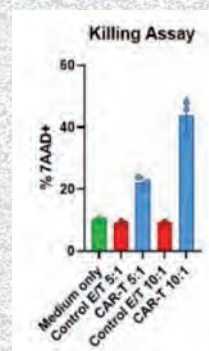


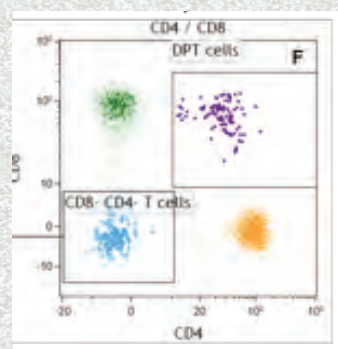
LETTERE GIC

Periodico della Società Italiana di Citometria

Impiego della citometria a flusso per la caratterizzazione funzionale delle vescicole extracellulari rilasciate da cellule CAR-T



Valore prognostico delle sottopopolazioni linfocitarie analizzate mediante citofluorimetria alla diagnosi in campioni di sangue midollare di pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin a cellule B



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

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

PROGRAMMA SCIENTIFICO



Società Italiana di Citometria
Scuola Nazionale di Citometria

QUADERNI GIC

I FONDAMENTI DELLA CITOMETRIA

a cura di Raffaele De Vita e Giuliano Mazzini



Società Italiana di Citometria
Scuola Nazionale di Citometria

QUADERNI DI CITOMETRIA

LE CELLULE NATURAL KILLER: BIOLOGIA, PATOLOGIA E RILEVANZA DELLA CITOMETRIA

GIOVANNI D'ARENA
LORIS ZAMAI
RENATO ZAMBELLO

a cura di Raffaele De Vita e Giuliano Mazzini



Società Italiana di Citometria
Scuola Nazionale di Citometria

QUADERNI DI CITOMETRIA

LA CITOMETRIA A FLUSSO PER LO STUDIO DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE

a cura di Raffaele De Vita e Giuliano Mazzini



Società Italiana di Citometria
Scuola Nazionale di Citometria

QUADERNI DI CITOMETRIA

VALUTAZIONE CITOFUORIMETRICA DELLA MALATTIA MINIMA RESIDUA

Antonella Aiello
Giovanni D'Arena
Giovanna Maisto
Paola Omedè
Livio Ottaiano
Giulia Scalia

a cura di Raffaele De Vita e Giuliano Mazzini

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/>

La soluzione completa per la Citometria a Flusso



Flessibilità

Anticorpi
CyFlow™ CE IVD



Automazione

Preparatore automatico
PS-10 e centrifuga
automatica per il lavaggio
cellulare Rotolavit II-S



Performance

Citometro a
Flusso XF-1600



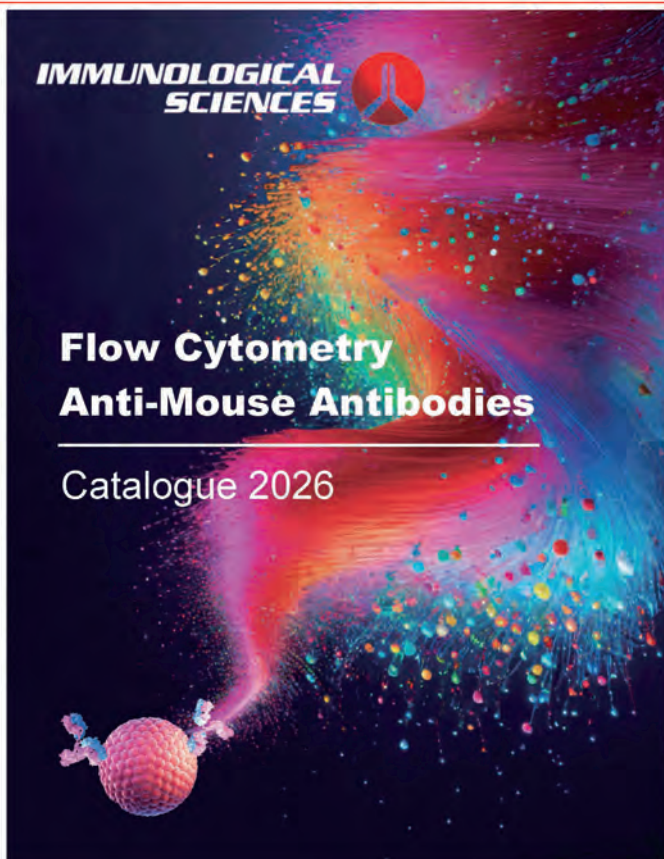
Gestione dei dati

Soluzioni software per
analisi e reportistica

Inquadra il QR code oppure
visita la pagina per saperne di più:

