casi (21). La remissione spontanea nell'adulto è più rara rispetto al paziente pediatrico, con tassi di cronicizzazione riportati fino al 66.7% (20).

In gravidanza l'ITP può essere già nota al momento del concepimento o può essere diagnosticata durante la gestazione. La patologia può essere riscontrata in maniera accidentale agli esami ematochimici di routine o può esordire con manifestazioni emorragiche (151). In letteratura sono riportate forme severe di ITP (e.g. conta piastrinica  $<50000 \times 10^9/L$ ) in 0.83/10,000 gravidanze (152). Durante la gravidanza tende a esserci un peggioramento della trombocitopenia, ma il rischio di sviluppare ITP severa risulta comunque accettabile (153). Il rischio di trombocitopenia nei neonati da madre affette da ITP risulta non prevedibile, dato che non vi è correlazione tra la conta piastrinica materna e quella del neonato (154)

#### *1.1.5.2 Sintomi emorragici*

Gli eventi emorragici in corso di ITP si manifestano con quadri clinici indicativi di disfunzione piastrinica (12). I segni clinici possono essere distinti in due categorie: (i) “dry purpura”, comprendente le emorragie cutanee che si manifestano come

petecchie o ecchimosi; (ii) “wet purpura”, che si manifesta con bolle emorragiche intramucose (tratto gastrointestinale, bocca, naso, occhi) e si associa a fenomeni emorragici severi (155,156). Sanguinamenti maggiori, quali emorragie intracraniche, gastrointestinali, genitourinarie o menorragia severa sono meno frequenti, ma rappresentano la principale indicazione al trattamento dell’ITP (142,157). Nel contesto delle ITP di nuova diagnosi, la frequenza di sintomi emorragici è del 91% nei bambini e del 69% negli adulti (21,158), con emorragie severe nel 2.9-8.3% dei bambini (159,160). Il riscontro di emorragia intracranica alla diagnosi si ha nello 0.4-0.6% dei bambini e nello 0.4-1.8% degli adulti (20,21,159,161). In corso di ITP cronica, uno o più episodi emorragici si manifestano nel 50% dei bambini (159) e nel 57% degli adulti affetti (162), con rischio di emorragia intracranica pari allo 0.4%/anno nei bambini e 1.4%/anno negli adulti (157).

La differenza nei disegni degli studi e, soprattutto, l’assenza di uno strumento universale e standardizzato per la misura dei sanguinamenti, rendono conto delle differenze nell’incidenza di eventi emorragici severi riportati in letteratura (161). In merito a quest’ultimo punto, l’IWG ha proposto uno strumento per la descrizione del fenotipo emorragico nei pazienti affetti da ITP, “SMOG” (Skin, Mucosa, Organ Grading), tuttavia le performance dello score non sono ancora state valutate negli studi clinici (163).

Le manifestazioni emorragiche in corso di ITP rappresentano l’evento clinico principale, con impatto diretto sulla morbilità, mortalità, qualità di vita e scelte terapeutiche (1,10,164). In quest’ottica, per una migliore gestione clinica dell’ITP, risulterebbe di fondamentale importanza l’identificazione di coloro che presentano un rischio aumentato di emorragia severa e/o fatale. I fattori predittivi di sanguinamento sono scarsamente caratterizzati nell’ITP per una serie di motivi: (i) la scarsa frequenza di eventi emorragici severi nell’ITP; (ii) le difficoltà nella standardizzazione delle misure relative al sanguinamento (161); (iii) la parzialità dei dati disponibili (e.g. i database amministrativi considerano solo pazienti ospedalizzati); (iv) l’impossibilità, dal punto di vista etico, dello studio della storia naturale della malattia, data la presenza di terapie efficaci (12,161). Nonostante i suddetti elementi, alcuni fattori di rischio per sanguinamenti maggiori sono stati

identificati: (i) trombocitopenia severa, definita come conta piastrinica  $<10-20 \times 10^9/L$  (165–168); (ii) età avanzata (167,169,170); (iii) pregressi sanguinamenti minori (170–172); (iv) ITP di nuova diagnosi (159,162,166,173).

Una revisione sistematica ha valutato il rischio emorragico, in relazione all'età, di pazienti affetti da ITP con conta piastrinica  $<30 \times 10^9/L$ . Cohen et al. hanno distinto tre classi di rischio: (i) basso, per pazienti di età  $<40$  anni (rischio 0.4%/anno di emorragia fatale, rischio cumulativo a 5 anni del 2.2%), (ii) intermedio, per pazienti di età 40-60 anni (rischio 1.2%/anno di emorragia fatale) (iii) alto, per pazienti di età  $>60$  anni (rischio 13.0%/anno di emorragia fatale, rischio cumulativo a 5 anni del 47.8% (169).

Per quanto riguarda la relazione tra trombocitopenia e sanguinamenti, emorragie significative raramente si manifestano in presenza di conta piastrinica  $>30 \times 10^9/L$ , mentre sanguinamenti maggiori si manifestano con trombocitopenie  $<10-20 \times 10^9/L$  (10,174,175). Questi cutoff sono considerati applicabili nel paziente affetto da ITP (141), anche se sussiste una significativa variabilità nel rischio emorragico tra i pazienti (161). Dalla letteratura emerge un'associazione diretta tra conta piastrinica ridotta e severità dell'emorragia (176,177), anche se questa relazione non è sempre rispettata in maniera lineare (178,179) e, talvolta, viene persa per trombocitopenie marcate (i.e.  $<30 \times 10^9/L$ ) (180). Va però considerato che i pazienti affetti da ITP hanno un rischio emorragico minore, a parità di conta piastrinica, rispetto a pazienti affetti da trombocitopenia per altre cause (12,181). Questo dato ha portato ad indagare e identificare altri fattori condizionanti il rischio emorragico in pazienti affetti da ITP, quali: (i) la presenza di piastrine giovani “da stress”, più attive dal punto di vista emostatico, maggiormente presenti nei pazienti affetti da ITP rispetto ad altre trombocitopenie (182); (ii) il grado di attivazione piastrinica (valutando l'espressione di P-selectina sulla superficie dei trombociti o il grado di aggregazione e degranulazione delle piastrine in risposta ad agonisti), associato a ridotto rischio emorragico (183–185); (iii) la presenza di microparticelle piastriniche, associate a ridotto rischio di sanguinamento (186,187), (iv) la natura e la specificità degli anticorpi anti-piastrina, in grado di influenzare la funzione piastrinica (adesione e aggregazione) e di influenzare la fagocitosi delle piastrine da parte dei monociti (182,188).

### *1.1.5.3 Affaticamento e qualità di vita*

L'affaticamento è un sintomo comune in corso di ITP, presente nel 22-50% dei casi (valutazione mediante ITP Patient Assessment Questionnaire) (189–191) ed associato a: (i) conta piastrinica  $<100 \times 10^9/L$  in pazienti con sintomi emorragici o conta piastrinica  $<30 \times 10^9/L$  in pazienti senza sintomi emorragici; (ii) terapia con steroidi; (iii) sintomi emorragici; (iv) altre condizioni mediche concomitanti; (v) sonnolenza diurna; (vi) sintomi ortostatici. La patogenesi dell'affaticamento è verosimilmente multifattoriale, con un ruolo attribuito alle alterazioni neurologiche secondarie allo stato pro-infiammatorio in corso di ITP (e.g. aumento del CRH, riduzione del TRH, alterazione nei livelli di serotonina e dopamina), agli effetti collaterali delle terapie (e.g. corticosteroidi, immunosoppressori), ad eventuali comorbidità, a insonnia o stati d'ansia concomitanti, all'anemizzazione conseguente alle manifestazioni emorragiche (12,192). L'utilizzo dei TPO mimetici non ha dimostrato una riduzione nell'affaticamento (193,194)

La qualità di vita correlata allo stato di salute (HRQoL) risulta ridotta in corso di ITP cronica, tanto nel paziente adulto (valutazione mediante “Short Form 36 Health Survey” o “ITP Life Quality Index) (164,190,195) quanto nel paziente pediatrico (valutazione mediante “Kid's ITP tools”) (196). L'impatto sull'HRQoL è rilevante anche sui familiari dei pazienti pediatrici affetti da ITP (197). Molteplici studi dimostrano un possibile aumento dell'HRQoL in pazienti adulti e pediatrici affetti da ITP e trattati con splenectomia, rituximab (194), romiplostim (198,199) o eltrombopag (193).

Nonostante l'impatto rilevante di affaticamento e riduzione dell'HRQoL, questi sintomi sono sotto-diagnosticati (190) e non sono generalmente riconosciuti come indicazione a trattamento in pazienti affetti da ITP (12,200).

### *1.1.5.4 Rischio trombo-embolico*

L'ITP cronica si associa a un incrementato rischio di eventi tromboembolici, nonostante la ridotta conta piastrinica (12,201). Ampi studi di popolazione condotti in Danimarca, Regno Unito, Stati Uniti, riportano un'incidenza di eventi tromboembolici venosi di 0.4-0.7/100 pazienti-anno e di eventi tromboembolici arteriosi di 1.0-2.8/100 pazienti-anno, valori rispettivamente 2 e 1.5 volte superiori

rispetto alla popolazione generale (202–206). La patogenesi della trombosi in corso di ITP è multifattoriale, riconducibile a: (i) aumentato rilascio di microparticelle pro-coagulanti da parte delle piastrine, in grado di attivare il complemento e la cascata coagulativa; (ii) presenza di anticorpi anti-fosfolipidi (8.6-73% dei pazienti affetti da ITP); (iii) aumento delle piastrine giovani, con maggiore potenziale trombogenico; (iv) la presenza di uno stato infiammatorio sistemico in corso di ITP; (v) fattori correlati alle terapie per ITP (192,207). In merito a quest'ultimo punto, un aumentato rischio trombotico è stato riscontrato in seguito a somministrazione di immunoglobuline per uso endovenoso (Intravenous immunoglobulin [IVIg]) (208), alte dosi di corticosteroidi (209), danazolo (210) e in seguito a splenectomia (211,212). Una recente metanalisi ha invece concluso che non vi è una relazione significativa tra il rischio trombotico e l'utilizzo di agonisti del recettore della TPO (TPO-RA) (213).

#### *1.1.5.5 Mortalità nell'ITP*

Gli individui affetti da ITP presentano un aumento della mortalità da 1.3 a 2.3 volte rispetto alla popolazione generale (214). Uno studio di popolazione condotto in Danimarca ha riportato una mortalità del 22% a 5 anni, del 34% a 10 anni, del 49% a 20 anni (215). La mortalità risulta aumentata per malattie cardiovascolari, infezioni, emorragie, neoplasie ematologiche (215,216). L'aumentata mortalità per neoplasie ematologiche riflette (i) l'esposizione cronica dei pazienti trattati per ITP a terapie immunosoppressive (e.g. corticosteroidi, ciclofosfamide) e (ii) il possibile nesso eziologico tra l'ITP e sottostanti disordini linfoproliferativi (12,215). L'aumentato rischio infettivo va ricondotto all'utilizzo di farmaci immunosoppressori e della splenectomia come presidi terapeutici per l'ITP (214).

#### *1.1.6 Percorso diagnostico nell'ITP*

La diagnosi di ITP è una diagnosi di esclusione, tipicamente di pazienti che si presentano con piastrinopenia isolata ( $<100 \times 10^9/L$ ), in assenza quindi di anemia e/o leucopenia (10). L'anamnesi, l'esame obiettivo, gli esami ematochimici e la valutazione dello striscio di sangue periferico sono indispensabili per escludere molte delle possibili patologie che entrano nella diagnosi differenziale (217,218).



A questo riguardo, il workup diagnostico mira ad escludere altre condizioni che possono causare trombocitopenia (200), quali: (i) infezioni virali (e.g. infezioni da HIV, HCV, HBV, EBV, CMV, virus Zika) o batteriche (e.g. *H. pylori*) nelle quali la piastrinopenia può essere presente con meccanismi non immunologici; (ii) sindrome da anticorpi anti-fosfolipidi; (iii) epatopatie o ipersplenismo; (iv) esposizione a farmaci o tossici, quali eparina, chemioterapici, abuso di alcool (e.g. trombocitopenia indotta da farmaci, trombocitopenia da eparina); (v) deficit di vitamina B9 o B12; (vi) microangiopatie (e.g. porpora trombotica trombocitopenica, coagulazione intravascolare disseminata, sindrome uremico-emolitica, microangiopatia trombotica indotta da farmaci); (vii) neoplasie ematologiche (e.g. leucemia linfatica cronica/linfoma a piccoli linfociti ma anche altri linfomi non-Hodgkin); (viii) piastrinopenie ereditarie (e.g. sindrome di Bernard-Soulier, malattia di von-Willebrand di tipo IIB, sindrome di Wiskott-Aldrich); (ix) alterazioni del midollo emopoietico (e.g. sindromi mielodisplastiche, leucemie, anemia aplastica, mielofibrosi, trombocitopenia amegacariocitica acquisita), (x) patologie correlate alla gravidanza (e.g. trombocitopenia gestazionale isolata, preeclampsia, sindrome HELLP) (217,219).

Un gruppo internazionale di esperti ha pubblicato nel 2010 delle raccomandazioni, aggiornate nel 2019 (“Updated International Consensus Report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia”), per il workup diagnostico e l’idoneo ricorso ad accertamenti aggiuntivi in corso di ITP. Secondo queste raccomandazioni, in tutti i casi di sospetta ITP sono necessari: (i) un’anamnesi mirata al quesito diagnostico, volta ad escludere altre cause di trombocitopenia e identificarne forme secondarie, comprese quelle associate all’assunzione di farmaci; (ii) un esame obiettivo completo, il quale dovrebbe risultare normale, eccetto per le eventuali manifestazioni emorragiche; (iii) un esame emocromocitometrico con formula leucocitaria, che dimostri trombocitopenia isolata; (iv) la valutazione dello striscio di sangue periferico (200). Posta la diagnosi di ITP, il differenziamento tra forma primaria e secondaria è guidato da una serie di approfondimenti diagnostici, alcuni eseguiti in tutti i pazienti, altri soltanto sulla base del sospetto clinico (217). La ricerca dell’infezione da *H. pylori* (Urea Breath Test o ricerca dell’antigene fecale) è raccomandata nel

percorso diagnostico iniziale nelle aree geografiche ad alta prevalenza di infezione (Giappone, Paesi del bacino mediterraneo) (220). La maggior parte degli Autori del report concorda sull'esecuzione routinaria, nei pazienti adulti, dei test sierologici per HBV, HIV e HCV, i quali possono associarsi a ITP secondaria o a trombocitopenia su base non immunologica. Il dosaggio delle immunoglobuline totali è indicato in caso di sospetta immunodeficienza primitiva (e.g. immunodeficienza comune variabile, sindrome autoimmune linfoproliferativa) o prima del trattamento con IVIg (200). Lo studio del midollo emopoietico non è raccomandato nel contesto nella diagnosi iniziale di ITP, ma è valutabile in caso di (i) recidiva di malattia, (ii) pazienti non responsivi alle terapie di prima linea, (iii) emocromo o striscio di sangue periferico indicativi di malattia del midollo, (iv) in caso di prevista splenectomia, (v) in presenza di epatosplenomegalia o adenopatia, per sospetto disordine linfoproliferativo. L'esame del midollo dovrebbe comprendere aspirato e biopsia midollare, citofluorimetria e analisi citogenetica, per un'eventuale diagnosi differenziale con disordini linfoproliferativi, sindromi mielodisplastiche o disordini primari del midollo emopoietico (200,217). Le indagini per altre patologie autoimmuni (e.g. LES, artrite reumatoide, sindrome di Evans, sindrome di Sjögren) sono indicate soltanto in presenza di una clinica suggestiva. La ricerca degli anticorpi anti-piastrine non è raccomandata di routine, data la limitata sensibilità dei test ad oggi disponibili (9), così come la ricerca degli anticorpi anti-fosfolipidi, in assenza di sintomi compatibili con la sindrome da anticorpi anti fosfolipidi (e.g. aborti ricorrenti, trombosi). Altri accertamenti di potenziale utilità per la diagnosi differenziale sono il test di Coombs diretto (per sospetta emolisi o prima della terapia con anti-D Ig), la ricerca degli ANA (associazione con andamento cronico dell'ITP) (221), la valutazione della funzione tiroidea (in pazienti con segni di tireopatia), test coagulativi (se sono pianificate procedure invasive). La valutazione dei livelli di TPO e la valutazione della frazione piastrinica immatura non hanno utilità ad oggi nel guidare la diagnosi differenziale o il management del paziente. Oltre agli accertamenti sopraindicati, la diagnosi di ITP può essere sostenuta da criteri *ex adjuvantibus*: la risposta a terapie specifiche (e.g. IVIg, anti-D Ig, steroidi) supporta fortemente la diagnosi (200,217).

Il percorso diagnostico dell'ITP in gravidanza è simile, con accorgimenti particolari per escludere disordini specifici della gravidanza (e.g. disordini ipertensivi, microangiopatie, coagulopatie, epatopatie) (200).

#### 1.1.7 Trattamento dell'ITP

Il trattamento dell'ITP è cambiato considerevolmente negli ultimi anni. Per molti decenni, l'ITP è stata gestita secondo il “modello terapeutico” del rigetto di trapianto, sfruttando l'immunosoppressione duratura per migliorare i sintomi della malattia. Questo modello di gestione raramente induce remissioni persistenti della patologia e ha serie ricadute su mortalità e morbidità dei pazienti affetti da ITP. L'avvento di nuove opportunità terapeutiche (e.g. TPO-RA), la migliore comprensione della patogenesi dell'ITP e la recente pandemia da SARS-CoV-2, stanno contribuendo a un progressivo cambiamento del paradigma di trattamento dell'ITP (39,190).

Secondo l'Updated International Primary ITP Consensus Report, gli obiettivi della gestione del paziente affetto da ITP sono: (i) l'individualizzazione dei target terapeutici, in relazione alle caratteristiche del paziente e alla fase di malattia; (ii) la prevenzione di sanguinamenti maggiori; (iii) il mantenimento della conta piastrinica  $>20-30 \times 10^9/L$  nei pazienti sintomatici; (iv) la minimizzazione degli effetti collaterali delle terapie; (v) l'ottimizzazione dell'HRQoL. La normalizzazione della conta piastrinica non rientra tra gli obiettivi terapeutici. Gli elementi di cui tenere conto per l'inizio della terapia comprendono la presenza e la severità dei sintomi emorragici, l'età e lo stile di vita del paziente, le eventuali comorbidità predisponenti al sanguinamento, i possibili effetti indesiderati delle terapie, le aspettative e la compliance del paziente, la necessità di terapie non ITP-correlate, l'accessibilità alle cure (200). Il trattamento dovrebbe essere iniziato in presenza di manifestazioni emorragiche, in pazienti asintomatici con conte piastriniche molto basse ( $<20-30 \times 10^9/L$ ), in pazienti asintomatici con conta piastrinica ridotta e fattori di rischio per sanguinamenti (26). In assenza di sanguinamenti attivi, altre condizioni cliniche che richiedano monitoraggio o ITP di nuova diagnosi con conta piastrinica  $<20 \times 10^9/L$ , la terapia può essere gestita in un setting domiciliare o ambulatoriale (175,200).

Nel 2009 l'IWG ha proposto dei criteri per la definizione della risposta alle terapie, basati sulla conta piastrinica, che è un parametro oggettivo e facilmente comparabile. Le definizioni proposte sono: (i) "Risposta completa" (complete response; CR), in presenza di una conta piastrinica  $>100 \times 10^9/L$  e assenza di sanguinamenti; (ii) "Risposta" (response; R), in presenza di una conta piastrinica  $30-100 \times 10^9/L$  con almeno il raddoppio delle piastrine rispetto al baseline e assenza di sanguinamento; (iii) "Nessuna risposta" (no response; NR), se la conta piastrinica è  $<30 \times 10^9$ , incremento della conta piastrinica  $<2$  volte rispetto al valore basale e/o presenza di sintomi emorragici; (iv) "Perdita di risposta" (loss of response; LR) per pazienti precedentemente CR o R andati incontro a recidiva (i.e. sintomi emorragici; conta piastrinica  $<100 \times 10^9/L$  in pazienti CR o  $<30 \times 10^9/L$  in pazienti R). Le conte piastriniche devono essere confermate in almeno due misurazioni, separate da sette giorni per CR ed R, in almeno due giorni successivi per NR (10). Le tempistiche per la valutazione della risposta alla terapia vanno personalizzate in relazione al tipo di trattamento utilizzato (10,222). L'IWG definisce l'ITP "refrattaria" se vengono soddisfatti tre criteri: (i) fallimento nel raggiungere R o perdita di R, in seguito a splenectomia (ii) ITP severa o con rischio di sanguinamento che, nell'opinione del medico, richieda terapia; (iii) esclusione delle possibili altre cause di trombocitopenia. L'IWG stesso ha comunque convenuto che la definizione della risposta alla terapia dovrebbe considerare, quando possibile, anche endpoint clinici (e.g. sanguinamenti, qualità di vita) attraverso strumenti validati e non soltanto endpoint surrogati (i.e. conta piastrinica) (10,163).

