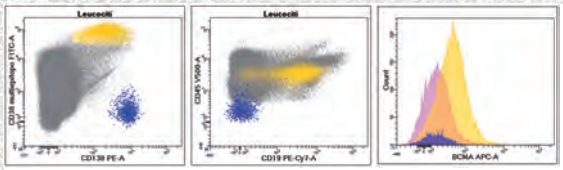
Vol. 34, Num. 2, 2025

LETTERE GIC

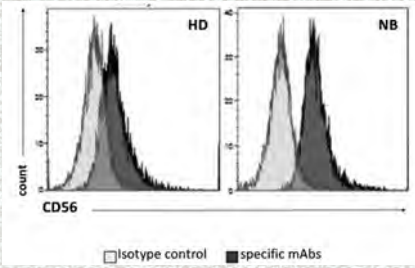
Periodico della Società Italiana di Citometria

Poste italiane spa spedizione in abbonamento postale 70% Roma AUT MP-AT/C/RM/

Interferenze dell'immunoterapia nella diagnosi citofluorimetrica delle malattie ematologiche: focus su linfomi a cellule B e mieloma multiplo



La citofluorimetria come strumento per studiare le proprietà immunomodulatorie di vescicole extracellulari isolate dal midollo osseo di pazienti con neuroblastoma



44ª CONFERENZA DI CITOMETRIA
SCUOLA DI CITOMETRIA
CORSI TEORICO-PRATICI DI FORMAZIONE E AGGIORNAMENTO
LA CITOMETRIA: ANALISI GESTIONE DEI DATI E LORO INTERPRETAZIONE

7 maggio-4 giugno 2026 in Web Live Streaming
10-12 giugno 2026 Residenziale
Biotecnologie - Università degli Studi di Napoli - Federico II

PROGRAMMA PRELIMINARE

Società Italiana di Citometria

44ª CONFERENZA DI CITOMETRIA

SCUOLA DI CITOMETRIA

CORSI TEORICO-PRATICI DI FORMAZIONE E AGGIORNAMENTO

LA CITOMETRIA: ANALISI GESTIONE DEI DATI E LORO INTERPRETAZIONE

7 maggio - 4 giugno 2026 Web Live Streaming

10-12 giugno 2026 Residenziale
Auditorium Biotecnologie
Università degli Studi di Napoli Federico II

Direttore della Scuola
Giuliano Mazzini (*Pavia*)

Comitato Scientifico e Organizzatore
Rosa Chianese (*Varese*)
Raffaele De Vita (*Roma*)
Stefania Loffredo (*Napoli*)
Giulia Scalia (*Napoli*)

SESSIONI PLENARIE COMUNI A TUTTI I CORSI
Web Live Streaming

Giovedì 7 maggio 14:30 - 17:30
Sessione di Apertura Multidisciplinare di Citometria

Martedì 19 maggio 14:30 - 17:30
Sessione Multidisciplinare di Citometria

Giovedì 4 giugno 14:30 - 17:30
Sessione Multidisciplinare di Citometria

CB CORSO BASE DI CITOMETRIA: DAI FONDAMENTI ALL'ANALISI DEI CAMPIONI
Coordinatori: N. Panini (Milano), C. Pioli (Roma)

Lunedì 11 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Modulo 1 Principi di Base, Strumentazione e Reagenti

Lunedì 25 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Modulo 2 Dalla preparazione all'analisi del campione passando dallo strumento

Giovedì 11 giugno 09:00-13:00 (in presenza)
Modulo 3 Esempi e problematiche specifiche in diversi Campi Applicativi

Giovedì 11 giugno 14:00-17:30 (in presenza)
Modulo 4 Didattica interattiva ed esercitazioni con Giovani Citometristi

C1 LA CITOMETRIA IN EMATOLOGIA: NUOVE SFIDE DELLA CITOMETRIA CLINICA IN AMBITO EMATOLOGICO NELL'ERA DELLE TERAPIE AVANZATE
Coordinatori: G. Coppola (Salerno), G. Scalia (Napoli)

Martedì 12 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Modulo 1 Rilevanza della Citometria a flusso quantitativa in ambito ematologico clinico

Martedì 26 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Modulo 2 Ruolo ed evoluzione della Citometria a flusso nel campo delle Leucemie Acute Mieloidi

Giovedì 11 giugno 09:00-13:00 (in presenza)
Modulo 3 Ruolo ed evoluzione della Citometria a flusso nel campo delle terapie avanzate

Giovedì 11 giugno 14:00-17:30 (in presenza)
Modulo 4 Stato dell'arte ed evoluzione della Citometria a flusso nell'ambito delle malattie linfoproliferative croniche

C2 LA CITOMETRIA IN IMMUNOLOGIA CITOMETRIA E IMMUNITÀ: DALLA FENOTIPIZZAZIONE AGLI STUDI FUNZIONALI
Coordinatori: A. Battaglia (Roma), D. Fenoglio (Genova)

Mercoledì 13 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Modulo 1 Caratterizzazione delle cellule regolatorie linfoidi

Mercoledì 27 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Modulo 2 "Exhaustion" e senescenza delle cellule linfoidi

Giovedì 11 giugno 09:00-13:00 (in presenza)
Modulo 3 Immunoterapia dei tumori: ruolo del monitoraggio nella medicina di precisione

Giovedì 11 giugno 14:00-17:30 (in presenza)
Modulo 4 La Citometria a flusso nel monitoraggio delle patologie infettive e autoimmuni

C3 LA CITOMETRIA IN ONCOLOGIA: CITOMETRIA FUNZIONALE COME STRUMENTO INTEGRATO PER APPLICAZIONI TERAPEUTICHE
Coordinatori: I. D'Agnano (Milano), V. Tirino (Napoli)

Giovedì 14 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Modulo 1 Citometria avanzata: strategie di sorting nello studio dell'eterogeneità dei tumori

Giovedì 28 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Modulo 2 Proliferazione e morte cellulare: lo yin e lo yang del ciclo vitale della cellula

Giovedì 11 giugno 09:00-13:00 (in presenza)
Modulo 3 Approcci citometrici avanzati nello studio di organelli e nanoparticelle nel targeting terapeutico e nella terapia farmacologica

Giovedì 11 giugno 14:00-17:30 (in presenza)
Modulo 4 Il microambiente sotto la lente della citometria: dall'analisi cellulare alla clinica

C4 CITOMETRIA AMBIENTALE: LA CITOMETRIA PER LE NUOVE SFIDE AMBIENTALI
Coordinatori: S. Amalfitano (Roma), R. Casotti (Napoli)

Venerdì 15 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Modulo 1 Citometria e la biodiversità

Venerdì 29 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Modulo 2 Citometria e approcci biotecnologici

Giovedì 11 giugno 09:00-13:00 (in presenza)
Modulo 3 Citometria ambientale: dalla teoria alla pratica

Giovedì 11 giugno 14:00-17:30 (in presenza)
Modulo 4 Citometria ambientale: dalla teoria alla pratica

- I Corsi sono a numero chiuso e si svolgono in parallelo;
- Le Sessioni Web Live Streaming si svolgeranno in orari pomeridiani su piattaforma PROEVENTI FAD www.proeventifad.it//
- Ulteriori informazioni e iscrizioni nel sito: http://www.conferenzadicitometriagic.it//

Segreteria Scientifica
Società Italiana di Citometria
associazione scientifica senza fini di lucro
iscritta nell'Elenco delle Società Medico Scientifiche del Ministero della Salute
c/o Divisione Biotecnologie
ENEA Centro Ricerche Casaccia s.p. 016
Via Anguillarese, 301 - 00123 Roma
tel. 06 30484671
e-mail: gic@citometriagic.it
http://www.citometriagic.i

Segreteria Organizzativa
ProEventi Srl
Viale Matteotti 36, 71016, San Severo
tel: 0882 242151
e-maill: citometriagic@proeventi.it
www.proeventi.it

Società Italiana di Citometria

PREMIO DI STUDIO
"Luigi Del Vecchio"
La Citometria nelle tesi sperimentali
40ª Edizione 2026

La Società Italiana di Citometria, allo scopo di promuovere la ricerca nel campo della Citometria, indice un concorso per l'assegnazione di Premi di Studio a:

- **2 Tesi di Laurea sperimentale** su argomenti di rilevanza applicativa e di base della Citometria;
- **1 Tesi di Specializzazione o di Dottorato** su argomenti di rilevanza applicativa e di base della Citometria.

I premi consistono in una borsa di partecipazione alla **44ª Conferenza e Scuola di Citometria** "La Citometria: analisi, gestione dei dati e loro interpretazione", **7 maggio – 4 giugno 2026** in Web Live Streaming, **10-12 giugno 2026** Residenziale, presso Biotecnologie - Università degli Studi di Napoli Federico II.

I Vincitori saranno ospiti del GIC, dove presenteranno una sintesi del loro Lavoro nella forma di poster e invitati a presentare un articolo per la Rivista di Citometria Peer Review "Lettere GIC"
.

Modalità di partecipazione
La domanda dovrà pervenire entro il **15 aprile 2026** alla Segreteria della Società Italiana di Citometria, all'indirizzo e-mail: gic@citometriagic.it, specificando: nome, cognome, indirizzo, recapiti telefonici ed e-mail personali e del laboratorio, e l'impegno a citare il Premio, nell'Articolo che sarà pubblicato.

Alla domanda dovrà essere allegata:
- Un file con la Tesi in originale, **discussa tra il 1 gennaio 2025 e il 15 aprile 2026** e firmata dal Candidato e dal Relatore, completa in tutte le sue parti, in un unico file, in formato pdf, ed un certificato di laurea in carta semplice o copia conforme all'originale, in formato pdf.

Il Segretario
Raffaele De Vita

Il Presidente
Rosa Chianese

Per informazioni:
Società Italiana di Citometria
associazione scientifica senza fini di lucro
iscritta nell'Elenco delle Società Medico Scientifiche del Ministero della Salute
c/o Divisione Biotecnologie - ENEA Centro Ricerche Casaccia s.p. 016
Via Anguillarese, 301 - 00123 Roma - tel: 06 30484671
e-mail: gic@citometriagic.it - http://www.citometriagic.it

Con il patrocinio di:

ENEA
Agenzia nazionale per le nuove tecnologie, l'energia e lo sviluppo economico sostenibile

IMMUNOLOGICAL SCIENCES

Flow Cytometry
Anti-Mouse Antibodies

Catalogue 2026

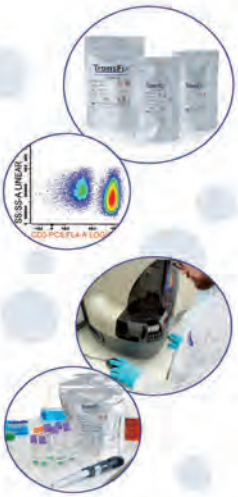
www.immunologicalsciences.com

CALTAG
Accuracy for Flow Cytometry

TransFix®

A Cellular Antigen Stabilisation Reagent

TransFix® is a stabilisation reagent that preserves cellular surface antigens and prevents cellular degradation in a variety of specimen types for flow cytometric analysis.



Blood Collection

TransFix®/EDTA Vacuum Blood Collection Tubes (TVT)
3 and 9 mL direct draw collection tubes prefilled with sufficient TransFix® and K_3EDTA for the stabilisation and anticoagulation of blood at the point of collection and for up to 14 days.

Cerebrospinal Fluid

TransFix® CSF Sample Storage Tubes
Sample storage tubes optimised to stabilise CSF for up to 3 days. Two formats available, small (for 0.25 – 1 mL samples) and large (for 1 - 4 mL samples).

Circulating Tumour Cells

Circulating Tumour Cell TransFix®/ EDTA Vacuum Blood Collection Tubes
Blood collection tubes prefilled with sufficient TransFix® for the collection and stabilisation of circulating tumour cells in a final draw volume of 9 mL.

Sample Storage

TransFix® Sample Storage Tubes
Sample storage tubes for stabilising 1 mL of sample. These tubes do not contain an anti-coagulant, allowing the stabilisation of blood collected with an anticoagulant other than EDTA.

REGULATORY STATUS
TransFix®, TVTs and CSF products are registered IVD devices in the UK, EU and many other territories around the world.

Why Stabilise Samples?

Once cells are taken from the body, they undergo apoptosis and enzymatic degradation which diminishes cell numbers and distorts the true immunophenotype of the specimen. Over time, cell sub-populations in aged samples become indistinguishable, rendering the sample unsuitable for flow cytometric analysis. Stabilising your samples with TransFix® allows you to maintain the immunophenotype of the cells for longer.

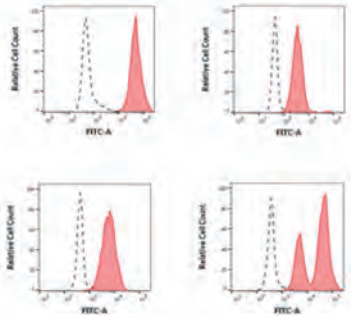
www.sichim.com

exbio

FagoFlowEx Kit

Cat.# ED7042 **CE-IVD**

The FagoFlowEx Kit is intended for examination of phagocytic activity of neutrophil granulocytes by measuring the respiratory (oxidative) burst after their stimulation with *E. coli* bacteria in human heparinized whole blood using flow cytometry.



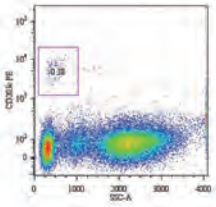
www.sichim.com

exbio

BasoFlowEx Kit

Cat.# ED7043 **CE-IVD**

The BasoFlowEx Kit is intended for flow cytometry examination of IgE-mediated allergic reactions via analysis of CD63 antigen exposition on basophils in human heparinized whole blood upon allergen stimulation.



Delimitation of basophil population (CD203cpos / SSClow).

www.sichim.com

SIC SOCIETÀ ITALIANA CHIMICI
Life Sciences

Via Rio nell'Elba, 140 – Rome / ITALY
Phone +39 06-8818936 / 8800211 – Fax +39 06-8815319
Email info@sichim.com Web-Site www.sichim.com

Periodico della Società Italiana di Citometria

LETTERE GIC

Vol. 34, Num. 2, 2025

DIRETTORE RESPONSABILE
DIRETTORE SCIENTIFICO EDITORIALE
Raffaele De Vita

COMITATO SCIENTIFICO EDITORIALE
Giovanni D'Arena
Ematologia
P.O. "S. Luca"
ASL Salerno

Raffaele De Vita
Divisione Tecnologie e Metodologie per la Salvaguardia della Salute
ENEA - Centro Ricerche Casaccia
Roma

Giuliano Mazzini
Istochimica & Citometria- IGM-CNR
c/o Dipartimento Biologia L. Spallanzani
Università degli Studi di Pavia

Mariano Rocchi
Dipartimento di Biologia
Campus Universitario
Università degli Studi di Bari

Antonio Russo
Direttore dell'U.O.C di Oncologia Medica
Dipartimento di Oncologia
Policlinico Universitario "P. Giaccone", Palermo

Vol. 34, num. 2 - Agosto 2025

Lettere GIC
Periodico della Società Italiana di Citometria
Autorizz. del trib. di Roma n° 512/92 del 17/9/92
Edizione quadrimestrale
Spedizione in abbonamento postale

Lettere GIC
Open Access Peer Review
Peer Review Journal
Open Access
ISSN 2280-8663

Grafica: Renato Cafieri
Stampa:
CSP-STAMPA DI CARLO PIGNANI
Zona Industriale Settevene - Nepi (VT)
csp.stampa@virgilio.it

Redazione:
Società Italiana di Citometria
c/o Divisione Biotecnologie
ENEA Centro Ricerche Casaccia, s.p. 016
Via Anguillarese, 301 - 00123 ROMA
☎ 06/30484671
e-mail: gic@citometriagic.it
http://www.citometriagic.it

Associato alla Unione Stampa Periodica Italiana

SOMMARIO

Programma Preliminare
44ª Conferenza e Scuola di Citometria
Corsi teorico-pratici di formazione e aggiornamento
"La Citometria: Analisi Gestione dei dati e loro interpretazione"
7 maggio-4 giugno 2026 in Web Live Streaming,
10-12 giugno 2026 Residenziale,
presso Biotecnologie
Università degli Studi di Napoli Federico II 6

Interferenze dell'immunoterapia nella diagnosi citofluorimetrica delle malattie ematologiche: focus su linfomi a cellule B e mieloma multiplo 15
Toma M., Chiappella A., Marasco V., Bermema A., Bozzi F., Aiello A.

La citofluorimetria come strumento per studiare le proprietà immunomodulatorie di vescicole extracellulari isolate dal midollo osseo di pazienti con neuroblastoma 22
Danilo Marimpietri, Maria Valeria Corrias, Irma Airoldi e Fabio Morandi

Elenco dei Citometristi Esperti con struttura di Albo scientifico-professionale Sessione di Ammissione 2026 30

La serie dei "Quaderni di Citometria" strumenti di studio e approfondimento 31

In copertina: Napoli sede della 44ª Conferenza di Citometria 2026

Società Italiana di Citometria

44ª CONFERENZA DI CITOMETRIA

SCUOLA DI CITOMETRIA
CORSI TEORICO-PRATICI DI FORMAZIONE E AGGIORNAMENTO

LA CITOMETRIA: ANALISI GESTIONE DEI DATI E LORO INTERPRETAZIONE

7 maggio / 4 giugno 2026 Web Live Streaming

10-13 giugno 2026 Residenziale
Auditorium Biotecnologie - Università degli Studi di Napoli Federico II

Direttore della Scuola
Giuliano Mazzini (*Pavia*)

Comitato Scientifico e Organizzatore
Rosa Chianese (*Varese*)
Raffaele De Vita (*Roma*)
Stefania Loffredo (*Napoli*)
Giulia Scalia (*Napoli*)

PROGRAMMA PRELIMINARE

SESSIONI PLENARIE COMUNI A TUTTI I CORSI (Web Live Streaming)

Giovedì 7 maggio 14:30 - 17:30

Sessione di Apertura Multidisciplinare di Citometria

Lettura di Apertura della Conferenza e Scuola

Presentazione Corsi della Scuola di Citometria: *Riunione di tutti i Partecipanti ai Corsi con il Comitato Scientifico e Organizzatore e i Coordinatori dei Corsi, informazioni organizzative e chiarimenti*

Martedì 19 maggio 14:30 - 17:30

Sessione Multidisciplinare di Citometria

Giovedì 4 giugno 14:30 - 17:30

Sessione Multidisciplinare di Citometria

CORSO BASE DI CITOMETRIA: DAI FONDAMENTI ALL'ANALISI DEI CAMPIONI

Coordinatori: Nicolò Panini (Milano), Claudio Pioli (Roma)

Lunedì 11 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Modulo 1: Principi di Base, Strumentazione e Reagenti

Lunedì 25 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Modulo 2: Dalla preparazione all'analisi del campione passando dallo strumento

Giovedì 11 giugno 09:00-13:00 (in presenza)
Modulo 3: Esempi e problematiche specifiche in diversi Campi Applicativi

Giovedì 11 giugno 14:00-17:30 (in presenza)
Modulo 4: Didattica interattiva ed esercitazioni con Glovani Citometristi

Obiettivo didattico

Il "Corso Base di Citometria: dai fondamenti all'analisi dei campioni" ha lo scopo di fornire una formazione di base su principi, strumenti e metodologie della Citometria ad allievi neofiti o con una esperienza iniziale, e a coloro che desiderano rafforzare le conoscenze su questi aspetti.