www.sysmex.it/citofluorimetria-clinica





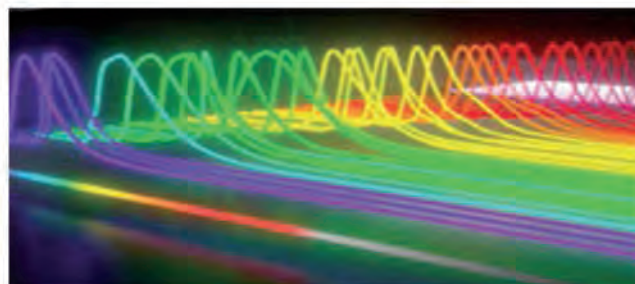
**Flow Cytometry
Anti-Mouse Antibodies**

Catalogue 2026

www.immunologicalsciences.com



**Flow Cytometry
Anti-Human Antibodies**



Catalogue 2026

www.immunologicalsciences.com



**FLOW
CYTOMETRY
ANTIBODIES**

**ANTI-HUMAN
FLOW CYTOMETRY
ANTIBODIES**

A brighter solution in
Flow Cytometry.



**BROWSE THE HUMAN
LIST IN THE QR CODE**

**ANTI-MOUSE
FLOW CYTOMETRY
ANTIBODIES**

Find the best combinations of
antibodies and conjugation
ideal for phenotyping.



**BROWSE THE MOUSE
LIST IN THE QR CODE**

SELECT YOUR FREE SAMPLE!

Send your samples request to info@immunologicalsciences.com



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



A Brighter Future in Flow

FLOW CYTOMETRY

**ANTI-HUMAN
CD ANTIGENS**

CATALOGUE 2026

www.sichim.com



LETTERE GIC

Vol. 35, Num.1, 2026

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. 35, num. 1 - 2026

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:



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 Scientifico

44^a Conferenza e Scuola di Citometria

Corsi teorico-pratici di formazione e aggiornamento
"La Citometria: Analisi Gestione dei dati
e loro interpretazione"

10-12 giugno 2026 Residenziale,

Biotecnologie - Università degli Studi di Napoli Federico II

6

Impiego della citometria a flusso per la caratterizzazione funzionale delle vescicole extracellulari rilasciate da cellule CAR-T

15

**Giulia Colasante, Francesca D'Ascanio, Domenico De Bellis, Sabino Porro,
Tamer Esmail, Arianna Aquilini-Mummolo, Ayesha Younas,
Pasquale Simeone, Mauro Di Ianni, Francesco Guardalupi, Giulia Corradi,
Serena Veschi, Rosalba Florio, Alessandro Cama, Francesca Zazzeroni,
Paola Lanuti**

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

22

Valore prognostico delle sottopopolazioni linfocitarie analizzate mediante citofluorimetria alla diagnosi in campioni di sangue midollare di pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin a cellule B

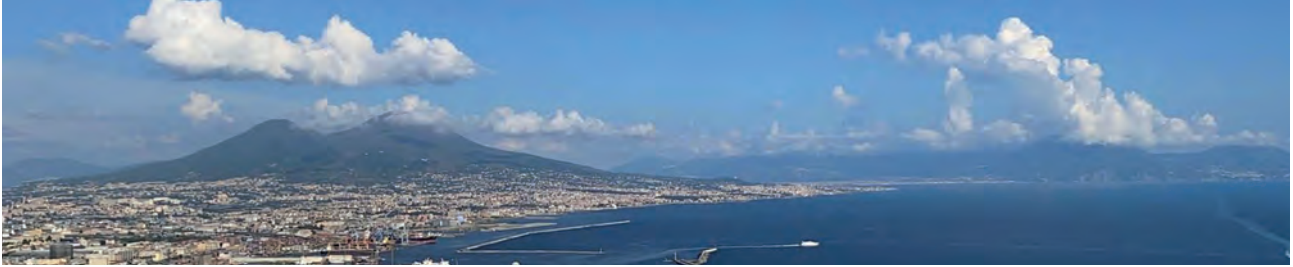
23

**Luciana Valvano, Rocchina Vilella, Fiorella D'Auria, Giovanni D'Arena,
Rossana Libonati, Michela Soda, Alessia Telesca, Giuseppe Pietrantuono,
Giovanna Rosaria Mansueto, Oreste Villani, Simona D'Agostino,
Giovanni Calice, Teodora Statuto**