#### *1.1.7.1 Terapie di prima linea*

I corticosteroidi rappresentano il trattamento iniziale standard per gli adulti con ITP, in assenza di controindicazioni. Gli steroidi nella terapia dell'ITP hanno multipli meccanismi d'azione, tra i quali l'aumento dei Treg periferici (106,223), il ripristino del rapporto Th1/Th2 (224,225), la modulazione delle CD (223), la riduzione di BAFF (80), il ripristino dell'equilibrio tra recettori Fc $\gamma$  attivatori e inibitori sulla superficie dei macrofagi (41) e la riduzione del rischio emorragico, agendo sulle piastrine (226) e sui vasi sanguigni (227). Le opzioni terapeutiche comprendono: (i) prednisolone con dose giornaliera di 1mg/kg (massima dose

giornaliera 80mg) per 2 settimane (fino ad un massimo di 3 settimane); (ii) desametasone con dose giornaliera di 40mg per 4 giorni, ripetibile fino a tre volte (200). Il tasso di risposta iniziale ai corticosteroidi si attesta intorno all'80-85% (228,229). Una metanalisi condotta da Mithoowani et al. ha dimostrato che non ci sono differenze nella risposta piastrinica a sei mesi tra le due opzioni terapeutiche, ma che il desametasone garantisce una risposta più rapida in acuto (230). In caso di risposta, la terapia va scalata, al fine di non superare le 6-8 settimane di trattamento. In caso di mancata risposta entro le prime due settimane, lo steroide va scalato rapidamente e rimosso entro una settimana. Cicli di terapia steroidea di durata superiore alle 6-8 settimane andrebbero evitati, anche se alcuni pazienti mantengono una risposta soddisfacente con terapie continuative a basse dosi (e.g. prednisolone  $\leq 5\text{mg}/\text{die}$ ) (200).

Le IVIg (dose: 1g/kg per 1 o 2 giorni consecutivi oppure 0.4 g/kg/die per 5 giorni) o le Ig anti-D (dose: 50-75  $\mu\text{g}/\text{kg}$  in singola somministrazione; non disponibili in Europa) sono una valida opzione terapeutica in pazienti con sanguinamento attivo o ad alto rischio di sanguinamento, che richiedono una procedura chirurgica o che non sono responsivi al prednisolone. Le IVIg e le Ig anti-D vanno inoltre preferite nei pazienti che hanno controindicazioni assolute all'assunzione di corticosteroidi ad alte dosi (e.g. diabete mellito insulino-dipendente, diabete mellito non controllato, disturbi psichiatrici, infezioni attive) (200). In letteratura sono riportati tassi di risposta per le IVIg del 72.2-80.7% (231–233) e del 50-70% per le Ig anti-D (234,235). Non sono chiari i meccanismi attraverso cui le IVIg svolgono la loro azione in corso di ITP (38). I modelli proposti comprendono la saturazione dei recettori Fc $\gamma$  sui macrofagi, l'alterazione del repertorio dei recettori Fc $\gamma$ , l'aumento della clearance degli autoanticorpi, la modulazione della maturazione delle CD e dei linfociti T (46,236–238). In seguito alla somministrazione delle IVIg, l'aumento della conta piastrinica avviene entro 24-48h, ma la risposte permane tipicamente per massimo quattro settimane (222). La terapia con Ig anti-D è valutabile in pazienti RhD<sup>+</sup> (239). Come per le IVIg, sono soltanto ipotizzati alcuni meccanismi d'azione. Un possibile meccanismo sembrerebbe l'aumentata degradazione degli eritrociti ricoperti dalle Ig anti-D, che competerebbero così con la fagocitosi delle piastrine opsonizzate, portando a un

aumento della conta piastrinica (240). Prima del trattamento con le Ig anti-D sono necessarie una serie di valutazioni (gruppo sanguigno, tipizzazione Rh, test di Coombs diretto, conta dei reticolociti), ed è raccomandata l'esecuzione di una premedicazione con steroidi per minimizzare reazioni acute post-infusione (241).

In situazioni di emergenza, in cui risulti necessario aumentare rapidamente la conta piastrinica, è raccomandato l'utilizzo di combinazioni di farmaci (generalmente corticosteroidi per via endovenosa associati a IVIg). La trasfusione di concentrati piastrinici è raccomandata, in associazione alla terapia medica, in caso di emorragia intracranica o di altri sanguinamenti potenzialmente letali. In assenza di risposta a queste combinazioni, sono valutabili altre opzioni terapeutiche, quali i TPO-RA, le Ig anti-D, gli alcaloidi della vinca, gli anti-fibrinolitici e, meno frequentemente, la splenectomia (200).

#### *1.1.7.2 Successive linee terapeutiche*

Nell'ITP dell'adulto, il trattamento con corticosteroidi si associa ad alti tassi di recidiva in seguito a dismissione della terapia (228,229). Nei pazienti che necessitano di una seconda linea di terapia, gli obiettivi sono (i) ottenere un incremento stabile della conta piastrinica, fino a livelli considerati "emostatici" per il singolo individuo, (ii) minimizzare gli effetti avversi. Il concetto di "remissione", nell'ITP, non ha una definizione univoca. Diversi studi hanno assunto come "remissione di malattia" una conta piastrinica stabilmente  $\geq 30 \times 10^9/L$  in assenza di terapie specifiche per l'ITP. In base a questa definizione, la probabilità cumulativa di remissione dell'ITP dopo terapie di seconda linea è dell'86% a 5 anni. Sono disponibili diverse possibilità di trattamento per l'ITP, con diversi meccanismi d'azione, anche in combinazione, ma nessuno studio ne ha identificata la sequenza ideale (200,222). Le opzioni terapeutiche successive ai corticosteroidi possono essere distinte in terapie croniche (e.g. TPO-RA, corticosteroidi a basse dosi, immunosoppressori) e terapie somministrate per un tempo definito o in singola occasione (e.g. RTX, splenectomia) (200).

La classe dei TPO-RA (romiplostim, eltrombopag, avatrombopag) ha assunto notevole importanza nella terapia dell'ITP cronica, riducendo il numero di pazienti che necessitano dell'immunosoppressione (39). I TPO-RA attivano il

recettore della TPO sui megacariociti, stimolando la produzione piastrinica (242). In aggiunta alla stimolazione della trombocitopoiesi, sembra che i TPO-RA abbiano un ruolo nel ripristino dell'immunosoppressione, aumentando la funzionalità dei Treg (102), modulando i recettori Fc $\gamma$  sui monociti (243) e influenzando il microambiente splenico (244). A differenza dei TPO-mimetici di prima generazione, i TPO-RA non hanno alcuna somiglianza con la TPO nativa; questo evita lo sviluppo di anticorpi diretti contro il farmaco in grado di cross-reagire con la TPO nativa (39). I TPO-RA sono approvati dall'FDA (US Food and Drug Administration) e dall'EMA (European Medicines Agency) per il trattamento di adulti e bambini affetti da ITP cronica, con risposte insufficienti alle terapie precedenti; l'avatrombopag è approvato soltanto per gli adulti (200). I TPO-RA sono caratterizzati da eccellenti tassi di risposta (50-90%) (242), con scarsi effetti collaterali (e.g. cefalea, nasofaringite) (245). La terapia continuativa induce risposte della durata media di 6-8 anni, permettendo la riduzione o la dismissione di altri trattamenti (178,245). Nonostante la dismissione del TPO-RA determini il ritorno della conta piastrinica a valori pre-terapia, nel 10-30% dei casi si hanno risposte di lunga durata anche dopo la sospensione (246,247). L'utilizzo dei TPO-RA può associarsi (10-50% dei trattati) a un aumento delle fibre di reticolina a livello midollare, senza alterazioni sostanziali dell'architettura del midollo emopoietico o alterazioni delle cellule del sangue periferico (242). In relazione al rischio tromboembolico potenzialmente associato alla terapia con TPO-RA, una metanalisi del 2022 ha concluso che non vi è un rischio aumentato nei pazienti affetti da ITP trattati con TPO-RA rispetto ai non trattati (213).

Dato il ruolo centrale dei linfociti B nella patogenesi dell'ITP, le terapie B-depletive rientrano tra le possibilità terapeutiche per l'ITP. Il RTX (dose: 375 mg/m<sup>2</sup>, una volta alla settimana per 4 settimane) è un anticorpo monoclonale chimerico diretto contro CD20, una proteina espressa sulla superficie dei linfociti B (non è espresso sui linfociti pro-B e sulle plasmacellule). Il legame RTX-CD20 è in grado di indurre la deplezione dei linfociti B per apoptosi, CDC e ADCC (248,249). L'efficacia nell'ITP è legata alla deplezione dei linfociti B auto-reattivi, con conseguente riduzione dello sviluppo di plasmacellule a breve emivita, producenti anticorpi anti-piastrine (26). Altri possibili meccanismi d'azione

comprendono l'aumentata funzione dei Treg (99), la normalizzazione del repertorio di linfociti T (93) e la riduzione dei Tfh splenici e circolanti (250). Il sesso femminile, l'età <40 anni e un breve periodo tra la diagnosi e la somministrazione di RTX, sono predittori di risposta alla terapia (251). Una revisione sistematica ha documentato tassi di risposta al RTX nell'ITP cronica pari al 60% (252), mentre soltanto il 20-30% dei trattati mantiene una risposta a 5 anni (253,254). I meccanismi responsabili della scarsa risposta al RTX sono poco noti, ma potrebbero dipendere dalla persistenza di plasmacellule spleniche (65) o midollari (255) a lunga emivita, non esprimenti CD20, o da un coinvolgimento preferenziale dei Tc nella distruzione piastrinica (92). Prima del trattamento, è necessaria la vaccinazione contro batteri capsulati Gram<sup>+</sup> e la valutazione dello status infettivo da HBV (200).

Un altro agente in grado di interferire con i processi patogenetici dell'ITP è il fostamatinib. Questa molecola è un inibitore di Syk (spleen tyrosine kinase), ed è in grado di bloccare la trasduzione del segnale a valle dei recettori Fcγ, interferendo con la distruzione, da parte dei macrofagi splenici, delle piastrine opsonizzate (39). Fostamatinib è stato approvato dall'FDA nel 2018 per il trattamento dell'ITP cronica nell'adulto poco responsiva alle terapie precedenti (i.e. splenectomia, TPO-RA, RTX). Due trials randomizzati e controllati hanno riportato tassi di risposta (conta piastrinica  $\geq 50 \times 10^9/L$ ) al fostamatinib pari al 43%, con risposte stabili (conta piastrinica  $\geq 50 \times 10^9/L$  per almeno 4 settimane su 6) nel 18% dei casi; questi risultati sembrano confermati in un terzo trial, estensione dei primi due. Tra gli effetti collaterali frequenti si riportano ipertensione e diarrea (256–258). L'ipertensione è dovuta all'interazione di Syk con il recettore di tipo 2 del fattore di crescita vascolare endoteliale (VEGFR-2), sottolineando la necessità di studi che valutino gli effetti sul rimodellamento vascolare dell'inibizione di Syk a lungo termine (38,259).

Numerosi altri farmaci sono stati valutati ed impiegati, talora off-label, per il trattamento dell'ITP refrattaria o utilizzati come agenti steroid-sparing per specifiche categorie di pazienti (e.g. pazienti in cui la splenectomia è controindicata, altri farmaci non disponibili). Tra questi si annoverano agenti immunosoppressori (e.g. micofenolato mofetile, ciclosporina A, azatioprina,



ciclofosfamide), dazanolo (derivato dell'etisterone, influenza la trasduzione del segnale degli ormoni steroidei), dapsona (antibiotico, meccanismo d'azione poco noto). Gli alcaloidi della vinca non sono più attualmente considerati per il trattamento dell'ITP cronica, a causa della rilevante neurotossicità (175,200). Nuove terapie specifiche per l'ITP sono in fase di studio, grazie al miglioramento della comprensione della fisiopatologia della malattia. Queste comprendono (i) rozanolixizumab ed efgartigimod, inibitori del recettore Fc neonatale, in grado di impedire il riciclo delle IgG patogenetiche (260,261), (ii) rilzabrutinib, inibitore di BTK (Bruton tyrosine kinase), capace di bloccare la fagocitosi Fc $\gamma$  mediata e la produzione di autoanticorpi (262), (iii) sutimlimab, inibitore della via classica del complemento (263), (iv) daratumumab, un anti-CD38, agente sulle plasmacellule a lunga emivita (264), (v) l'acido tutto-trans retinoico, in grado di ristabilire il ruolo immunomodulatorio delle MSC midollari (265), (vi) sirolimus, un inibitore di mTOR, in grado di ripristinare un'adeguata megacariocitopoiesi (266), (vii) oseltamivir, un antivirale inibitore della neuraminidasi, in grado di ridurre la desializzazione delle piastrine (267), (viii) belimumab, in grado di bloccare il signalling indotto da BAFF (268).

#### *1.1.7.3 Splenectomia*

La splenectomia rimane un caposaldo della terapia dell'ITP (26), con i migliori tassi di risposta a lungo termine: 78% a 10 anni (269) e 67% a 20 anni (270). L'efficacia della procedura, nell'ITP, risiede nel fatto che la milza rappresenta il principale sito di distruzione delle piastrine (46,129), il sito in cui il processo autoimmune si mantiene (131) e la sede delle plasmacellule a lunga emivita (65). Le linee guida internazionali raccomandano la splenectomia come terapia di seconda linea per l'ITP, da eseguirsi non prima di 12 mesi dalla diagnosi, a causa della possibile remissione spontanea della malattia o della stabilizzazione della conta piastrinica a un livello considerato "emostatico" per l'individuo (200). La splenectomia dovrebbe prevedere anche la rimozione dell'eventuale tessuto splenico accessorio (presente all'imaging nel 30% dei pazienti affetti da ITP) (200,271). Quest'ultimo infatti è associato a una scarsa risposta alla splenectomia e ha un verosimile ruolo chiave nelle recidive di malattia, dato che il microambiente immunologico della

milza accessoria riproduce quello della milza principale (272–274). Nonostante l'alta percentuale di risposte a lungo termine, la splenectomia viene sempre meno utilizzata per il trattamento dell'ITP e sempre più spesso come linea di trattamento avanzata (275). Le motivazioni di ciò devono essere individuate nella disponibilità di nuove terapie mediche e nelle complicanze, potenzialmente letali, dell'intervento, quali (i) complicanze perioperatorie, (ii) eventi trombo-embolici, (iii) infezioni post-operatorie e a lungo termine (211). Le complicanze perioperatorie ad oggi sono notevolmente ridotte grazie alla splenectomia laparoscopica eseguita da personale esperto, approccio che permette, oltre ad una riduzione della mortalità, anche un miglior controllo del dolore post-operatorio, una ridotta ospedalizzazione, una ripresa più rapida e costi minori (276). Le complicanze emorragiche sono prevenute sfruttando terapie bridge (e.g. corticosteroidi, IVIg, TPO-RA), in grado di aumentare la conta piastrinica prima dell'intervento (277). Il rischio trombo-embolico viene gestito mediante profilassi post-operatoria in pazienti con conta piastrinica compresa tra  $30 \times 10^9/L$  e  $50 \times 10^9/L$  e in generale in tutti i pazienti ad alto rischio per comorbidità o precedenti eventi trombotici (123,200). Da considerare che nei pazienti splenectomizzati per ITP vi è inoltre un aumento del rischio di trombosi venosa a lungo termine (211). La prevenzione delle complicanze infettive è effettuata mediante vaccinazione e/o terapie antibiotiche profilattiche (200). Il rischio di infezione da batteri capsulati rappresenta infatti la complicanza più preoccupante della splenectomia (123). L'Updated International Primary ITP Consensus Report raccomanda la vaccinazione contro *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* e *Haemophilus influenzae* almeno due settimane prima della splenectomia, tenendo in considerazione possibili interferenze legate all'assunzione di RTX (RTX può attenuare la risposta alle vaccinazioni per i 6-12 mesi successivi) (200,278).

In letteratura si riporta un tasso di fallimento della splenectomia fino al 19% (270,279,280), attribuibile alla persistenza di nicchie di plasmacellule auto-reattive in altre sedi e/o alla distruzione piastrinica in sedi diverse dalla milza (281,282). Il 20-30% dei pazienti che rispondono inizialmente alla splenectomia vanno incontro a recidiva di malattia, spesso entro i primi 24 mesi dall'intervento (269,283). Purtroppo non sono disponibili fattori che efficientemente possano predire la

risposta alla splenectomia (284) e, pertanto, la selezione dei pazienti si basa sul fallimento di trattamenti precedenti in soggetti che desiderano un approccio potenzialmente curativo in maniera definitiva e che accettano i rischi infettivi ed operatori (123,200). Negli scorsi decenni sono stati proposti moltissimi predittori di risposta alla splenectomia nell'ITP, sia pre-operatori (e.g. età; sesso; durata di malattia; risposta agli steroidi; risposta alle IVIg; risposta alle Ig anti-D; conta piastrinica pre-operatoria; severità dei sintomi emorragici; sede del sequestro piastrinico; emivita piastrinica; presenza/tipo di anticorpi anti-piastrina; documentata iperplasia dei megacariociti) che post-operatori (e.g. conta piastrinica post-operatoria; velocità di recupero della conta piastrinica; peso o dimensioni della milza; iperplasia dei follicoli splenici) (276). Il pattern di sequestro piastrinico, valutato mediante scintigrafia con piastrine autologhe marcate, è emerso da almeno tre decenni come fattore predittivo di risposta alla splenectomia in pazienti affetti da ITP (123). Una recente revisione sistematica della letteratura, ha identificato un tasso di risposta alla splenectomia dell'87.1% in pazienti con pattern di sequestro splenico, del 47.1% in pazienti con pattern misto e del 25.5% in pazienti con pattern epatico. Nonostante i risultati promettenti, il valore predittivo del pattern di sequestro piastrinico risulta sovrastimato, a causa di una serie di bias nella selezione dei pazienti negli studi considerati (285). In aggiunta a ciò, la scintigrafia basata su piastrine autologhe marcate è una metodica complessa, non ampiamente disponibile e di conseguenza non universalmente raccomandabile (123,286). Come emerge da una revisione sistematica della letteratura condotta da Kojouri et al., nessuna di queste caratteristiche (e.g. pre-operatorie e post-operatorie), presa singolarmente, si è dimostrata sufficientemente attendibile nel prevedere la risposta alla splenectomia nell'ITP (123,276). Uno studio pilota del 2020, ha identificato una serie di parametri clinico-patologici (alta dose di steroide pre-intervento, comorbidità autoimmuni, bassi livelli di Tfh nella polpa bianca) che, combinati, potrebbero predire in maniera più accurata l'outcome della splenectomia nell'ITP (128).



## 2. SCOPO DELLO STUDIO

Scopi del presente studio sono:

- valutare i parametri clinico-patologici predittivi di risposta alla splenectomia in pazienti affetti da ITP;
- proporre un semplice score per prevedere la risposta all'intervento.



### 3. MATERIALI E METODI

#### **3.1 Disegno dello studio e selezione dei casi**

Questo studio retrospettivo multicentrico ha considerato dapprima una coorte (n=25; discovery set) di pazienti adulti, affetti da ITP, per i quali diagnosi e terapia sono avvenuti presso l'Azienda Ospedale-Università di Padova (Unità di Ematologia e Immunologia Clinica, Clinica Medica 1, Clinica Chirurgica 3), sottoposti a splenectomia terapeutica tra Febbraio 2003 e Giugno 2020. I criteri di inclusione per lo studio erano: (i) età alla splenectomia  $\geq 16$  anni; (ii) disponibilità di dati clinico-laboratoristici (età alla diagnosi; comorbidità autoimmuni; terapie pre-splenectomia; conta piastrinica pre/post splenectomia); (iii) disponibilità di campioni di milza per le analisi istologiche; (iv) follow up  $\geq 3$  mesi in seguito alla splenectomia. L'intervento chirurgico è stato eseguito sulla base del giudizio clinico, in coloro che erano affetti da una forma di ITP particolarmente aggressiva, in pazienti con recidive di malattia dimostrate o sottoposti a terapie farmacologiche croniche tali (e.g. alte dosi di corticosteroidi) da richiedere un ulteriore intervento terapeutico. La risposta alla splenectomia è stata valutata secondo i criteri dell'IWG (paragrafo 1.1.7) (10). Al fine di identificare variabili predittive di risposta alla splenectomia, sono stati identificati due gruppi di pazienti: (i) Soggetti con risposta alla splenectomia (responders), caratterizzati da CR o R persistenti dopo l'intervento; (ii) Soggetti refrattari alla splenectomia o con perdita della risposta (non-responders), caratterizzati da NR o LR. Le variabili associate all'outcome chirurgico ( $p < 0.05$ ), anche solo marginalmente ( $p < 0.1$ ), sono state combinate in uno score clinico volto a valutare, a priori, il rischio di recidiva di ITP in seguito alla splenectomia. A ciascuna variabile dello score, quando presente nel singolo caso, è stato attribuito arbitrariamente valore pari a 1. Le variabili istologiche associate alla non responsività, sono state combinate in due ulteriori score, istologico e clinico-istologico, volti a valutare il rischio di recidiva precoce in seguito a splenectomia.

I dati ottenuti, sono stati successivamente validati considerando una seconda coorte di pazienti (n=39; validation set) adulti, affetti da ITP, per i quali diagnosi e terapia sono avvenuti presso tre presidi ospedalieri italiani di secondo livello (Azienda

Ospedale-Università di Padova: n=3; Ospedale San Bortolo di Vicenza: n=18; Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna Policlinico di Sant'Orsola: n=18), sottoposti a splenectomia terapeutica tra Ottobre 2003 e Dicembre 2021. Sono stati mantenuti i medesimi criteri di inclusione del discovery set. Lo studio è stato condotto in accordo con i principi della Dichiarazione di Helsinki (287)

### **3.2 Valutazione istologica e morfometrica**

I preparati istologici delle milze dei pazienti operati presso la Clinica Chirurgica 3 dell'Azienda Ospedale-Università di Padova sono stati revisionati presso l'Unità di Anatomia Patologica (Dipartimento di Medicina – Università degli Studi di Padova). Presso la medesima Unità, sono stati sottoposti a rivalutazione microscopica anche i campioni provenienti dai Centri di Vicenza e di Bologna. I campioni maggiormente rappresentativi sono stati selezionati per un'ulteriore caratterizzazione istologica. In particolare, sono stati considerati i seguenti parametri macroscopici e microscopici: (i) peso della milza; (ii) presenza di splenuli accessori; (iii) il pattern istologico della milza in corso di ITP, come precedentemente descritto in letteratura (paragrafo 1.1.4.3) (128); (iv) densità dei follicoli linfoidi (FL) della polpa bianca (i.e. numero di LF per mm<sup>2</sup>); (v) densità delle ZM dei follicoli linfoidi (i.e. numero di ZM per mm<sup>2</sup>) e il loro spessore (vi) densità delle cellule T<sub>H</sub> (i.e. numero di cellule PD1<sup>+</sup> intra-follicolari per campo ad alta potenza [HPF]).