Struttura del Corso

Il Corso è strutturato su quattro moduli, ciascuno dei quali costituito da più lezioni. Le prime lezioni affronteranno i principi di base, le proprietà delle molecole fluorescenti e le componenti degli strumenti citometrici (fluidica, ottica ed elettronica). Successivamente, verranno descritti quali campioni possono essere analizzati mediante Citometria a flusso, la loro preparazione e conservazione. Seguiranno lezioni con esempi di applicazioni in diversi campi, evidenziando in particolare gli aspetti metodologici critici. Analisi multiparametriche saranno utilizzate quali esempi per descrivere aspetti relativi a controlli, compensazione, scelta di fluorocromi e marcatori, disegno di pannelli, strategie di gating e di analisi su diversi tipi di tessuto. Il corso si concluderà con un modulo interattivo dedicato agli esempi proposti dai partecipanti, di particolare significato interpretativo e di rilevanza analitica in vari campi applicativi.

Corso C1

LA CITOMETRIA IN EMATOLOGIA
NUOVE SFIDE DELLA CITOMETRIA CLINICA IN AMBITO EMATOLOGICO NELL'ERA DELLE TERAPIE AVANZATE

Coordinatori: Giuseppe Coppola (Salerno), Giulia Scalia (Napoli)

Martedì 12 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

Modulo 1: Rilevanza della Citometria a flusso quantitativa in ambito ematologico clinico

Martedì 26 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

Modulo 2: Ruolo ed evoluzione della Citometria a flusso nel campo delle Leucemie Acute Mieloidi

Giovedì 11 giugno 09:00-13:00 (in presenza)

Modulo 3: Ruolo ed evoluzione della Citometria a flusso nel campo delle terapie avanzate

Giovedì 11 giugno 14:00-17:30 (in presenza)

Modulo 4: Stato dell'arte ed evoluzione della Citometria a flusso nell'ambito delle malattie linfoproliferative croniche

Obiettivo didattico

Il Corso si propone di approfondire l'evoluzione della citometria a flusso in relazione alle nuove sfide, che si aggiungono a quelle tradizionali, in sinergia con l'evoluzione diagnostica e terapeutica in ambito clinico ematologico, in particolare per il ruolo della odierna caratterizzazione immunofenotipica cellulare ai fini della diagnosi e del monitoraggio nel corso di immunoterapie con anticorpi biclonali e di terapie avanzate con cellule CAR. Rilevanti appaiono, pertanto, nell'attuale contesto anche gli aspetti di ricerca traslazionale in citometria oncoematologica.

Particolare attenzione è dedicata agli aspetti metodologici e all'analisi dei display, nell'ottica della standardizzazione metodologica e della qualità e riproducibilità interlaboratorio dei risultati analitici, in termini di sensibilità, specificità e accuratezza ai fini interpretativi per applicazioni cliniche, che puntano sempre più all'appropriatezza e alla medicina di precisione. In quest'ottica assume un'importanza sempre maggiore l'interazione tra i risultati citometrici e le altre piattaforme diagnostiche.

Il corso punta a ottenere un aggiornamento culturale e metodologico, supportato dalla presentazione e discussione di casi clinici, con un approccio "globale" al processo di diagnosi citometrica oncoematologica. In tale ottica sono considerati, oltre agli aspetti analitici nel laboratorio di citometria a flusso, anche i requisiti rilevanti a partire dalla richiesta fino alla refertazione, nonchè le interazioni multidisciplinari, per un'ottimale integrazione dell'analisi citometrica nel processo diagnostico-terapeutico.

Corso C2

LA CITOMETRIA IN IMMUNOLOGIA
CITOMETRIA E IMMUNITÀ: DALLA FENOTIPIZZAZIONE AGLI STUDI FUNZIONALI

Coordinatori: Alessandra Battaglia (Roma), Daniela Fenoglio (Genova)

Mercoledì 13 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Modulo 1: Caratterizzazione delle cellule regolatorie linfoidi

Mercoledì 27 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Modulo 2: "Exhaustion" e senescenza delle cellule linfoidi

Giovedì 11 giugno 09:00-13:00 (in presenza)
Modulo 3: Immunoterapia dei tumori: ruolo del monitoraggio nella medicina di precisione

Giovedì 11 giugno 14:00-17:30 (in presenza)
Modulo 4: La Citometria a flusso nel monitoraggio delle patologie infettive e autoimmuni

Obiettivo didattico

Il corso ha l'obiettivo di fornire una formazione approfondita e aggiornata per affrontare la complessità delle indagini in citometria a flusso multiparametrica applicate allo studio della risposta immunitaria in ambito clinico e traslazionale. In particolare, il percorso formativo intende illustrare le soluzioni strumentali e metodologiche più efficaci per l'analisi delle popolazioni cellulari del sistema immunitario, incluse quelle rare o provenienti da tessuti intrinsecamente problematici.

Struttura del Corso

Il programma è articolato in quattro moduli.
I primi due moduli includono contenuti tecnico–specialistici di citometria a flusso avanzata applicati a temi trasversali rilevanti per diversi ambiti della medicina di precisione, con particolare attenzione al trasferimento delle conoscenze più aggiornate della profilazione delle popolazioni immunoregolatorie e del processo di immunosenescenza.
Nel terzo modulo verranno presentate le strategie citometriche più aggiornate applicate all'immunomonitoraggio della risposta antitumorale in pazienti oncologici per una medicina di precisione.
Nel quarto modulo saranno illustrate le più recenti applicazioni citometriche per la diagnosi e il monitoraggio di pazienti affetti da patologie infettive, autoimmuni e metaboliche.
Al termine di ciascun modulo è previsto un evento "live" di domande e risposte, dedicato alla discussione delle problematiche immunologiche e citometriche più frequentemente affrontate dai citometristi.

Corso C3

LA CITOMETRIA IN ONCOLOGIA
CITOMETRIA FUNZIONALE COME STRUMENTO INTEGRATO PER APPLICAZIONI TERAPEUTICHE

Coordinatori: Igea D'Agnano (Milano), Virginia Tirino (Napoli)

Giovedì 14 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

Modulo 1: Citometria avanzata: strategie di sorting nello studio dell'eterogeneità dei tumori

Giovedì 28 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

Modulo 2: Proliferazione e morte cellulare: lo yin e lo yang del ciclo vitale della cellula

Giovedì 11 giugno 09:00-13:00 (in presenza)

Modulo 3: Approcci citometrici avanzati nello studio di organelli e nanoparticelle nel targeting terapeutico e nella terapia farmacologica

Giovedì 11 giugno 14:00-17:30 (in presenza)

Modulo 4: Il microambiente sotto la lente della Citometria: dall'analisi cellulare alla clinica

Obiettivo didattico

Il "Corso di Oncologia" dedicato alla Citometria ha come scopo principale quello di approfondire le più recenti e innovative applicazioni della Citometria nel contesto del Laboratorio di Oncologia Sperimentale, con particolare attenzione agli aspetti pratici e traslazionali. I partecipanti riceveranno una panoramica aggiornata sulle metodologie più avanzate disponibili in questo settore.
Il corso è articolato in quattro moduli:
Il primo modulo introduce le tecniche di sorting citometrico per analizzare l'eterogeneità tumorale.
Il secondo modulo si concentra sulle metodologie per valutare la vitalità e la morte cellulare, con particolare attenzione alla proliferazione e ai diversi tipi di morte cellulare indotti da trattamenti farmacologici su modelli di cellule tumorali umane.
Il terzo modulo affronta approcci citometrici avanzati per lo studio di organelli e nanoparticelle, sia per il targeting che per la terapia farmacologica.
Il quarto modulo è dedicato all'uso della Citometria per valutare i marcatori di risposta nei tumori solidi e per analizzare le interazioni cellula-cellula nel microambiente tumorale.
Al termine di ogni modulo, verrà stimolata la discussione attraverso l'analisi di file citometrici e la condivisione di problematiche metodologiche riscontrate dai partecipanti nei rispettivi laboratori di ricerca oncologica.
L'obiettivo finale è trasmettere non solo competenze metodologiche, ma anche strategie di analisi e gating utili nello studio dei tumori solidi.

Struttura del Corso

I quattro moduli che compongono il corso affronteranno ciascuno un tema specifico dell'Oncologia. Durante il percorso formativo verranno proposti sia contenuti teorici introduttivi ai vari argomenti, sia di carattere pratico. Il corso offre un "training virtuale" che include sia le procedure sperimentali per la preparazione e l'analisi dei campioni, sia la valutazione dei dati ottenuti. Verranno illustrati i protocolli relativi alle diverse tematiche, con particolare attenzione alle criticità che possono emergere. Al termine di ogni modulo, saranno

analizzati file citometrici e discussi i risultati, favorendo un'interazione attiva tra i partecipanti, che potranno presentare e approfondire problematiche specifiche riscontrate nei propri laboratori.

Dettaglio degli argomenti trattati:
- Sorting citometrico: aspetti metodologici e applicazioni
- Ciclo cellulare e colture cellulari
- Morte cellulare: apoptosi, necrosi e autofagia
- Vescicole extracellulari
- Mitocondri
- Linfociti e cellule tumorali: approcci metodologici in Citometria
- Interazione cellula-cellula

Corso C4

CITOMETRIA AMBIENTALE
LA CITOMETRIA PER LE NUOVE SFIDE AMBIENTALI

Coordinatori: Stefano Amalfitano (Roma), Raffaella Casotti (Napoli)

Venerdì 15 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Modulo 1: Citometria e la biodiversità

Venerdì 29 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Modulo 2: Citometria e approcci biotecnologici

Giovedì 11 giugno 09:00-13:00 (in presenza)
Modulo 3: Citometria ambientale: dalla teoria alla pratica
Giovedì 11 giugno 14:00-17:30 (in presenza
Modulo 4: Citometria ambientale: dalla teoria alla pratica

Obiettivo didattico
Il Corso "La citometria per le nuove sfide ambientali" offre un aggiornamento sulle più recenti applicazioni della citometria a flusso in ambiti che vanno oltre la diagnostica biomedica tradizionale. Verranno approfonditi temi quali la biodiversità, la microbiologia ambientale e industriale, la citogenetica e la genomica vegetale, nel quadro più ampio della conservazione e gestione sostenibile delle risorse naturali. Esperti di fama internazionale, provenienti da istituti di ricerca e università italiane e straniere, presenteranno lo stato attuale delle conoscenze nel campo della citometria ambientale, illustreranno dati e casi di studio, e discuteranno le ampie prospettive di sviluppo tecnologico e scientifico che questa metodologia offre alla ricerca ambientale e biotecnologica.

CALENDARIO

Giovedì 7 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Sessione di Apertura Multidisciplinare di Citometria

Martedì 19 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Sessione Multidisciplinare di Citometria

Giovedì 4 giugno 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
Sessione Multidisciplinare di Citometria

CB CORSO BASE:
lunedì 11 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
lunedì 25 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

C1 CORSO EMATOLOGIA
martedì 12 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
martedì 26 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

C2 CORSO IMMUNOLOGIA
mercoledì 13 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
mercoledì 27 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

C3 CORSO ONCOLOGIA
giovedì 14 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
giovedì 28 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

C4 CORSO CITOMETRIA AMBIENTALE
venerdì 15 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)
venerdì 29 maggio 14:30-17:30 (Web Live Streaming)

10-12 giugno 2026 (Residenziale)
Auditorium Biotecnologie - Università degli Studi di Napoli Federico II

mercoledì 10 giugno 14:00-17:30
Sessione Plenaria comune a tutti i Corsi

giovedì 11 giugno 08:30-13:00 - 14:00-17:30
Corsi in parallelo

venerdì 12 giugno 08:30-12:30
Sessione Plenaria comune a tutti i Corsi

PROGRAMMA SOCIALE PRELIMINARE

mercoledì 10 giugno
17:30 Brindisi di Benvenuto

giovedì 11 giugno
17:00 Assemblea dei Soci
18:00 Degustazione “Sapere i Sapori … a Km 0”

venerdì 12 giugno
12:45 Sorteggio Premi scheda valutazione evento
13:00 Lunch di saluto*

**è indispensabile la prenotazione alla Segreteria GIC con un messaggio e-mail entro il 16 marzo 2026*

QUOTE DI ISCRIZIONE PER OGNI CORSO

			Dopo il 16 marzo 2026
Soci GIC*	€ 160,00 + IVA 22%	Soci GIC*	€ 200,00 + IVA 22%
non Soci	€ 220,00 + IVA 22%	non Soci	€ 260,00 + IVA 22%
non strutt Soci GIC*	€ 90,00 + IVA 22%	non strutt Soci GIC*	€ 140,00 + IVA 22%
non strutt non Soci	€ 150,00 + IVA 22%	non strutt non Soci	€ 190,00 + IVA 22%

In regola con la quota associativa 2026

+ Quaderno GIC** € 10,00 + IVA 22%
+ 3 Quaderni GIC** € 20,00 + IVA 22%

**I Fondamenti della Citometria
**La Citometria a Flusso per lo Studio della Proliferazione Cellulare
**Le cellule Natural Killer: Biologia, Patologia e Rilevanza della Citometria
**Valutazione citofluorimetrica della malattia minima residua

RISERVATO AI DIPENDENTI DELLE PUBBLICHE AMMINISTRAZIONI (OSPEDALE, UNIVERSITÀ, COMUNE, ASL ...)

Per poter ricevere fattura elettronica intestata ad un Ente Pubblico ed emessa con il metodo SPLIT PAYMENT (addebito dell'IVA in fattura alla P.A.) o in esenzione IVA ai sensi dell'art. 10 del DPR 633/72 come modificato dall'art. 14, comma 10 della legge 24 dicembre 1993 n. 537, dovranno essere inviate, unitamente alla scheda di iscrizione:

• richiesta specifica con i dati fiscali dell'Ente e dati del referente amministrativo della pratica (telefono ed e-mail);
• dichiarazione scritta (contenente tutti i dati fiscali dell'Ente), in cui si specifichi che il dipendente (indicare nome e cognome) per cui viene richiesta l'iscrizione è autorizzato a frequentare l'evento per aggiornamento professionale;
• codice IPA che identifica la Pubblica Amministrazione (codice alfanumerico composto da 6 caratteri);
• ogni altra eventuale informazione che l'Ente stesso ritenga necessaria ed opportuna per facilitare l'identificazione del pagamento del servizio come da norma della fatturazione elettronica.

Coloro che intendono usufruire della quota ridotta per i giovani "non strutturati" dovranno inviare, insieme alla scheda d'iscrizione, una autocertificazione vistata dal Responsabile della Struttura.

La quota include:
- le colazioni di lavoro, le pause caffè;
- le attività previste dal programma sociale;
- il materiale didattico: pen-drive con copia delle slide delle Lezioni e file di aggiornamento e formazione;
- Crediti per Elenco Citometristi Esperti;
- Attestati di partecipazione.

INFORMAZIONI GENERALI

• I Corsi sono a numero chiuso e si svolgono in parallelo;
• Le Sessioni Web Live Streaming si svolgeranno in orari pomeridiani su piattaforma PROEVENTI FAD;
• I Partecipanti che si iscriveranno a un Corso entro il 16 marzo, possono chiedere di seguire gratuitamente, esclusivamente come "UDITORI" e senza ricevere Attestato, i Moduli Web Live Streaming di un altro Corso;
• L'Attestato di partecipazione verrà inviato a coloro che seguiranno l'intero Corso.

È prevista l'annuale **Assemblea dei Soci GIC**, l'assegnazione dei Premi di Studio GIC e la presentazione di prodotti e di apparecchiature da parte delle principali Aziende del settore.

PROGRAMMA E ISCRIZIONE ALLA CONFERENZA AL SITO:
http://www.conferenzadicitometriagic.it//

SESSIONI WEB LIVE STREAMING
Le sessioni Web Live Streaming si svolgeranno sulla piattaforma PROEVENTI FAD
www.proeventifad.it//

ULTERIORI INFORMAZIONI AL SITO:
http://www.citometriagic.it//

SEDE DEI CORSI IN PRESENZA
Auditorium Biotecnologie
Università degli Studi di Napoli Federico II
Via Tommaso De Amicis, 95, 80131 Napoli

COME RAGGIUNGERE LA SEDE:
L'Auditorium di Biotecnologie, sede della Conferenza, è situato nell'area dell'Azienda Ospedaliera Universitaria 'Federico II' con ingresso in Via Tommaso De Amicis.

Metro
Metropolitana di Napoli Linea 1- Fermata 'Policlinico' a 200 metri dall'Auditorium di Biotecnologie, sede della Conferenza.

Treno
Stazione Napoli Centrale – Piazza Garibaldi – arrivo treni Trenitalia https://www.trenitalia.com/ed Italo https://www.italotreno.it/ e poi proseguire in metropolitana Linea 1 "Policlinico'.

Aereo
Aeroporto di Napoli Capodichino https://www.aeroportodinapoli.it/ e poi prendere un taxi. L'area Taxi è situata di fronte agli Arrivi.
Sono in vigore tariffe predeterminate su percorsi prestabiliti, sia urbani che extraurbani, comprensive di ogni supplemento extra.
Navetta Alibus è la linea di collegamento speciale e veloce tra l'Aeroporto ed il centro della città di Napoli, in particolare Stazione Centrale e Porto (Molo Beverello). https://www.aeroportodinapoli.it/collegamenti-con-napoli-centro.

Auto
Chi proviene dall'A1, dalla A3, e dalla A14, può immettersi sul raccordo per la tangenziale di Napoli, uscendo allo svincolo n.7 'Zona Ospedaliera' Policlinico.
Parcheggio a pagamento "Colli Aminei" , a 500 m. dall'Auditorium di Biotecnologie, sede della Conferenza.
Un ampio parcheggio auto a pagamento si trova anche nei pressi della Metropolitana (fermata 'Policlinico') a 200 m. dall'Auditorium di Biotecnologie, sede della Conferenza.

Taxi
Lo stazionamento dei taxi è a 200 m. dall'Auditorium di Biotecnologie sede della Conferenza, e situato all'ingresso di Via Pansini dell'Azienda Ospedaliera Universitaria 'Federico II'.