News in Bibliografia

31

Peer Review Journal



Società
Italiana di
Citometria

44^a CONFERENZA E SCUOLA DI CITOMETRIA

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

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*)
Virginia Tirino (*Napoli*)

Mercoledì 10 giugno 14:00-17:30

SESSIONE PLENARIA DI APERTURA: CITOMETRIA MULTIDISCIPLINARE COMUNE A TUTTI I CORSI

14:00 Registrazione

14:30 **Apertura**

Rosa Chianese (*Milano*), Raffaele De Vita (*Roma*), Stefania Loffredo (*Napoli*),
Giuliano Mazzini (*Pavia*), Giulia Scalia (*Napoli*), Virginia Tirino (*Napoli*)

Moderatori: Raffaele De Vita (Roma), Antonella Aiello (Milano)

15:00 **Artificial Intelligence in Cytometry**

“Auto gating, population detection, MRD et al.”

Yinxiu Zhan (*Milano*)

15:30 **Citometria a flusso ad alta dimensionalità: analisi non supervisionata e
identificazione delle popolazioni cellulari**

Domenico Lo Tartaro (*Modena*)

Moderatori: Alessandra Battaglia (Roma), Giuseppe Coppola (Salerno)

16:00 **La MRD nel Mieloma Multiplo: evidenze attuali e prospettive future**

Elona Saraci (*Torino*)

supported by BD BIOSCIENCES

16:30 **La competenza immunitaria antivirale: Identificazione di meccanismi
patogenetici e nuove strategie immunomodulanti**

Chiara Agrati (*Roma*)

supported by BECKMAN COULTER

Moderatori: Raffaele De Vita (Roma), Claudio Pioli (Roma)

17:00 **Lettura Magistrale di Apertura**

Immunità Innata, Infiammazione e Cancro

Alberto Mantovani (*Milano*)

Brindisi di Benvenuto

Giovedì 11 giugno

Corso CB

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

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

08:30-13:00

Sessione 3: Esempi e problematiche specifiche in diversi Campi Applicativi

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

La Citometria a flusso come strumento analitico per l'enologia e l'agroalimentare

Federico Sizzano (Nyon, CH)

La mia prima analisi multiparametrica: controlli, controlli, controlli

Claudio Pioli (Roma)

10:30 *Pausa caffè*

Pannelli complessi in Citometria convenzionale: progettazione e problematiche

Gabriele Favaretto (Roma)

Pannelli complessi in Citometria spettrale: progettazione e problematiche

Claudia D'Oria (Milano)

13:00 *Pausa pranzo*

14:00-17:00

Sessione 3: Esempi e problematiche specifiche in diversi Campi Applicativi

Non solo analisi, il cell sorting e quello che gli utenti devono sapere

Nicolò Panini (Milano)

Sessione 4: Didattica interattiva ed esercitazioni con Giovani Citometristi

Esempi di analisi citometriche, con file proposti dagli Allievi, di particolare significato interpretativo e di rilevanza analitica in diversi campi applicativi

Coordinatori e Docenti

Discussione e conclusioni

17:00 *Assemblea GIC Aperta a tutti*

17:45 *Sapere i Saperi a km 0 "degustazioni campane"*

Giovedì 11 giugno

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)

08:30-13:00

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

Moderatori: Rosa Chianese (Milano), Giuseppe Coppola (Salerno)

Evoluzione della Citometria a flusso, dalla diagnosi alla terapia, con l'avvento delle terapie avanzate mediante trapianto di cellule CAR

Giuseppe Gaipa (Monza), Chiara Buracchi (Milano)

Esempi pratici e presentazione di casi clinici. Esempi di refertazione, metodo di analisi e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

10:30 *Pausa caffè*

Prospettive del monitoraggio citometrico nell'ambito delle terapie avanzate mediante cellule CAR-T "commerciali"

Cristiana Carniti (Milano)

Esempi pratici e presentazione di casi clinici. Esempi di refertazione, metodo di analisi e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

Discussione

13:00 *Pausa pranzo*

14:00-17:00

Sessione 4: Ruolo ed evoluzione della Citometria a flusso nel campo delle Leucemie Acute Mieloidi

Moderatori: Rachele Amodeo (Roma), Giulia Scalia (Napoli)

Stato dell'arte nella diagnostica e monitoraggio citometrico delle Leucemie Acute Mieloidi