Le analisi morfometriche e l'acquisizione di immagini sono state effettuate utilizzando la fotocamera digitale Leica DFC295 e il software LAS X (Leica Microsystems; Milano – Italia).

### **3.3 Analisi immunoistochimiche**

Le analisi immunoistochimiche sono state effettuate su sezioni di tessuto fissato in formalina e incluso in paraffina, dello spessore di 4µm, utilizzando il Bond Polymer Refine Detection kit in un coloratore automatizzato (BOND-MAX system; Leica Biosystems – Newcastle upon Tyne, UK).

Tutte le colorazioni sono state effettuate su sezioni intere, utilizzando i seguenti anticorpi primari: anti-CD4 (clone 4B12; Dako – Golstrup, Danimarca), anti-CD8



(clone C8/144B; Dako), anti-GATA3 (clone L50-823; Cell Marque – Darmstadt, Germania), anti-t-Bet (clone 4B10; Abcam – Cambridge, UK), anti-Foxp3 (clone 236A/E7; Leica Biosystems), anti-CD138 (clone MI15; Dako), anti-CD10 (clone 56C6; Dako), anti-CD68 (clone PF-M1; Dako), anti-PD1 (clone NAT105; Abcam) e anti-NMDA (clone 253A; Abcam).

### **3.4 Elaborazione dei dati**

Nel discovery set, la distribuzione delle variabili quantitative è stata valutata mediante il test di Shapiro-Wilk e le differenze tra variabili quantitative sono state valutate con il test t di Student a 2 code per dati non appaiati (variabili continue normali) e test U di Mann-Whitney a 2 code (variabili continue non normali). Le differenze tra le variabili qualitative sono state valutate mediante test esatto di Fisher o test chi-quadrato, appropriatamente adoperati in relazione alle frequenze nelle tabelle di contingenza. La valutazione della correlazione tra due o più variabili è stata eseguita mediante analisi di regressione lineare.

Sono state identificate, nel discovery set, le variabili significativamente associate ( $p < 0.05$ ), o con un trend verso la significatività ( $p < 0.1$ ), alla non responsività alla splenectomia, al fine di comporre uno score prognostico. Le variabili quantitative selezionate sono state esplicitate come variabili qualitative dicotomiche, adottando come cutoff i valori identificati tramite l'utilizzo di curve ROC e dell'indice di Youden. Nella scelta del punteggio dello score necessario per definire un paziente ad alto rischio di recidiva, è stato massimizzato il valore predittivo negativo (VPN). Le analisi di sopravvivenza sono state eseguite valutando la sopravvivenza libera da recidiva (relapse-free survival; RFS), con il confronto tra gruppi prognostici che è stato eseguito mediante il metodo di Kaplan-Meier e il test log-rank.

I medesimi test statistici utilizzati nel discovery set (test di Shapiro-Wilk per la distribuzione delle variabili quantitative; test t di Student a 2 code per dati non appaiati e test U di Mann-Whitney a 2 code per le differenze tra variabili quantitative; test esatto di Fisher e test chi-quadrato per le differenze tra variabili qualitative), sono stati utilizzati per valutare le differenze tra quest'ultimo e il validation set.

L'analisi dei dati è stata effettuata mediante i software MedCalc® Statistical Software version 20.218 (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2023) e GraphPad Prism version 9.5.1 (GraphPad Software, San Diego, California, USA; [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

Le differenze tra i gruppi sono state considerate statisticamente significative per valori di  $p < 0.05$ .

## 4. RISULTATI

### 4.1 Caratteristiche clinico-epidemiologiche del discovery set

Le caratteristiche del discovery set sono riassunte nella tabella II. L'età media alla diagnosi è risultata pari a 38.8 anni (deviazione standard [DS]: 16.5 anni; errore standard della media: 3.3) con una prevalenza del sesso femminile (19/25 [76.0%]).

Tabella II. Caratteristiche clinico-epidemiologiche del discovery set (n=25)

Variabili	Discovery set (n=25)
Sesso (%)	
Femmine	19 (76.0)
Maschi	6 (24.0)
Età media alla diagnosi di ITP (anni)	38.8 ± 16.5
Conta piastrinica mediana (x 10 <sup>9</sup> /L)	
Diagnosi di ITP	18 (IQR <sup>1</sup> : 10.5 – 35.5)
Pre-splenectomia <sup>2</sup>	29 (IQR:22.5 – 46.0)
Post-splenectomia <sup>3</sup>	334 (IQR: 179.0 – 428.5)
Sintomi emorragici (%)	
Minori <sup>4</sup>	13 (52.0)
Maggiori <sup>5</sup>	3 (12.0)
Comorbidità autoimmuni (%)	6 (24.0)
Sottoposti a terapia steroidea pre-splenectomia (%)	23 (92.0)
Dose mediana di steroide pre-splenectomia (mg/die)	25 (IQR: 10.0 – 44.0) (range: 0 – 75)
Sottoposti a TPO-RA pre-splenectomia (%)	7 (28.0)
Età media alla splenectomia (anni)	42.0 ± 15.1 (range: 16 – 68)
Risposta alla splenectomia <sup>6</sup> (%)	
CR	22 (88.0)
R	0 (0.0)
NR	3 (12.0)
Loss of Response – LR <sup>6</sup> (%)	5/22 (22.7)
RFS post splenectomia (%)	
a 1 anno	69.6 (C.I. 95% 50.8 – 88.4)
a 3 anni	63.2 (C.I. 95%: 41.5 - 84.9)
a 5 anni	58.8 (C.I. 95% 35.4 – 82.2)

Note. (1) Scarto interquartile, esplicitato con il primo e il terzo quartile; rappresenta l'intervallo di valori all'interno del quale risiedono il 50% centrale degli elementi della distribuzione. (2) Conta piastrinica minima nel mese antecedente la splenectomia. (3) 2° valore massimo della conta piastrinica nei due mesi successivi all'intervento. (4) Presenza di porpora muco-cutaneo e/o epistassi. (5) Presenza di sanguinamento sintomatico in sede critica (intracranico, intraspinale, intraoculare, retroperitoneale, intrarticolare, pericardico, intramuscolare) e/o sanguinamento che determini riduzione  $\geq 20\text{g/L}$  di Hb o che necessiti di trasfusione di almeno 2 unità di emazie concentrate. (6) Criteri IWG.

Comorbidità autoimmuni non ematologiche e/o positività sierologiche per autoanticorpi sono state documentate in 6/25 (24.0%) casi (anemia emolitica autoimmune, lupus eritematoso sistemico, morbo di Basedow, positività ad alto titolo di ANA, sindrome di Sjögren, sindrome poliendocrina autoimmune di 2° tipo: 1 caso ciascuna).

La terapia somministrata in cronico e/o come linea precedente alla splenectomia comprendeva: (i) corticosteroidi in monoterapia (14/25 [56.0%] pazienti; dose mediana di steroidi 37.5 mg/die), (ii) corticosteroidi associati a RTX (4/25 [16.0%] pazienti), (iii) corticosteroidi associati a TPO-RA (3/25 [12.0%] pazienti), (iv) corticosteroidi associati a TPO-RA e RTX (2/25 [8.0%] pazienti), (v) TPO-RA associato a RTX (2/25 [8.0%] pazienti). Complessivamente, 23/25 (92.0%) pazienti erano sottoposti a terapia steroidea cronica (dose mediana di steroidi: 25.0 mg/die) e 7/25 (28.0%) pazienti sono stati trattati con TPO-RA prima dell'intervento chirurgico. Nel corso della malattia, 18/25 (72.0%) casi sono stati trattati almeno una volta con IVIg. Inoltre, una quota di pazienti è stata trattata con altri farmaci, anche in combinazione (danazolo, ciclofosfamide, vincristina: un caso ciascuno; ciclosporina: 2 casi; micofenolato mofetile: 4 casi; azatioprina: 7 casi).

In relazione alla tempistica dell'intervento, 17/25 (68.0%) pazienti sono stati sottoposti a splenectomia in fase di ITP cronica, 7/25 (28.0%) in fase di ITP persistente, 1/25 (4.0%) in fase di ITP di nuova diagnosi (definizioni IWG) (10). In accordo con i criteri definiti dall'IWG (10), la splenectomia ha determinato una risposta in 22/25 (88.0%) pazienti, in tutti i casi con le caratteristiche della CR. NR è stata riportata in 3/25 (12.0%) casi. Nel corso del follow up, 5/22 casi con iniziale CR, sono andati incontro a LR (22.7% dei CR, 20.0% del totale).

Il follow-up mediano post splenectomia è stato di 35 mesi (range: 3 – 164 mesi), con RFS ad 1 anno del 69.6% (intervallo di confidenza al 95% [C.I. 95%]: 50.8% – 88.4%), a 3 anni del 63.2% (C.I. 95%: 41.5% - 84.9%) e a 5 anni del 58.8% (C.I. 95%: 35.4% – 82.2%). Un paziente (4.0%) è deceduto, 6 anni dopo la splenectomia, per cause correlate alla malattia (shock settico da *S. pneumoniae*) in corso di ITP refrattaria.

## 4.2 Caratteristiche istopatologiche delle milze del discovery set

La tabella III riassume i parametri macroscopici e microscopici delle milze dei pazienti del discovery set.

Tabella III. Caratteristiche istopatologiche del discovery set (n=25)

Variabili	Discovery set (n=25)
Peso medio della milza (g)	134.2 ± 50.7
Splenuli accessori (%)	8/22 (36.4%) <sup>a</sup>
Pattern istologico	
HWP	11/25 (44.0%)
nAWP	11/25 (44.0%)
WPD	3/25 (12.0%)
Densità media di FL (no/mm <sup>2</sup> )	0.6 ± 0.3
Diametro medio WP (µm)	372.5 ± 75.1
Spessore medio delle ZM (µm)	151.9 ± 77.0
Mediana dei rapporti ZM/WP <sup>b</sup>	0.40 (IQR: 0.32 – 0.50)
Densità mediana dei linfociti Tfh (no/HPF)	40.0 (IQR: 24.0 – 56.0)

Note. (a) Per n=3 casi non erano disponibili informazioni in merito al riscontro o meno di splenuli accessori. (b) Parametro surrogato per la valutazione dell'espansione delle zone marginali. Abbreviazioni. FL = follicoli linfoidi; WP = polpa bianca; ZM = zone marginali; HPF = campo ad alto ingrandimento

La valutazione istologica delle milze dei pazienti del discovery set ha permesso di identificare 3 pattern microarchitetturali, già descritti in letteratura (paragrafo 1.1.4.3) (128): (i) HWP in 11/25 (44.0%) casi, caratterizzato da FL ben demarcati con ampi CG (Figura 1A); (ii) nAWP in 11/25 (44.0%) casi, con numerosi FL senza evidenza di CG (Figura 1B); (iii) WPD in 3/25 (12.0%) casi, con marcata atrofia linfoide (Figura 1C).

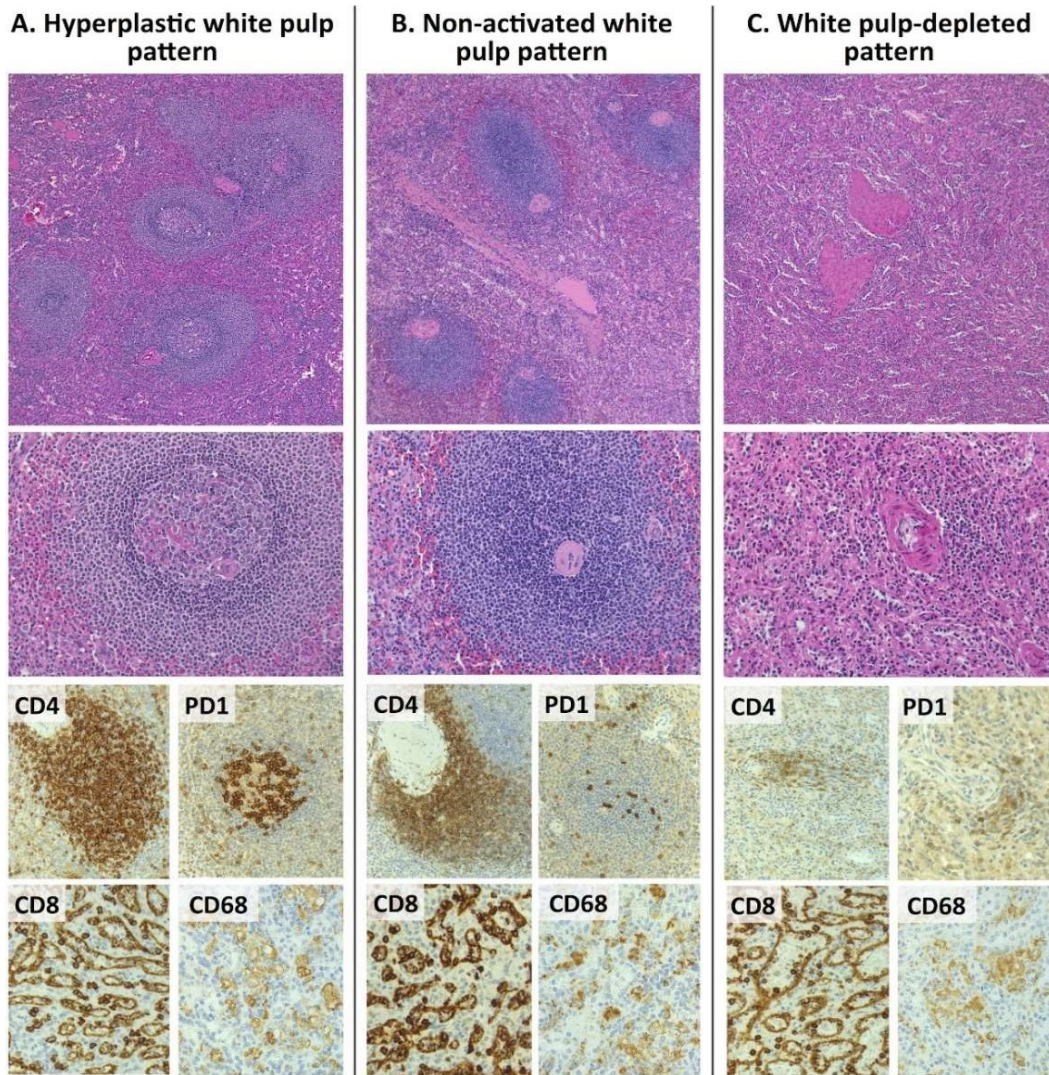


Figura 1. Caratteristiche istologiche rappresentative delle milze in ITP. A. Il pattern con iperplasia della polpa bianca (Hyperplastic White Pulp; HWP) è caratterizzato da FL con CG evidenti e ZM ben rappresentate. Le cuffie perivascolari di linfociti T CD4<sup>+</sup> sono ben evidenti e le cellule Tfh PD1<sup>+</sup> nei CG sono numerose. B. Il pattern con polpa bianca non attivata (non-Activated White Pulp; nAWP) è caratterizzato da numerosi FL privi di CG ed è caratterizzato da una ridotta quota di linfociti Tfh PD1<sup>+</sup> intra-follicolari. Le cuffie perivascolari di linfociti T CD4<sup>+</sup> sono ancora evidenti. C. A differenza dei pattern HWP e nAWP, il pattern con deplezione della polpa bianca (White Pulp Depleted; WPD) è caratterizzato da atrofia linfoide, con pochi linfociti T CD4<sup>+</sup> e scarse cellule Tfh PD1<sup>+</sup>. La localizzazione e la numerosità dei linfociti Tc CD8<sup>+</sup>, degli istiociti CD68<sup>+</sup> e dei sinusoidi della polpa rossa è simile nei tre gruppi.

(Ematossilina/eosina e immunoperoxidasi; ingrandimento originale: 10x e 20x).

### 4.3 Caratteristiche cliniche, istologiche e risposta alla splenectomia

In relazione alla risposta alla splenectomia, sono stati identificati due gruppi di pazienti (Tabella IV): (i) Soggetti con risposta alla splenectomia (responders; 17/25 [68.0%] casi); (ii) Soggetti refrattari alla splenectomia o con perdita della risposta (non-responders; 8/25 [32.0%] casi).

Tabella IV. Caratteristiche clinico-istologiche del discovery set (n=25) nei responders e non-responders

Variabili	Responders (n=17)	Non-Responders (n=8)	Responders vs Non-responders (p-value)
Sesso (%)			
Femmine	12 (70.6)	7 (87.5)	n.s.*
Maschi	5 (29.4)	1 (12.5)	
Età media alla diagnosi (anni)	33.2 ± 15.7	50.5 ± 11.6	0.011
Conta piastrinica mediana (x 10 <sup>9</sup> /L)			
Diagnosi di ITP	25 (IQR: 10.5 – 32.5)	19 (IQR:10.3–64.5)	n.s.
Pre-splenectomia**	29 (IQR: 21.5 – 63)	31.5 (IQR:23.3-41.5)	n.s.
Comorbidità autoimmuni (%)			
Assenti	15 (88.2)	4 (50.0)	0.059
Presenti	2 (11.8)	4 (50.0)	
Dose mediana di steroide pre-splenectomia (mg/die)	25.0 (IQR: 5.6 – 25)	43.8 (IQR: 15.6 – 50.0)	0.036
Durata mediana di malattia pre-splenectomia (mesi)	19 (IQR: 10 – 79)	16 (IQR: 6 - 41)	n.s.
Età media alla splenectomia (anni)	37.1 ± 13.9	53.3 ± 10.9	0.016
Pattern istologico (%)			
HWP	9 (52.9)	2 (25.0)	n.s.
nAWP	7 (41.2)	4 (50.0)	
WPD	1 (5.9)	2 (25.0)	
Densità media di FL (no/mm <sup>2</sup> )	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.3	n.s.
Diametro medio WP (µm)	388.9 ± 70.8	339.8 ± 82.2	n.s.
Atrofia delle ZM (%) <sup>§</sup>			
Presente	8 (47.1)	7 (87.5)	0.088
Assente	9 (52.9)	1 (12.5)	
Espansione dei linfociti Tfh (%) <sup>α</sup>			
Presente	13 (76.5)	2 (25.0)	0.028
Assente	4 (23.5)	6 (75.0)	

Note. (\*) La differenza calcolata tra responders e non-responders non è significativa per p<0.05 e/o non mostra un trend verso la significatività statistica (p<0.1). (\*\*) Conta piastrinica minima nel mese antecedente la splenectomia. (§) Definita come rapporto ZM/WP<0.434. (α) Definita come densità dei linfociti Tfh≥36.5 cellule/HPF.

Abbreviazioni. FL = follicoli linfoidi; WP = polpa bianca; ZM = zone marginali; HPF = campo ad alto ingrandimento.

Pur senza significatività statistica, abbiamo osservato che le comorbidità autoimmuni e/o positività per autoanticorpi erano più frequenti nei non-responders (4/8 [50.0%] non-responders versus 2/17 [11.8%] responders;  $p=0.059$ ).

La dose di corticosteroidi somministrata nei giorni antecedenti la splenectomia era significativamente maggiore nei non-responders (dose mediana: 43.8 mg/die non-responders versus 25.0 mg/die responders;  $p=0.036$ ; Figura 2).

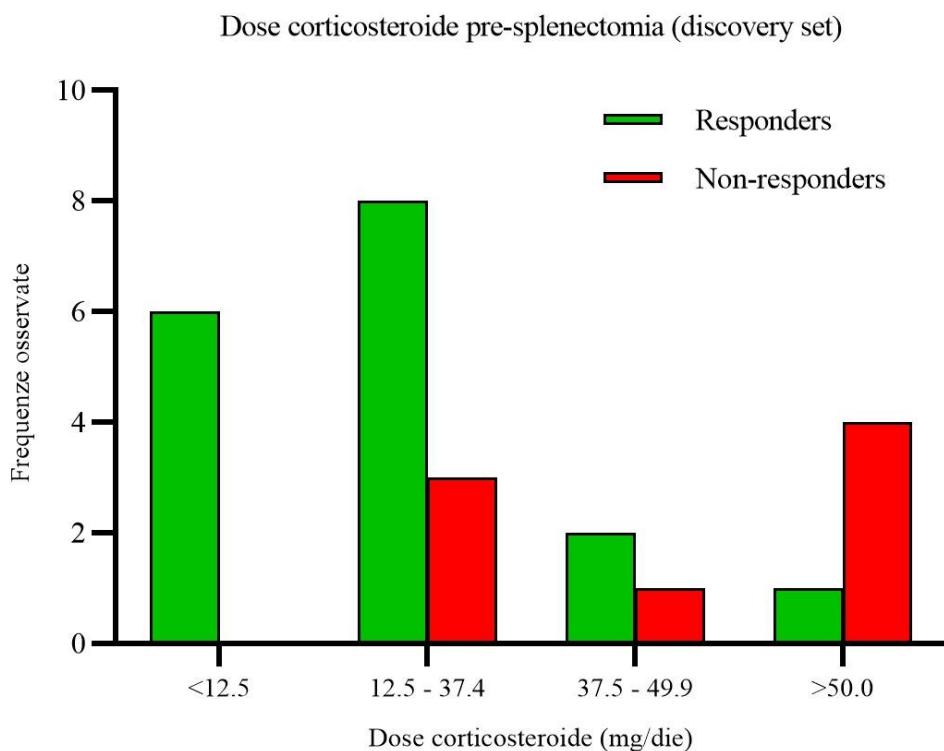


Figura 2. Distribuzione delle dosi di corticosteroidi assunte cronicamente, pre-splenectomia, dai pazienti del discovery set.

In particolare, una dose di steroide  $\geq 37.5$  mg/die prima della splenectomia è risultata associata in maniera statisticamente significativa alla non responsività alla splenectomia (5/8 [62.5%] non-responders versus 2/17 [17.6%] responders;  $p=0.017$ ).