Segreteria Scientifica

Società Italiana di Citometria
associazione scientifica senza fini di lucro
iscritta nell'Elenco delle Società Medico
Scientifiche del Ministero della Salute
c/o Divisione Biotecnologie
ENEA Centro Ricerche Casaccia s.p. 016
Via Anguillarese, 301 - 00123 Roma
tel. 06 30484671
e-mail: gic@citometriagic.it
http://www.citometriagic.it

Segreteria Organizzativa

ProEventi Srl
Viale Matteotti 36, 71016, San Severo
tel: 0882 242151
e-maill: citometriagic@proeventi.it

www.proeventi.it

Interferenze dell'immunoterapia nella diagnosi citofluorimetrica delle malattie ematologiche: focus su linfomi a cellule B e mieloma multiplo

Toma M. [1], Chiappella A.[2], Marasco V. [2], Bermema A. [2], Bozzi F. [1], Aiello A.[1]
[1]S.C. Anatomia Patologica 2, Dipartimento Servizi e Diagnostica Avanzata e [2]S.C. Ematologia, Dipartimento di Ematologia ed Oncologia, Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano

email: antonella.aiello@istitutotumori.mi.it

Abstract
Immunotherapy has emerged as a major breakthrough in the treatment of hematological malignancies. Its employment in the management of mature B-cell and plasmacell neoplasms (B-NHL and MM) is being rapidly expanded, due to tolerable side effects and remarkable efficacy in patients relapsing and resistant to multiple lines of therapy (R/R).
Therapeutic monoclonal antibodies (mAb) and adoptive immunotherapy (CAR-T), target antigens expressed by cancer cells activating cytotoxic mechanisms or guiding the patient's immune system to destroy the tumor. In B-NHL, the main targets for immunotherapy are CD19 and CD20. Anti-CD22 drug conjugated mAb (ADC) and CAR-T are currently under investigation for the management of subtypes of R/R NHL, while CD79b ADC has been approved as first line or bridging therapy in high-grade B-NHL. In MM, CD38 is the first exploited target for immunotherapy. BCMA, GPRC5D and FcRH5 are additional antigens expressed or upregulated by plasmacells which have recently emerged as novel targets for R/R MM.
Although immunotherapy has improved the outcome of B-cell and plasmacell neoplasms, relapse remains the major obstacle to achieve long-term survival. Tumor cells develop different mechanisms for adaptation to therapy, including target antigen loss, downmodulation, internalization and shaving, as well as recurrence as negative clones.
Flow cytometry provides a rapid evaluation of hematological neoplasms through definition of cell lineage and phenotype and assessment of measurable residual disease for therapy planning and prognostication. Mechanisms of immunotherapy resistance, along with steric hindrance of therapeutic mAb preventing efficient binding of diagnostic Ab, are regarded as main complications for flow cytometric analyses. Incorporation of additional lineage markers (CD37 CD24 CD40 for B cells) or different Ab (like multiepitope CD38 for plasmacells) within multicolor panels, together with modified gating strategies to screen for neoplastic cell clones, should be introduced in order to overcome analytical challenges. Interplay with clinicians and access to medication history can be another crucial step to tailor Ab panels to specific therapy settings.
Target therapy may also generate several artifacts that clinical cytometrists need to take into account, such as interference between therapeutic and diagnostic Abs, selective eradication of specific subpopulations mimicking maturation arrest or circulation of apparently abnormal cells.
Nowadays, multiple agent combinations and dual targeted CAR-T (CD19/CD20 and CD20/CD22 for B-NHL, BCMA/CD19 for MM) as well as new immune-based therapies against CD138 are under investigation in clinical trials or preclinical studies in order to mitigate treatment failure. As a consequence, flow cytometric challenges will further increase in the future and laboratories will need to keep up with a constantly evolving immunotherapy scenario.

Introduzione
Nell'ultimo decennio le terapie target hanno cambiato le prospettive terapeutiche delle malattie ematolinfoidi, apportando notevoli benefici clinici ai pazienti ematologici. Il 40-50% dei pazienti con linfoma non-Hodgkin B (B-NHL) e mieloma multiplo (MM) trattato con terapie convenzionali può infatti andare incontro a ripresa di malattia o sviluppare una malattia refrattaria (R/R) ai farmaci. Malgrado le immunoterapie abbiano sensibilmente migliorato l'outcome dei pazienti con malattia R/R inducendo risposte profonde e sopravvivenza prolungata, una parte di questi pazienti può tuttavia recidivare ulteriormente, necessitando quindi di nuovi approcci e nuove combinazioni di farmaci (*Crump 2017, Garfal 2024*).
I trattamenti target, che colpiscono antigeni normalmente utilizzati per la ricerca diagnostica di malattia, presentano notevoli ripercussioni sulle modalità di analisi citofluorimetrica, rendendo necessari un costante aggiornamento degli operatori, un continuo scambio di informazioni cliniche con gli ematologi ed un adeguamento del metodo analitico agli schemi terapeutici dei pazienti. Questo articolo è focalizzato sui B-NHL e sui MM, che rappresentano le due principali categorie di tumori ematologici oggetto di terapie target nel nostro Istituto.

Farmaci immunoterapici
I composti immunoterapici agiscono supportando il sistema immunitario a riconoscere e distruggere le cellule tumorali attraverso svariati meccanismi, preservando il più possibile le cellule sane. Questi farmaci includono due principali categorie: anticorpi monoclonali (AbMo) e cellule T ingegnerizzate con un recettore antigenico chimerico (CAR-T). Quelli di uso più comune (*Tawfik 2021*) comprendono:
AbMo terapeutici e nanocorpi (frammenti anticorpali a singolo dominio), che inducono apoptosi diretta, citotossicità Ab- o complemento-dipendente o fagocitosi;

AbMo coniugati a farmaci (ADC AbMo), che rilasciano nella cellula bersaglio radioisotopi o sostanze chemioterapiche inducendo danno al DNA o ai microtubuli;
AbMo bispecifici/T-cell engagers (BiAb o BiTE), proteine geneticamente ingegnerizzate disegnate per legare un antigene di una cellula tumorale e un antigene di una cellula T effettrice, determinando l'attivazione del linfocita T ed il rilascio di perforine e citochine dannose per la cellula neoplastica;
CAR-T, dove l'immunorecettore CAR innesca l'attivazione e la proliferazione del linfocita T e, conseguentemente, l'eliminazione del clone neoplastico attraverso meccanismi citotossici analoghi a quelli innescati dai BiAb (*Haydu 2024*).

Antigeni target
Nei linfociti B i principali recettori bersaglio degli agenti immunoterapici sono rappresentati dagli antigeni di linea CD19, CD20, CD22 e CD79b. Il primo e più noto anticorpo anti-CD20, impiegato da più di 20 anni per il trattamento dei B-NHL, è Rituximab, utilizzato sia in monoterapia che abbinato a farmaci chemioterapici, a cui hanno fatto seguito AbMo di nuova generazione come Obinotuzumab e Ofatumumab e BiAb anti-CD20/CD3 come Glofitamab e Mosunetuzumab. Attualmente nella pratica clinica sono impiegati diversi farmaci diretti contro CD19 (AbMo Tafasitamab e Blinatumomab, CAR-T), CD22 (AbMo Epratuzumab), CD79b (ADC AbMo Polatuzumab) (*Wang 2020*).
Nelle plasmacellule del MM l'antigene CD38, comunemente riconosciuto dagli anticorpi Daratumumab e Isatuximab, è stato il primo target di terapia immunologica. Daratumumab è in uso già da un decennio sia in prima linea che nelle malattie R/R. Più recentemente sono emerse molecole alternative a CD38 con espressione più ristretta al comparto plasmacellulare, quali BCMA (CD269), GPRC5D e FcRH5, che sono state identificate per colpire più selettivamente le cellule del MM R/R, con minore interferenza negli altri distretti del sistema immunitario. Contro queste molecole sono stati prodotti BiAb (Teclistamab anti-BCMA, Cevostamab anti-FcRH5, Talquetamab anti-GPRC5D), ADC AbMo (Belantamb anti-BCMA) e CAR-T (*Devasia 2024*).

CAR-T approvate per B-NHL e MM
La terapia con cellule CAR-T è costosa e non priva di effetti collaterali (tra i più comuni neurotossicità e sindrome da rilascio di citochine), ma rappresenta un'opzione terapeutica promettente per le malattie R/R. Ad oggi l'approvazione al suo utilizzo da parte della Food and Drug Administration (FDA) è ristretta a 6 principali malattie ematologiche, che ne possono beneficiare con elevati livelli di remissione o miglioramento di Overall Survival e sopravvivenza libera da malattia a 5 anni (*Brudno 2024*):
1) Leucemia Linfoblastica Acuta (ALL); 2) Linfomi a grandi cellule B (LBCL); 3) Linfoma follicolare (FL); 4) Linfoma mantellare (MCL); 5) Leucemia linfocitica cronica (CLL); 6) MM.
Le CAR-T specifiche per i B-NHL sono generalmente dirette contro l'Ag CD19. Inizialmente approvate come terza linea di terapia nei DLBCL (Axi-cel, Tisa-cel e Liso-cel) e nei MCL, (Brexu-cel), l'impiego di Axi-cel e Liso-cel è stato più recentemente approvato da FDA e EMA (European Medicines Agency) anche come seconda linea di terapia per i DLBCL (*Boardman 2023*), visti gli evidenti vantaggi in termini di sopravvivenza libera da eventi avversi.
Le CAR-T attualmente approvate per il trattamento del MM R/R (Ide-cel e Cilta-cel) (*Lin 2024*) sono dirette contro BCMA, una glicoproteina transmembrana presente sui linfociti B maturi e sulle plasmacellule ma non sui linfociti B naïve. Benchè BCMA non rappresenti un marcatore per la ricerca di malattia plasmacellulare, il monitoraggio dell'antigene nei pazienti trattati o candidati al trattamento anti-BCMA può predire la risposta alla terapia mirata.

Resistenza alle immunoterapie
Malgrado gli agenti immunoterapici mostrino una grande efficacia nel trattamento dei B-NHL e del MM, la complessa biologia di queste neoplasie permette alle cellule maligne di sviluppare vari meccanismi di resistenza. Alcuni dei fattori coinvolti in una ridotta risposta ai trattamenti target sono: il volume del tumore, la sua localizzazione, l'interazione con il microambiente circostante che ne può favorire la crescita, una ridotta espansione, persistenza o efficacia dei linfociti T, un aumentato esaurimento dei linfociti T (*Rejeski 2023*).
Una conseguenza più diretta dell'effetto degli agenti immunoterapici sulla cellula neoplastica è data dalla sottoespressione antigenica derivata da fenomeni genetici o epigenetici che determinano una downmodulazione o la totale scomparsa di un antigene bersaglio (*Zhou 2021*). Nei B-NHL, mutazioni geniche e perdita di eterozigosi sono alla base della perdita dell'antigene CD19 nei pazienti trattati con CAR-T *(Sotillo 2015*), come illustrato nel caso di DLBCL R/R difettivo per CD19 dopo trattamento con Tisacel riportato in fig.1. Meccanismi di splicing alternativo dei geni CD19 e CD22 determinano sottoespressione o produzione di proteine tronche non riconosciute efficacemente dai farmaci target (*Sotillo 2015, Zheng 2022*). La rimozione dell'antigene CD20 (antigen "shaving") dalla superficie cellulare dei pazienti trattati con Rituximab, che avviene attraverso la formazione di un complesso CD20/Rituximab/C3b poi sequestrato dai macrofagi, rende inefficace i trattamenti con tutti quei farmaci il cui bersaglio è rappresentato dall'antigene CD20 (*Kennedy 2004*). Una rapida perdita di CD19 può essere anche osservata in pazienti trattati con Rituximab (*Jones 2012*).
Nel MM, il trattamento con l'anticorpo terapeutico anti-CD38 può indurre una downmodulazione dell'antigene sulla superficie delle plasmacellule neoplastiche (*Rawstron 2008, Paiva 2010*) oppure può determinare la selezione clonale di cellule poco esprimenti l'antigene che riescono quindi a sfuggire all'effetto dei farmaci. Al contrario, CD319 è preservato sulle plasmacellule anche dopo trattamento con Elotuzumab (*Soh 2021 Elotuzumab*).

Approcci citofluorimetrici per contrastare perdite antigeniche indotte dalle terapie target
Il citofluorimetrista deve essere consapevole del fatto che i meccanismi di resistenza messi in atto dalle cellule neoplastiche contribuiscono ad ostacolare il riconoscimento delle cellule patologiche con i pannelli citofluori-

metrici o le strategie di gating standard. Per contrastare e superare le difficoltà indotte dalle perdite antigeniche e dall'ingombro sterico che impedisce all'anticorpo diagnostico di legarsi ad un antigene target già coniugato al farmaco, si possono disegnare pannelli anticorpali che contengano molteplici o nuovi marcatori per la popolazione di interesse, con la conseguente necessità di modificare anche gli approcci di gating. Attualmente non esiste un metodo standardizzato per l'analisi di campioni trattati con immunoterapie, il che rende la disponibilità di informazioni cliniche sulla terapia applicata un aspetto fondamentale per personalizzare la composizione dei pannelli.

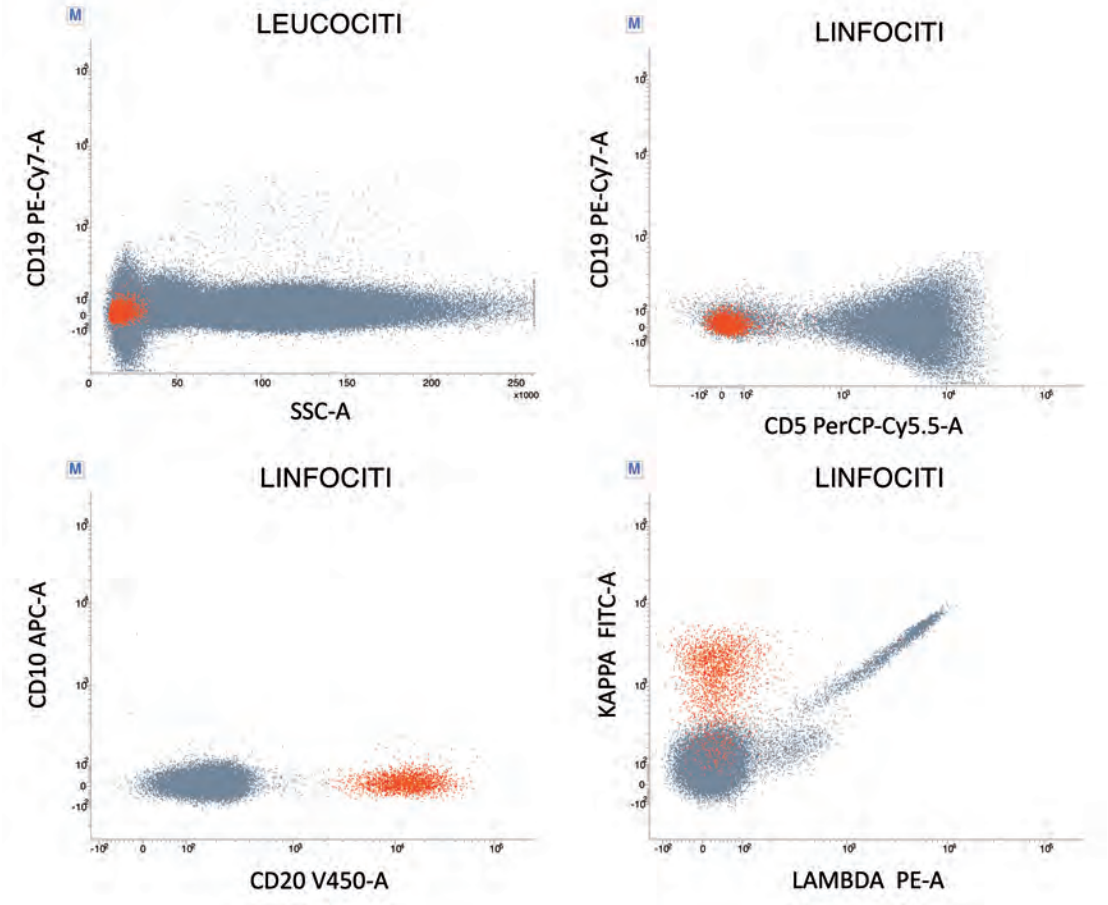


Fig. 1. DLBCL trasformato da FL R/R a due anni da terapia con CAR-T Tisacel. Il clone neoplastico (in arancione), negativo per CD10 e CD38, mostra perdita completa di CD19, ma in un pannello a 8 colori standard contenente kappa/lambda/CD5/CD19/CD10/CD38/CD20/CD45 può essere identificato dall'espressione brillante di CD20 e dalla restrizione clonale di catene kappa. Clone residuo = 6.6% dei linfociti e 0.6% dei leucociti.

B-NHL

Nelle patologie a cellule B caratterizzate da espressione aberrante di alcuni antigeni (quali CD5 nei MCL e CD10 nei FL e in alcuni DLBCL), questi marcatori possono essere sfruttati per la ricerca del clone patologico anche in caso di sottoepressione o assenza di un marker della linea B comunemente utilizzato per la costruzione del gate iniziale. Analogamente, la restrizione delle catene leggere delle immunoglubuline, combinata all'espressione di almeno un antigene di linea B e ad un eventuale marcatore aberrante, può fungere da marker clone-associato.

Nei B-NHL in cui non vengano identificate aberrazioni immunofenotipiche, dovrebbero essere utilizzati almeno due marcatori di linea, insieme alla restrizione delle catene leggere, per riconoscere la popolazione neoplastica. A questo scopo nei pannelli multicolore possono essere inclusi diversi anticorpi diretti contro i linfociti B, come CD22, CD24, CD37, CD40, a condizione che essi stessi non rappresentino il bersaglio di immunoterapie in corso (ad esempio con anticorpi o CAR-T anti-CD22 e anti-CD37) (*Wang 2020, Frigault 2024*). L'aggiunta di nuovi marcatori implica un'analisi più articolata e la definizione di nuovi gate di cattura dei linfociti B difettivi per CD19 o CD20, come mostrato nell'esempio di un MCL CD19-negativo in cui il cluster patologico B CD5+ è stato confermato con l'inserimento di CD22 nel pannello linfoide B standard (dettagli in fig.2).

MM

La tradizionale strategia di gating per l'identificazione delle plasmacellule del MM si basa sui marcatori CD38, CD138, CD45 e sui parametri fisici, utilizzando generalmente un gate iniziale CD38++/CD138+ e accertando in seguito il livello di espressione di CD45 sulle plasmacellule così identificate. Tuttavia la molecola CD138 è poco stabile ed è sensibile a diversi fattori preanalitici e analitici quali la temperatura, il tipo di anticoagulante (EDTA è preferibile ad eparina) e l'invecchiamento del prelievo. Di contro CD38 è sovente sottoespresso nei MM, mentre l'uso di farmaci target come Daratumumab e Isatuximab inducono una downmodulazione o addirittura la scomparsa dell'antigene dalla superficie delle

plasmacellule (*Rawstron 2008, Paiva 2010*), rendendo CD38 poco efficace per il riconoscimento della malattia. I farmaci anti-CD38 inoltre possono rimanere legati alla superficie cellulare per parecchio tempo, generando problemi di ingombro sterico, come illustrato in fig. 3A dove l'anticorpo diagnostico anti-CD38 non riconosce le plasmacellule e l'intera popolazione leucocitaria in un caso di MM plurirefrattario trattato con Daratumumab. Questo ostacolo può essere superato con l'uso di un anticorpo multiepitopo anti-CD38 che lega determinanti antigenici differenti da quello riconosciuto dal farmaco, ripristinando quindi il legame con l'antigene plasmacellulare target (*Zhou 2021*) (fig.3B). Al contrario, nei casi con perdita completa di CD38 –come raffigurato in fg.4 l'anticorpo multiepitopo non può legarsi al suo bersaglio e la presenza del clone MM può essere dimostrata dalla positività per CD138 e da atipie fenotipiche come l'assenza di CD45 e CD19. Nei casi con sottoespressione di CD38 oppure di CD138, le combinazioni anticorpali suggerite dalle linee guida per lo studio dei MM (che includono CD56, CD117, CD19, CD27, CD81, CD45 e le catene intracitoplasmatiche kappa e lambda) sono infatti di supporto nell'identificazione e differenziazione di plasmacellule sane policlonali da quelle patologiche clonali con profilo antigenico aberrante (*Arroz 2016*). Se, tuttavia, entrambe le molecole CD38 e CD138 sono perse dal clone neoplastico, si possono introdurre nei pannelli ulteriori marcatori selettivamente espressi o sovraespressi nel comparto plasmacellulare, come CD229 e CD319, recettori appartenenti alla famiglia SLAM (signaling lymphocytic activation molecule) (*Soh 2021 MRD*), previa verifica che non siano essi stessi bersaglio di terapie mirate nei pazienti in esame (*Soh 2021 Elotuzumab*). In assenza di CD38 e CD138, i nuovi gate plasmacellulari possono essere disegnati tramite un'analisi bivariata di CD229 e/o CD319 contro CD45, per poi accertare l'espressione delle catene leggere per la conferma della linea e della clonalità (*Gao 2023*).