Marisa Gorrese (Salerno), Vincenza Cerbone (Napoli)

Esempi pratici e presentazione di casi clinici. Esempi di refertazione, metodo di analisi e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

Moderatori: Daniela Graziano (Napoli), Maddalena Raia (Napoli)

Evoluzione della citometria a flusso nel monitoraggio delle malattie oncoematologiche in trattamento con anticorpi monoclonali

Giovanni Rossi (San Giovanni Rotondo), Grazia Dell'Olio (San Giovanni Rotondo)

Esempi pratici e presentazione di casi clinici. Esempi di refertazione, metodo di analisi e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

Discussione e conclusioni

17:00 *Assemblea GIC Aperta a tutti*

17:45 *Sapere i Sapori a km 0 "degustazioni campane"*

Giovedì 11 giugno

Corso C2

**CITOMETRIA E IMMUNITÀ:
DALLA FENOTIPIZZAZIONE AGLI STUDI FUNZIONALI**

Coordinatori: Chiara Agrati (Roma), Alessandra Battaglia (Roma), Daniela Fenoglio (Genova)
08:30-13:00

Sessione 3: Immunoterapia dei tumori: ruolo del monitoraggio citometrico nella medicina di precisione

Introduzione

Moderatore: Daniela Fenoglio (Genova)

Il sistema immunitario come farmaco vivente contro il cancro: l'ingegnerizzazione delle cellule immunitarie per il targeting di precisione delle cellule tumorali

Cristina Maccalli (Genova)

I linfociti NK nel cancro del colon-retto: caratterizzarli fenotipicamente per disegnare nuove immunoterapie

Mariella Della Chiesa (Genova)

10:30 *Pausa caffè*

Moderatore: Chiara Agrati (Roma)

Riconoscimento citometrico delle cellule mieloidi soppressorie di origine granulocitaria: fenotipo, funzione e criticità

Alessandra Battaglia (Roma)

Introduzione al panorama mioeloide mediante la Citometria a flusso spettrale e approcci di analisi unbiased

Achille Anselmo & Francesca Clemente (Milano)

Discussione

13:00 *Pausa pranzo*

14:00-17:00

Sessione 4: La Citometria a flusso nel monitoraggio delle patologie infettive e autoimmuni

Moderatore: Daniela Fenoglio (Genova)

Dalla soppressione cellulo-mediata alle cellule T regolatorie: una prospettiva storica

Giuseppe Matarese (Napoli)

Analisi dell'attività antivirale dei linfociti T gamma delta: ruolo della citofluorimetria

Chiara Agrati (Roma)

Moderatore: Alessandra Battaglia (Roma)

Analisi citofluorimetrica delle cellule B in contesti di vaccinazione, infezione e malattia

Eva Piano-Mortari (Roma)

Analisi citofluorimetrica multiparametrica per l'identificazione e la caratterizzazione di linfociti T specifici ad antigeni virali

Laura Maggi (Firenze)

Discussione e conclusioni

17:00 *Assemblea GIC Aperta a tutti*

17:45 *Sapere i Sapori a km 0 "degustazioni campane"*

Giovedì 11 giugno

Corso C3

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

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

08:30-13:00

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

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

Esplorare i mitocondri con la Citometria: nuovi approcci e applicazioni

Vitale Del Vecchio (Roma)

10:30 *Pausa caffè*

Vescicole extracellulari: come la Citometria rende visibile l'invisibile

Paola Lanuti (Chieti)

Discussione

13:00 *Pausa pranzo*

14:00-17:00

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

Analisi citometrica multiparametrica dell'assetto immunologico in pazienti con NSCLC avanzato: strategie di gating e marcatori predittivi di risposta all'immunoterapia

Rosa Camerlingo (Napoli)

Biomarcatori immunologici e citofluorimetria: una combinazione chiave per la profilazione del paziente oncologico

Ilaria Grazia Zizzari (Roma)

Discussione e conclusioni

17:00 *Assemblea GIC Aperta a tutti*

17:45 *Sapere i Sapori a km 0 "degustazioni campane"*

Giovedì 11 giugno

Corso C4

**CITOMETRIA AMBIENTALE
LA CITOMETRIA PER LE NUOVE SFIDE AMBIENTALI**

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

08:30-13:00

Sessione 3: Citometria ambientale dalla teoria alla pratica: Tecniche citometriche per il monitoraggio ambientale