Sia l'età alla diagnosi di ITP che l'età alla splenectomia erano significativamente maggiori nei non-responders (età media alla diagnosi: 50.5 anni non-responders versus 33.2 anni responders,  $p=0.011$ ; età media alla splenectomia: 53.3 anni non-responders versus 37.1 responders,  $p=0.016$ ). In particolare, la non responsività alla splenectomia è risultata significativamente associata con un'età alla diagnosi  $\geq 49$  anni (6/8 [75.0%] non-responders versus 4/17 [23.5%] responders;  $p=0.028$ ) e con



un'età alla splenectomia  $\geq 40$  anni (7/8 [87.5%] non-responders versus 5/12 [41.7%] responders;  $p=0.011$ )

Per quanto riguarda le caratteristiche istologiche, nessun pattern (i.e. HWP, nAWP, WPD) ha mostrato un'associazione statisticamente significativa con l'esito (e.g. responsività o non responsività) della splenectomia ( $p=0.45$ ).

La densità dei linfociti Tfh era significativamente maggiore nei responders (densità mediana di Tfh: 45.57 cellule/HPF responders versus 24.5 cellule/HPF nei non responders;  $p=0.023$ ). In particolare, una densità di linfociti Tfh  $< 36.5$  cellule/HPF è risultata significativamente associata alla refrattarietà alla splenectomia (6/8 [75.0%] non-responders versus 4/17 [23.5%] responders;  $p=0.028$ ), con un trend verso la significatività statistica valutando l'associazione con la non-responsività ad 1 anno dalla splenectomia (5/7 [71.4%] nei non-responders versus 3/15 [20.0%] nei responders;  $p=0.052$ ).

Il rapporto ZM/WP non ha dimostrato differenze significative tra responders e non-responders (valore mediano: 0.434 vs 0.36;  $p=0.13$ ), come pure non significativa è risultata l'atrofia delle zone marginali, definita come  $ZM/WP < 0.434$ , pur mostrando una maggiore prevalenza nei soggetti non-responders nell'intero follow up (7/8 [87.5%] non-responders versus 8/17 [47.1%] responders;  $p=0.088$ ) e ad 1 anno dalla splenectomia (7/8 [87.5%] non-responders versus 7/15 [46.7%] responders;  $p=0.088$ )

Nessun altro parametro clinico, istologico o morfometrico ha mostrato differenze significative ( $p < 0.05$ ), o trend verso la significatività ( $p < 0.1$ ), tra responders e non-responders (Tabella IV).

#### **4.4 Applicazione dello score clinico nel discovery set**

Per quanto singoli parametri clinico-istologici correlassero con la responsività alla splenectomia, nessuna variabile era in grado di predire l'outcome chirurgico in tutti i pazienti del discovery set. Per superare tale limitazione, è stata considerata una combinazione di multipli indicatori prognostici.

In particolare, si è valutata la co-occorrenza di variabili statisticamente associate ( $p < 0.05$ ), o con un trend verso la significatività statistica ( $p < 0.1$ ), alla refrattarietà alla splenectomia (i.e. presenza di comorbidità autoimmuni, dosaggio di

corticosteroidi pre-splenectomia  $\geq 37.5$  mg/die, età alla diagnosi di ITP  $\geq 49$  anni). La presenza di almeno un fattore di rischio si è dimostrata associata alla refrattarietà alla splenectomia ( $p=0.022$ ), con una significatività statistica ancora maggiore in presenza di almeno due fattori di rischio ( $p=0.006$ ). Le variabili cliniche identificate, sono state combinate in uno score clinico integrato (1 punto per ogni fattore), volto a valutare, prima dell'intervento, il rischio di recidiva (e.g. NR o LR) in seguito alla splenectomia. È stato attribuito un alto rischio di recidiva in presenza di almeno 1 fattore (punteggio  $\geq 1$ ) e un basso rischio di recidiva se nessun fattore di rischio era presente (punteggio=0). Lo score così composto ha distinto, nel discovery set, 16/25 (64.0%) casi ad alto rischio di recidiva e 9/25 (36.0%) casi a basso rischio di recidiva. Nel gruppo dei 16 pazienti con uno score ad alto rischio di recidiva, 8/16 (50.0%) casi si sono effettivamente rivelati refrattari, mentre nessuno dei pazienti con score a basso rischio si è rivelato non-responder. Pertanto, la sensibilità e la specificità dello score si sono dimostrati rispettivamente 100% e 52.9%, con un valore predittivo positivo (VPP) del 50% e un VPN del 100%. In linea con tali risultati, la RFS è risultata significativamente minore nei pazienti ad alto rischio (RFS a 1 anno:  $53.2\% \pm 25.2\%$  pazienti ad alto rischio versus 100% pazienti a basso rischio; RFS a 3 anni:  $38.5\% \pm 26.4\%$  pazienti ad alto rischio versus 100% pazienti a basso rischio; test log-rank,  $p=0.0017$ ) (Figura 3).

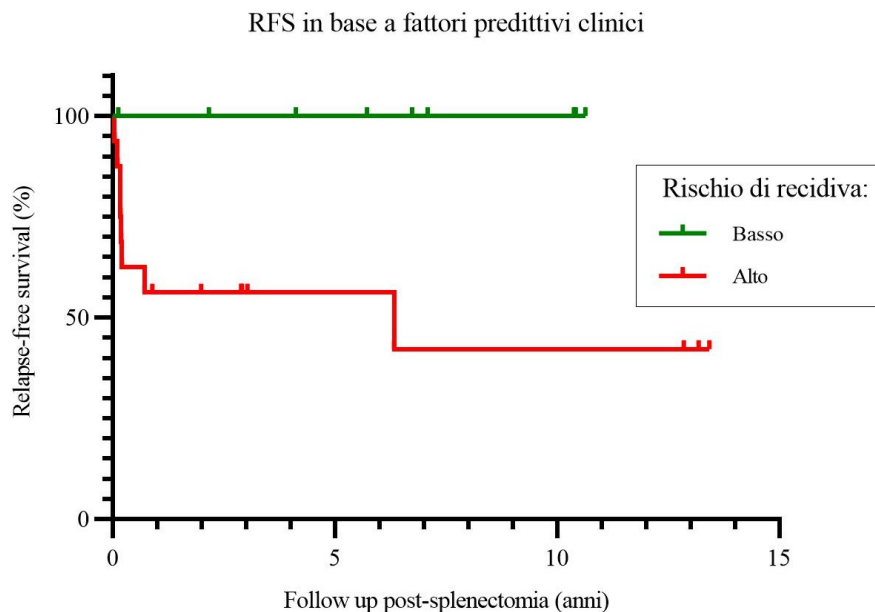


Figura 3. Relapse-free survival nel discovery set in casi a basso rischio di recidiva (punteggio=0) e ad alto rischio di recidiva (punteggio $\geq 1$ ), valutati in base allo score clinico (età alla diagnosi  $\geq 49$  anni, presenza di comorbidità autoimmuni, dose di steroide pre-operatorio  $\geq 37.5$  mg/die).

#### 4.5 Integrazione clinico-istologica nel discovery set

Tra i parametri istologici valutati, la densità di linfociti Tfh  $< 36.5$  cellule/HPF e l'atrofia delle ZM (ZM/WP $<0.434$ ) hanno mostrato, rispettivamente, un'associazione statisticamente significativa ( $p<0.05$ ) e un trend verso la significatività statistica ( $p<0.1$ ) con la ricorrenza precoce di ITP in seguito a splenectomia. In particolare, entrambe le variabili hanno mostrato un trend verso la significatività statistica (rispettivamente  $p=0.052$  e  $p=0.088$ ) in associazione alla non-responsività alla splenectomia entro il primo anno in seguito all'intervento. Queste due variabili sono state inserite in uno score istologico (1 punto per ogni fattore), volto a valutare, post intervento, il rischio di recidiva precoce (i.e. RFS  $< 1$  anno) di ITP. È stato attribuito un alto rischio di recidiva di ITP post-splenectomia in presenza di almeno 1 fattore (punteggio  $\geq 1$ ). Lo score ha identificato, nel discovery set, 18/25 (71.0%) casi ad alto rischio di recidiva, dimostrando una sensibilità del 100%, una specificità del 41.2%, un VPP del 44.4% e un VPN del 100% (Tabella V). La RFS non ha dimostrato differenze statisticamente significative tra pazienti ad alto e basso rischio di recidiva, nel discovery set, sulla base dello score istologico (RFS a 1 anno:  $58.8\% \pm 23.4\%$  nei pazienti ad alto rischio versus 100% nei pazienti a basso rischio; test log-rank,  $p=0.07$ ).

Tabella V. Applicazione degli score nel discovery set

	Score clinico <sup>1</sup>	Score istologico <sup>2</sup>	Score clinico-istologico <sup>3</sup>
Alto rischio di recidiva	16/25	18/25	13/25
Basso rischio di recidiva	9/25	7/25	12/25
Veri positivi	8/16	8/16	8/13
Veri negativi	9/9	7/7	12/12
Sensibilità (%)	100	100	100
Specificità (%)	52.9	41.2	70.6
Valore predittivo positivo (%)	50	44.4	61.5
Valore Predittivo negativo (%)	100	100	100

Note. (1) Paziente ad alto rischio in presenza di  $\geq 1$  fattore di rischio (età alla diagnosi  $\geq 49$  anni, comorbidità autoimmuni, dose di steroide pre-splenectomia  $\geq 37.5$  mg/die). (2) Paziente ad alto rischio in presenza di  $\geq 1$  fattore di rischio (densità di linfociti Tfh  $< 36.5$  cellule/HPF, MZ/WP  $< 0.434$ ). (3) Paziente ad alto rischio in presenza di  $\geq 2$  fattori di rischio (età alla diagnosi  $\geq 49$  anni, comorbidità autoimmuni, dose di steroide pre-splenectomia  $\geq 37.5$  mg/die, densità di linfociti Tfh  $< 36.5$  cellule/HPF, MZ/WP  $< 0.434$ ).

I parametri clinici ed istologici sono stati quindi integrati in un unico score clinico-istologico (1 punto per ogni fattore), con l'attribuzione di un alto rischio di recidiva di ITP post-splenectomia in presenza di almeno 2 fattori (punteggio  $\geq 2$ ). È stato attribuito un alto rischio di recidiva a 13/25 (52.0%) casi e lo score clinico-istologico ha dimostrato una sensibilità del 100%, una specificità del 70.6%, un VPP del 61.5% e un VPN del 100% nell'identificare i pazienti che andavano incontro a recidiva di ITP. La RFS è risultata significativamente minore nei pazienti ad alto rischio (RFS a 1 anno:  $41.7\% \pm 27.9\%$  nei pazienti ad alto rischio versus 100% nei pazienti a basso rischio; RFS a 3 anni:  $36.4\% \pm 28.4\%$  nei pazienti ad alto rischio versus 100% nei pazienti a basso rischio; test log-rank,  $p=0.0022$ ; Figura 4).

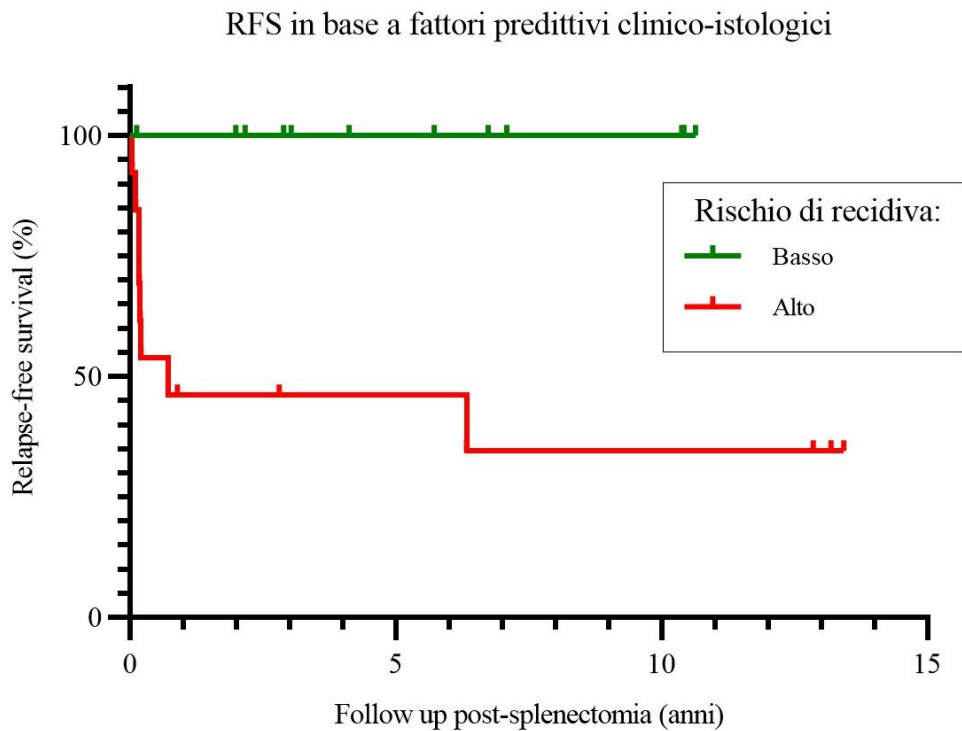


Figura 4. Relapse-free survival nel discovery set in casi a basso rischio di recidiva (punteggio  $\leq 1$ ) e ad alto rischio di recidiva (punteggio  $\geq 2$ ), valutati in base allo score clinico-istologico (età alla diagnosi  $\geq 49$  anni, presenza di comorbidità autoimmuni, dose di steroide pre-operatorio  $\geq 37.5$  mg/die, densità di linfociti Tfh  $< 36.5$  cellule/HPF, MZ/WP  $< 0.434$ ).

#### 4.6 Validazione dei risultati

I risultati ottenuti nel discovery set sono stati applicati al validation set ( $n=39$ ), composto da pazienti sottoposti a splenectomia terapeutica per ITP, le cui caratteristiche epidemiologiche, cliniche, istologiche e il periodo di follow up erano sovrapponibili a quelle dei casi del discovery set (Tabella VI). L'unica differenza

statisticamente significativa riscontrata tra le due coorti riguardava la conta piastrinica pre-splenectomia, definita come la conta piastrinica minima nel mese antecedente la splenectomia.

Tabella VI. Caratteristiche del discovery set (n=25) e del validation set (n=39)

Variabili	Discovery set (n=25)	Validation set (n=39)	Discovery set vs Validation set (p-value)
Sesso (%)			
Femmine	19 (76.0)	24 (61.5)	n.s.*
Maschi	6 (24.0)	15 (38.5)	
Età media alla diagnosi di ITP (anni)	38.8 ± 16.5	37.1 ± 16.9	n.s.
Conta piastrinica mediana (x10 <sup>9</sup> /L)			
Diagnosi di ITP	18 (IQR: 10.5 – 35.5)	22 (IQR: 9.5 – 51.5)	n.s.
Pre-splenectomia <sup>1</sup>	29 (IQR: 22.5 – 46.0)	8 (IQR: 4.0 – 12.0)	p<0.00001
Post-splenectomia <sup>2</sup>	334 (IQR:179.0 –428.5)	303 (IQR: 162.0–535.0)	n.s.
Comorbidità autoimmuni (%)	6 (24.0)	3 (7.7)	n.s.
Sottoposti a TPO-RA pre- splenectomia (%)	7 (28.0%)	7 (17.9)	n.s.
Durata mediana di malattia pre- splenectomia (mesi)	17 (IQR: 10 – 49)	22 (IQR:15 – 87)	n.s.
Età media alla splenectomia (anni)	41.9 ± 15.1 (range: 16 – 68)	43.3 ± 18.1 (range: 18 – 77)	n.s.
Fase di malattia <sup>3</sup> (%)			
ITP di nuova diagnosi	1 (4.0%)	0 (0.0%)	n.s.
ITP persistente	7 (28.0%)	5 (12.8%)	
ITP cronica	17 (68.0%)	34 (87.2%)	
Risposta alla splenectomia (%)			
CR	22 (88.0)	37 (94.8)	n.s.
R	0 (0.0)	1 (2.6)	
NR	3 (12.0)	1 (2.6)	
Loss of Response – LR (%)	5/22 (22.7)	12/38 (31.6)	n.s.

Responsività alla splenectomia (%)			
Responsivi	17 (68.0)	26 (66.7)	n.s.
Non Responsivi	8 (32.0)	13 (33.3)	
RFS post splenectomia (%)			
a 1 anno	69.6 (C.I. 50.8 – 88.4)	73.5 (C.I. 58.7 – 88.3)	n.s.
a 5 anni	58.8 (C.I. 35.4 – 82.2)	52.0 (C.I. 32.4 – 71.6)	n.s.
Follow up mediano post-splenectomia (mesi)	35 (IQR: 2 – 106) (range: 3 – 164)	28 (IQR: 6 – 81) (range: 3 – 171)	n.s.
Pattern istologico (%)			
HWP	11 (44.0)	25 (64.1)	n.s.
nAWP	11 (44.0)	9 (23.1)	
WPD	3 (12.0)	5 (12.8)	
Mediana dei rapporti ZM/WP	0.40 (IQR: 0.32 – 0.50)	0.48 (IQR: 0.38 – 0.53)	n.s.
Densità mediana dei linfociti Tfh (no/HPF)	40 (IQR: 24.0 – 56.0)	29.7 (IQR: 11.5 – 54.8)	n.s.

Note. (\*) La differenza calcolata tra discovery set e validation set non è significativa per  $p < 0.05$  e/o non mostra un trend verso la significatività statistica ( $p < 0.1$ ). (1) Conta piastrinica minima nel mese antecedente la splenectomia. (2) 2° valore massimo della conta piastrinica nei due mesi successivi all'intervento. (3) Secondo i criteri IWG (10) (paragrafo 1.1.1).

Lo score clinico (i.e. alto rischio di recidiva di ITP post splenectomia in presenza di almeno 1 fattore di rischio tra (i) presenza di comorbidity autoimmuni, (ii) dosaggio di corticosteroidi pre-splenectomia  $\geq 37.5$  mg/die, (iii) età alla diagnosi di ITP  $\geq 49$  anni), in relazione ai dati disponibili, è risultato applicabile a 38/39 (97.4%) casi. Sono stati distinti 15/38 (39.5%) casi ad alto rischio di recidiva e 23/38 (60.5%) casi a basso rischio di recidiva. Nel gruppo dei 15 pazienti con uno score ad alto rischio di recidiva, 8/15 (53.3%) si sono effettivamente rivelati refrattari, mentre nel gruppo dei 23 pazienti con score a basso rischio, 4/23 (17.4%) casi si sono rivelati non-responders. Lo score clinico ha dimostrato, nel validation set, un VPP del 53.4% e un VPN del 82.6%. La RFS è risultata significativamente minore nei pazienti ad alto rischio (RFS a 1 anno:  $57.1\% \pm 36.7\%$  nei pazienti ad alto rischio versus  $89.5\% \pm 13.8\%$  nei pazienti a basso rischio; RFS a 3 anni:  $41.7\% \pm$

27.9% nei pazienti ad alto rischio versus  $87.5\% \pm 22.9\%$  nei pazienti a basso rischio; test log-rank,  $p=0.011$ ) (Figura 5).

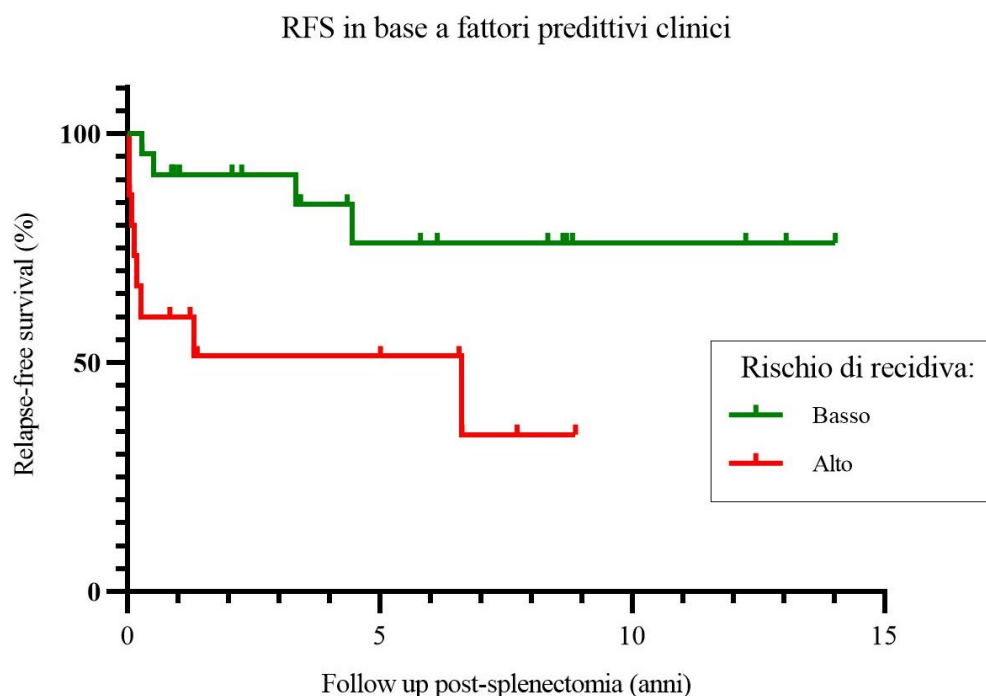


Figura 5. Relapse-free survival nel validation set in casi a basso rischio di recidiva (punteggio=0) e ad alto rischio di recidiva (punteggio $\geq$ 1), valutati in base allo score clinico.

Lo score clinico-istologico, in relazione ai dati disponibili, è risultato applicabile a 38/39 (97.4%) casi del validation set e ha identificato 18/38 (47.4%) casi ad alto rischio di recidiva, dimostrando un VPP pari al 38.9% e un VPN pari al 70.0%. La RFS non ha dimostrato differenze statisticamente significative (test log-rank,  $p=0.55$ ) tra pazienti ad alto e basso rischio di recidiva, nel validation set, sulla base dello score clinico-istologico.