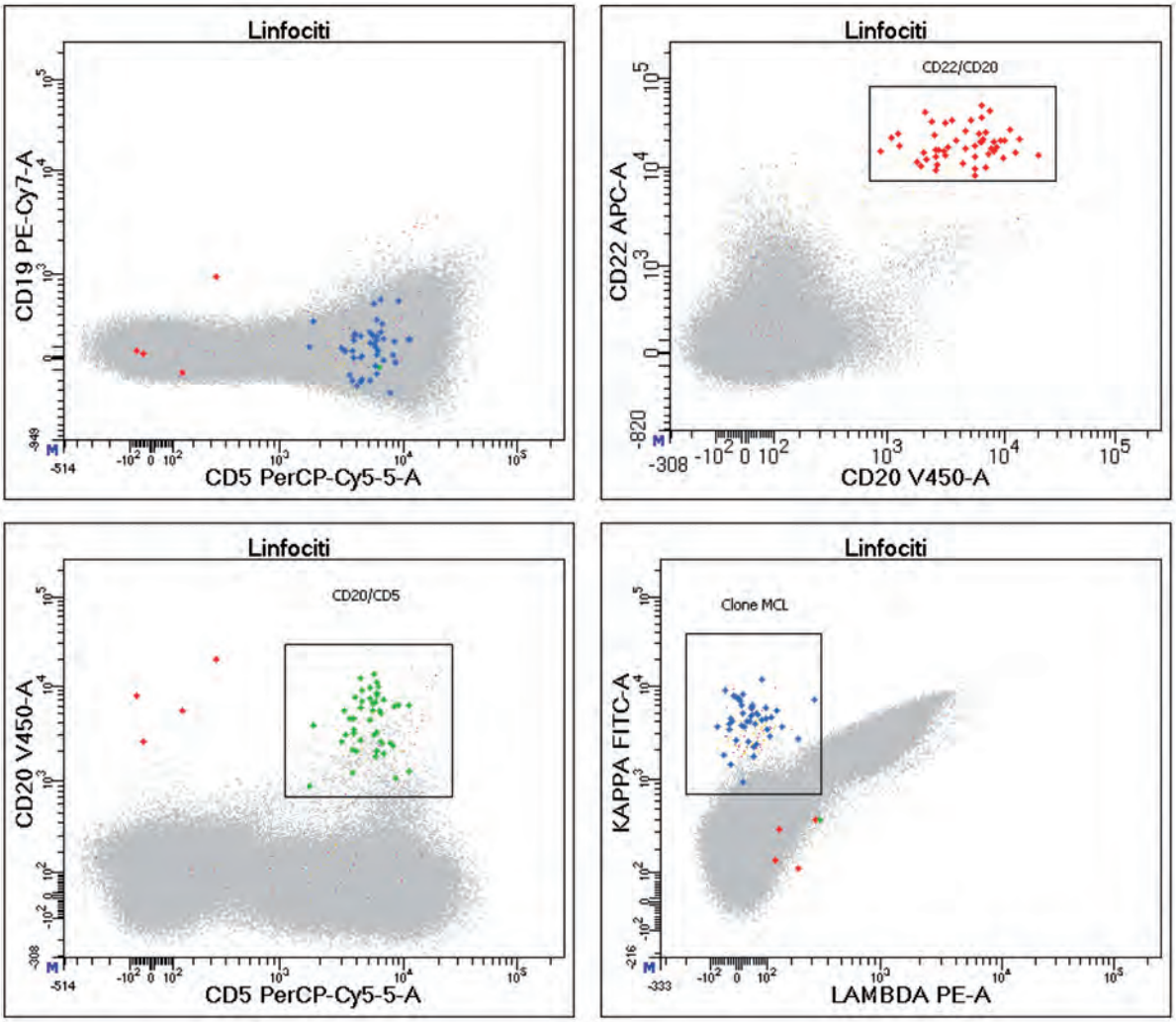


Fig. 2. MCL R/R a 3 mesi da trattamento con CAR-T Brexucel, con perdita di CD19. Il pannello utilizzato a 9 colori, che prevede l'aggiunta di CD22 al tubo standard descritto in fig.1, permette di identificare i linfociti B tramite l'espressione brillante di CD20 e CD22. Al loro interno è stato isolato un cluster di cellule CD5+ (in verde), in cui è stato dimostrato il clone MCL residuo con restrizione clonale kappa (59 cellule, 0.004%, in blu).

Artefatti legati alle terapie target

Le terapie dirette contro antigeni di superficie possono avere effetti anche sulle cellule non neoplastiche che esprimono l'antigene target, causando artefatti diagnostici che il citometrista deve tenere in considerazione.

Le terapie anti-CD20, ad esempio, causano una diminuzione non solo delle cellule B neoplastiche ma anche dei linfociti B sani, simulando in un midollo l'arresto allo stadio di ematogoni. Analogamente, terapie con

CAR-T BCMA comportano l'eliminazione dei linfociti B più maturi, lasciando in circolo per un periodo solo linfociti B transizionali CD5-positivi.
Le terapie anti-CD38 riducono transitoriamente anche cellule CD38-positive come i linfociti natural killer (NK) e T attivati. Inoltre l'antigene può essere mascherato anche nei precursori linfoidi e mieloidi, mimando atipie immunofenotipiche associate a patologie neoplastiche. Infine il trattamento con Daratumumab può generare una falsa restrizione clonale kappa sugli ematogoni, causata da una cross-reattività dell'anticorpo fluorescinato anti-kappa con il farmaco (Ab IgG1-kappa) legato alla superficie degli ematogoni *(Jiang 2020, Gao 2023*). Da ricordare inoltre che l'antigene CD19 può essere presente anche su alcuni linfociti NK e cellule CAR-T, interferendo con la ricerca di malattia B residua.
Un'ulteriore complicazione che si può riscontrare nei pazienti R/R trattati con CAR-T è l'insorgenza di neoplasie ematologiche secondarie, tra cui leucemie mieloidi acute, sindromi mielodisplastiche e T-NHL. Uno studio del gruppo Italiano CART-SIE riporta come fattori di rischio in questi pazienti una bassa conta piastrinica, un precedente trapianto di midollo allogenico, lo stadio III o IV alla diagnosi ed episodi di neurotossicità post-CAR-T (*Barone 2024*). La fig.5 illustra un caso di leucemia a grandi linfociti granulari di tipo T (T-LGL) insorta in un paziente con pregresso DLBCL trattato con Axicel che ha poi sviluppato citopenia trilineare, infezioni ricorrenti e mielodisplasia a basso rischio. La ricerca citofluorimetrica di nuove patologie nei pazienti trattati con CAR-T deve quindi rimanere sempre allertata.

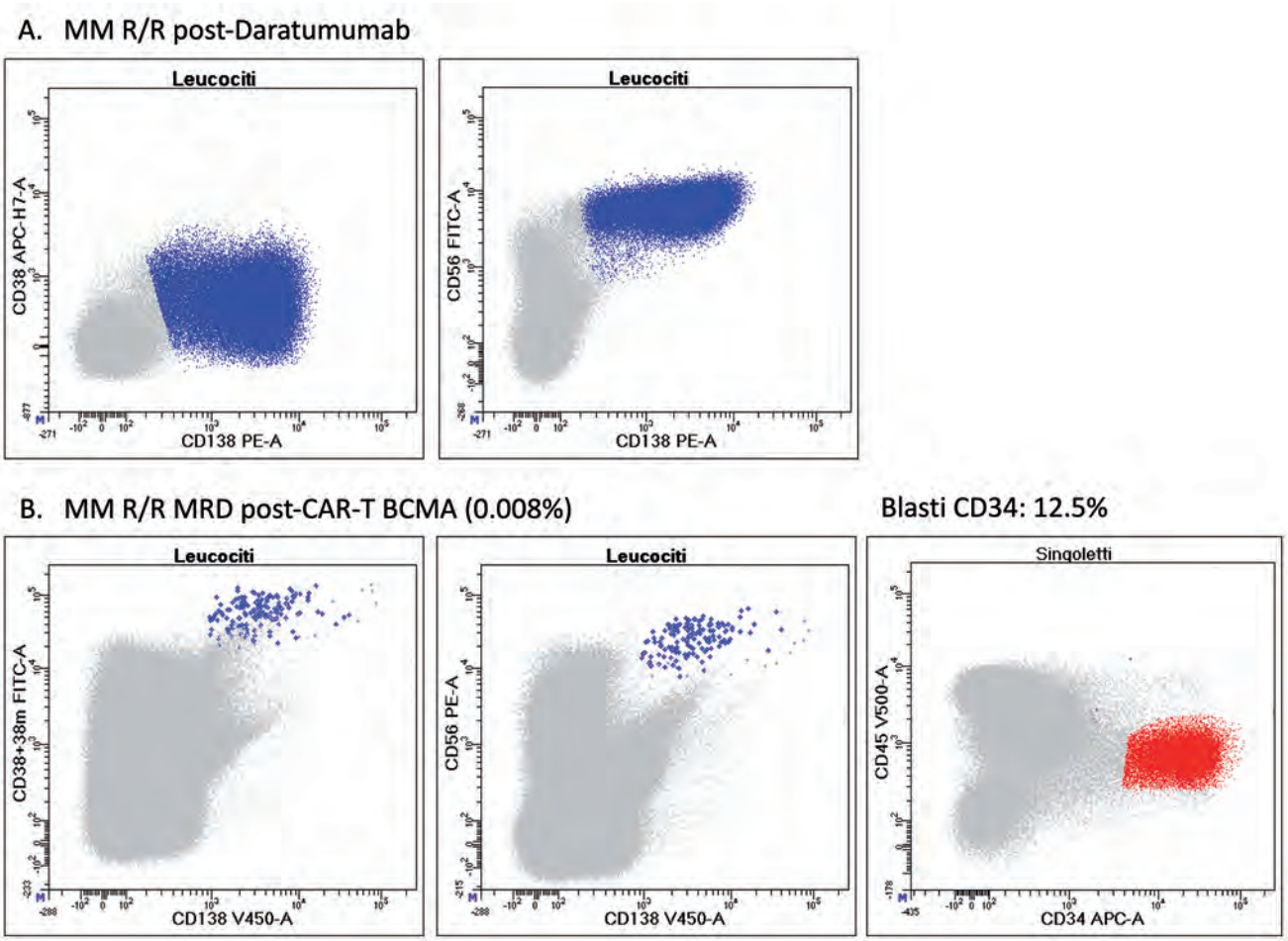


Fig. 3. MM R/R. A) Terza recidiva post-chemioterapia (CT), trapianto autologo e Daratumumab/chemio. Sia il clone plasmacellulare (in blu) che l'intera popolazione leucocitaria (in grigio) non presentano espressione di CD38, mascherato da Daratumumab. Le plasmacellule del MM sono identificate dalla positività per CD138 e CD56. B) Valutazione post CAR-T BCMA (quarta linea) con anticorpo multiepitopo anti-CD38 (aggiunto in drop-in alla miscela commerciale a 8 colori contenente CD38/CD56/CD45/CD19/CD117/CD81/CD138/CD27). E' evidente un esiguo clone MM residuo (0.008%) CD38++ CD138+ CD56+. Il paziente, candidato ad allo-trapianto, presentava un quadro di mielodisplasia con eccesso di blasti (CD34+ in rosso = 12.5%) che ha richiesto trattamento con CT per leucemia mieloide acuta.

Sviluppi futuri

Uno stratagemma clinico mirato a superare l'insorgenza di resistenza alle immunoterapie consiste nel bersagliare molteplici antigeni simultaneamente. Un esempio di questo approccio prevede l'utilizzo di anticorpi trispecifici (TsAb), la cui azione si basa su diversi meccanismi e con i quali sono in corso diversi trial clinici (*Dalle 2024*). Alcuni TsAb possono agire evitando fenomeni di tolleranza o anergia dei linfociti T stimolati dai BiAb, fornendo un secondo segnale costimolatorio ai linfociti T in modo da ridurne l'esaurimento (CD3-CD2-CD19 TsAb). Altre forme di TsAb possono aumentare l'efficacia terapeutica, come dimostrato nel MM dove TsAb che interagiscono con CD3, CD28 e CD38 potenziano sia l'attivazione T linfocitaria che il riconoscimento del target tumorale (*Wu 2020*). Un TsAb che bersaglia diversi anti-

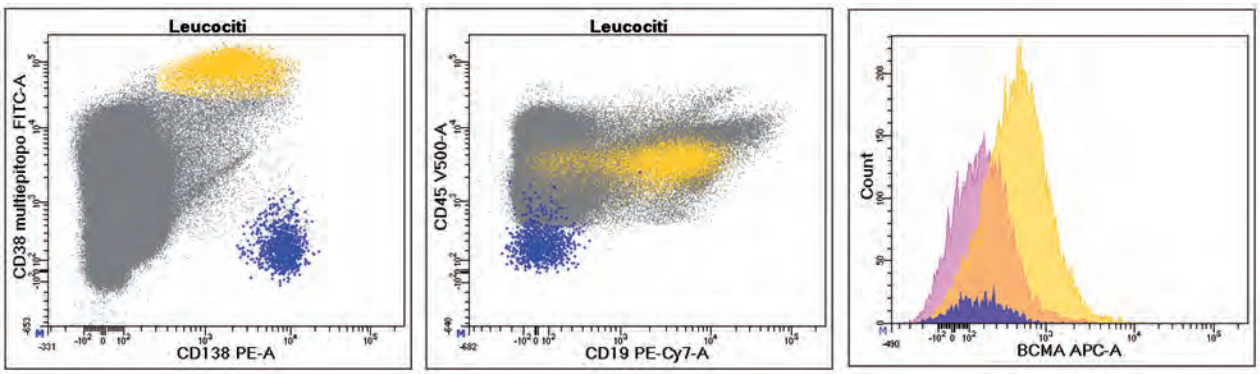


Fig. 4. MM R/R a 11 linee di terapia. Il trattamento con Daratumumab ha selezionato un clone CD38-negativo in cui, a differenza delle plasmacellule sane, l'Ag non è rilevabile neanche con l'Ab multiepitopo anti-CD38. Lo stesso clone non esprime BCMA, verosimilmente per selezione indotta dai trattamenti con CAR-T, ADC-AbMo e BiAb anti-BCMA. In blu: MM residuo (0.04%). In giallo: plasmacellule sane. In rosa: linfociti B.

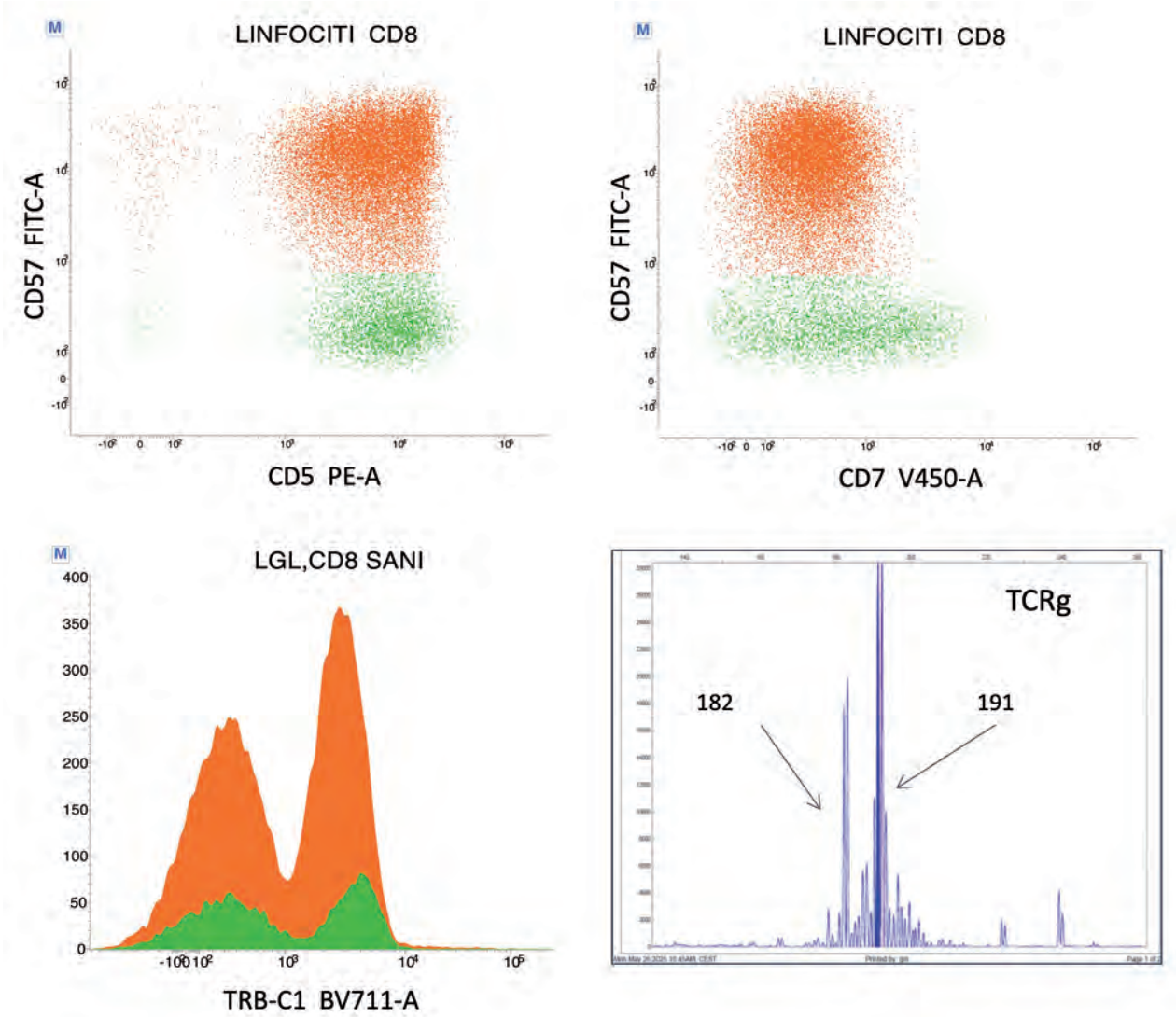


Fig. 5. T-LGL secondaria a trattamento con CAR-T Axicel in paziente con pregresso DLBCL. La popolazione T-LGL (57% dei linfociti totali) esprime fenotipo CD3+ CD8+ CD57+ CD56- CD5+ CD7-/+ e risulta apparentemente policlonale in base alla distribuzione della catena C1 del T-cell receptor beta (TRB-C1). Il riarrangiamento dei geni del TCR gamma (TCRg) dimostra invece due picchi prevalenti di 182 e 191 paia di basi all'interno di un background policlonale. Arancione: T-LGL. Verde: linfociti T CD8 normali.

geni tumorali, come quello che, oltre a CD3, riconosce CD19 e CD22 nelle B-ALL (*Zhao 2022*) può inoltre evitare l'elusione dell'immunosorveglianza da parte delle cellule neoplastiche in caso di downmodulazione di CD19 o CD22.