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

Introduzione

Tecniche citometriche per il monitoraggio microbiologico: Procedure di laboratorio
Cecilia Balestra (Trieste), Stefano Amalfitano (Roma)

10:30 *Pausa caffè*

Tecniche citometriche per il monitoraggio microbiologico: Esempi applicativi
Stefano Amalfitano (Roma), Cecilia Balestra (Trieste)

Discussione e conclusioni

13:00 *Pausa pranzo*

14:00-17:00

Sessione 4: Citometria ambientale dalla teoria alla pratica: Tecniche citometriche in campo biotecnologico

Tecniche citometriche su matrici vegetali: Procedure di laboratorio
Anna Farina (Roma), Debora Giorgi (Roma)

Tecniche citometriche su matrici vegetali: Esempi applicativi
Anna Farina (Roma), Debora Giorgi (Roma)

Discussione e conclusioni

17:00 *Assemblea GIC Aperta a tutti*

17:45 *Sapere i Sapori a km 0 "degustazioni campane"*

Venerdì 12 giugno

**SESSIONE PLENARIA DI CITOMETRIA MULTIDISCIPLINARE
COMUNE A TUTTI I CORSI**

Moderatori: Rosa Chianese (Milano), Daniela Fenoglio (Genova)

09:00 **L'invecchiamento rimodella la granulopoiesi generando neutrofili patogenici**
Marco Bacigaluppi (Milano-Zurigo)

09:40 **Regolazione della risposta T: tessuto, infiammazione cronica e autoimmunità**
Raffaele De Palma (Genova)

10:20 *Pausa caffè*

10:40 **Monitoraggio della malattia residua minima in Citometria a flusso nella leucemia mieloide acuta dell'età pediatrica**
Barbara Buldini (Padova)

Moderatori: Raffaele De Vita (Roma), Virginia Tirino (Napoli)

11:20 **Letture Magistrali conclusive**
Nuove strategie con anticorpi terapeutici a CAR-T contro le cellule staminali dei tumori colorettali: bersagli e interazioni con il microambiente tumorale
Ruggero De Maria (Roma)

12:00 **Conclusioni**
Rosa Chianese (Milano), Raffaele De Vita (Roma), Stefania Loffredo (Napoli), Giuliano Mazzini (Pavia), Giulia Scalia (Napoli), Virginia Tirino (Napoli)

12:20 Premiazione delle schede di valutazione della Conferenza

12:30 *Light Lunch di saluto*

CON IL PATROCINIO DI



Agenzia Nazionale per le Nuove Tecnologie,
L'Energia e lo Sviluppo Economico Sostenibile



Biotechnologie Avanzate Franco Salvatore



Associazione Italiana Ematologia Oncologia Pediatrica



Gruppo Italiano per il Trapianto di Midollo Osseo,
Cellule Staminali Emopoietiche e Terapia Cellulare



Società Italiana di Patologia Clinica e Medicina di Laboratorio

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. 0 16
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-mail: citometriagic@proeventi.it



www.proeventi.it



SPONSOR PLATINUM



SPONSOR GOLD



Impiego della citometria a flusso per la caratterizzazione funzionale delle vescicole extracellulari rilasciate da cellule CAR-T

Giulia Colasante^{1,2,3}, Francesca D'Ascanio^{1,2,4}, Domenico De Bellis^{1,2}, Sabino Porro^{1,2}, Tamer Esmail^{1,2}, Arianna Aquilini-Mummolo^{1,2}, Ayesha Younas^{1,2}, Pasquale Simeone^{1,2}, Mauro Di Ianni^{1,2}, Francesco Guardalupi^{1,2}, Giulia Corradi^{1,2}, Serena Veschi^{1,2,5}, Rosalba Florio^{1,2,5}, Alessandro Cama^{1,2,5}, Francesca Zazzeroni³, Paola Lanuti^{1,2}

¹Dipartimento di Medicina e Scienze dell'Invecchiamento, Università degli Studi "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara

²Center for Advanced Studies and Technology (CAST), Università degli Studi "G. d'Annunzio" di Chieti-Pescara

³Dipartimento di Scienze Cliniche Applicate e Biotecnologiche, (DISCAB) Università degli Studi Dell'Aquila

⁴Department of Humanities, Law and Economics, "Leonardo da Vinci" University - Torrevicchia Teatina