Un'ulteriore stratificazione dei pazienti, sulla base dei parametri clinici, è stata ottenuta mediante un'analisi post-hoc, distinguendo 3 classi di rischio di recidiva di ITP post-splenectomia (i.e. basso: 0 fattori di rischio; intermedio: 1 fattore di rischio; alto >1 fattore di rischio; Figura 6). La differenza tra le tre classi di rischio risulta statisticamente significativa in entrambe le coorti (test log-rank:  $p=0.002$  discovery set,  $p<0.0001$  validation set). La maggior parte dei pazienti che, sulla base del solo score clinico, erano classificati come ad alto rischio di recidiva, secondo questa ulteriore stratificazione rientra nella classe di rischio intermedio (10/16 [62.5%] nel discovery set, 14/15 [93.3%] nel validation set).

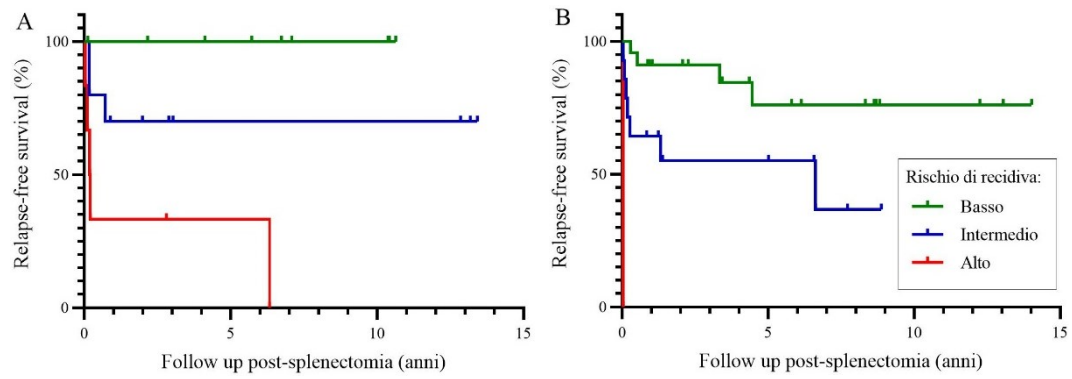


Figura 6. Relapse-free survival post splenectomia in base ai fattori predittivi dello score clinico in casi a basso rischio di recidiva (nessun fattore di rischio), rischio intermedio (presenza di 1 fattore di rischio), rischio alto (presenza di >1 fattore di rischio). A. Stratificazione nelle tre classi di rischio nel discovery set. B. Stratificazione nelle tre classi di rischio nel validation set.



## 5. DISCUSSIONE

Numerose evidenze scientifiche suggeriscono che l'ITP sia una sindrome clinica, con un fenotipo comune derivante da diversi meccanismi patogenetici (i.e. alterazioni dell'immunità innata, dell'immunità adattativa, del microambiente splenico, della megacariocitopoiesi), il cui contributo varia da paziente a paziente (26,27). Nella fisiopatologia dell'ITP la milza ha un ruolo cardine, in quanto sede primaria, nella maggior parte degli affetti, delle risposte immunitarie dirette contro le piastrine (39,123). In particolare, i macrofagi della polpa rossa sono responsabili della fagocitosi delle piastrine e agiscono come principali APC, sostenendo l'attivazione e il differenziamento di cloni di linfociti T e B auto-reattivi (45,46,129,131). L'interazione dei macrofagi con i linfociti T perivascolari ne induce l'attivazione e il differenziamento a Tfh, a loro volta in grado di stimolare i linfociti B, che colonizzano la polpa bianca (66). I linfociti B auto-reattivi vanno incontro a switch isotipico e ipermutazione somatica all'interno dei CG, differenziandosi in cellule della memoria e plasmacellule (64,66). Queste ultime producono autoanticorpi (e.g. IgG, IgM ed IgA anti-GPIIb/IIIa, anti-GPIb/IX/V, anti-GPIa/IIa, anti-GPIV, anti-GPV, anti GPVI) che determinano l'opsonizzazione e la CDC delle piastrine (57,69–72,132). Le cuffie T perivascolari sono inoltre sede di linfociti Tc, i quali possono determinare la distruzione piastrinica mediante citotossicità diretta o apoptosi (110). In accordo con il ruolo centrale rivestito dalla milza nella patogenesi dell'ITP, la splenectomia rappresenta l'opzione terapeutica con i migliori tassi di risposta a lungo termine (123,269,270). Nonostante ciò, i rischi associati a complicanze chirurgiche, ad infezioni e ad eventi trombotici relegano la splenectomia a linea di trattamento successiva alle numerose terapie mediche (200,275). Negli anni sono stati proposti numerosi predittori di risposta alla splenectomia, sia pre-operatori (e.g. età, sesso, conta piastrinica pre-operatoria, durata di malattia, risposta agli steroidi, risposta alle IVIg, risposta alle Ig anti-D, severità dei sintomi emorragici, sede del sequestro piastrinico, emivita piastrinica, presenza/tipo di anticorpi anti-piastrina, documentata iperplasia dei megacariociti) che post-operatori (e.g. conta piastrinica post-operatoria, velocità di recupero della conta piastrinica, peso o dimensioni della milza, iperplasia dei follicoli splenici),

ma nessuno di questi fattori si è tuttavia dimostrato riproducibile in studi successivi o in revisioni sistematiche della letteratura (276,284). Le ragioni di ciò dipendono probabilmente da: (i) la limitata numerosità e differente composizione delle popolazioni di studio; (ii) il ricorso a correlazioni clinico-prognostiche poco precise; (iii) la varietà delle terapie che precedono la splenectomia; (iv) la variabilità del follow up post-intervento.

I dati ottenuti nella nostra coorte (discovery set,  $n=25$ ), in accordo con precedenti riscontri presenti in letteratura (276), dimostrano che numerose variabili proposte come predittive di risposta alla splenectomia (e.g. sesso, durata di malattia, conta piastrinica pre-splenectomia, conta piastrinica post-splenectomia), non hanno un reale impatto prognostico. Allo stesso tempo, è stato identificato un ruolo prognostico per parametri clinici e istologici precedentemente poco considerati, quali: (i) dosi elevate di steroide pre-splenectomia; (ii) presenza di comorbidità autoimmuni; (iii) età alla diagnosi di ITP  $\geq 49$  anni; (iv) età alla splenectomia  $\geq 40$  anni; (v) atrofia delle ZM (i.e.  $ZM/WP < 0.434$ ); (vi) densità di linfociti Tfh  $< 36.5$  cellule/HPF (Tabella IV, paragrafo 4.3).

Per quanto sia l'età alla splenectomia  $\geq 40$  anni che l'età alla diagnosi di ITP  $\geq 49$  anni abbiamo dimostrato un ruolo prognostico in relazione all'esito della splenectomia, nel nostro score clinico abbiamo deciso di considerare soltanto l'età alla diagnosi. Quest'ultimo parametro infatti risulta maggiormente correlato alla malattia in sé, non dipendendo da altri interventi terapeutici. In relazione all'età alla splenectomia invece, gli studi presenti in letteratura ne hanno dimostrato un ruolo controverso nel predire l'esito dell'intervento (276). Per quanto questo parametro risulti di facile riscontro, soprattutto ipotizzando un setting ambulatoriale di gestione del paziente affetto da ITP cronica per il quale si stia valutando la splenectomia terapeutica, il suo utilizzo come fattore predittivo di risposta all'intervento presenta alcune criticità, quali: (i) non permette di operare alcuna distinzione dei pazienti sulla base delle linee di trattamento alle quali sono già andati incontro; (ii) è un valore subordinato al momento in cui vengono svolte le analisi dei dati, dipendente dalle decisioni mediche e dalla disponibilità o meno di linee di trattamento non chirurgiche.

La dose di corticosteroide nel periodo pre-splenectomia, nel discovery set, rappresenta la minima quantità di farmaco assunta cronicamente (i.e. dose assunta negli 1-3 mesi antecedenti la splenectomia) che, sulla base del giudizio clinico, risulta necessaria al fine di mantenere una conta piastrinica stabile e/o ritenuta sicura per il singolo caso. La valutazione retrospettiva dei dati clinico-laboratoristici ha permesso di verificare che tra responders e non-responders vi è una differenza statisticamente significativa nella dose di corticosteroidi assunta pre-splenectomia (dose mediana: 43.8 mg/die non-responders versus 25.0 mg/die responders;  $p=0.036$ ) a fronte di una differenza non significativa nella conta piastrinica pre-splenectomia (conta piastrinica mediana [ $\times 10^9/L$ ]: 31.5 non-responders versus 29 responders;  $p=0.58$ ). In aggiunta a ciò, l'analisi di regressione lineare ha escluso una correlazione tra la dose di corticosteroide somministrata cronicamente nel periodo pre-operatorio e la conta piastrinica pre-splenectomia nel discovery set. Alla luce di queste considerazioni, si può ipotizzare che, a parità di conta piastrinica pre-splenectomia, una dose maggiore di corticosteroidi possa identificare pazienti più resistenti alla terapia medica che si mantengono tali anche post-splenectomia, diversamente da coloro che necessitano di una dose minore di steroide prima dell'intervento chirurgico. È importante sottolineare che, come evidenziato nella Figura 2 (paragrafo 4.3), la posologia di corticosteroide nei soggetti responders era di molto inferiore al cutoff di 37.5 mg/die, valore identificato mediante valutazione dell'indice di Youden, rendendo quindi maggiormente significativa la reale differenza di posologia tra responders e non responders.

La combinazione delle variabili cliniche selezionate (i.e. dose di corticosteroide pre-splenectomia  $\geq 37.5$  mg/die, presenza di comorbidità autoimmuni, età alla diagnosi di ITP  $\geq 49$  anni) in uno score integrato (1 punto per ogni fattore), ha consentito di stratificare i pazienti in gruppi con diverso outcome chirurgico. In particolare, la presenza di  $\geq 1$  fattore di rischio clinico si associava a ridotta RFS a 1 e a 3 anni dopo la splenectomia (Figura 3, paragrafo 4.4). Questa stratificazione dei pazienti permetterebbe di operare una migliore selezione dei soggetti da sottoporre a splenectomia, escludendo coloro che sono ad alto rischio di recidiva post-intervento, sulla base di fattori predittivi esclusivamente clinici.

Lo score clinico proposto si è dimostrato efficiente anche dopo validazione su una coorte multicentrica di pazienti (validation set, n=39). Infatti, anche nel validation set, un punteggio  $\geq 1$  ha distinto pazienti ad alto e a basso rischio di recidiva (Figura 5, paragrafo 4.6). L'omogeneità del discovery set e del validation set, in termini di caratteristiche cliniche ed epidemiologiche (Tabella VI, paragrafo 4.6), rafforza il potenziale impatto dello score clinico nella selezione accurata dei pazienti da sottoporre a splenectomia. La discrepanza nella conta piastrinica pre-splenectomia tra le due coorti di pazienti non costituisce di fatto un elemento che riduce l'omogeneità dei due gruppi, poiché è chiaro che esso esprime in entrambe le coorti una condizione di refrattarietà a terapie precedenti, pertanto privo di impatto sulla decisione di sottoporre il paziente o meno a splenectomia terapeutica. Infatti la scelta di eseguire l'intervento chirurgico dipende dall'andamento clinico (e.g. forme di ITP rapidamente progressive non responsive a terapie mediche), dalle risposte alle terapie mediche precedenti (e.g. dose di corticosteroidi necessaria per mantenere una conta piastrinica adeguata), dallo stile di vita del paziente (123,200). Nel nostro studio abbiamo inoltre dimostrato una significatività nella valutazione del rischio di recidiva anche dopo stratificazione in tre classi di rischio (i.e. basso, intermedio, alto), in entrambe le coorti (Figura 6, paragrafo 4.6). Attraverso questa ulteriore suddivisione, un maggior numero di pazienti viene incluso nelle classi di rischio intermedio e alto. Tale separazione, nella pratica clinica, potrebbe essere particolarmente utile nella selezione dei pazienti da sottoporre a splenectomia, in quanto fornirebbe una stima ancora più accurata del rischio di recidiva di ITP.

La numerosità ridotta delle coorti analizzate (discovery set, n=25; validation set, n=39) rappresenta il principale limite del nostro studio. È quindi auspicabile in futuro un ampliamento del numero dei pazienti coinvolti, mediante (i) il coinvolgimento di altri centri di riferimento per il trattamento dell'ITP e (ii) l'estrapolazione di dati standardizzati dalle casistiche presenti in letteratura, al fine di poter eseguire analisi multivariate e analisi di regressione logistica multivariata che permetterebbero di verificare e validare ulteriormente le relazioni tra le variabili cliniche da noi identificate e l'outcome della splenectomia. Va inoltre sottolineato che il nostro è uno studio retrospettivo e in quanto tale la raccolta anamnestica dei dati può rappresentarne un limite, soprattutto in uno studio multicentrico. Dati

clinico-laboratoristici incompleti o poco precisi possono determinare l'esclusione dallo studio di pazienti potenzialmente idonei allo studio, riducendo la casistica analizzabile, già esigua data la bassa prevalenza dell'ITP nella popolazione generale (12). Al fine di un ampliamento delle coorti analizzate, risulterà quindi necessario adoperarsi per ottenere dei dati di qualità, con una raccolta anamnestica il più possibile standardizzata e mirata su quelli che sono i parametri che hanno dimostrato avere un effettivo ruolo prognostico nei pazienti affetti da ITP. Una volta confermata retrospettivamente, su coorti più ampie, la validità dello score clinico, sarà fondamentale la sua valutazione prospettica, per confermarne l'effettivo ruolo prognostico. In questo senso, sarà fondamentale standardizzare ulteriormente, in un'ottica di applicazione multicentrica dello score, il parametro relativo alla dose di corticosteroide assunta pre-splenectomia, in termini di: (i) intervallo di tempo minimo per considerare una terapia steroidea come cronica; (ii) momento in cui applicare lo score clinico, ovvero il momento in cui eseguire la rilevazione della dose di corticosteroide assunta cronicamente dal paziente. Una validazione prospettica permetterebbe quindi effettivamente di selezionare in maniera più accurata i pazienti affetti da ITP da sottoporre a splenectomia.

Se confermato in una casistica più ampia, lo score clinico descritto nel nostro studio, applicato alla pratica clinica della gestione dell'ITP, costituirebbe uno strumento particolarmente utile alla selezione di pazienti con maggiori probabilità di risposta, in particolare nei centri specializzati nella cura di questa patologia, con esperienza nella selezione pre-operatoria, nella condotta peri-operatoria di un intervento laparoscopico e nella gestione dei rischi infettivi e trombotici conseguenti all'intervento. In un contesto come questo, la splenectomia potrebbe rappresentare non più una terapia di salvataggio in un paziente pluritrattato (quindi anche più a rischio di complicanze chirurgiche), ma un'alternativa terapeutica personalizzata e con un più favorevole rapporto rischio/beneficio.

La valutazione clinica è stata affiancata dalla valutazione istologica delle milze asportate chirurgicamente. Le analisi morfologiche condotte sulle milze della nostre coorte hanno confermato l'esistenza di diversi pattern istologici (i.e. HWP, WPD, nAWP), già descritti in letteratura (128) e in linea con precedenti studi, i quali descrivevano quadri variabili da spiccata iperplasia follicolare ad atrofia

linfoide della polpa bianca (124–127). Tali reperti potrebbero sottendere condizioni immunologiche e meccanismi patogenetici differenti, confermando come l'ITP possa essere considerata più propriamente una sindrome disimmune e non una patologia con un singolo meccanismo fisiopatologico. Non è stata tuttavia riscontrata alcuna correlazione tra il pattern istologico e l'esito della splenectomia nel discovery set (Tabella IV, paragrafo 4.3). Un possibile ruolo predittivo di recidiva precoce post-splenectomia lo hanno dimostrato l'atrofia delle ZM e la ridotta densità dei linfociti Tfh, in accordo con precedenti riscontri in letteratura (127,128). Dal punto di vista fisiopatologico, l'atrofia delle ZM e la ridotta densità di linfociti Tfh identificherebbero casi di ITP in cui la milza non rappresenta la principale sede di produzione di autoanticorpi e, di conseguenza, la splenectomia non determinerebbe benefici rilevanti. Quando i parametri identificati sono stati incorporati in uno score istologico integrato (1 punto per ogni fattore), questo non ha permesso di distinguere in maniera statisticamente significativa i pazienti considerati ad alto e basso rischio di recidiva precoce. Ugualmente, l'integrazione dei parametri clinici ed istologici, che aveva dimostrato efficienza nel discovery set (Figura 4, paragrafo 4.5), non è stata confermata nel validation set, in cui appunto lo score clinico-istologico non ha distinto in maniera efficiente i pazienti ad alto e basso rischio di recidiva di malattia.

È verosimile ipotizzare che i parametri istologici da noi utilizzati forniscano una descrizione morfologica, non funzionale, del microambiente splenico, con impatto quindi nella scarsa capacità di discriminazione, degli score istologico e clinico-istologico, tra pazienti ad alto e basso rischio di recidiva. Indipendentemente dalle performance degli score, è interessante notare che i parametri istologici valutati hanno dimostrato un certo grado di correlazione con l'esito della splenectomia, soprattutto per quanto riguarda la densità dei linfociti Tfh nel discovery set. Ulteriori indagini dovranno valutare, anche su coorti più ampie, se effettivamente la scarsa densità di linfociti Tfh possa essere un parametro identificativo di uno scarso coinvolgimento della milza nella fisiopatologia dell'ITP, individuando sottogruppi di pazienti splenectomizzati ma ad alto rischio di recidiva. Se questo dato si confermasse, sarà interessante valutare un suo ruolo come fattore predittivo

di risposta alla splenectomia attraverso lo studio di corrispettivi circolanti di Tfh con specificità antigenica per antigeni piastrinici.





## 6. CONCLUSIONI

Alcuni parametri clinici (i.e. età alla diagnosi  $\geq 49$  anni, età alla splenectomia  $\geq 40$  anni, presenza di comorbidità autoimmuni, dose di steroide pre-splenectomia  $\geq 37.5$  mg/die) hanno un ruolo predittivo nella valutazione della risposta alla splenectomia nei pazienti affetti da ITP. Uno score clinico integrato (1 punto per ogni fattore), basato sulla presenza di alcuni di questi fattori (i.e. età alla diagnosi  $\geq 49$  anni, età alla splenectomia  $\geq 40$  anni, presenza di comorbidità autoimmuni, dose di steroide pre-splenectomia  $\geq 37.5$  mg/die), è in grado di predire l'esito della splenectomia nei pazienti affetti da ITP, risultando potenzialmente utile per una selezione più accurata dei pazienti da avviare alla procedura. Le caratteristiche istologiche della milza in corso di ITP sono eterogenee e definiscono dei pattern ricorrenti, verosimilmente correlati alla fisiopatologia della sindrome. Alcuni parametri istologici (i.e. atrofia delle ZM, ridotta densità dei linfociti Tfh) potrebbero permettere di identificare coloro che sono ad alto rischio di recidiva post-splenectomia.



## 7. BIBLIOGRAFIA

1. Lambert MP, Gernsheimer TB. Clinical updates in adult immune thrombocytopenia. *Blood*. 25 maggio 2017;129(21):2829–35.
2. Ruggeri M, Fortuna S, Rodeghiero F. Heterogeneity of terminology and clinical definitions in adult idiopathic thrombocytopenic purpura: a critical appraisal from a systematic review of the literature. *Haematologica*. 1 gennaio 2008;93(1):98–103.
3. Guidelines for the investigation and management of idiopathic thrombocytopenic purpura in adults, children and in pregnancy: *Guideline*. *Br J Haematol*. febbraio 2003;120(4):574–96.
4. Biino G, Santimone I, Minelli C, Sorice R, Frongia B, Traglia M, et al. Age-And Sex-Related Variations in Platelet Count in Italy: A Proposal of Reference Ranges Based on 40987 Subjects' Data. Freson K, curatore. *PLoS ONE*. 31 gennaio 2013;8(1):e54289.
5. Lugada ES, Mermin J, Kaharuza F, Ulvestad E, Were W, Langeland N, et al. Population-Based Hematologic and Immunologic Reference Values for a Healthy Ugandan Population. *Clin Vaccine Immunol*. gennaio 2004;11(1):29–34.
6. Adibi P, Faghih Imani E, Talaei M, Ghanei M. Population-based platelet reference values for an Iranian population. *Int J Lab Hematol*. giugno 2007;29(3):195–9.
7. Pabbi S, Tiwari A, Aggarwal G, Sharma G, Marik A, Luthra A, et al. Reference interval of platelet counts and other platelet indices in apparently healthy blood donors in North India according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines: Need to redefine the platelet count cutoffs for repeat plateletpheresis donation? *Asian J Transfus Sci*. 2022;16(2):248.
8. Stasi R, Amadori S, Osborn J, Newland AC, Provan D. Long-Term Outcome of Otherwise Healthy Individuals with Incidentally Discovered Borderline Thrombocytopenia. Djulbegovic B, curatore. *PLoS Med*. 17 gennaio 2006;3(3):e24.
9. Urbensky JR, Moore JE, Arnold DM, Smith JW, Kelton JG, Nazy I. The sensitivity and specificity of platelet autoantibody testing in immune thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis of a diagnostic test. *J Thromb Haemost*. maggio 2019;17(5):787–94.
10. Rodeghiero F, Stasi R, Gernsheimer T, Michel M, Provan D, Arnold DM, et al. Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group. *Blood*. 12 marzo 2009;113(11):2386–93.
11. Neunert C, Lim W, Crowther M, Cohen A, Solberg L, Crowther MA. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood*. 21 aprile 2011;117(16):4190–207.