Analogamente sono in via di sviluppo nuovi approcci basati su CAR-T bispecifiche (dual-target). Nelle neoplasie a cellule B, CAR-T CD19/CD20 o CD19/CD22 sono mirate a superare la resistenza indotta da perdita di CD19 e la loro efficacia e sicurezza nel trattamento sono

state dimostrate in trials clinici di fase I (*Furqan 2022*). Nei pazienti con MM R/R, studi preliminari hanno dimostrato che il trattamento con CAR-T CD19/BCMA induce una risposta profonda e prolungata, raggiungendo negatività per la malattia misurabile residua (*Du 2023*).
L'introduzione dei TsAb e delle CAR bispecifiche e la loro combinazione con linfociti NK (CAR-NK), rappresentano una promettente prospettiva terapeutica nei B-NHL e nei MM R/R.
Nuove molecole, infine, stanno diventando oggetto di studio per terapie mirate al fine di aumentare l'efficacia dei trattamenti nelle malattie R/R. Nel MM, diverse strategie basate sulla molecola CD138 sono in esame in trial clinici o studi preclinici per mitigare l'occorrenza di ricadute con le terapie target attualmente disponibili (Riccardi 2024).

Conclusioni

Gli approcci immunoterapici per il trattamento dei B-NHL e dei MM R/R si sono rivelati molto efficaci e nel prossimo futuro sono attesi nuovi farmaci o nuove combinazioni di farmaci mirati. In questo scenario terapeutico in continua evoluzione e rapida espansione, il citometrista clinico dovrà quindi tenersi sempre aggiornato e considerare l'impatto di questi agenti sui profili immunofenotipici dei tumori, cercando di adeguare reagenti, pannelli e strategie di analisi a tutti i possibili cambiamenti indotti dalle nuove terapie.

REFERENZE

1) Arroz M, Came N, Lin P, et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(1):31-39. doi: 10.1002/cyto.b.21228.

2) Barone A, Chiappella A, Casadei B, et al. Secondary primary malignancies after CD-19 directed CAR-T-cell therapy in lymphomas: A report from the Italian CART-SIE study. *Br J Haematol*. 2024;205(4):1356-1360. doi: 10.1111/bjh.19590.

3) Boardman AP and Salles G. CAR T-cell therapy in large B cell lymphoma. *Hematol Oncol*. 2023;41 Suppl 1:112-118. doi: 10.1002/hon.3153.

4) Brudno JN, Maus MV and Hinrichs CS. CAR T Cells and T-Cell Therapies for Cancer: A Translational *Science Review*. JAMA. 2024;332(22):1924-1935. doi: 10.1001/jama.2024.19462.

5) Crump M, Neelapu SS, Farooq U, et al. Outcomes in refractory diffuse large B-cell lymphoma: results from the international SCHOLAR-1 study. *Blood*. 2017;130(16):1800–1808. doi: 10.1182/blood-2017-03-769620.

6) Dalle IA, Dulery R, Moukalled N, etal. Bi- and Tri-specific antibodies in non-Hodgkin lymphoma: current data and perspectives. Blood Cancer J. 2024;14:23. doi: 10.1038/s41408-024-00989-w.

7) Devasia AJ, Chari A and Lancman G. Bispecific antibodies in the treatment of multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2024;14(1):158. doi: 10.1038/s41408-024-01139-y.

8) Du J, Qiang WT, LU J, Jia YC, He HY, Liu J, et al. Updated results of a phase I open-label single-arm study of dual Targeting BCMA and CD19 Fastcar-T cells (GC012F) as first-line therapy for transplant-eligible newly diagnosed high-risk multiple myeloma. *Blood*. 2023;142(Supplement 1):1022.

9) Frigault MJ, Graham CE, Berger TR, et al. Phase 1 study of CAR-37 T cells in patients with relapsed or refractory CD37+ lymphoid malignancies. *Blood*. 2024;144(11):1153-1167. doi: 10.1182/blood.2024024104.

10) Furqan F and Shah NN. Bispecific CAR T-cells for B-cell Malignancies. *Expert Opin Biol Ther*. 2022;22(8):1005-1015. doi: 10.1080/14712598.2022.2086043.

11) Gao Q, Chen X, Cherian S, et al. Mature B- and plasma-cell flow cytometric analysis: a review of the impact of targeted therapy. Cytometry B Clin Cytom. 2023;104(3):224-242. doi: 10.1002/cyto.b.22097.

12) Garfall AL. New Biological Therapies for Multiple Myeloma. *Annu Rev Med.* 2024;75:13-29. doi: 10.1146/annurev-med-050522-033815.

13) Haydu JE and Abramson JS. The rules of T-cell engagement: current state of CAR T cells and bispecific antibodies in B-cell lymphomas. *Blood Adv*. 2024;8:4700-4710. doi: 10.1182/blood advances.2021004535.

14) Jiang XY, Luider J and Shameli A. Artifactual kappa light chain restriction of marrow hematogones: a potential diagnostic pitfall in minimal residual disease assessment of plasma cell myeloma patients on daratumumab. *Cytometry B Clin Cytom*. 2020;98(1):68-74. doi: 10.1002/cyto.b.21837.

15) Jones JD, Hamilton BJ and Rigby WF. Rituximab mediates loss of CD19 on B cells in the absence of cell death. *Arthritis Rheum*. 2012;64(10):3111-3118. doi: 10.1002/art.34560.

16) Kennedy AD, Beum PV, Solga MD, et al. Rituximab infusion promotes rapid complement depletion and acute CD20 loss in chronic lymphocytic leukemia. *J Immunol*. 2004;172(5):3280-3288. doi: 10.4049/jimmunol.172.5.3280.

17) Lin Y, Qiu L, Usmani S, Joo CW, et al. International Myeloma Working Group. Consensus guidelines and recommendations for the management and response assessment of chimeric antigen receptor T-cell therapy in clinical practice for relapsed and refractory multiple myeloma: a report from the International Myeloma Working Group Immunotherapy Committee. *Lancet Oncol*. 2024;25(8):e374-e387. doi: 10.1016/S1470-2045(24)00094-9.

18) Paiva B, Almeida J, Pérez-Andrés M, et al. Utility of flow cytometry immunophenotyping in multiple myeloma and other clonal plasma cell-related disorders. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78(4):239-252. doi: 10.1002/cyto.b.20512.

19) Rawstron AC , Orfao A, Beksac M, et al. Report of the European Myeloma Network on multiparametric flow cytometry in multiple myeloma and related disorders. *Haematologica*. 2008;93(3):431-438. doi: 10.3324/haematol.11080.

20) Rejeski K, Jain MD and Smith EL. Mechanisms of resistance and treatment of relapse after CAR T-cell therapy for large B-cell lymphoma and multiple myeloma. *Transplant Cell Ther*. 2023;29(7): 418–428. doi:10.1016/j.jtct.2023.04.007.

21) Riccardi F, Tangredi C, Dal Bo M, et al. Targeted therapy for multiple myeloma: an overview on CD138-based strategies. *Front Oncol*. 2024;14:1370854. doi: 10.3389/fonc.2024.1370854.

22) Soh KT and Wallace PK. Evaluation of measurable residual disease in multiple myeloma by multiparametric flow cytometry: Current paradigm, guidelines, and future applications. Int J Lab *Hematol*. 2021;43 Suppl 1:43-53. doi: 10.1111/ijlh.13562.

23) Soh KT, Tario JD Jr, Hahn T, et al. CD319 (SLAMF7) an Alternative Marker for Detecting Plasma Cells in the Presence of Daratumumab or Elotuzumab. *Cytometry B Clin Cytom*. 2020;100(4):497–508. doi: 10.1002/cyto.b.21961.

24) Sotillo E, Barrett DM, Black KL, et al. Convergence of Acquired Mutations and Alternative Splicing of CD19 Enables Resistance to CART-19 *Immunotherapy*. Cancer Discov. 2015;5(12):1282-1295. doi: 10.1158/2159-8290.CD-15-1020.

25) Tawfik EA, Aldrak NA, Albrahim SH, et al. Immunotherapy in hematological malignancies: recent advances and open questions. *Immunotherapy*. 2021;13(14):1215-1229. doi: 10.2217/imt-2021-0065.

26) Wang L, Li LR and Young KH. New agents and regimens for diffuse large B cell lymphoma. *J Hematol Oncol*. 2020;13:175. doi: 10.1186/s13045-020-01011-z.

27) Wu L, Seung E, Xu L, et al. Trispecific antibodies enhance the therapeutic efficacy of tumor-directed T cells through T cell receptor costimulation. *Nat Cancer*. 2020;1:86–98. doi: 10.1038/s43018-019-0004-z.

28) Zhao L, Li S, Wei X, Q, et al. A novel CD19/CD22/CD3 trispecific antibody enhances therapeutic efficacy and overcomes immune escape against B-ALL. *Blood*. 2022;140:1790–1802. doi: 10.1182/blood.2022016243.

29) Zhou T and Wang HW. Antigene loss after targeted immunotherapy in hematological malignancies. *Clin Lab Med*. 2021;41(3):341-357. doi: 10.1016/j.cll.2021.04.005.

La citofluorimetria come strumento per studiare le proprietà immunomodulatorie di vescicole extracellulari isolate dal midollo osseo di pazienti con neuroblastoma

Danilo Marimpietri[1], Maria Valeria Corrias[2], Irma Airoldi[1] e Fabio Morandi[1]
[1]UOSD Laboratorio di Terapie Cellulari, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy;
[2]UOSD Terapie Sperimentali in Oncologia, IRCCS Istituto Giannina Gaslini, Genova, Italy;

e-mail: fabiomorandi@gaslini.org

Abstract
Extracellular vesicles (EVs) are released by all cell types and contribute to cell-to-cell communications. Different studies have addressed the role of EVs in the progression and metastasis of solid and hematological tumors. In this context, they express different surface proteins derived from tumor cells, including immune checkpoints. In this study, we investigated by flow cytometry the expression of two immune checkpoint, HLA-G and PD-L1, on EVs isolated from BM samples from patients with Neuroblastoma (NB) and we characterized the immunosuppressive function of these EVs.
EVs derived from BM of NB patients showed a higher expression of CD56 than those from healthy donors (HD), independently from the presence of infiltrating NB cells in the BM. Moreover, only a small fraction of EVs expressed GD2, whereas the majority of EVs expressed markers of BM-resident cells. HLA-G and PD-L1 expression was higher on EVs from NB patients than on those from HD. Nonetheless, NB-derived EVs are able to modulate T cell responses to common bacterial antigen, in terms of T cell proliferation and cytokine secretion. Some of these immunomodulatory properties relied on HLA-G and PD-L1, but other mechanism(s) seems to be involved. Finally, high expression of CD56, HLA-G and PD-L1 correlated with a better prognosis of NB patients. We can conclude that HLA-G and PD-L1-bearing EVs in the BM of NB patients may be released predominantly by resident BM cells to counteract the inflammation occurring in the BM microenvironment of NB patients.

Introduzione
Il neuroblastoma (NB) è il tumore solido extracranico più comune dell'infanzia, con un'incidenza di circa 10 casi per milione di individui con un'età inferiore ai 15 anni (Maris, 2010). Il tumore primario deriva dalle cellule progenitrici della cresta neurale e mostra caratteristiche genetiche e biologiche che ne determinano il decorso clinico (Cheung, 2013). I pazienti con NB sono attualmente stratificati dall'International Neuroblastoma Risk Group Staging System in rischio basso, intermedio e alto (stadio L1, L2 e M rispettivamente) (Cohn, 2009). I pazienti con NB ad alto rischio rappresentano la metà dei casi totali e mostrano un tasso di sopravvivenza del 50%, nonostante la chemioterapia (Cohn, 2009). Nei pazienti allo stadio M, l'infiltrazione di cellule NB metastatiche nel midollo osseo (BM) rappresenta un fattore prognostico negativo per questi bambini (Morandi, 2015). Le cellule di NB infiltranti il midollo osseo esprimono diversi immune checkpoints che sono coinvolti nell'inibizione delle risposte immunitarie antitumorali (Morandi, 2012; Dondero, 2016; Wienke, 2021). Tra di essi troviamo HLA-G, molecola HLA di classe Ib che interagisce con diversi recettori su linfociti T e cellule NK (Pistoia et al., 2007) e PD-1 è un recettore inibitorio espresso principalmente dai linfociti T, ma anche dalle cellule NK attivate (Benson et al., 2010) e può interagire con due diversi ligandi di PD-1, ovvero PD-L1 e PD-L2, possono essere espressi da cellule presentanti l'antigene e da altre cellule in tessuti sani o da cellule tumorali (PD-L1) (Pardoll, 2012). L'espressione di PD-L1 può essere indotta su linee cellulari di NB e cellule NB metastatiche infiltranti il BM dopo stimolazione con IFN-γ. Pertanto, l'asse PD-1/PD-L1 può svolgere un ruolo nella soppressione immunitaria mediata da NB (Dondero et al., 2016) e, nei modelli preclinici, il blocco dell'interazione PD-1/PD-L1 ha aumentato l'efficacia terapeutica (Ivasko et al., 2022). Le vescicole extracellulari (EV) di derivazione tumorale hanno un ruolo importante nella progressione tumorale, nella formazione della nicchia pre-metastatica e nell'inibizione della risposta immunitaria antitumorale (Wang et al., 2022; Castillo-Peña, 2023). È stato dimostrato che le EV isolate dal plasma di pazienti con NB veicolano proteine differenti rispetto alle vescicole di soggetti sani, con un'aumentata espressione di proteine tumore-associate, come la nucleolina e NCAM (Morini et al., 2023) e fattori coinvolti nella modulazione della risposta immunitaria (Schmittgen, 2019) e nell'insorgenza della resistenza alla terapia (Richard, 2020). Tali EV hanno un ruolo importante nella progressione del NB (Marimpietri, 2021) e hanno una attività immunoregolatoria, tramite l'elevata espressione di ectoenzimi adenosinergici (CD38, CD39, CD203a e CD73) che generano adenosina (Morandi, 2019). Lo scopo di questo studio era quello di caratterizzare ulteriormente tale funzione immunoregolatoria, analizzando tramite citofluorimetria EV isolate dal BM di pazienti con NB e da soggetti sani, valutando su di esse l'espressione di HLA-G, PD-1 e PD-L1 e il ruolo di tali molecole nelle proprietà immunoregolatorie delle EV da pazienti con NB.

Materiali e metodi
Pazienti
Ventinove campioni di aspirati di BM sono stati raccolti da pazienti con NB alla diagnosi (9 stadio L, 16 stadio M, 2 stadio MS e 2 non definiti) per scopi diagnostici e da 15 donatori sani (HD) dopo consenso informato scritto. Il disegno dello studio è stato approvato dal Comitato Etico dell'IRCCS Istituto Giannina Gaslini (14/3/2008) in conformità ai principi della Dichiarazione di Helsinki.

Le caratteristiche demografiche, biologiche e cliniche dei pazienti sono riassunte nella Tabella 1. L'infiltrazione del midollo osseo da parte di cellule NB metastatiche è stata valutata mediante analisi morfologiche di 6 strisci colorati con May-Grunwald Giemsa.

Isolamento e caratterizzazione delle EV

Gli aspirati di BM sono stati centrifugati a 3000 x g per 15 minuti a 4°C per ottenere plasma di BM, conservato a -80°C in piccole aliquote (300 µl) fino all'uso. Dopo lo scongelamento, dimensioni e concentrazione delle EV sono state analizzate tramite Nano Tracking Analysis (NTA) utilizzando il NanoSight NS300 (Malvern Panalytical Ltd, Malvern, Regno Unito) in una coorte di soggetti (NB, n=14; HD, n=10) e poi isolate tramite centrifugazione a 20.000xg per 1h a 4°C (Morandi et al., 2019 e 2020). In alcuni campioni NB (n=8) le EV sono state caratterizzate in termini di dimensioni e concentrazione prima e dopo il loro arricchimento. L'intera procedura è stata eseguita sotto una cappa a flusso laminare per preservare la sterilità dei campioni di EV, successivamente utilizzati in studi funzionali in vitro su cellule in coltura.

Analisi citofluorimetrica

L'espressione degli immune-checkpoints sulle EV è stata valutata mediante citometria a flusso utilizzando anticorpi monoclonali di topo (mAbs, BioLegend, San Diego, California, USA): anti-HLA-G PE (clone 87G), anti-PD-1 Alexa Fluor 488 (clone NAT105), anti-PD-L1 PE/Cyanine 7 (clone 29E2A3). L'espressione di CD56 e GD2 è stata valutata utilizzando rispettivamente l'anti-CD56 APC (clone AF12-7H3, Miltenyi Biotec) e l'anti-GD2 PE (clone 14G2a, BioLegend). Per studiare l'origine cellulare delle EV, sono stati utilizzati i seguenti mAbs: anti-CD45 FITC (clone HI30, BD), anti-CD34 PE (clone AC136, Miltenyi Biotec), anti-HLA-DR APC (clone G46-6, BD), anti-CD3 PE-CF594 (clone UCHT-1, BD), anti-CD19 FITC (clone HIB19, BD), anti-CD90 APC (clone 5E10, BD), anti-CD105 PE (clone 266, BD) e anti-CD14 PC5 (clone A07765, Beckman Coulter). I campioni sono stati incubati in MACS buffer con mAb specifici per 20 minuti al buio a 4°C, quindi diluiti con 1 ml di MACS buffer e centrifugati a 20000 x g per 1 ora a 4°C. Le EV sono state quindi risospese in MACS buffer (200 µl) e sottoposte ad analisi citofluorimetrica utilizzando un citometro Gallios e il software Kaluza

Table 1. Demographic, biological and clinical features of the 29 NB patients.