⁵Department of Pharmacy, University "G. D'Annunzio", Chieti

e-mail: giulia.colasante001@phd.unich.it

Abstract

Extracellular vesicles (EVs) are a heterogeneous population of particles bordered by a lipid bilayer that, by mediating intercellular communication, coordinate a wide range of physiological and pathological processes in diverse biological systems. The content of EVs is directly related to the state of parental cells; therefore, EVs are potentially useful dynamic biomarkers for the diagnosis and prognosis of a wide range of pathological conditions. Furthermore, recent advances in the isolation, characterisation and manipulation of EVs have highlighted their relevance as potential therapeutic agents in a variety of conditions. Cell therapy based on the use of "Chimeric Antigen Receptor" (CAR)-T cells is currently used in the treatment of haematological malignancies, although there are still issues to be resolved before they can be widely disseminated, including susceptibility to tumour load and immune checkpoint activation. Importantly, CAR-T-derived EVs (CAR-T EVs) have strong potential as novel off-the-shelf agents for the treatment of haematological diseases, given their low immunogenicity [1]. Furthermore, CAR-T EVs are constitutively released from their parent cells and circulate in the bloodstream, thus they may serve as a monitoring tool for haematological patients undergoing CAR-T cell therapy.

In this context, we analysed and characterised both morphologically and functionally the potential of EVs derived from a CAR-T cell model targeting a molecule particularly expressed by pancreatic adenocarcinoma cells, B7-H3.

1. INTRODUZIONE

Le Vescicole Extracellulari (EVs) sono particelle rivestite da membrana plasmatica e secrete nell'ambiente extracellulare da tutti i tipi di cellule, sia in condizioni fisiologiche che patologiche [2], in grado di mediare la comunicazione intercellulare. Le EVs sono state identificate in tutti i fluidi biologici e la loro capacità di attraversare le barriere biologiche e di veicolare biomolecole attive le rende potenziali candidati per terapie "EV-based" [3]. Le EVs derivate da cellule CAR-T (CAR-T EVs) sono promettenti agenti terapeutici «off-the-shelf» per malattie ematologiche e un promettente tool di monitoraggio prognostico e diagnostico.

Tradizionalmente, le EVs sono state classificate in tre sottotipi, sulla base della loro biogenesi: esosomi, microvescicole e corpi apoptotici. Gli esosomi, con-

siderati le EVs di dimensioni inferiori (30-150 nm), si formano attraverso una via di biogenesi endosomiale che inizia con l'endocitosi e la formazione degli endosomi precoci, i quali maturano in endosomi tardivi o corpi multivescicolari (MVB). All'interno dei MVB, porzioni della membrana endosomiale si invaginano dando origine a vescicole intraluminali che incorporano specifiche proteine, lipidi e acidi nucleici, tramite meccanismi dipendenti dai complessi ESCRT o da vie ESCRT-indipendenti. La fusione dei MVB con la membrana plasmatica determina infine il rilascio delle vescicole intraluminali nello spazio extracellulare, dove prendono il nome di esosomi [4, 5]. Le microvescicole, di dimensioni comprese tra 100 nm e 1 µm, originano, invece, dalla gemmazione diretta verso l'esterno [5, 6]. I corpi apoptotici (800 nm-5 µm), sono rilasciati dalle cellule durante il processo apoptotico [5, 7]. Recentemente sono state individuate altre classi di EVs, e tra queste gli oncosomi (1000 nm) e i "Large Oncosomes" (1-10 µm), secreti dalle cellule tumorali, sono state associate all'invasione tumorale e all'angiogenesi [5, 8]. I migrasomi che sono EVs di grandi dimensioni generate dalle cellule durante la migrazione cellulare [5, 9], gli esomeri sono nanoparticelle non membranose [5, 10], e i supermeri sono nanoparticelle extracellulari funzionali [5, 11].

Con i recenti avanzamenti tecnologici, è stato tuttavia osservato che i diversi sottotipi di EVs presentano una importante sovrapposizione dimensionale. Per questo motivo e poiché quasi mai vengono identificati i meccanismi di biogenesi delle EVs studiate, le linee guida pubblicate dall'ISEV più recentemente, sottolineano l'opportunità di suddividerle in due categorie, basandosi esclusivamente sulla misura delle loro dimensioni, in «small vesicles», con diametri inferiori a 200 nm e «medium-large vesicles» se dimostrano dimensioni maggiori di 200 nm [12]. Tuttavia, mentre il termine «small vesicles» identifica tipicamente le EVs con un diametro inferiore a 200 nm, non esiste un'accettazione definitiva di specifici limiti dimensionali superiori e inferiori per la loro classificazione. Ad esempio, è stato osservato che diverse tecniche di separazione, tra cui l'ultracentrifugazione differenziale (dUC), producono popolazioni di EVs con profili dimensionali simili. Pertanto, le linee guida MISEV più recenti suggeriscono di essere il più specifici possibile sull'uso dei termini considerando il metodo di caratterizzazione utilizzato [5].