12. Kohli R, Chaturvedi S. Epidemiology and Clinical Manifestations of Immune Thrombocytopenia. *Hämostaseologie*. agosto 2019;39(03):238–49.
13. Kurata Y, Fujimura K, Kuwana M, Tomiyama Y, Murata M. Epidemiology of primary immune thrombocytopenia in children and adults in Japan: a population-based study and literature review. *Int J Hematol*. marzo 2011;93(3):329–35.
14. Frederiksen H, Schmidt K. The Incidence of Idiopathic Thrombocytopenic Purpura in Adults Increases With Age. *Blood*. 1 agosto 1999;94(3):909–13.
15. Marieke Schoonen W, Kucera G, Coalson J, Li L, Rutstein M, Mowat F, et al. Epidemiology of immune thrombocytopenic purpura in the General Practice Research Database. *Br J Haematol*. aprile 2009;145(2):235–44.
16. ACOG practice bulletin Thrombocytopenia in pregnancy. *Int J Gynecol Obstet*. 1999;67(2):117–28.
17. al-Mofada SM, Osman ME, Kides E, al-Momen AK, al-Herbish AS, al-Mobaireek K. Risk of thrombocytopenia in the infants of mothers with idiopathic thrombocytopenia. *Am J Perinatol*. novembre 1994;11(6):423–6.
18. McCrae KR, Samuels P, Schreiber AD. Pregnancy-associated thrombocytopenia: pathogenesis and management. *Blood*. 1 dicembre 1992;80(11):2697–714.
19. Burrows RF, Kelton JG. Fetal Thrombocytopenia and Its Relation to Maternal Thrombocytopenia. *N Engl J Med*. 11 novembre 1993;329(20):1463–6.
20. Moulis G, Palmaro A, Montastruc JL, Godeau B, Lapeyre-Mestre M, Sailer L. Epidemiology of incident immune thrombocytopenia: a nationwide population-based study in France. *Blood*. 20 novembre 2014;124(22):3308–15.
21. Kuhne T, Berchtold W, Michaels LA, Wu R, Donato H, Espina B, et al. Newly diagnosed immune thrombocytopenia in children and adults: a comparative prospective observational registry of the Intercontinental Cooperative Immune Thrombocytopenia Study Group. *Haematologica*. 1 dicembre 2011;96(12):1831–7.
22. Segal JB, Powe NR. Prevalence of immune thrombocytopenia: analyses of administrative data. *J Thromb Haemost*. 2006;4(11):2377–83.
23. Terrell DR, Beebe LA, Neas BR, Vesely SK, Segal JB, George JN. Prevalence of primary immune thrombocytopenia in Oklahoma. *Am J Hematol*. settembre 2012;87(9):848–52.
24. Bennett D, Hodgson ME, Shukla A, Logie JW. Prevalence of Diagnosed Adult Immune Thrombocytopenia in the United Kingdom. *Adv Ther*. dicembre 2011;28(12):1096–104.
25. Terrell DR, Beebe LA, Vesely SK, Neas BR, Segal JB, George JN. The incidence of immune thrombocytopenic purpura in children and adults: A critical review of published reports. *Am J Hematol*. 2010;85(3):174–80.
26. Audia S, Mahévas M, Samson M, Godeau B, Bonnotte B. Pathogenesis of immune thrombocytopenia. *Autoimmun Rev*. giugno 2017;16(6):620–32.

27. Cines DB, Bussel JB, Liebman HA, Luning Prak ET. The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity. *Blood*. 25 giugno 2009;113(26):6511–21.
28. Cooper N, Bussel J. The pathogenesis of immune thrombocytopaenic purpura. *Br J Haematol*. 2006;133(4):364–74.
29. Li H, Zhao H, Xue F, Zhang X, Zhang D, Ge J, et al. Reduced expression of MIR409-3p in primary immune thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 2013;161(1):128–35.
30. Zhao H, Li H, Du W, Zhang D, Ge J, Xue F, et al. Reduced MIR130A is involved in primary immune thrombocytopenia via targeting TGFB1 and IL18. *Br J Haematol*. 2014;166(5):767–73.
31. Jernås M, Nookaew I, Wadenvik H, Olsson B. MicroRNA regulate immunological pathways in T-cells in immune thrombocytopenia (ITP). *Blood*. 14 marzo 2013;121(11):2095–8.
32. Boughton BJ, Simpson AW, Bolt C, Buchan A, McLeish P. Platelet Membrane Glycoprotein IIb/IIIa has Sequence Homologies with Human Virus Proteins and Synthetic Viral Peptides Inhibit Anti-GPIIb/IIIa Antibodies in Autoimmune Thrombocytopenic Purpura. *Platelets*. gennaio 1995;6(2):75–82.
33. Bettaieb A, Oksenhendler E, Duedari N, Bierling P. Cross-reactive antibodies between HIV-gp120 and platelet gpIIIa (CD61) in HIV-related immune thrombocytopenic purpura. *Clin Exp Immunol*. 1 gennaio 1996;103(1):19–23.
34. Zhang W, Nardi MA, Borkowsky W, Li Z, Karpatkin S. Role of molecular mimicry of hepatitis C virus protein with platelet GPIIIa in hepatitis C-related immunologic thrombocytopenia. *Blood*. 23 aprile 2009;113(17):4086–93.
35. Takahashi T, Yujiri T, Shinohara K, Inoue Y, Sato Y, Fujii Y, et al. Molecular mimicry by *Helicobacter pylori* CagA protein may be involved in the pathogenesis of *H. pylori*-associated chronic idiopathic thrombocytopenic purpura: *H. pylori* Infection Induces Chronic ITP by Molecular Mimicry. *Br J Haematol*. gennaio 2004;124(1):91–6.
36. Musaji A, Cormont F, Thirion G, Cambiaso CL, Coutelier JP. Exacerbation of autoantibody-mediated thrombocytopenic purpura by infection with mouse viruses. *Blood*. 1 ottobre 2004;104(7):2102–6.
37. Swinkels M, Rijkers M, Voorberg J, Vidarsson G, Leebeek FWG, Jansen AJG. Emerging Concepts in Immune Thrombocytopenia. *Front Immunol*. 30 aprile 2018;9:880.
38. Audia S, Mahévas M, Nivet M, Ouandji S, Ciudad M, Bonnotte B. Immune Thrombocytopenia: Recent Advances in Pathogenesis and Treatments. *HemaSphere*. 1 giugno 2021;5(6):e574.
39. Provan D, Semple JW. Recent advances in the mechanisms and treatment of immune thrombocytopenia. *eBioMedicine*. 1 febbraio 2022;76.
40. Norris PAA, Segel GB, Burack WR, Sachs UJ, Lissenberg-Thunnissen SN, Vidarsson G, et al. FcγRI and FcγRIII on splenic macrophages mediate

phagocytosis of anti-glycoprotein IIb/IIIa autoantibody-opsonized platelets in immune thrombocytopenia. *Haematologica*. 2021;106(1):250–4.

41. Liu X guang, Ma S hui, Sun J zhi, Ren J, Shi Y, Sun L, et al. High-dose dexamethasone shifts the balance of stimulatory and inhibitory Fcγ receptors on monocytes in patients with primary immune thrombocytopenia. *Blood*. 10 febbraio 2011;117(6):2061–9.
42. Lanzavecchia A. How can cryptic epitopes trigger autoimmunity? *J Exp Med*. 1 giugno 1995;181(6):1945–8.
43. Gessner JE, Heiken H, Tamm A, Schmidt RE. The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol*. 1 giugno 1998;76(6):231–48.
44. Simitsek PD, Campbell DG, Lanzavecchia A, Fairweather N, Watts C. Modulation of antigen processing by bound antibodies can boost or suppress class II major histocompatibility complex presentation of different T cell determinants. *J Exp Med*. 1 giugno 1995;181(6):1957–63.
45. Kuwana M, Okazaki Y, Ikeda Y. Splenic macrophages maintain the anti-platelet autoimmune response via uptake of opsonized platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost JTH*. febbraio 2009;7(2):322–9.
46. Audia S, Santegoets K, Laarhoven AG, Vidarsson G, Facy O, Ortega-Deballon P, et al. Fcγ receptor expression on splenic macrophages in adult immune thrombocytopenia. *Clin Exp Immunol*. maggio 2017;188(2):275–82.
47. Catani L, Fagioli ME, Tazzari PL, Ricci F, Curti A, Rovito M, et al. Dendritic cells of immune thrombocytopenic purpura (ITP) show increased capacity to present apoptotic platelets to T lymphocytes. *Exp Hematol*. 1 luglio 2006;34(7):879–87.
48. Chu XX, Huang BH, Zhang XL, Chen LM, Wang Y, Yu WJ, et al. Dexamethasone inhibits immunoreactivity of dendritic cells in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood Coagul Fibrinolysis Int J Haemost Thromb*. settembre 2010;21(6):564–7.
49. Catani L, Sollazzo D, Trabanelli S, Curti A, Evangelisti C, Polverelli N, et al. Decreased expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 in dendritic cells contributes to impaired regulatory T cell development in immune thrombocytopenia. *Ann Hematol*. 1 gennaio 2013;92(1):67–78.
50. Xu S qian, Wang C yan, Zhu X juan, Dong X yuan, Shi Y, Peng J, et al. Decreased indoleamine 2,3-dioxygenase expression in dendritic cells and role of indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells in immune thrombocytopenia. *Ann Hematol*. ottobre 2012;91(10):1623–31.
51. Shao Q, Ning H, Lv J, Liu Y, Zhao X, Ren G, et al. Regulation of Th1/Th2 polarization by tissue inhibitor of metalloproteinase-3 via modulating dendritic cells. *Blood*. 17 maggio 2012;119(20):4636–44.

52. Liu X, Shin N, Koblish HK, Yang G, Wang Q, Wang K, et al. Selective inhibition of IDO1 effectively regulates mediators of antitumor immunity. *Blood*. 29 aprile 2010;115(17):3520–30.
53. Semple JW, Bruce S, Freedman J. Suppressed natural killer cell activity in patients with chronic autoimmune thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol*. 1991;37(4):258–62.
54. Ebbo M, Audonnet S, Grados A, Benarous L, Mahevas M, Godeau B, et al. NK cell compartment in the peripheral blood and spleen in adult patients with primary immune thrombocytopenia. *Clin Immunol*. 1 aprile 2017;177:18–28.
55. Kurata Y, Curd JG, Tamerius JD, McMillan R. Platelet-associated complement in chronic ITP. *Br J Haematol*. agosto 1985;60(4):723–33.
56. Castelli R, Lambertenghi Delilliers G, Gidaro A, Cicardi M, Bergamaschini L. Complement activation in patients with immune thrombocytopenic purpura according to phases of disease course. *Clin Exp Immunol*. settembre 2020;201(3):258–65.
57. Najaoui A, Bakchoul T, Stoy J, Bein G, Rummel MJ, Santoso S, et al. Autoantibody-mediated complement activation on platelets is a common finding in patients with immune thrombocytopenic purpura (ITP). *Eur J Haematol*. 2012;88(2):167–74.
58. Peerschke EIB, Andemariam B, Yin W, Bussel JB. Complement activation on platelets correlates with a decrease in circulating immature platelets in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. febbraio 2010;148(4):638–45.
59. Usuki Y, Kohsaki M, Nagai K, Ohe Y, Hara H. Complement-dependent cytotoxic factor to megakaryocyte progenitors in sera from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Int J Cell Cloning*. novembre 1986;4(6):447–63.
60. Kapur R, Heitink-Pollé KatjaMJ, Porcelijn L, Bentlage ArthurEH, Bruin MarrieCA, Visser R, et al. C-reactive protein enhances IgG-mediated phagocyte responses and thrombocytopenia. *Blood*. 12 marzo 2015;125(11):1793–802.
61. Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, Moore CV. Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *J Lab Clin Med*. 1951;38(1):1–10.
62. Porcelijn L, Schmidt DE, Oldert G, Hofstede-van Egmond S, Kapur R, Zwaginga JJ, et al. Evolution and Utility of Antiplatelet Autoantibody Testing in Patients with Immune Thrombocytopenia. *Transfus Med Rev*. ottobre 2020;34(4):258–69.
63. McMillan R. Autoantibodies and autoantigens in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Semin Hematol*. luglio 2000;37(3):239–48.
64. Roark JH, Bussel JB, Cines DB, Siegel DL. Genetic analysis of autoantibodies in idiopathic thrombocytopenic purpura reveals evidence of clonal expansion and somatic mutation. *Blood*. 15 agosto 2002;100(4):1388–98.

65. Mahévas M, Patin P, Huetz F, Descatoire M, Cagnard N, Bole-Feysot C, et al. B cell depletion in immune thrombocytopenia reveals splenic long-lived plasma cells. *J Clin Invest.* 2 gennaio 2013;123(1):432–42.
66. Audia S, Rossato M, Santegoets K, Spijkers S, Wichers C, Bekker C, et al. Splenic TFH expansion participates in B-cell differentiation and antiplatelet-antibody production during immune thrombocytopenia. *Blood.* 30 ottobre 2014;124(18):2858–66.
67. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Ikeda Y. Detection of circulating b cells secreting platelet-specific autoantibody is useful in the diagnosis of autoimmune thrombocytopenia. *Am J Med.* 1 marzo 2003;114(4):322–5.
68. Karpatkin S, Siskind GW. In Vitro Detection of Platelet Antibody in Patients with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura and Systemic Lupus Erythematosus. *Blood.* 1 giugno 1969;33(6):795–812.
69. He R, Reid DM, Jones CE, Shulman NR. Spectrum of Ig Classes, Specificities, and Titers of Serum Antiglycoproteins in Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Blood.* 15 febbraio 1994;83(4):1024–32.
70. van Leeuwen EF, Van Der Ven JThM, Engelfriet CP, von dem Borne AEG. Specificity of Autoantibodies in Autoimmune Thrombocytopenia. *Blood.* 1 gennaio 1982;59(1):23–6.
71. Vollenberg R, Jouni R, Norris PAA, Burg-Roderfeld M, Cooper N, Rummel MJ, et al. Glycoprotein V is a relevant immune target in patients with immune thrombocytopenia. *Haematologica.* giugno 2019;104(6):1237–43.
72. Tsubakio T, Tani P, Curd JG, Mcmillan R. Complement activation in vitro by antiplatelet antibodies in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 1986;63(2):293–300.
73. Li J, van der Wal DE, Zhu G, Xu M, Yougbare I, Ma L, et al. Desialylation is a mechanism of Fc-independent platelet clearance and a therapeutic target in immune thrombocytopenia. *Nat Commun.* 17 luglio 2015;6:7737.
74. Marini I, Zlamal J, Faul C, Holzer U, Hammer S, Pelzl L, et al. Autoantibody-mediated desialylation impairs human thrombopoiesis and platelet lifespan. *Haematologica.* 1 gennaio 2021;106(1):196–207.
75. Goette NP, Glembotsky AC, Lev PR, Grodzielski M, Contrufo G, Pierdominici MS, et al. Platelet Apoptosis in Adult Immune Thrombocytopenia: Insights into the Mechanism of Damage Triggered by Auto-Antibodies. *PLOS ONE.* 5 agosto 2016;11(8):e0160563.
76. Fujisawa K, O’Toole TE, Tani P, Loftus JC, Plow EF, Ginsberg MH, et al. Autoantibodies to the presumptive cytoplasmic domain of platelet glycoprotein IIIa in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 15 maggio 1991;77(10):2207–13.



77. Solanilla A, Pasquet JM, Viallard JF, Contin C, Grosset C, Déchanet-Merville J, et al. Platelet-associated CD154 in immune thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1 gennaio 2005;105(1):215–8.
78. Vincent FB, Saulep-Easton D, Figgett WA, Fairfax KA, Mackay F. The BAFF/APRIL system: Emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev*. giugno 2013;24(3):203–15.
79. Zhou Z, Zhou Z, Chen Z, Zhou Z, Chen Z, Li H, et al. BAFF and BAFF-R of peripheral blood and spleen mononuclear cells in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Autoimmunity*. 1 gennaio 2009;42(2):112–9.
80. Emmerich F, Bal G, Barakat A, Milz J, Mühle C, Martinez-Gamboa L, et al. High-level serum B-cell activating factor and promoter polymorphisms in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol*. 2007;136(2):309–14.
81. Thai LH, Le Gallou S, Robbins A, Crickx E, Fadeev T, Zhou Z, et al. BAFF and CD4+ T cells are major survival factors for long-lived splenic plasma cells in a B-cell-depletion context. *Blood*. 5 aprile 2018;131(14):1545–55.
82. Blair PA, Noreña LY, Flores-Borja F, Rawlings DJ, Isenberg DA, Ehrenstein MR, et al. CD19+CD24hiCD38hi B Cells Exhibit Regulatory Capacity in Healthy Individuals but Are Functionally Impaired in Systemic Lupus Erythematosus Patients. *Immunity*. 29 gennaio 2010;32(1):129–40.
83. Bouaziz JD, Calbo S, Maho-Vaillant M, Saussine A, Bagot M, Bensussan A, et al. IL-10 produced by activated human B cells regulates CD4+ T-cell activation in vitro. *Eur J Immunol*. 2010;40(10):2686–91.
84. Lemoine S, Morva A, Youinou P, Jamin C. Human T cells induce their own regulation through activation of B cells. *J Autoimmun*. 1 maggio 2011;36(3):228–38.
85. Li X, Zhong H, Bao W, Boulad N, Evangelista J, Haider MA, et al. Defective regulatory B-cell compartment in patients with immune thrombocytopenia. *Blood*. 18 ottobre 2012;120(16):3318–25.
86. Kuwana M, Kaburaki J, Ikeda Y. Autoreactive T cells to platelet GPIIb-IIIa in immune thrombocytopenic purpura. Role in production of anti-platelet autoantibody. *J Clin Invest*. 1 ottobre 1998;102(7):1393–402.
87. Semple JW, Freedman J. Increased Antiplatelet T Helper Lymphocyte Reactivity in Patients With Autoimmune Thrombocytopenia. *Blood*. 15 novembre 1991;78(10):2619–25.
88. Semple JW, Milev Y, Cosgrave D, Mody M, Hornstein A, Blanchette V, et al. Differences in Serum Cytokine Levels in Acute and Chronic Autoimmune Thrombocytopenic Purpura: Relationship to Platelet Phenotype and Antiplatelet T-Cell Reactivity. *Blood*. 15 maggio 1996;87(10):4245–54.

89. Ogawara H, Handa H, Morita K, Hayakawa M, Kojima J, Amagai H, et al. High Th1/Th2 ratio in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* ottobre 2003;71(4):283–8.
90. Wang T, Zhao H, Ren H, Guo J, Xu M, Yang R, et al. Type 1 and type 2 T-cell profiles in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Haematologica.* luglio 2005;90(7):914–23.
91. Panitsas FP, Theodoropoulou M, Kouraklis A, Karakantza M, Theodorou GL, Zoumbos NC, et al. Adult chronic idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) is the manifestation of a type-1 polarized immune response. *Blood.* 1 aprile 2004;103(7):2645–7.
92. Audia S, Samson M, Mahévas M, Ferrand C, Trad M, Ciudad M, et al. Preferential splenic CD8+ T-cell activation in rituximab-nonresponder patients with immune thrombocytopenia. *Blood.* 3 ottobre 2013;122(14):2477–86.
93. Stasi R, Del Poeta G, Stipa E, Evangelista ML, Trawinska MM, Cooper N, et al. Response to B-cell-depleting therapy with rituximab reverts the abnormalities of T-cell subsets in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 15 ottobre 2007;110(8):2924–30.
94. Kuwana M, Kaburaki J, Kitasato H, Kato M, Kawai S, Kawakami Y, et al. Immunodominant epitopes on glycoprotein IIb-IIIa recognized by autoreactive T cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1 luglio 2001;98(1):130–9.
95. Vignali DAA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* luglio 2008;8(7):523–32.
96. Ling Y, Cao X, Yu Z, Ruan C. Circulating dendritic cells subsets and CD4+Foxp3+ regulatory T cells in adult patients with chronic ITP before and after treatment with high-dose dexamethasone. *Eur J Haematol.* 2007;79(4):310–6.
97. Liu B, Zhao H, Poon MC, Han Z, Gu D, Xu M, et al. Abnormality of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* febbraio 2007;78(2):139–43.
98. Sakakura M, Wada H, Tawara I, Nobori T, Sugiyama T, Sagawa N, et al. Reduced Cd4+Cd25+ T cells in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Thromb Res.* 2007;120(2):187–93.
99. Stasi R, Cooper N, Del Poeta G, Stipa E, Laura Evangelista M, Abruzzese E, et al. Analysis of regulatory T-cell changes in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura receiving B cell-depleting therapy with rituximab. *Blood.* 15 agosto 2008;112(4):1147–50.
100. Yu J, Heck S, Patel V, Levan J, Yu Y, Bussel JB, et al. Defective circulating CD25 regulatory T cells in patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 15 agosto 2008;112(4):1325–8.