N	Sex	Age (months)	Stage	BM infiltration	MYCN status	Relapse	EFS (years)	State at follow-up	OS (years)
1	Female	72	M	2	single copy	No	6,4	Alive	6,4
2	Male	43	M	2	MYCN gain	Yes	0,4	Alive	3,7
3	Female	26	M	3	MYCN gain	No	9,4	Alive	9,4
4	Female	17	M	3	amplified	Yes	0,9	Dead	1,5
5	Female	36	M	3	MYCN gain	Yes	2,0	Dead	3,0
6	Female	24	M	3	ND	Yes	1,3	Dead	1,5
7	Female	3	MS	1	amplified	No	2,4	Alive	2,4
8	Male	1	L2	0	single copy	No	4,8	Alive	4,8
9	Female	45	**ND**	0	ND	No	3,3	Alive	3,3
10	Female	11	M	1	single copy	No	1,1	Alive	1,1
11	Male	39	M	2	ND	Lost			
12	Female	4	MS	0	single copy	No	4,7	Alive	4,7
13	Female	17	L2	0	single copy	No	4,5	Alive	4,5
14	Female	39	L2	0	ND	Lost			
15	Female	140	M	1	single copy	Yes	3,1	Alive	4,8
16	Female	34	L2	0	single copy	No	0,3	Alive	0,3
17	Female	21	M	2	amplified	Yes	0,1	Dead	3,5
18	Male	14	M	1	amplified	No	1,7	Alive	1,7
19	Male	34	M	2	single copy	No	3,4	Alive	3,4
20	Male	45	L2	0	single copy	No	1,3	Alive	1,3
21	Female	51	M	3	single copy	Yes	2,2	Dead	2,7
22	Male	21	M	1	ND	Lost			
23	Male	4	L2	0	single copy	No	3,2	Alive	3,2
24	Female	30	M	1	MYCN gain	No	2,6	Alive	2,6
25	Female	6	L2	0	single copy	No	3,9	Alive	3,9
26	Female	30	L2	0	single copy	No	2,4	Alive	2,4
27	Male	12	L2	ND	ND	Lost			
28	Female	24	**ND**	ND	ND	Lost			
29	Male	32	M	ND	ND	Lost			

ATTIVITÀ SCIENTIFICA

(Beckman Coulter, Brea, California, USA). I parametri sono stati settati aumentando il gain sui parametri fisici (FSC/SSC) fino a visualizzare la nuvola delle EV. I risultati sono stati espressi come percentuale di EV positive o media relativa dell'intensità di fluorescenza (MRFI), calcolata come fluorescenza media ottenuta con mAb specifici/fluorescenza media ottenuta con controllo isotipico.

Studi funzionali

Per studiare la modulazione immunitaria mediata da EV derivate da BM di pazienti con NB, sono stati impostati i seguenti esperimenti funzionali. I preparati di buffy-coat (BC) sono stati ottenuti da 3 donatori di sangue sani presso l'IRCCS San Martino dopo consenso informato. Le cellule mononucleate totali (MNC) sono state isolate mediante gradiente di densità Ficoll/Hypaque (Cytiva, Marlborough, USA) dopo centrifugazione a 2000 x g per 30 minuti a temperatura ambiente e successive fasi di lavaggio. Le MNC sono state seminate in piastre a fondo piatto da 96 pozzetti a 1x106 cellule/pozzetto in RPMI (Euroclone) con siero AB umano al 5% (ottenuto da donatori del nostro Istituto). Dopo la quantificazione, ogni preparazione di EV è stata suddivisa in tre aliquote: una non trattata, una trattata con anticorpi monoclonali bloccanti HLA-G (clone 87G, Miltenyi Biotec) e una con anticorpi monoclonali bloccanti anti-PD-L1 (clone 2340D, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). Ogni aliquota è stata incubata per 30 minuti a temperatura ambiente (RT), prima di essere aggiunta alla MNC seminata in un rapporto di 200:1 (200x106 EVs/well). Ogni preparazione di EV è stata isolata da un pool di tre campioni di midollo osseo o tre diversi pazienti con NB, per ridurre al minimo la variabilità e generare una quantità sufficiente di EV per gli studi funzionali. In alcuni pozzetti, le vescicole extracellulari non sono state aggiunte (controllo non trattato). Le MNC sono state incubate durante la notte a 37°C, 5% di CO2, in presenza o in assenza di EV. Le EV isolate da HD non sono state incluse negli studi funzionali, poiché in quantità insufficiente. Il volume di plasma osseo raccolto da HD è stato contenuto per limitare i rischi per i volontari e per ragioni etiche.

Saggio di secrezione di IFN-γ

Gli effetti delle EV derivate dal midollo osseo dei pazienti con NB sulla secrezione di IFN-γ sono stati valutati su MNC incubate overnight come descritto e stimolate con 1 μg/ml di Staphylococcus Enterotoxin B (SEB, Sigma Aldrich), utilizzando il Rapid Cytokine Inspector (RCI CD4/CD8, Miltenyi Biotec), seguendo il protocollo. Le cellule sono state quindi analizzate tramite citometro a flusso MACS Quant 10, utilizzando la "modalità Express" automatizzata (Miltenyi Biotec) per rilevare la produzione di IFN-γ mediante colorazione intracellulare di popolazioni di cellule T CD4 e CD8. I risultati sono stati espressi come percentuale di cellule produttrici di IFN-γ+ tra i linfociti T CD3+CD4+ o CD3+CD8+.

Saggio di proliferazione

La proliferazione delle cellule T è stata valutata mediante citometria a flusso utilizzando il kit di proliferazione cellulare CellTrace™ CFSE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). In breve, un'aliquota del preparato MNC è stata sospesa in RPMI e colorata con 2 μM di carbossifluoresceina diacetato N-succinimidil estere (CFSE) per 15 minuti a 37°C. Successivamente, è stato aggiunto RPMI 20% FBS (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, USA), le cellule sono state centrifugate a 300 x g per 10 minuti e sospese in RPMI con 5% siero AB umano. Dopo l'incubazione overnight in presenza o assenza di EV (come descritto), le MNC sono state stimolate con SEB (1 μg/ml). In alcuni pozzetti, il SEB non è stato aggiunto (controllo negativo). La piastra è stata incubata a 37°C, 5% di CO2, per 6 giorni. I surnatanti sono stati quindi raccolti e conservati a -20°C mentre le cellule dopo il lavaggio sono state colorate con anti-CD3 PC7 (Beckman Coulter), anti-CD4 APC e anti-CD8 PE (Miltenyi Biotec) per 20 minuti a temperatura ambiente. Dopo il lavaggio, le cellule sono state sospese in MACS buffer e sottoposte ad analisi citofluorimetrica utilizzando il citometro Gallios e il software Kaluza (Beckman Coulter). I risultati sono espressi come % di cellule T CD3+CD4+ e CD3+CD8+ proliferanti (tramite diluizione del CFSE e riduzione della fluorescenza).

Secrezione di citochine

La concentrazione di diverse citochine è stata misurata sui surnatanti raccolti dal saggio di proliferazione e conservati a -20°C fino all'uso, utilizzando il kit MACSPlex Cytokine 12 (Miltenyi Biotec), seguendo il protocollo del produttore. I campioni sono stati acquisiti utilizzando l'analizzatore MACS Quant 10 in "Modalità Express" specifica per questo test (Miltenyi Biotec). La concentrazione di citochine nei campioni è espressa in pg/ml.

Analisi statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il software Prism, versione 5.03 (GraphPad Software Inc.). La distribuzione dei dati è stata analizzata utilizzando il test D'Agostino e Pearson. Il t-test di Student o il test di Mann-Whitney sono stati utilizzati per confrontare i set di dati, a seconda della distribuzione dei dati. Il log-rank test e il test Gehan-Breslow-Wilcoxon sono stati eseguiti per confrontare la sopravvivenza dei pazienti. Le differenze sono state considerate significative quando il valore p era < 0,05. L'analisi delle curve ROC è stata eseguita utilizzando MedCalc (MedCalc Software Ltd, Ostenda, Belgio). I risultati sono riportati come mediana+errore standard (SE) o deviazione standard (SD).

Risultati

Caratterizzazione di EV derivate da BM

In primo luogo, abbiamo determinato la concentrazione e la dimensione delle EV in campioni di aspirati di BM da 10 HD e 14 NB (6 allo stadio L2 e 8 allo stadio M) mediante NTA. Come mostrato nella Figura 1, pannello A, la dimensione delle EV era simile tra NB e HD e tra i pazienti con NB in stadio M e in stadio L. La concentrazione delle EV era significativamente più alta nei pazienti NB rispetto a HD (p=0,03) (Figura 1, pannello B). Inoltre, il numero di EV da pazienti NB sia in stadio L che in stadio M erano significativamente più alti rispetto a HD (p=0,015 e p=0,0022, rispettivamente), sebbene non siano state rilevate differenze significative tra i pazienti con NB (Figura 1, pannello B). Poiché i pazienti in stadio L non hanno cellule NB infiltranti il BM, abbiamo ipotizzato che le EV nel BM dei pazienti con NB non

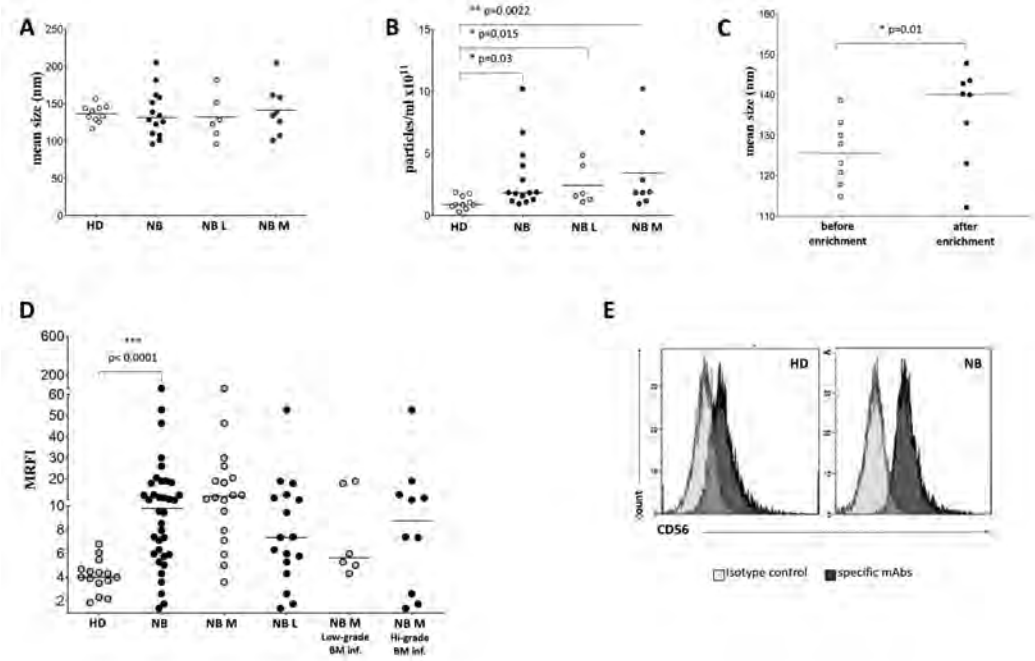


Figura 1. Caratterizzazione e analisi fenotipica delle vescicole extracellulari in campioni di midollo osseo. La dimensione (pannello A) e la concentrazione (pannello B) delle EV sono state analizzate in campioni di midollo osseo provenienti da controlli sani (punti bianchi) e pazienti NB (punti neri), e in pazienti NB in stadio L (punti grigio chiaro) o in stadio M (punti grigio scuro). I risultati sono espressi rispettivamente in nm e particelle/ml x 1011. Pannello C. La dimensione delle vescicole extracellulari è stata analizzata anche in campioni di pazienti con NB prima (punti bianchi) e dopo (punti neri) l'arricchimento delle vescicole extracellulari. Pannello D. L'espressione di CD56 è stata analizzata su EV isolate da campioni di midollo osseo di i) controlli sani (punti bianchi) e pazienti NB (punti neri), ii) pazienti NB in stadio M (punti grigi) e stadio L (punti grigio scuro) e iii) pazienti NB in stadio M con infiltrazione BM bassa (punti grigi) e alta (punti grigio scuro) di cellule NB. I risultati sono espressi come MRFI. Le barre orizzontali indicavano le mediane. Sono indicate differenze statisticamente significative. Pannello E. Viene mostrata una colorazione rappresentativa per CD56. I picchi grigi indicavano la colorazione con controlli isotipici, mentre i picchi neri indicavano la colorazione con mAb specifici.

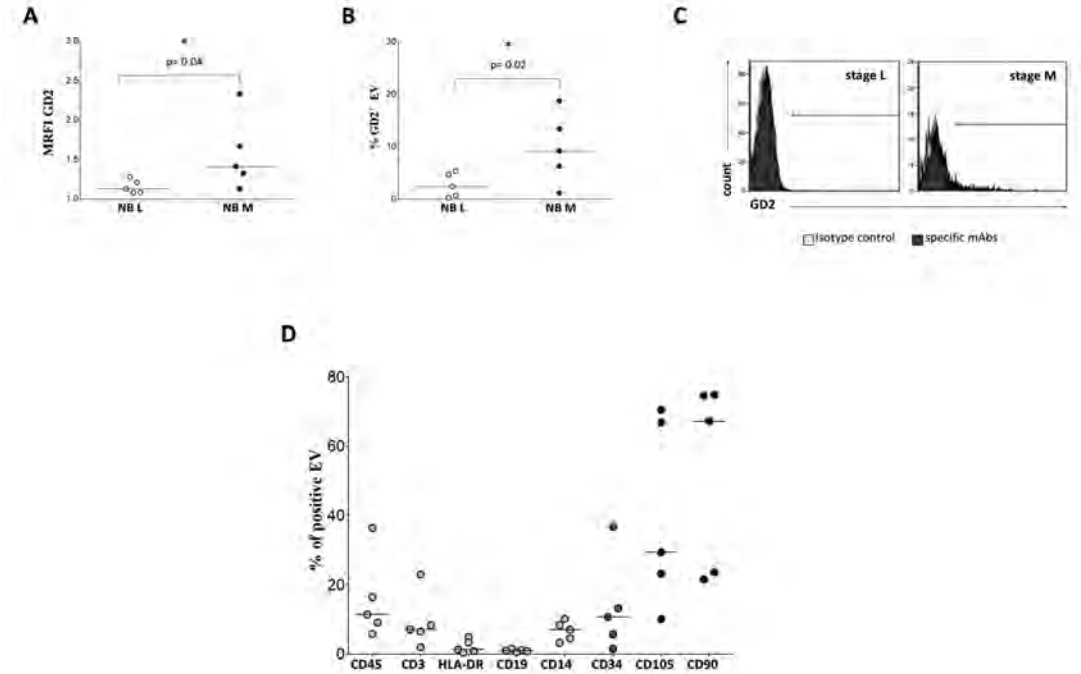


Figura 2. Caratterizzazione e analisi fenotipica delle vescicole extracellulari in campioni di midollo osseo. L'espressione di GD2 è stata analizzata su vescicole extracellulari isolate da campioni di midollo osseo di pazienti con NB in stadio L (punti bianchi) o stadio M (punti neri). I risultati sono espressi rispettivamente come MRFI (pannello A) e % di veicoli elettrici GD2+ (pannello B). Barre orizzontali indicate significa. Sono indicate differenze statisticamente significative. Una colorazione rappresentativa per GD2 è mostrata nel pannello C. I picchi grigi indicavano la colorazione con controlli isotipici, mentre i picchi neri indicavano la colorazione con mAb specifici. Il pannello D mostra l'espressione di CD45, CD3, HLA-DR, CD19, CD14, CD34, CD105 e CD90 su EV isolate da 5 campioni di midollo osseo di pazienti con NB. I risultati sono espressi come % di EV positivo. Le barre orizzontali indicavano le mediane.

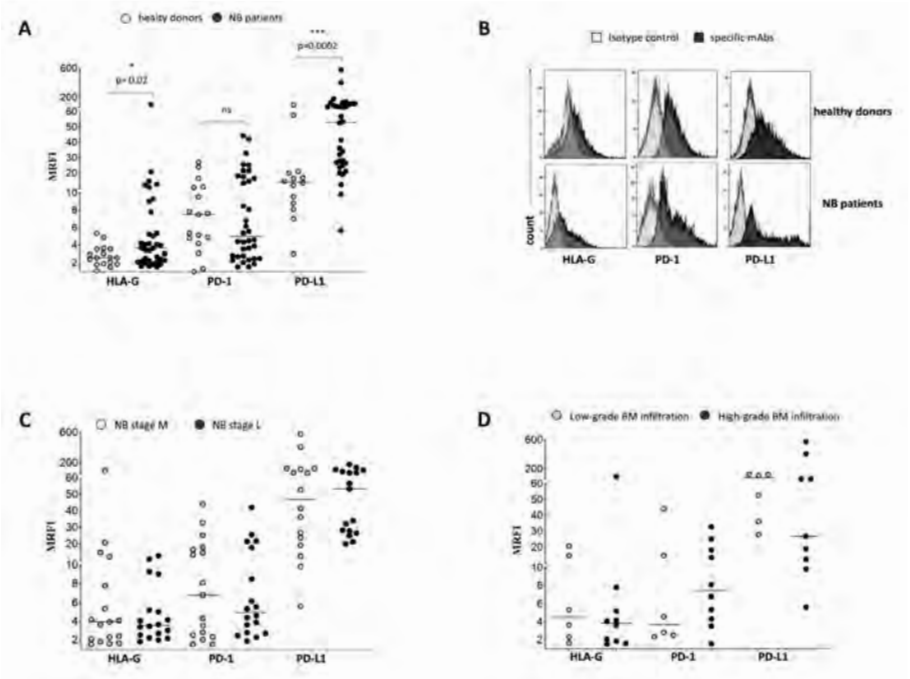


Figura 3. Analisi fenotipica delle vescicole extracellulari in campioni di midollo osseo. L'espressione di HLA-G, PD-1 e PD-L1 è stata analizzata su EV isolate da campioni BM di i) controlli sani (punti bianchi) e pazienti NB (punti neri) (pannello A), ii) pazienti in stadio M (punti grigi) e stadio L (punti grigio scuro), NB (pannello C) e iii) pazienti con NB in stadio M con infiltrazione BM bassa (punti grigi) e alta (punti grigio scuro) di cellule NB (pannello D). I risultati sono espressi come MRFI. Le barre orizzontali indicavano le mediane. Sono indicate differenze statisticamente significative. Una colorazione rappresentativa è mostrata nel pannello B.

derivino esclusivamente dai NB infiltranti. Come mostrato nella Figura 1, pannello C, la dimensione media delle vescicole extracellulari era significativamente più alta dopo l'arricchimento (p=0,01), quindi EV di dimensione maggiore sono state arricchite nei campioni dopo la centrifugazione.