Le EVs sono internalizzate dalle cellule bersaglio tramite

diverse vie endocitiche (clatrina-mediata, caveoline-mediata, lipid raft-mediata, macropinosi, fagocitosi) o mediante fusione diretta con le membrane plasmatiche [13].

L'isolamento delle EVs non si basa su un unico metodo standard, e la scelta dipende dal campione e dall'applicazione prevista per le EVs isolate [12].

Una delle tecniche più consolidate è l'ultracentrifugazione, utilizzata sia nella modalità differenziale (dUC) per separare le particelle in base a dimensione e densità, sia attraverso gradienti di densità per ottenere un grado di purezza superiore. Sebbene la dUC garantisca campioni relativamente puri, la sua applicazione è limitata dai tempi operativi prolungati e dalla necessità di strumentazione ad alta velocità altamente specializzata [14, 15]. In alternativa, si possono impiegare metodi basati esclusivamente su criteri dimensionali, quali la cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) e l'ultrafiltrazione [16, 17] oppure tecniche di precipitazione chimica mediante l'uso di polietilenglicole (PEG) [18, 19].

Per chi necessita di una maggiore specificità molecolare, l'immunoaffinità sfrutta il legame selettivo tra antigene e anticorpo per isolare sottopopolazioni specifiche [20]. In questo ambito, il Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) sta emergendo come una risorsa dal grande potenziale [21], poiché permette di purificare e caratterizzare simultaneamente diversi sottotipi di EV basandosi sui loro fenotipi e marcatori di superficie [22]. Una volta isolate, l'identificazione delle EV richiede un'analisi rigorosa dal punto di vista morfologico e dimensionale. Per determinare concentrazione e dimensioni basandosi sul moto browniano, le tecniche d'elezione sono la Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) e il Dynamic Light Scattering (DLS) [23, 24], affiancate dal Resistive Pulse Sensing (RPS), che invece rileva la distribuzione dimensionale tramite variazioni di corrente elettrica [25]. L'indagine morfologica profonda e lo studio delle proprietà meccaniche sono affidati alla microscopia ad alta risoluzione, in particolare la microscopia elettronica a trasmissione e a scansione (TEM, SEM) e la microscopia a forza atomica (AFM) [5, 26]. Infine, per una valutazione dettagliata della singola vescicola, la citometria a flusso (FCM) si dimostra fondamentale, consentendo di analizzare l'espressione dei marcatori e le dimensioni attraverso precisi protocolli di calibrazione [27].

Tuttavia, la citometria a flusso presenta diversi limiti associati principalmente alla manipolazione dei campioni, all'acquisizione e all'analisi dei dati.

Uno dei problemi che si incontrano quando si analizzano le EVs tramite citometria a flusso è relativo alla sensibilità strumentale. Non tutte le piattaforme citometriche sono in grado di rilevare eventi di piccole dimensioni [28].

Nell'ultimo decennio, la maggior parte dei citometri a flusso commerciali è stata ottimizzata per l'analisi di particelle di piccole dimensioni. I produttori di strumenti hanno sviluppato rivelatori e ottiche per migliorare la sensibilità dei citometri a flusso per la rilevazione di particelle di piccole dimensioni. Ad esempio, i nuovi citometri a flusso hanno implementato un canale di diffusione laterale ad alta sensibilità per l'identificazione di particelle di piccole dimensioni, consentendo la rilevazione di particelle di 110 nm senza richiedere alcuna modifica alla configurazione dello strumento [28].

Le vescicole extracellulari stanno emergendo come una risorsa di straordinario interesse per la medicina moderna,

grazie alla loro versatilità e alle proprietà biologiche uniche che le rendono protagoniste in diversi ambiti clinici.

Uno dei campi di applicazione più promettenti riguarda il loro impiego come biomarcatori non invasivi nell'ambito della biopsia liquida. Essendo presenti nei fluidi corporei, esse offrono una finestra preziosa per monitorare lo stato di salute del paziente senza ricorrere a procedure chirurgiche invasive. Oltre alla diagnosi, le EVs si rivelano strumenti eccezionali per la somministrazione mirata di farmaci: la loro natura biologica permette infatti di superare ostacoli fisiologici altrimenti invalicabili, come la barriera emato-encefalica (BBB), aprendo nuove strade per il trattamento di patologie del sistema nervoso centrale [29].