101. Audia S, Samson M, Guy J, Janikashvili N, Fraszczak J, Trad M, et al. Immunologic effects of rituximab on the human spleen in immune thrombocytopenia. *Blood*. 20 ottobre 2011;118(16):4394–400.
102. Bao W, Bussel JB, Heck S, He W, Karpoff M, Boulad N, et al. Improved regulatory T-cell activity in patients with chronic immune thrombocytopenia treated with thrombopoietic agents. *Blood*. 25 novembre 2010;116(22):4639–45.
103. Li F, Ji L, Wang W, Hua F, Zhan Y, Zou S, et al. Insufficient secretion of IL-10 by Tregs compromised its control on over-activated CD4+ T effector cells in newly diagnosed adult immune thrombocytopenia patients. *Immunol Res*. 1 marzo 2015;61(3):269–80.
104. Sun T, Zhang D, Yang Y, Zhang X, Lv C, Fu R, et al. Interleukin 35 may contribute to the loss of immunological self-tolerance in patients with primary immune thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 2015;169(2):278–85.
105. Olsson B, Ridell B, Carlsson L, Jacobsson S, Wadenvik H. Recruitment of T cells into bone marrow of ITP patients possibly due to elevated expression of VLA-4 and CX3CR1. *Blood*. 15 agosto 2008;112(4):1078–84.
106. Li Z, Mou W, Lu G, Cao J, He X, Pan X, et al. Low-dose rituximab combined with short-term glucocorticoids up-regulates Treg cell levels in patients with immune thrombocytopenia. *Int J Hematol*. 1 gennaio 2011;93(1):91–8.
107. Frenette PS, Pinho S, Lucas D, Scheiermann C. Mesenchymal stem cell: keystone of the hematopoietic stem cell niche and a stepping-stone for regenerative medicine. *Annu Rev Immunol*. 2013;31:285–316.
108. Zhang D, Li H, Ma L, Zhang X, Xue F, Zhou Z, et al. The defective bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with chronic immune thrombocytopenia. *Autoimmunity*. 1 dicembre 2014;47(8):519–29.
109. Pérez-Simón JA, Tabera S, Sarasquete ME, Díez-Campelo M, Canchado J, Sánchez-Abarca LI, et al. Mesenchymal stem cells are functionally abnormal in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Cytotherapy*. 2009;11(6):698–705.
110. Olsson B, Andersson PO, Jernås M, Jacobsson S, Carlsson B, Carlsson LMS, et al. T-cell-mediated cytotoxicity toward platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Nat Med*. settembre 2003;9(9):1123–4.
111. Zhang F, Chu X, Wang L, Zhu Y, Li L, Ma D, et al. Cell-mediated lysis of autologous platelets in chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol*. 2006;76(5):427–31.
112. Olsson B, Jernås M, Wadenvik H. Increased plasma levels of granzymes in adult patients with chronic immune thrombocytopenia. *Thromb Haemost*. giugno 2012;107(06):1182–4.
113. Vrbensky JR, Nazy I, Clare R, Larché M, Arnold DM. T cell-mediated autoimmunity in immune thrombocytopenia. *Eur J Haematol*. 2022;108(1):18–27.

114. Chen X, Oppenheim JJ. Th17 cells and Tregs: unlikely allies. *J Leukoc Biol.* 1 maggio 2014;95(5):723–31.
115. Hu Y, Ma D xin, Shan N ning, Zhu Y yuan, Liu X guang, Zhang L, et al. Increased Number of Tc17 and Correlation with Th17 Cells in Patients with Immune Thrombocytopenia. *PLOS ONE.* 24 ottobre 2011;6(10):e26522.
116. Zhang J, Ma D, Zhu X, Qu X, Ji C, Hou M. Elevated profile of Th17, Th1 and Tc1 cells in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Haematologica.* 1 settembre 2009;94(9):1326–9.
117. Ma D, Zhu X, Zhao P, Zhao C, Li X, Zhu Y, et al. Profile of Th17 cytokines (IL-17, TGF- $\beta$ , IL-6) and Th1 cytokine (IFN- $\gamma$ ) in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Ann Hematol.* 1 novembre 2008;87(11):899–904.
118. Guo ZX, Chen ZP, Zheng CL, Jia HR, Ge J, Gu DS, et al. The role of Th17 cells in adult patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol.* giugno 2009;82(6):488–9.
119. Cao J, Chen C, Zeng L, Li L, Li X, Li Z, et al. Elevated plasma IL-22 levels correlated with Th1 and Th22 cells in patients with immune thrombocytopenia. *Clin Immunol.* 1 ottobre 2011;141(1):121–3.
120. Hu Y, Li H, Zhang L, Shan B, Xu X, Li H, et al. Elevated profiles of Th22 cells and correlations with Th17 cells in patients with immune thrombocytopenia. *Hum Immunol.* 1 giugno 2012;73(6):629–35.
121. Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R, Wolk K. Interleukin-22: A cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1 ottobre 2010;21(5):365–79.
122. Yoshida Y. Historical review. The light and shadow of Paul Kaznelson: his life and contribution to hematology. *Ann Hematol.* novembre 2008;87(11):877–9.
123. Chaturvedi S, Arnold DM, McCrae KR. Splenectomy for immune thrombocytopenia: down but not out. *Blood.* 15 marzo 2018;131(11):1172–82.
124. Tavassoli M, McMillan R. Structure of the Spleen in Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Am J Clin Pathol.* 1 agosto 1975;64(2):180–91.
125. Hayes MM, Jacobs P, Wood L, Dent DM. Splenic pathology in immune thrombocytopenia. *J Clin Pathol.* settembre 1985;38(9):985–8.
126. Daridon C, Loddenkemper C, Spieckermann S, Kühl AA, Salama A, Burmester GR, et al. Splenic proliferative lymphoid nodules distinct from germinal centers are sites of autoantigen stimulation in immune thrombocytopenia. *Blood.* 13 dicembre 2012;120(25):5021–31.
127. Furudoï A, Rivière É, Lazaro E, Furudoï E, Viallard JF, Parrens M. Adult Primary Immune Thrombocytopenia: Spleen Histology Findings and Outcomes According to Rituximab Use Based on Analysis of 41 Cases. *Am J Surg Pathol.* marzo 2018;42(3):401–12.

128. Pizzi M, Friziero A, Vianello F, Binotto G, Da Dalt G, Zoletto S, et al. Histology of the spleen in immune thrombocytopenia: clinical-pathological characterization and prognostic implications. *Eur J Haematol.* febbraio 2021;106(2):281–9.
129. McMillan R, Longmire RL, Tavassoli M, Armstrong S, Yelenosky R. In vitro platelet phagocytosis by splenic leukocytes in idiopathic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 31 gennaio 1974;290(5):249–51.
130. Kuwana M, Kawakami Y, Ikeda Y. Suppression of autoreactive T-cell response to glycoprotein IIb/IIIa by blockade of CD40/CD154 interaction: implications for treatment of immune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 15 gennaio 2003;101(2):621–3.
131. Kuwana M, Okazaki Y, Kaburaki J, Kawakami Y, Ikeda Y. Spleen Is a Primary Site for Activation of Platelet-Reactive T and B Cells in Patients with Immune Thrombocytopenic Purpura. *J Immunol.* 1 aprile 2002;168(7):3675–82.
132. Karpatkin S, Strick N, Siskind GW. Detection of splenic anti-platelet antibody synthesis in idiopathic autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP). *Br J Haematol.* agosto 1972;23(2):167–76.
133. McMillan R, Longmire RL, Yelenosky R, Donnell RL, Armstrong S. Quantitation of Platelet-Binding IgG Produced in Vitro by Splens from Patients with Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *N Engl J Med.* 17 ottobre 1974;291(16):812–7.
134. Kosugi S, Kurata Y, Tomiyama Y, Tahara T, Kato T, Tadokoro S, et al. Circulating thrombopoietin level in chronic immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* giugno 1996;93(3):704–6.
135. McMillan R, Nugent D. The effect of antiplatelet autoantibodies on megakaryocytopoiesis. *Int J Hematol.* febbraio 2005;81(2):94–9.
136. Houwerzijl EJ, Blom NR, van der Want JJJ, Esselink MT, Koornstra JJ, Smit JW, et al. Ultrastructural study shows morphologic features of apoptosis and para-apoptosis in megakaryocytes from patients with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 15 gennaio 2004;103(2):500–6.
137. McMillan R, Wang L, Tomer A, Nichol J, Pistillo J. Suppression of in vitro megakaryocyte production by antiplatelet autoantibodies from adult patients with chronic ITP. *Blood.* 15 febbraio 2004;103(4):1364–9.
138. Li S, Wang L, Zhao C, Li L, Peng J, Hou M. CD8<sup>+</sup> T cells suppress autologous megakaryocyte apoptosis in idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* 2007;139(4):605–11.
139. Rivière É, Viallard JF, Guy A, Kilani B, Vieira-Dias J, Pons AC, et al. Intrinsically impaired platelet production in some patients with persistent or chronic immune thrombocytopenia. *Br J Haematol.* 2015;170(3):408–15.
140. Grimaldi-Bensouda L, Nordon C, Michel M, Viallard JF, Adoue D, Magy-Bertrand N, et al. Immune thrombocytopenia in adults: a prospective cohort study

of clinical features and predictors of outcome. *Haematologica*. 1 settembre 2016;101(9):1039–45.

141. Neunert CE, Buchanan GR, Blanchette V, Barnard D, Young NL, Curtis C, et al. Relationships among bleeding severity, health-related quality of life, and platelet count in children with immune thrombocytopenic purpura. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;53(4):652–4.

142. Neunert CE, Buchanan GR, Imbach P, Bolton-Maggs PHB, Bennett CM, Neufeld E, et al. Bleeding manifestations and management of children with persistent and chronic immune thrombocytopenia: data from the Intercontinental Cooperative ITP Study Group (ICIS). *Blood*. 30 maggio 2013;121(22):4457–62.

143. Imbach P, Kühne T, Müller D, Berchtold W, Zimmerman S, Elalfy M, et al. Childhood ITP: 12 months follow-up data from the prospective registry I of the Intercontinental Childhood ITP Study Group (ICIS). *Pediatr Blood Cancer*. 2006;46(3):351–6.

144. Donato H, Picón A, Martínez M, Rapetti MC, Rosso A, Gomez S, et al. Demographic data, natural history, and prognostic factors of idiopathic thrombocytopenic purpura in children: A multicentered study from Argentina. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;52(4):491–6.

145. Treutiger I, Rajantie J, Zeller B, Henter J, Elinder G, Rosthøj S. Does treatment of newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura reduce morbidity? *Arch Dis Child*. agosto 2007;92(8):704–7.

146. Kühne T, Buchanan GR, Zimmerman S, Michaels LA, Kohan R, Berchtold W, et al. A prospective comparative study of 2540 infants and children with newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP) from the intercontinental childhood ITP study group. *J Pediatr*. novembre 2003;143(5):605–8.

147. Heitink-Pollé KMJ, Nijsten J, Boonacker CWB, de Haas M, Bruin MCA. Clinical and laboratory predictors of chronic immune thrombocytopenia in children: a systematic review and meta-analysis. *Blood*. 20 novembre 2014;124(22):3295–307.

148. Edslev PW, Rosthøj S, Treutiger I, Rajantie J, Zeller B, Jonsson OG, et al. A clinical score predicting a brief and uneventful course of newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura in children. *Br J Haematol*. 2007;138(4):513–6.

149. Bennett CM, Neunert C, Grace RF, Buchanan G, Imbach P, Vesely SK, et al. Predictors of remission in children with newly diagnosed immune thrombocytopenia: Data from the Intercontinental Cooperative ITP Study Group Registry II participants. *Pediatr Blood Cancer*. 2018;65(1):e26736.

150. Zeller B, Rajantie J, Hedlund-Treutiger I, Tedgård U, Wesenberg F, Jonsson OG, et al. Childhood idiopathic thrombocytopenic purpura in the Nordic countries: epidemiology and predictors of chronic disease. *Acta Paediatr Oslo Nor* 1992. febbraio 2005;94(2):178–84.

151. Gill KK, Kelton JG. Management of idiopathic thrombocytopenic purpura in pregnancy. *Semin Hematol.* 1 luglio 2000;37(3):275–89.
152. Care A, Pavord S, Knight M, Alfirevic Z. Severe primary autoimmune thrombocytopenia in pregnancy: a national cohort study. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* aprile 2018;125(5):604–12.
153. Loustau V, Debouverie O, Canoui-Poitrine F, Baili L, Khellaf M, Touboul C, et al. Effect of pregnancy on the course of immune thrombocytopenia: a retrospective study of 118 pregnancies in 82 women. *Br J Haematol.* 2014;166(6):929–35.
154. Kelton JG. Idiopathic thrombocytopenic purpura complicating pregnancy. *Blood Rev.* 1 marzo 2002;16(1):43–6.
155. Provan D. Characteristics of immune thrombocytopenic purpura: a guide for clinical practice. *Eur J Haematol.* 2009;82(s71):8–12.
156. Kistanguri G, McCrae KR. Immune Thrombocytopenia. *Hematol Oncol Clin North Am.* giugno 2013;27(3):495–520.
157. Neunert C, Noroozi N, Norman G, Buchanan GR, Goy J, Nazi I, et al. Severe bleeding events in adults and children with primary immune thrombocytopenia: a systematic review. *J Thromb Haemost.* marzo 2015;13(3):457–64.
158. Bolton-Maggs PH, Moon I. Assessment of UK practice for management of acute childhood idiopathic thrombocytopenic purpura against published guidelines. *Lancet Lond Engl.* 30 agosto 1997;350(9078):620–3.
159. Rosthøj S, Hedlund-Treutiger I, Rajantie J, Zeller B, Jonsson OG, Elinder G, et al. Duration and morbidity of newly diagnosed idiopathic thrombocytopenic purpura in children: a prospective nordic study of an unselected cohort. *J Pediatr.* settembre 2003;143(3):302–7.
160. Neunert CE, Buchanan GR, Imbach P, Bolton-Maggs PHB, Bennett CM, Neufeld EJ, et al. Severe hemorrhage in children with newly diagnosed immune thrombocytopenic purpura. *Blood.* 15 novembre 2008;112(10):4003–8.
161. Arnold DM. Bleeding complications in immune thrombocytopenia. *Hematology.* 5 dicembre 2015;2015(1):237–42.
162. Altomare I, Cetin K, Wetten S, Wasser JS. Rate of bleeding-related episodes in adult patients with primary immune thrombocytopenia: a retrospective cohort study using a large administrative medical claims database in the US. *Clin Epidemiol.* 20 giugno 2016;8:231–9.
163. Rodeghiero F, Michel M, Gernsheimer T, Ruggeri M, Blanchette V, Bussel JB, et al. Standardization of bleeding assessment in immune thrombocytopenia: report from the International Working Group. *Blood.* 4 aprile 2013;121(14):2596–606.

164. McMillan R, Bussel JB, George JN, Lalla D, Nichol JL. Self-reported health-related quality of life in adults with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Am J Hematol.* 2008;83(2):150–4.
165. Buchanan GR, Adix L. Grading of hemorrhage in children with idiopathic thrombocytopenic purpura. *J Pediatr.* novembre 2002;141(5):683–8.
166. Rosthøj S, Rajantie J, Treutiger I, Zeller B, Tedgård U, Henter JI, et al. Duration and morbidity of chronic immune thrombocytopenic purpura in children: five-year follow-up of a Nordic cohort. *Acta Paediatr.* 2012;101(7):761–6.
167. Tsuda H, Tsuji T, Tsuji M, Yamasaki H. Life-threatening bleeding episodes in primary immune thrombocytopenia: a single-center retrospective study of 169 inpatients. *Ann Hematol.* novembre 2017;96(11):1915–20.
168. Piel-Julian ML, Mahévas M, Germain J, Languille L, Comont T, Lapeyre-Mestre M, et al. Risk factors for bleeding, including platelet count threshold, in newly diagnosed immune thrombocytopenia adults. *J Thromb Haemost.* 2018;16(9):1830–42.
169. Cohen YC, Djulbegovic B, Shamaï-Lubovitz O, Mozes B. The Bleeding Risk and Natural History of Idiopathic Thrombocytopenic Purpura in Patients With Persistent Low Platelet Counts. *Arch Intern Med.* 12 giugno 2000;160(11):1630–8.
170. Cortelazzo S, Finazzi G, Buelli M, Molteni A, Viero P, Barbui T. High Risk of Severe Bleeding in Aged Patients With Chronic Idiopathic Thrombocytopenic Purpura. *Blood.* 1 gennaio 1991;77(1):31–3.
171. Psaila B, Petrovic A, Page LK, Menell J, Schonholz M, Bussel JB. Intracranial hemorrhage (ICH) in children with immune thrombocytopenia (ITP): study of 40 cases. *Blood.* 26 novembre 2009;114(23):4777–83.
172. Mithoowani S, Cervi A, Shah N, Ejaz R, Sirotych E, Barty R, et al. Management of major bleeds in patients with immune thrombocytopenia. *J Thromb Haemost.* 2020;18(7):1783–90.
173. Butros LJ, Bussel JB. Intracranial hemorrhage in immune thrombocytopenic purpura: a retrospective analysis. *J Pediatr Hematol Oncol.* agosto 2003;25(8):660–4.
174. Lacey J, Penner J. Management of Idiopathic Thrombocytopenic Purpura in the Adult. *Semin Thromb Hemost.* 15 ottobre 2008;3(03):160–74.
175. Neunert C, Terrell DR, Arnold DM, Buchanan G, Cines DB, Cooper N, et al. American Society of Hematology 2019 guidelines for immune thrombocytopenia. *Blood Adv.* 10 dicembre 2019;3(23):3829–66.
176. Pansy J, Minkov M, Dengg R, Quehenberger F, Lackner H, Nebl A, et al. Evaluating Bleeding Severity in Children with newly Diagnosed Immune Thrombocytopenia: A Pilot Study. *Klin Pädiatr.* novembre 2010;222(6):374–7.
177. Khellaf M, Michel M, Schaeffer A, Bierling P, Godeau B. Assessment of a therapeutic strategy for adults with severe autoimmune thrombocytopenic purpura



based on a bleeding score rather than platelet count. *Haematologica*. giugno 2005;90(6):829–32.

178. Kuter DJ, Bussel JB, Newland A, Baker RI, Lyons RM, Wasser J, et al. Long-term treatment with romiplostim in patients with chronic immune thrombocytopenia: safety and efficacy. *Br J Haematol*. 2013;161(3):411–23.

179. Shirasugi Y, Ando K, Miyazaki K, Tomiyama Y, Okamoto S, Kurokawa M, et al. Romiplostim for the treatment of chronic immune thrombocytopenia in adult Japanese patients: a double-blind, randomized Phase III clinical trial. *Int J Hematol*. luglio 2011;94(1):71–80.

180. Page LK, Psaila B, Provan D, Michael Hamilton J, Jenkins JM, Elish AS, et al. The immune thrombocytopenic purpura (ITP) bleeding score: assessment of bleeding in patients with ITP. *Br J Haematol*. 2007;138(2):245–8.

181. Boulware R, Refaai MA. Why do patients with immune thrombocytopenia (ITP) experience lower bleeding events despite thrombocytopenia? *Thromb Res*. marzo 2020;187:154–8.

182. Rand M, Dean J. Platelet function in autoimmune (idiopathic) thrombocytopenic purpura. *Acta Paediatr*. 1998;87(s424):57–60.

183. van Bladel ER, Laarhoven AG, van der Heijden LB, Heitink-Pollé KM, Porcelijn L, van der Schoot CE, et al. Functional platelet defects in children with severe chronic ITP as tested with 2 novel assays applicable for low platelet counts. *Blood*. 6 marzo 2014;123(10):1556–63.

184. Panzer S, Rieger M, Vormittag R, Eichelberger B, Dunkler D, Pabinger I. Platelet function to estimate the bleeding risk in autoimmune thrombocytopenia. *Eur J Clin Invest*. ottobre 2007;37(10):814–9.

185. Middelburg RA, Carbaat-Ham JC, Hesam H, Ragusi MAAD, Zwaginga JJ. Platelet function in adult ITP patients can be either increased or decreased, compared to healthy controls, and is associated with bleeding risk. *Hematology*. 20 ottobre 2016;21(9):549–51.

186. Tantawy AAG, Matter RM, Hamed AA, Shams El Din El Telbany MA. Platelet microparticles in immune thrombocytopenic purpura in pediatrics. *Pediatr Hematol Oncol*. maggio 2010;27(4):283–96.

187. Jy W, Horstman LL, Arce M, Ahn YS. Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias. *J Lab Clin Med*. aprile 1992;119(4):334–45.

188. Hoemberg M, Stahl D, Schlenke P, Sibrowski W, Pachmann U, Cassens U. The Isotype of Autoantibodies Influences the Phagocytosis of Antibody-Coated Platelets in Autoimmune Thrombocytopenic Purpura. *Scand J Immunol*. 2011;74(5):489–95.

189. Newton JL, Reese JA, Watson SI, Vesely SK, Bolton-Maggs PHB, George JN, et al. Fatigue in adult patients with primary immune thrombocytopenia: Fatigue in ITP. *Eur J Haematol*. maggio 2011;86(5):420–9.

190. Cooper N, Kruse A, Kruse C, Watson S, Morgan M, Provan D, et al. Immune thrombocytopenia (ITP) World Impact Survey (I-WISH): Impact of ITP on health-related quality of life. *Am J Hematol.* 1 febbraio 2021;96(2):199–207.
191. Mathias SD, Bussel JB, George JN, McMillan R, Okano GJ, Nichol JL. A disease-specific measure of health-related quality of life for use in adults with immune thrombocytopenic purpura: its development and validation. *Health Qual Life Outcomes.* 22 febbraio 2007;5:11.
192. Hill QA, Newland AC. Fatigue in immune thrombocytopenia. *Br J Haematol.* luglio 2015;170(2):141–9.
193. Cheng G, Saleh MN, Marcher C, Vasey S, Mayer B, Aivado M, et al. Eltrombopag for management of chronic immune thrombocytopenia (RAISE): a 6-month, randomised, phase 3 study. *The Lancet.* gennaio 2011;377(9763):393–402.
194. Kuter DJ, Mathias SD, Rummel M, Mandanas R, Giagounidis AA, Wang X, et al. Health-related quality of life in nonsplenectomized immune thrombocytopenia patients receiving romiplostim or medical standard of care. *Am J Hematol.* 2012;87(5):558–61.
195. Viana R, D'Alessio D, Grant L, Cooper N, Arnold D, Morgan M, et al. Psychometric Evaluation of ITP Life Quality Index (ILQI) in a Global Survey of Patients with Immune Thrombocytopenia. *Adv Ther.* 2021;38(12):5791–808.
196. Flores A, Klaassen RJ, Buchanan GR, Neunert CE. Patterns and influences in health-related quality of life in children with immune thrombocytopenia: A study from the Dallas ITP Cohort. *Pediatr Blood Cancer.* agosto 2017;64(8).
197. Zhang H, Wang L, Quan M, Huang J, Wu P, Lu Q, et al. Health-related quality of life in children with chronic immune thrombocytopenia in China. *Health Qual Life Outcomes.* 15 marzo 2016;14:45.
198. Mathias SD, Li X, Eisen M, Carpenter N, Crosby RD, Blanchette VS. A Phase 3, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study to Determine the Effect of Romiplostim on Health-Related Quality of Life in Children with Primary Immune Thrombocytopenia and Associated Burden in Their Parents. *Pediatr Blood Cancer.* luglio 2016;63(7):1232–7.
199. George JN, Mathias SD, Go RS, Guo M, Henry DH, Lyons R, et al. Improved quality of life for romiplostim-treated patients with chronic immune thrombocytopenic purpura: results from two randomized, placebo-controlled trials. *Br J Haematol.* febbraio 2009;144(3):409–15.
200. Provan D, Arnold DM, Bussel JB, Chong BH, Cooper N, Gernsheimer T, et al. Updated international consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood Adv.* 26 novembre 2019;3(22):3780–817.
201. Nørgaard M. Thrombosis in patients with primary chronic immune thrombocytopenia. *Thromb Res.* ottobre 2012;130:S74–5.