Analisi fenotipica di EV derivate da BM

Abbiamo valutato l'espressione di CD56 (antigene NB-associato, espresso anche cellule NK, cellule T attivate, monociti e cellule dendritiche) su EV isolate da BM di pazienti NB e HD. Come mostrato nella Figura 1, pannello D, l'espressione di CD56 era significativamente più bassa nelle EV isolate da 17 HD rispetto a quelle di 29 pazienti NB (20 allo stadio M e 9 allo stadio L, p<0,0001). L'espressione di CD56 sulle EV era simile nei pazienti con NB allo stadio M o L. Abbiamo poi confrontato l'espressione di CD56 su EV isolate da pazienti con NB in stadio M con infiltrazione bassa (grado 1) o intermedia/alta (grado 2-3) di cellule NB nel midollo osseo. Nessuna differenza significativa è stata misurata in tali coorti di pazienti. Questi dati suggeriscono che CD56 può essere derivato da popolazioni di cellule residenti nel BM piuttosto che da cellule NB infiltranti. Una colorazione rappresentativa per CD56 sulle vescicole extracellulari è mostrata nella Figura 1, pannello E. Abbiamo studiato l'espressione del disialoganglioside GD2, un antigene NB-associato, su EV isolate da una coorte di pazienti con NB (5 stadio L e 5 stadio M). Come mostrato nella Figura 2, pannello A, l'espressione di GD2 era significativamente più alta nelle vescicole extracellulari dello stadio M rispetto ai pazienti con NB in stadio L (p=0,04). Poiché GD2 non era espresso sull'intera popolazione di EV ma in una piccola frazione, abbiamo analizzato anche la percentuale di EV GD2+. Come mostrato nella Figura 2, pannello B, la percentuale di EV GD2+ era più alta nei pazienti NB in stadio M rispetto ai pazienti NB in stadio L (p=0,02). Una colorazione rappresentativa per GD2 sulle EV è mostrata nella Figura 2, pannello C. L'espressione estremamente bassa di GD2 nelle EV isolate da BM di pazienti con NB, in particolare nei soggetti allo stadio L dove era praticamente non rilevabile, conferma come tali EV derivassero principalmente da cellule residenti nel BM piuttosto che da cellule NB infiltranti. Pertanto, abbiamo studiato l'espressione di diversi marcatori per leucociti (CD45), linfociti T (CD3), linfociti B (CD19), monociti (CD14), cellule staminali emopoietiche (CD34), cellule presentanti l'antigene (HLA-DR) e cellule stromali mesenchimali (CD105 e CD90). Come mostrato nella Figura 2, pannello D, la percentuale di EV CD45+ era bassa. La maggior parte di tali EV CD45+ sono CD3+ o CD14+, mentre le EV CD19+ e HLA-DR+ erano poche o assenti. Anche l'antigene CD34 è poco presente su queste EV. I marcatori più espressi sulle EV sono quelli delle cellule stromali mesenchimali (MSC), CD105 e CD90. Quindi, le EV nel BM di pazienti con NB sono parzialmente rilasciate dai leucociti maturi e dalle cellule staminali emopoietiche, ma principalmente dalle MSC. Abbiamo quindi analizzato diversi immune checkpoints come HLA-G, PD-1 e PD-L1. Come mostrato nella Figura 3, pannello A, l'espressione di HLA-G e PD-L1 era significativamente più alta nelle EV da NB rispetto a HD, mentre l'espressione di PD-1 era simile in soggetti NB e HD. Un'analisi citofluorimetrica rappresentativa è mostrata nella Figura 3, pannello B. L'espressione di HLA-G, PD-1 e PD-L1 era simile in pazienti NB stadio M e L (Figura 3, pannello C). Come mostrato nella Figura 3, pannello D, non sono state rilevate differenze significative nei pazienti allo stadio M con tassi di infiltrazione NB bassi o alti per quanto riguarda l'espressione di HLA-G, PD-1 e PD-L1. Questi risultati suggeriscono

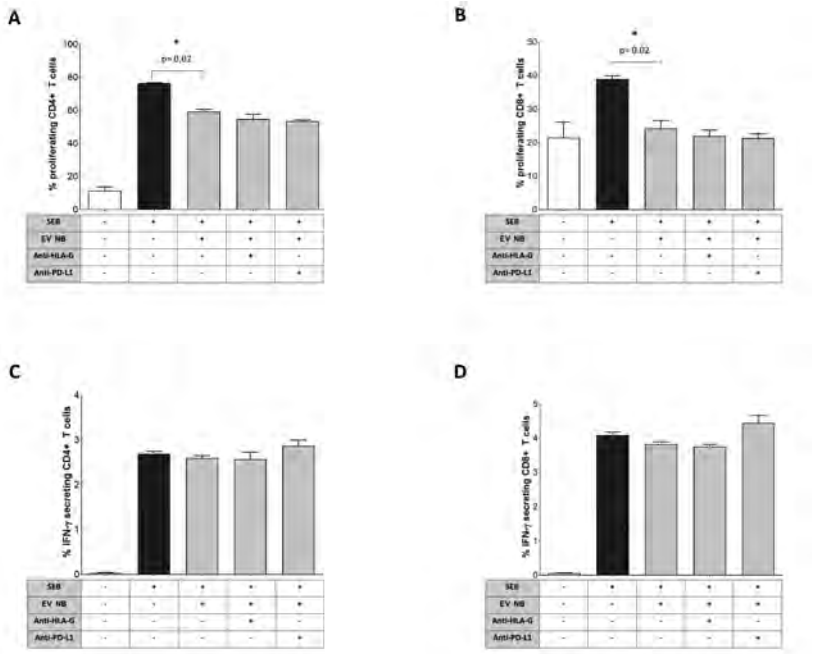


Figura 4. Funzioni immunoregolatorie delle EV derivate dal midollo osseo dei pazienti con NB. La proliferazione di cellule T CD4 (pannello A) o CD8 (pannello B) da donatori normali (non stimolati o stimolati con SEB) è stata valutata mediante citometria a flusso in presenza o assenza di EV derivate dal midollo osseo di pazienti con NB e in presenza o assenza di anticorpi bloccanti contro HLA-G o PD-L1. I risultati sono espressi come mediana+SE della % di cellule proliferanti (come testimoniato dalla diluizione di CFSE). Nelle stesse condizioni sperimentali, la secrezione intracellulare di IFN-γ è stata valutata mediante citometria a flusso in cellule T CD4+ (pannello C) o CD8+ (pannello D). I risultati sono espressi come mediana+SE della % di cellule IFN-γ+. Sono indicate differenze statisticamente significative.

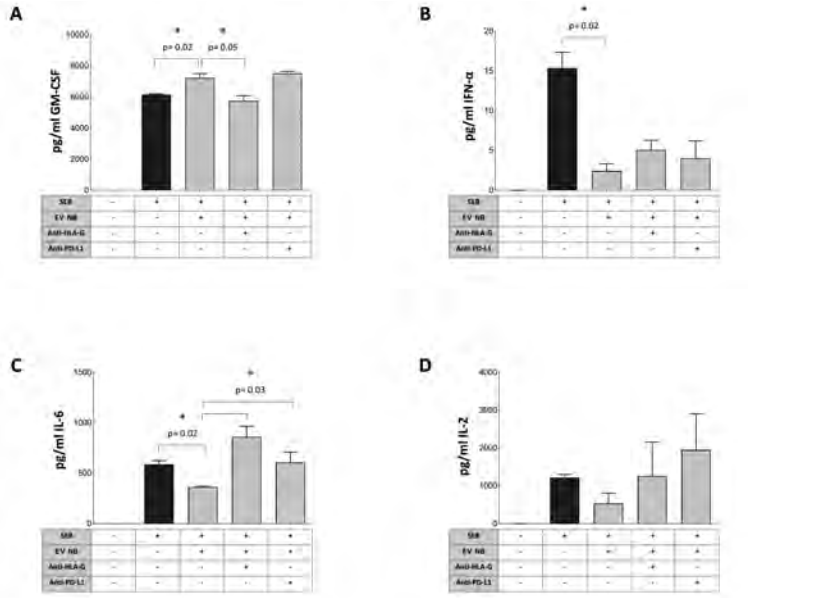


Figura 5. Modulazione della produzione di citochine da parte di EV derivate dal midollo osseo di pazienti con NB. La secrezione di diverse citochine (pannello A GM-CSF, pannello B INF-α, pannello C IL-6, pannello D IL-2) da parte di MNC da donatori normali (non stimolati o stimolati con SEB) è stata valutata mediante citometria a flusso in presenza o assenza di EV derivate dal midollo osseo di pazienti NB e in presenza o assenza di anticorpi bloccanti contro HLA-G o PD-L1. I risultati sono espressi in pg/ml (mediana+SE). Sono indicate differenze statisticamente significative.

come le EV da BM di pazienti con NB possano derivare principalmente da cellule residenti nel BM piuttosto che da cellule NB infiltranti. Pertanto, poiché CD56 può rappresentare un marcatore di attivazione su popolazioni di cellule immunitarie, le EV CD56+ potrebbero originare da cellule attivate nel midollo osseo, il che testimonia un elevato stato infiammatorio nel microambiente del BM in pazienti con NB, che è assente nei soggetti sani.

Studi funzionali

Abbiamo analizzato se le EV da BM di pazienti NB possano inibire la proliferazione dei linfociti T indotta da SEB. Come mostrato nella Figura 4, pannelli A e B, la percentuale di linfociti T CD4+ e CD8+ proliferanti è aumentata in presenza di SEB e parzialmente inibita in presenza di EV da pazienti NB (p=0,02). Gli anticorpi bloccanti anti-HLA-G o PD-L1 non sono efficaci nel

ripristinare la proliferazione delle cellule T, il che suggerisce che tale effetto non sia attribuibile a HLA-G o PD-1/PD-L1. Successivamente, abbiamo valutato tramite analisi citofluorimetrica la produzione intracellulare di IFN-γ in risposta a SEB. Come mostrato nella Figura 4, i pannelli C e D, i linfociti T CD4+ e CD8+ producono IFN-γ in risposta al SEB e tale produzione non è significativamente alterata in presenza di EV derivate da NB.
Abbiamo quindi studiato la capacità delle EV derivate dal BM di pazienti con NB di modulare il rilascio di 12 citochine pro o anti-infiammatorie da parte di MNC stimolate da SEB. Come mostrato nella Figura 5, pannello A, SEB induce la secrezione di GM-CSF da parte di MNC, con un aumento significativo in presenza di EV da NB (p=0,02, pannello A) e una significativa inibizione in presenza di anticorpi bloccanti HLA-G (p=0,05) ma non PD-L1. SEB induce la secrezione di IFN-α (Figura 5, pannello B) e tale secrezione è significativamente inibita in presenza di EV derivate da NB (p=0,02), senza effetti significativi in presenza anticorpi monoclonali bloccanti contro HLA-G o PD-L1. SEB induce il rilascio di alti livelli di IL-6 (Figura 5, pannello C), ma in presenza di EV da NB la secrezione di IL-6 è significativamente inibita (p=0,02) e parzialmente ripristinata da mAb bloccanti contro HLA-G (p=0,03) o PD-L1 (p=0,03). Un simile pattern è stato osservato per IL-2: abbiamo misurato una bassa secrezione basale nelle cellule non stimolate, e mille volte superiore in presenza di SEB. Le EV da NB inibiscono la secrezione di IL-2, che viene parzialmente ripristinata da anticorpi bloccanti, sebbene queste differenze non siano significative (Figura 5, pannello D). Infine, la secrezione di altri mediatori solubili come IL-4, IL-10, TNF-α, IL-5, IL-9, IL-12p70 e IL-17A indotta dall'enterotossina batterica non viene modulata in presenza di EV derivate da NB. Non siamo stati in grado di determinare gli effetti sulla secrezione di IFN-γ, poiché la concentrazione era superiore al limite di rilevabilità del saggio in tutte le condizioni sperimentali.

Discussione

Il ruolo delle EV nella progressione tumorale è stato riconosciuto negli ultimi anni, sia per i tumori solidi che per quelli ematologici (Mitchell, 2023) e, di conseguenza, sono state recentemente proposte come biomarcatori tumorali per scopi diagnostici e possibili bersagli per nuove strategie terapeutiche (Das, 2023). Tali EV hanno un ruolo nell'inibizione della risposta immunitaria antitumorale, nella formazione di metastasi tumorali e, soprattutto, nella resistenza ai farmaci in pazienti con NB (Marimpietri et al., 2021). Le EV derivate da cellule tumorali possono esprimere proteine di superficie derivate da tali cellule, tra cui ligandi per i recettori inibitori e gli immune checkpoints, che possono supportare l'immune escape delle cellule tumorali dal riconoscimento del sistema immunitario. Infatti, le cellule effettrici, come i linfociti T e le cellule NK, sono probabilmente ostacolate nel riconoscere ed eliminare le cellule neoplastiche in presenza di EV derivate da tumore. Il ruolo di HLA-G espresso sulle EV e l'effetto inibitorio sui linfociti T sono stati descritto in diversi tumori (Schwich, 2020; Li, 2021) e di conseguenza HLA-G è stato proposto come marcatore per la progressione tumorale (Schwich, 2019). Allo stesso modo, le EV che esprimono PD-L1 sono state rilevate in diversi tumori (Dou, 2022; Serratì, 2022; Eslami, 2023; Genova, 2023), e la presenza di EV esprimenti PD-L1 rappresenta un marcatore prognostico per l'esito clinico e per la risposta alla terapia (de Miguel-Perez, 2022; Dou, 2022; Serratì, 2022; Eslami, 2023; Genova, 2023). Il presente studio ha confermato la presenza di EV esprimenti HLA-G, PD-1 e PD-L1 nei campioni raccolti da pazienti affetti da NB, così come l'espressione di CD56, un marcatore di attivazione delle cellule immunitarie. Il livello di espressione nei pazienti con NB era significativamente più alto rispetto a soggetti sani, anche se tale espressione era indipendente dallo stadio della malattia e dal grado di infiltrazione del midollo osseo da parte delle cellule metastatiche di NB. Questi risultati supportano l'ipotesi che le EV derivate dal BM sono principalmente secrete dalle cellule residenti nel midollo osseo piuttosto che dalle cellule NB infiltranti. In particolare, tali EV sono rilasciate principalmente dalle MSC, con un contributo minore dalle HSC e dai leucociti maturi. Un ulteriore supporto a questa conclusione viene dalla scoperta che GD2, un antigene associato a NB, è espresso a livelli molto bassi e solo su una piccola frazione di EV derivate da BM. Esaminando gli effetti delle EV derivate dal BM di pazienti con NB su cellule MNC da donatori sani non abbiamo riscontrato nessun effetto sulla produzione di IFN-γ da parte delle cellule T CD4+ o CD8+, mentre la proliferazione di entrambi i subsets di cellule T era parzialmente inibita. Tale effetto, tuttavia, è indipendente dall'espressione di HLA-G o PD-L1 sulle EV, suggerendo che l'inibizione è probabilmente mediata da altri meccanismi. In questo contesto, è stata riportata la funzione immunoregolatoria di diverse molecole, tra cui IDO (Morini, 2023) ed ectoenzimi adenosinergici (Morandi et al., 2019). Le EV derivate da pazienti aumentano la secrezione di GM-CSF da parte delle MNC attivate, parzialmente attraverso HLA-G, e inibiscono la secrezione di IL-6 parzialmente tramite HLA-G e PD-L1. Tali EV modulano anche la secrezione di IL-2 e IFN-α da parte delle MNC. GM-CSF può modulare la risposta immunitaria attraverso l'attivazione di neutrofili e macrofagi associati al tumore e aumentare l'espressione di PD-L1 su queste ultime cellule (Wang, 2023). L'IL-6 può avere n effetto negativo nella risposta immunitaria antitumorale, poiché può promuovere la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule tumorali e la diffusione metastatica. Tuttavia, IL-6 può anche supportare l'attivazione, la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule T e aumentare la funzione citotossica e le attività antitumorali (Fisher, 2014). Nel loro insieme, questi risultati suggeriscono che le EV derivate da BM possono avere un impatto positivo sulla sopravvivenza dei pazienti con NB attraverso un effetto immunomodulatorio che va a bilanciare lo stato infiammatorio del midollo osseo, che è presente nei pazienti con NB indipendentemente dall'infiltrazione di neuroblasti nella nicchia del midollo osseo (Scaruffi, 2012) ed è correlata ad un esito clinico peggiore (Zheng, 2020). Inoltre, le cellule tumorali possono interagire con cellule immunitarie e non immunitarie all'interno del microambiente tumorale primario, ma anche generare segnali che viaggiano su lunghe distanze, inducendo la formazione di una nicchia pre-metastatica e promuovendo la diffusione dai tumori primari (Peinado, 2017). Pertanto, non possiamo esclud-

ere che la presenza di EV nel microambiente del BM possa essere correlata al tumore primario.
In conclusione, le EV isolate dal BM di pazienti con NB possono essere prevalentemente secrete da cellule normali residenti nel BM. Queste vescicole, a differenza delle EV riportate in altri tessuti neoplastici, dove rappresentano un meccanismo di escape dal sistema immunitario delle cellule metastatiche, sono rilasciate prevalentemente dalle cellule normali come meccanismo per contrastare lo stato immunosoppressivo dipendente dall'infiammazione che si verifica nel midollo dei pazienti con NB. Tuttavia, tale ipotesi richiede ulteriori indagini e deve essere confermata in studi futuri, in cui lo stato infiammatorio delle cellule residenti nel midollo osseo, così come l'espressione di altri marcatori sulle EV derivate dal BM, saranno specificamente valutati.

Referenze

Benson, D.M., Jr., Bakan, C.E., Mishra, A., Hofmeister, C.C., Efebera, Y., Becknell, B., Baiocchi, R.A., Zhang, J., Yu, J., Smith, M.K., Greenfield, C.N., Porcu, P., Devine, S.M., Rotem-Yehudar, R., Lozanski, G., Byrd, J.C., and Caligiuri, M.A. (2010). The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. Blood 116, 2286-2294.

Castillo-Peña, A., and Molina-Pinelo, S. (2023). Landscape of tumor and immune system cells-derived exosomes in lung cancer: mediators of antitumor immunity regulation. Front Immunol 14, 1279495.

Cheung, N.K., and Dyer, M.A. (2013). Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. Nat Rev Cancer 13, 397-411.

Cohn, S.L., Pearson, A.D., London, W.B., Monclair, T., Ambros, P.F., Brodeur, G.M., Faldum, A., Hero, B., Iehara, T., Machin, D., Mosseri, V., Simon, T., Garaventa, A., Castel, V., and Matthay, K.K. (2009). The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. J Clin Oncol 27, 289-297.

Das, K., Mukherjee, T., and Shankar, P. (2023). The Role of Extracellular Vesicles in the Pathogenesis of Hematological Malignancies: Interaction with Tumor Microenvironment; a Potential Biomarker and Targeted Therapy. Biomolecules 13.

De Miguel-Perez, D., Russo, A., Arrieta, O., Ak, M., Barron, F., Gunasekaran, M., Mamindla, P., Lara-Mejia, L., Peterson, C.B., Er, M.E., Peddagangireddy, V., Buemi, F., Cooper, B., Manca, P., Lapidus, R.G., Hsia, R.C., Cardona, A.F., Naing, A., Kaushal, S., Hirsch, F.R., Mack, P.C., Serrano, M.J., Adamo, V., Colen, R.R., and Rolfo, C. (2022). Extracellular vesicle PD-L1 dynamics predict durable response to immune-checkpoint inhibitors and survival in patients with non-small cell lung cancer. J Exp Clin Cancer Res 41, 186.

Dondero, A., Pastorino, F., Della Chiesa, M., Corrias, M.V., Morandi, F., Pistoia, V., Olive, D., Bellora, F., Locatelli, F., Castellano, A., Moretta, L., Moretta, A., Bottino, C., and Castriconi, R. (2016). PD-L1 expression in metastatic neuroblastoma as an additional mechanism for limiting immune surveillance. Oncoimmunology 5, e1064578.

Dou, X., Hua, Y., Chen, Z., Chao, F., and Li, M. (2022). Extracellular vesicles containing PD-L1 contribute to CD8+ T-cell immune suppression and predict poor outcomes in small cell lung cancer. Clin Exp Immunol 207, 307-317.

Eslami, S.Z., Cortés-Hernández, L.E., Sinoquet, L., Gauthier, L., Vautrot, V., Cayrefourcq, L., Avoscan, L., Jacot, W., Pouderoux, S., Viala, M., Thomas, Q.D., Lamy, P.J., Quantin, X., Gobbo, J., and Alix-Panabières, C. (2023). Circulating tumour cells and PD-L1-positive small extracellular vesicles: the liquid biopsy combination for prognostic information in patients with metastatic non-small cell lung cancer. Br J Cancer.

Fisher, D.T., Appenheimer, M.M., and Evans, S.S. (2014). The two faces of IL-6 in the tumor microenvironment. Semin Immunol 26, 38-47.

Genova, C., Tasso, R., Rosa, A., Rossi, G., Reverberi, D., Fontana, V., Marconi, S., Croce, M., Dal Bello, M.G., Dellepiane, C., Tagliamento, M., Ciferri, M.C., Zullo, L., Fedeli, A., Alama, A., Cortese, K., Gentili, C., Cella, E., Anselmi, G., Mora, M., Barletta, G., Rijavec, E., Grossi, F., Pronzato, P., and Coco, S. (2023). Prognostic Role of Soluble and Extracellular Vesicle-Associated PD-L1, B7-H3 and B7-H4 in Non-Small Cell Lung Cancer Patients Treated with Immune Checkpoint Inhibitors. Cells 12.

Ivasko, S.M., Anders, K., Grunewald, L., Launspach, M., Klaus, A., Schwiebert, S., Ruf, P., Lindhofer, H., Lode, H.N., Andersch, L., Schulte, J.H., Eggert, A., Hundsdoerfer, P., Künkele, A., and Zirngibl, F. (2022). Combination of GD2-directed bispecific trifunctional antibody therapy with Pd-1 immune checkpoint blockade induces anti-neuroblastoma immunity in a syngeneic mouse model. Front Immunol 13, 1023206.

Li, P., Wang, N., Zhang, Y., Wang, C., and Du, L. (2021). HLA-G/sHLA-G and HLA-G-Bearing Extracellular Vesicles in Cancers: Potential Role as Biomarkers. Front Immunol 12, 791535.

Marimpietri, D., Airoldi, I., Faini, A.C., Malavasi, F., and Morandi, F. (2021). The Role of Extracellular Vesicles in the Progression of Human Neuroblastoma. Int J Mol Sci 22.

Maris, J.M. (2010). Recent advances in neuroblastoma. N Engl J Med 362, 2202-2211.

Morandi, F., Corrias, M.V., and Pistoia, V. (2015). Evaluation of bone marrow as a metastatic site of human neuroblastoma. Ann N Y Acad Sci 1335, 23-31.

Morandi, F., Marimpietri, D., Görgens, A., Gallo, A., Srinivasan, R.C., El-Andaloussi, S., and Gramignoli, R. (2020). Human Amnion Epithelial Cells Impair T Cell Proliferation: The Role of HLA-G and HLA-E Molecules. Cells 9.

Morandi, F., Marimpietri, D., Horenstein, A.L., Corrias, M.V., and Malavasi, F. (2019). Microvesicles expressing adenosinergic ectoenzymes and their potential role in modulating bone marrow infiltration by neuroblastoma cells. Oncoimmunology 8, e1574198.

Morandi, F., Scaruffi, P., Gallo, F., Stigliani, S., Moretti, S., Bonassi, S., Gambini, C., Mazzocco, K., Fardin, P., Haupt, R., Arcamone, G., Pistoia, V., Tonini, G.P., and Corrias, M.V. (2012). Bone marrow-infiltrating human neuroblastoma cells express high levels of calprotectin and HLA-G proteins. PLoS One 7, e29922.

Morini, M., Raggi, F., Bartolucci, M., Petretto, A., Ardito, M., Rossi, C., Segalerba, D., Garaventa, A., Eva, A., Cangelosi, D., and Bosco, M.C. (2023). Plasma-Derived Exosome Proteins as Novel Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Neuroblastoma Patients. Cells 12.

Pardoll, D.M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer 12, 252-264.

Peinado, H., Zhang, H., Matei, I.R., Costa-Silva, B., Hoshino, A., Rodrigues, G., Psaila, B., Kaplan, R.N., Bromberg, J.F., Kang, Y., Bissell, M.J., Cox, T.R., Giaccia, A.J., Erler, J.T., Hiratsuka, S., Ghajar, C.M., and Lyden, D. (2017). Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. Nat Rev Cancer 17, 302-317.

Pistoia, V., Morandi, F., Wang, X., and Ferrone, S. (2007). Soluble HLA-G: Are they clinically relevant? Semin Cancer Biol 17, 469-479.

Richard, H., Pokhrel, A., Chava, S., Pathania, A., Katta, S.S., and Challagundla, K.B. (2020). Exosomes: Novel Players of Therapy Resistance in Neuroblastoma. Adv Exp Med Biol 1277, 75-85.

Scaruffi, P., Morandi, F., Gallo, F., Stigliani, S., Parodi, S., Moretti, S., Bonassi, S., Fardin, P., Garaventa, A., Zanazzo, G., Pistoia, V., Tonini, G.P., and Corrias, M.V. (2012). Bone marrow of neuroblastoma patients shows downregulation of CXCL12 expression and presence of IFN signature. Pediatric Blood & Cancer 59, 44-51.

Schmittgen, T.D. (2019). Exosomal miRNA Cargo as Mediator of Immune Escape Mechanisms in Neuroblastoma. Cancer Res 79, 1293-1294.

Schwich, E., Hò, G.T., Lemaoult, J., Bade-Döding, C., Carosella, E.D., Horn, P.A., and Rebmann, V. (2020). Soluble HLA-G and HLA-G Bearing Extracellular Vesicles Affect ILT-2 Positive and ILT-2 Negative CD8 T Cells Complementary. Front Immunol 11, 2046.

Schwich, E., Rebmann, V., Horn, P.A., Celik, A.A., Bade-Döding, C., Kimmig, R., Kasimir-Bauer, S., and Buderath, P. (2019). Vesicular-Bound HLA-G as a Predictive Marker for Disease Progression in Epithelial Ovarian Cancer. Cancers (Basel) 11.

Serratì, S., Guida, M., Di Fonte, R., De Summa, S., Strippoli, S., Iacobazzi, R.M., Quarta, A., De Risi, I., Guida, G., Paradiso, A., Porcelli, L., and Azzariti, A. (2022). Circulating extracellular vesicles expressing PD1 and PD-L1 predict response and mediate resistance to checkpoint inhibitors immunotherapy in metastatic melanoma. Mol Cancer 21, 20.

Wang, P., Tao, L., Yu, Y., Wang, Q., Ye, P., Sun, Y., and Zhou, J. (2023). Oral squamous cell carcinoma cell-derived GM-CSF regulates PD-L1 expression in tumor-associated macrophages through the JAK2/STAT3 signaling pathway. Am J Cancer Res 13, 589-601.

Wang, S., Sun, J., Dastgheyb, R.M., and Li, Z. (2022). Tumor-derived extracellular vesicles modulate innate immune responses to affect tumor progression. Front Immunol 13, 1045624.

Wienke, J., Dierselhuis, M.P., Tytgat, G.a.M., Künkele, A., Nierkens, S., and Molenaar, J.J. (2021). The immune landscape of neuroblastoma: Challenges and opportunities for novel therapeutic strategies in pediatric oncology. European Journal of Cancer 144, 123-150.

Zheng, C., Liu, S., Feng, J., and Zhao, X. (2020). Prognostic Value of Inflammation Biomarkers for Survival of Patients with Neuroblastoma. Cancer Manag Res 12, 2415-2425.

QUOTA ASSOCIATIVA GIC 2026... E QUELLE ARRETRATE

Carissimo Socio, come sai, la quota sociale, oltre ad essere la principale fonte di finanziamento per il funzionamento della nostra Società, è anche un segno annuale di adesione e partecipazione.
La quota sociale, attualmente ad un livello minimo, è un dovere che ogni Socio deve assolvere entro il 31 marzo di ogni anno, onde evitare che la gestione delle quote con relativi solleciti e verifiche abbia un costo superiore alla stessa quota.
La quota per il 2026 e quelle arretrate è di € 25,00 annuale e potrà essere versata tramite assegno circolare o bancario, non trasferibile, intestato a Società Italiana di Citometria oppure tramite versamento in contanti alla Segreteria oppure mediante bonifico bancario: c/c n. 4350 c/o Banca Nazionale del Lavoro 6385 Roma Casaccia, Via Anguillarese 301 - 00123 Roma.
Coordinate bancarie IBAN: IT 04B0100503385000000004350 indicando nella causale: Cognome e Nome del Socio e quota associativa GIC: (anno).
Con l'intento di favorire i cosidetti "non strutturati" (studenti, borsisti, etc.) la quota sociale è ridotta a € 15,00, chi si trova in questa condizione dovrà esplicitamente dichiararlo mediante autocertificazione contestualmente all'invio della quota annuale.
Fiduciosi della tua collaborazione e partecipazione, cogliamo l'occasione per inviarti i nostri più cari saluti.

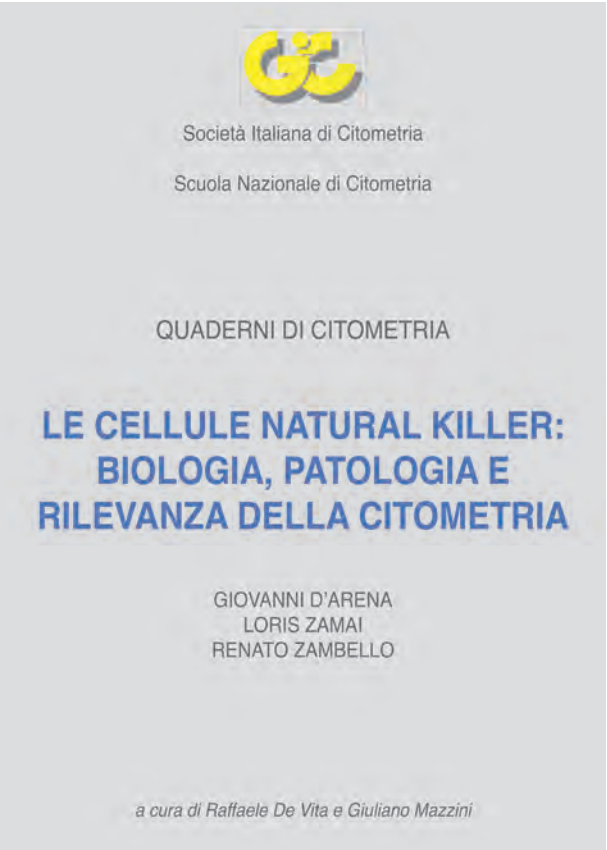
LA SEGRETERIA

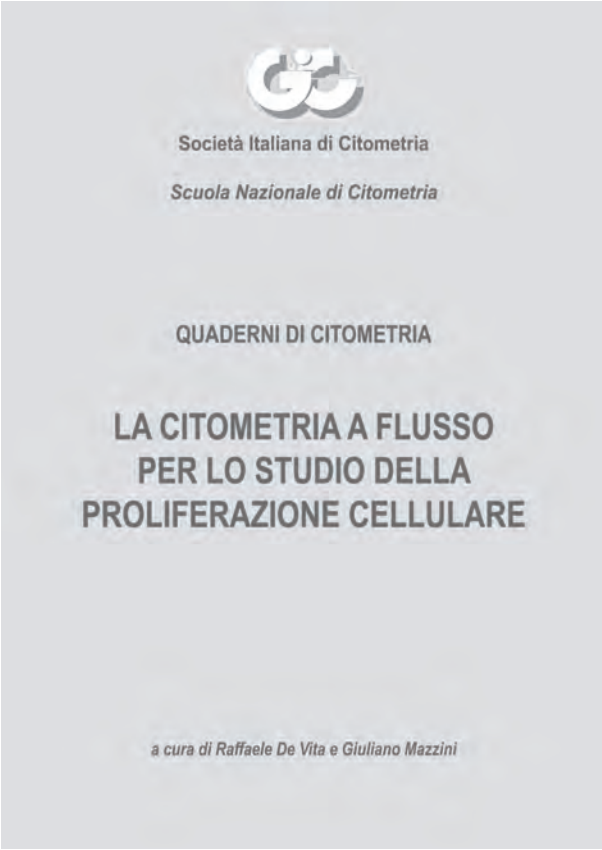
Citometristi Esperti

Elenco dei Citometristi Esperti con struttura di Albo scientifico-professionale

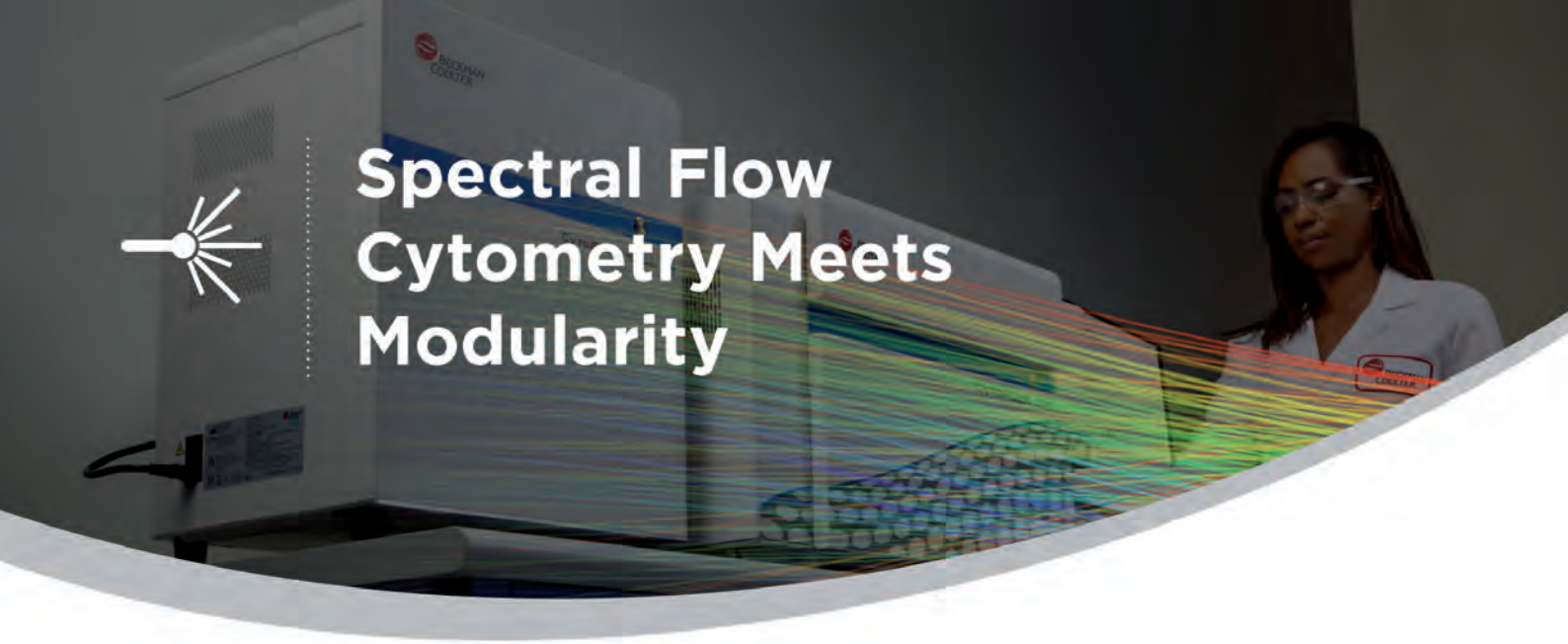
Dal 2013 il GIC ha intrapreso un percorso per il riconoscimento della figura professionale di "Citometrista Esperto" istituendo uno specifico Elenco, con struttura di Albo scientifico-professionale.
La qualifica di "Citometrista Esperto" può essere ottenuta con due diversi profili :
Citometrista Esperto "**Livello Base**" e Citometrista Esperto "**Livello Avanzato**", entrambi i profili vengono ulteriormente articolati in specifiche aree applicative della Citometria: Ematologia, Immunologia, Ricerca e Ambiente/Microbiologia.
L'accesso a ciascun livello avviene mediante la valutazione oggettiva del profilo accademico e professionale del candidato ed il superamento delle prove di esame (uno scritto ed uno orale).
La qualifica di Citometrista Esperto e la conseguente iscrizione all'"Albo" vuole avere il significato di "riconoscimento" delle effettive capacita e conoscenze professionali e non quello di un ulteriore titolo accademico. Intende essere uno strumento da "spendere" nel campo professionale ed allo stesso tempo uno strumento effettivo di formazione ed aggiornamento delle proprie tematiche professionali.

SESSIONE DI AMMISSIONE 2026
http://www.citometriagic.it





Il GIC promuove un nuovo supporto didattico e di aggiornamento "Quaderni GIC". Analogamente allo storico Manuale, i "Quaderni" rappresentano anche un valido strumento di studio ed approfondimento; nella realizzazione di questa iniziativa è stato dato molto risalto sin dall'inizio alle "conoscenze di base" che un Citometrista Esperto deve conoscere. Questo bagaglio di conoscenze non è inteso semplicemente come valore culturale, ma è prima di tutto una condizione indispensabile, che porta il Citometrista dal semplice livello di operatore esecutivo a quello di protagonista. Egli è infatti responsabile dell'intero ciclo analitico di un campione e deve saper valutare criticamente il risultato del proprio lavoro. I Quaderni sono disponibili per i Soci GIC e per i Partecipanti alla Conferenza e ai Corsi GIC e possono essere richiesti anche contestualmente all'iscrizione:http://www.citometriagic.it//
e http://www.conferenzadicitometriagic.it//



Spectral Flow Cytometry Meets Modularity

Pair Your CytoFLEX LX/S* Flow Cytometer with the CytoFLEX mosaic Spectral Detection Module to Enable Your Spectral Flow Cytometry Capabilities

The CytoFLEX mosaic Detection Module is the natural evolution of our CytoFLEX Platform. A smart approach to spectral, it connects to your CytoFLEX LX/ S Flow Cytometer, giving you the flexibility to mix and match different detection methods in one instrument.

The Best CytoFLEX You Can Get

CytoFLEX mosaic 88 Detection Module for CytoFLEX LX Flow Cytometer

(88 channels of detection:
1 FSC, 6 SSC, 81 fluorescent)

CytoFLEX mosaic 63 Detection Module for 4-laser CytoFLEX S Flow Cytometer

(63 channels of detection:
1 FSC, 4 SSC, 58 fluorescent)

A flexible approach to spectral flow cytometry

Data you can trust

Makes the complex easy

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.
*Only valid for CytoFLEX S (V-B-Y-R) Series Flow Cytometer.

© 2025 Beckman Coulter, Inc. All rights reserved. Beckman Coulter, the stylized logo, and the Beckman Coulter product and service marks mentioned herein are trademarks or registered trademarks of Beckman Coulter, Inc. in the United States and other countries. All other trademarks are the property of their respective owners.

For Beckman Coulter's worldwide office locations and phone numbers, please visit Contact Us at beckman.com

2025-GBL-EN-107398-v1

BECKMAN COULTER Life Sciences

danaher