202. Langeberg WJ, Schoonen WM, Eisen M, Gamelin L, Stryker S. Thromboembolism in patients with immune thrombocytopenia (ITP): a meta-analysis of observational studies. *Int J Hematol.* giugno 2016;103(6):655–64.
203. Severinsen MT, Engebjerg MC, Farkas DK, Jensen AØ, Nørgaard M, Zhao S, et al. Risk of venous thromboembolism in patients with primary chronic immune thrombocytopenia: a Danish population-based cohort study. *Br J Haematol.* 2011;152(3):360–2.
204. Nørgaard M, Severinsen MT, Lund Mæggbæk M, Jensen AØ, Cha S, Sørensen HT. Risk of arterial thrombosis in patients with primary chronic immune thrombocytopenia: a Danish population-based cohort study. *Br J Haematol.* 2012;159(1):109–11.
205. Enger C, Bennett D, Forssen U, Fogarty PF, McAfee AT. Comorbidities in patients with persistent or chronic immune thrombocytopenia. *Int J Hematol.* settembre 2010;92(2):289–95.
206. Sarpatwari A, Bennett D, Logie JW, Shukla A, Beach KJ, Newland AC, et al. Thromboembolic events among adult patients with primary immune thrombocytopenia in the United Kingdom General Practice Research Database. *Haematologica.* luglio 2010;95(7):1167–75.
207. Tan Y, Yan M, Cheng Z, Pan X. Pulmonary Thromboembolism in Immune Thrombocytopenia: A Report of Five Cases and a Review of the Literature. *Int J Gen Med.* 13 agosto 2021;14:4479–83.
208. Guo Y, Tian X, Wang X, Xiao Z. Adverse Effects of Immunoglobulin Therapy. *Front Immunol.* 2018;9:1299.
209. Orsi FA, Lijfering WM, Geersing G, Rosendaal FR, Dekkers OM, le Cessie S, et al. Glucocorticoid use and risk of first and recurrent venous thromboembolism: self-controlled case-series and cohort study. *Br J Haematol.* giugno 2021;193(6):1194–202.
210. Alvarado RG, Liu JY, Zwolak RM. Danazol and limb-threatening arterial thrombosis: Two case reports. *J Vasc Surg.* 1 dicembre 2001;34(6):1123–6.
211. Thai LH, Mahévas M, Roudot-Thoraval F, Limal N, Languille L, Dumas G, et al. Long-term complications of splenectomy in adult immune thrombocytopenia. *Medicine (Baltimore).* 2 dicembre 2016;95(48):e5098.
212. Thomsen RW, Schoonen WM, Farkas DK, Riis A, Fryzek JP, Sørensen HT. Risk of venous thromboembolism in splenectomized patients compared with the general population and appendectomized patients: a 10-year nationwide cohort study. *J Thromb Haemost.* 2010;8(6):1413–6.
213. Tjepkema M, Amini S, Schipperus M. Risk of thrombosis with thrombopoietin receptor agonists for ITP patients: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* marzo 2022;171:103581.

214. Frederiksen H, Christiansen CF, Nørgaard M. Risk and prognosis of adult primary immune thrombocytopenia. *Expert Rev Hematol.* gennaio 2012;5(2):219–28.
215. Frederiksen H, Maegbaek ML, Nørgaard M. Twenty-year mortality of adult patients with primary immune thrombocytopenia: a Danish population-based cohort study. *Br J Haematol.* luglio 2014;166(2):260–7.
216. Portielje JEA, Westendorp RGJ, Kluin-Nelemans HC, Brand A. Morbidity and mortality in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 1 maggio 2001;97(9):2549–54.
217. Sandal R, Mishra K, Jandial A, Sahu KK, Siddiqui AD. Update on diagnosis and treatment of immune thrombocytopenia. *Expert Rev Clin Pharmacol.* maggio 2021;14(5):553–68.
218. Lo E, Deane S. Diagnosis and classification of immune-mediated thrombocytopenia. *Autoimmun Rev.* 1 aprile 2014;13(4):577–83.
219. George JN, Arnold DM. Immune thrombocytopenia (ITP) in adults: Clinical manifestations and diagnosis.
220. R S, A S, Jb S, J O, Ml E, N C, et al. Effects of eradication of *Helicobacter pylori* infection in patients with immune thrombocytopenic purpura: a systematic review. *Blood.* 2 maggio 2009;113(6).
221. Moulis G, Germain J, Comont T, Brun N, Dingremont C, Castel B, et al. Newly diagnosed immune thrombocytopenia adults: Clinical epidemiology, exposure to treatments, and evolution. Results of the CARMEN multicenter prospective cohort. *Am J Hematol.* 2017;92(6):493–500.
222. Khan AM, Mydra H, Nevarez A. Clinical Practice Updates in the Management Of Immune Thrombocytopenia. *P T Peer-Rev J Formul Manag.* dicembre 2017;42(12):756–63.
223. Ling Y, Cao X, Yu Z, Ruan C. Circulating dendritic cells subsets and CD4+Foxp3+ regulatory T cells in adult patients with chronic ITP before and after treatment with high-dose dexamethasone. *Eur J Haematol.* ottobre 2007;79(4):310–6.
224. Li J, Wang Z, Hu S, Zhao X, Cao L. Correction of abnormal T cell subsets by high-dose dexamethasone in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Immunol Lett.* 2013;154(1–2):42–8.
225. Guo X hong, Zhao F, Shi W, Ma X min, Xu Q, Patiguli A bu li zi, et al. [Detection and clinical significance of Th1/Th2 cytokines in patients with idiopathic thrombocytopenic purpura]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi Chin J Cell Mol Immunol.* novembre 2012;28(11):1185–7.
226. Bhorja P, Sharma S, Varma N, Malhotra P, Varma S, Luthra-Guptasarma M. Effect of steroids on the activation status of platelets in patients with Immune thrombocytopenia (ITP). *Platelets.* 17 febbraio 2015;26(2):119–26.

227. Kitchens CS. Amelioration of Endothelial Abnormalities by Prednisone in Experimental Thrombocytopenia in the Rabbit. *J Clin Invest.* novembre 1977;60(5):1129–34.
228. Wei Y, Ji X bin, Wang Y wen, Wang J xia, Yang E qin, Wang Z cheng, et al. High-dose dexamethasone vs prednisone for treatment of adult immune thrombocytopenia: a prospective multicenter randomized trial. *Blood.* 21 gennaio 2016;127(3):296–302.
229. Cheng Y, Wong RSM, Soo YOY, Chui CH, Lau FY, Chan NPH, et al. Initial Treatment of Immune Thrombocytopenic Purpura with High-Dose Dexamethasone. *N Engl J Med.* 28 agosto 2003;349(9):831–6.
230. Mithoowani S, Gregory-Miller K, Goy J, Miller MC, Wang G, Noroozi N, et al. High-dose dexamethasone compared with prednisone for previously untreated primary immune thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Haematol.* ottobre 2016;3(10):e489–96.
231. Kovaleva L, Apte S, Damodar S, Ramanan V, Loriya S, Navarro-Puerto J, et al. Safety and efficacy of a 10% intravenous immunoglobulin preparation in patients with immune thrombocytopenic purpura: results of two international, multicenter studies. *Immunotherapy.* dicembre 2016;8(12):1371–81.
232. Robak T, Mainau C, Pyringer B, Chojnowski K, Warzocha K, Dmoszynska A, et al. Efficacy and safety of a new intravenous immunoglobulin 10% formulation (octagam® 10%) in patients with immune thrombocytopenia. *Hematol Amst Neth.* ottobre 2010;15(5):351–9.
233. Robak T, Salama A, Kovaleva L, Vyhovska Y, Davies SV, Mazzucconi MG, et al. Efficacy and safety of Privigen, a novel liquid intravenous immunoglobulin formulation, in adolescent and adult patients with chronic immune thrombocytopenic purpura. *Hematol Amst Neth.* agosto 2009;14(4):227–36.
234. Naithani R, Kumar R, Mahapatra M, Tyagi S, Saxena R. Efficacy and safety of anti-D for treatment of adults with immune thrombocytopenia. *Platelets.* novembre 2009;20(7):525–7.
235. Scaradavou A, Woo B, Woloski BM, Cunningham-Rundles S, Ettinger LJ, Aledort LM, et al. Intravenous anti-D treatment of immune thrombocytopenic purpura: experience in 272 patients. *Blood.* 15 aprile 1997;89(8):2689–700.
236. Clynes R. Immune complexes as therapy for autoimmunity. *J Clin Invest.* gennaio 2005;115(1):25–7.
237. Nagelkerke SQ, Kuijpers TW. Immunomodulation by IVIg and the Role of Fc-Gamma Receptors: Classic Mechanisms of Action after all? *Front Immunol.* 2014;5:674.
238. Gilardin L, Bayry J, Kaveri SV. Intravenous immunoglobulin as clinical immune-modulating therapy. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can.* 3 marzo 2015;187(4):257–64.

239. Salama A, Kiefel V, Amberg R, Mueller-Eckhardt C. Treatment of autoimmune thrombocytopenic purpura with rhesus antibodies (anti-Rh0(D)). *Blut*. luglio 1984;49(1):29–35.
240. Song S, Crow AR, Siragam V, Freedman J, Lazarus AH. Monoclonal antibodies that mimic the action of anti-D in the amelioration of murine ITP act by a mechanism distinct from that of IVIg. *Blood*. 15 febbraio 2005;105(4):1546–8.
241. Gaines AR. Disseminated intravascular coagulation associated with acute hemoglobinemia or hemoglobinuria following Rh(0)(D) immune globulin intravenous administration for immune thrombocytopenic purpura. *Blood*. 1 settembre 2005;106(5):1532–7.
242. Ghanima W, Cooper N, Rodeghiero F, Godeau B, Bussel JB. Thrombopoietin receptor agonists: ten years later. *Haematologica*. 1 giugno 2019;104(6):1112–23.
243. Liu X guang, Liu S, Feng Q, Liu X na, Li G sheng, Sheng Z, et al. Thrombopoietin receptor agonists shift the balance of Fcγ receptors toward inhibitory receptor IIb on monocytes in ITP. *Blood*. 11 agosto 2016;128(6):852–61.
244. Pizzi M, Vianello F, Binotto G, Vianelli N, Carli G, Auteri G, et al. Thrombopoietin receptor agonists increase splenic regulatory T-cell numbers in immune thrombocytopenia. *Br J Haematol*. settembre 2022;198(5):916–22.
245. Wong RSM, Saleh MN, Khelif A, Salama A, Portella MSO, Burgess P, et al. Safety and efficacy of long-term treatment of chronic/persistent ITP with eltrombopag: final results of the EXTEND study. *Blood*. 7 dicembre 2017;130(23):2527–36.
246. Červinek L, Mayer J, Doubek M. Sustained remission of chronic immune thrombocytopenia after discontinuation of treatment with thrombopoietin-receptor agonists in adults. *Int J Hematol*. luglio 2015;102(1):7–11.
247. González-López TJ, Pascual C, Álvarez-Román MT, Fernández-Fuertes F, Sánchez-González B, Caparrós I, et al. Successful discontinuation of eltrombopag after complete remission in patients with primary immune thrombocytopenia. *Am J Hematol*. marzo 2015;90(3):E40–43.
248. Glennie MJ, French RR, Cragg MS, Taylor RP. Mechanisms of killing by anti-CD20 monoclonal antibodies. *Mol Immunol*. 1 settembre 2007;44(16):3823–37.
249. Perosa F, Prete M, Racanelli V, Dammacco F. CD20-depleting therapy in autoimmune diseases: from basic research to the clinic. *J Intern Med*. 2010;267(3):260–77.
250. Audia S, Rossato M, Trad M, Samson M, Santegoets K, Gautheron A, et al. B cell depleting therapy regulates splenic and circulating T follicular helper cells in immune thrombocytopenia. *J Autoimmun*. 1 febbraio 2017;77:89–95.

251. Marangon M, Vianelli N, Palandri F, Mazzucconi MG, Santoro C, Barcellini W, et al. Rituximab in immune thrombocytopenia: gender, age, and response as predictors of long-term response. *Eur J Haematol.* 2017;98(4):371–7.
252. Chugh S, Darvish-Kazem S, Lim W, Crowther MA, Ghanima W, Wang G, et al. Rituximab plus standard of care for treatment of primary immune thrombocytopenia: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Haematol.* febbraio 2015;2(2):e75-81.
253. Patel VL, Mahévas M, Lee SY, Stasi R, Cunningham-Rundles S, Godeau B, et al. Outcomes 5 years after response to rituximab therapy in children and adults with immune thrombocytopenia. *Blood.* 21 giugno 2012;119(25):5989–95.
254. Deshayes S, Khellaf M, Zarour A, Layese R, Fain O, Terriou L, et al. Long-term safety and efficacy of rituximab in 248 adults with immune thrombocytopenia: Results at 5 years from the French prospective registry ITP-ritux. *Am J Hematol.* dicembre 2019;94(12):1314–24.
255. Yu TS, Wang HY, Zhao YJ, Yu YF, Hou Y, Liu S, et al. Abnormalities of bone marrow B cells and plasma cells in primary immune thrombocytopenia. *Blood Adv.* 26 ottobre 2021;5(20):4087–101.
256. Bussel J, Arnold DM, Grossbard E, Mayer J, Trelinski J, Homenda W, et al. Fostamatinib for the treatment of adult persistent and chronic immune thrombocytopenia: Results of two phase 3, randomized, placebo-controlled trials. *Am J Hematol.* luglio 2018;93(7):921–30.
257. Bussel JB, Arnold DM, Boxer MA, Cooper N, Mayer J, Zayed H, et al. Long-term fostamatinib treatment of adults with immune thrombocytopenia during the phase 3 clinical trial program. *Am J Hematol.* maggio 2019;94(5):546–53.
258. Paik J. Fostamatinib: A Review in Chronic Immune Thrombocytopenia. *Drugs.* giugno 2021;81(8):935–43.
259. Skinner M, Philp K, Lengel D, Coverley L, Lamm Bergström E, Glaves P, et al. The contribution of VEGF signalling to fostamatinib-induced blood pressure elevation. *Br J Pharmacol.* maggio 2014;171(9):2308–20.
260. Robak T, Kaźmierczak M, Jarque I, Musteata V, Trelinski J, Cooper N, et al. Phase 2 multiple-dose study of an FcRn inhibitor, rozanolixizumab, in patients with primary immune thrombocytopenia. *Blood Adv.* 8 settembre 2020;4(17):4136–46.
261. Newland AC, Sánchez-González B, Rejtő L, Egyed M, Romanyuk N, Godar M, et al. Phase 2 study of efgartigimod, a novel FcRn antagonist, in adult patients with primary immune thrombocytopenia. *Am J Hematol.* 2020;95(2):178–87.
262. Kuter DJ, Efraim M, Mayer J, Trněný M, McDonald V, Bird R, et al. Rilzabrutinib, an Oral BTK Inhibitor, in Immune Thrombocytopenia. *N Engl J Med.* 14 aprile 2022;386(15):1421–31.

263. Broome CM, Röth A, Kuter DJ, Scully M, Smith R, Wang J, et al. Long-Term Safety and Efficacy of Sutimlimab in Patients with Chronic Immune Thrombocytopenia. *Blood*. 5 novembre 2020;136:14–5.
264. Crickx E, Audia S, Robbins A, Boutboul D, Comont T, Cheminant M, et al. Daratumumab, an original approach for treating multi-refractory autoimmune cytopenia. *Haematologica*. 5 agosto 2021;106(12):3198–201.
265. Wang Y, Zhang J, Su Y, Wang C, Zhang G, Liu X, et al. miRNA-98-5p Targeting IGF2BP1 Induces Mesenchymal Stem Cell Apoptosis by Modulating PI3K/Akt and p53 in Immune Thrombocytopenia. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 5 giugno 2020;20:764–76.
266. Feng Y, Xiao Y, Yan H, Wang P, Zhu W, Cassady K, et al. Sirolimus as Rescue Therapy for Refractory/Relapsed Immune Thrombocytopenia: Results of a Single-Center, Prospective, Single-Arm Study. *Front Med*. 2020;7.
267. Jansen AJG, Peng J, Zhao HG, Hou M, Ni H. Sialidase inhibition to increase platelet counts: A new treatment option for thrombocytopenia. *Am J Hematol*. 2015;90(5):E94–5.
268. Mahévas M, Azzaoui I, Crickx E, Canoui-Poitrine F, Gobert D, Languille L, et al. Efficacy, safety and immunological profile of combining rituximab with belimumab for adults with persistent or chronic immune thrombocytopenia: results from a prospective phase 2b trial. *Haematologica*. 1 set. 2021;106(9):2449–57.
269. Chater C, Terriou L, Duhamel A, Launay D, Chambon JP, Pruvot FR, et al. Reemergence of Splenectomy for ITP Second-line Treatment? *Ann Surg*. novembre 2016;264(5):772–7.
270. Vianelli N, Palandri F, Polverelli N, Stasi R, Joelsson J, Johansson E, et al. Splenectomy as a curative treatment for immune thrombocytopenia: a retrospective analysis of 233 patients with a minimum follow up of 10 years. *Haematologica*. giugno 2013;98(6):875–80.
271. Vikse J, Sanna B, Henry BM, Tattera D, Sanna S, Pękala PA, et al. The prevalence and morphometry of an accessory spleen: A meta-analysis and systematic review of 22,487 patients. *Int J Surg*. 1 settembre 2017;45:18–28.
272. Pizzi M, Vianello F, Lorenzi L, Binotto G, Sbaraglia M, Scarmozzino F, et al. Accessory spleens recapitulate the immune microenvironment of the main spleen in immune thrombocytopenia. *Br J Haematol*. 14 marzo 2023;
273. Navez J, Hubert C, Gigot JF, Navez B, Lambert C, Jamar F, et al. Does the site of platelet sequestration predict the response to splenectomy in adult patients with immune thrombocytopenic purpura? *Platelets*. 18 agosto 2015;26(6):573–6.
274. Kao NL. Positive predictive values of imaging studies used before accessory splenectomy. *Am J Hematol*. 2001;66(4):307–307.
275. Palandri F, Polverelli N, Sollazzo D, Romano M, Catani L, Cavo M, et al. Have splenectomy rate and main outcomes of ITP changed after the introduction of



new treatments? A monocentric study in the outpatient setting during 35 years. *Am J Hematol.* giugno 2016;91(4):E267-272.

276. Kojouri K, Vesely SK, Terrell DR, George JN. Splenectomy for adult patients with idiopathic thrombocytopenic purpura: a systematic review to assess long-term platelet count responses, prediction of response, and surgical complications. *Blood.* 1 novembre 2004;104(9):2623–34.

277. Habermalz B, Sauerland S, Decker G, Delaitre B, Gigot JF, Leandros E, et al. Laparoscopic splenectomy: the clinical practice guidelines of the European Association for Endoscopic Surgery. *Surg Endosc.* aprile 2008;22(4):821–48.

278. Nazi I, Kelton JG, Larché M, Snider DP, Heddle NM, Crowther MA, et al. The effect of rituximab on vaccine responses in patients with immune thrombocytopenia. *Blood.* 12 settembre 2013;122(11):1946–53.

279. Tada K, Ohta M, Saga K, Takayama H, Hirashita T, Endo Y, et al. Long-term outcomes of laparoscopic versus open splenectomy for immune thrombocytopenia. *Surg Today.* 1 febbraio 2018;48(2):180–5.

280. Park YH, Yi HG, Kim CS, Hong J, Park J, Lee JH, et al. Clinical Outcome and Predictive Factors in the Response to Splenectomy in Elderly Patients with Primary Immune Thrombocytopenia: A Multicenter Retrospective Study. *Acta Haematol.* 2016;135(3):162–71.

281. Kuwana M, Iki S, Urabe A. The role of autoantibody-producing plasma cells in immune thrombocytopenic purpura refractory to rituximab. *Am J Hematol.* settembre 2007;82(9):846–8.

282. Najean Y, Rain JD, Billotey C. The site of destruction of autologous <sup>111</sup>In-labelled platelets and the efficiency of splenectomy in children and adults with idiopathic thrombocytopenic purpura: a study of 578 patients with 268 splenectomies. *Br J Haematol.* giugno 1997;97(3):547–50.

283. McMillan R, Durette C. Long-term outcomes in adults with chronic ITP after splenectomy failure. *Blood.* 15 agosto 2004;104(4):956–60.

284. Juliá A, Araguás C, Rosselló J, Bueno J, Domenech P, Olona M, et al. Lack of useful clinical predictors of response to splenectomy in patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol.* ottobre 1990;76(2):250–5.

285. Amini SN, Nelson VS, Sobels A, Schoones JW, Zwaginga JJ, Schipperus MR. Autologous platelet scintigraphy and clinical outcome of splenectomy in immune thrombocytopenia: A systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1 settembre 2020;153:103040.

286. Recommended method for indium-111 platelet survival studies. International Committee for Standardization in Hematology. Panel on Diagnostic Applications of Radionuclides. *J Nucl Med Off Publ Soc Nucl Med.* aprile 1988;29(4).

287. World Medical Association. World Medical Association Declaration of Helsinki: Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. *JAMA.* 27 novembre 2013;310(20):2191–4.