Tuttavia, il passaggio verso un utilizzo clinico sistematico richiede il superamento di alcune sfide tecniche cruciali. La ricerca attuale è infatti fortemente concentrata sull'ottimizzazione della produzione su larga scala, sul perfezionamento delle tecniche di crioconservazione per garantirne la stabilità nel tempo e su una comprensione più profonda della loro biodistribuzione in vivo a seconda delle diverse vie di somministrazione.

Un'attenzione particolare è rivolta all'oncologia, dove è ormai noto che le EVs di origine tumorale svolgono un ruolo determinante nel modellare il microambiente circostante. Queste vescicole, infatti, non solo favoriscono la progressione del cancro, ma mediano anche i meccanismi di resistenza ai farmaci, rendendo il loro studio fondamentale per lo sviluppo di terapie oncologiche più efficaci e personalizzate.

Recentemente, le EV derivate da cellule CAR-T (CAR-T EVs) sono state proposte come approccio terapeutico alternativo, con il potenziale di superare alcune delle limitazioni della terapia cellulare CAR-T [1].

1.1 Terapia cellulare delle CAR-T nel cancro del pancreas

Il cancro del pancreas (PC) è il 12° tumore più comune e la 7° causa di morte per cancro in tutto il mondo. Questo tipo di tumore ha una prognosi sfavorevole a causa della diagnosi tardiva e delle limitate opzioni terapeutiche. Il tasso di sopravvivenza relativa a 5 anni per il PC è del 12%. Pertanto, la diagnosi precoce e l'identificazione di bersagli terapeutici molecolari migliorano le prospettive di sopravvivenza a lungo termine. Secondo i dati pubblicati nel 2023 dal National Cancer Institute, il 90% dei tumori del pancreas è costituito da adenocarcinomi duttali pancreatici (PDAC), che si prevede saranno la seconda causa di morte per cancro entro il 2030.

L'immunoterapia è efficace nel trattamento di diversi tipi di cancro; tuttavia, non è associata a un miglioramento della sopravvivenza globale nei pazienti affetti da PC. Pertanto, sono necessarie nuove strategie terapeutiche per migliorare gli esiti dei pazienti con PC.

Un'alternativa promettente potrebbe essere l'immunoterapia con cellule CAR-T. Tuttavia, è stato sottolineato che il successo della terapia cellulare CAR-T nel trattamento del PC è ostacolato dalla TME [7].

Un altro fattore che limita l'efficacia della terapia con cellule CAR-T è il profilo immunosoppressivo di citochine e chemochine nel TME. Per superare le limitazioni della terapia con cellule CAR-T nel PC, si stanno sviluppando e testando diverse strategie in studi preclinici e clinici [30].

Il B7-H3 (noto anche come CD276), membro della famiglia B7 delle proteine dei checkpoint immunitari, è una proteina di membrana di tipo I con una sequenza simile al dominio extracellulare del PD-L1 [31]. In uno studio condotto su pazienti affetti da cancro del pancreas, B7-H3 è stata riconosciuta come una molecola co-stimolatoria non solo abbondantemente espressa nel PC, ma anche associata ad una maggiore efficacia del trattamento. I ricercatori hanno scoperto che, sebbene l'espressione di B7-H3 fosse rilevabile nella maggior parte dei campioni di tumore pancreatico esaminati e significativamente upregolata nel PC rispetto al pancreas normale, i pazienti con alti livelli di B7-H3 tumorale avevano una prognosi post-operatoria significativamente migliore rispetto ai pazienti con bassi livelli di B7-H3 tumorale [32].

Inoltre, uno studio ha dimostrato che la terapia CAR-T mirata al CD276 è in grado di controllare la crescita dell'adenocarcinoma duttale pancreatico in vitro e in modelli murini ortotopici e metastatici di xenotrapianto. Pertanto, prove sempre più numerose dimostrano che il CD276 è emerso come un promettente bersaglio terapeutico per la terapia CAR-T [31].

Il numero complessivo di studi clinici avviati e conclusi nel campo della medicina rigenerativa basata sulle cellule è aumentato in modo significativo negli ultimi decenni. I benefici terapeutici delle terapie cellulari sono in parte legati agli effetti paracrini indotti dal rilascio delle EV. Ad oggi, sono passati quasi 80 anni dalla prima scoperta delle EV e sono stati condotti molti studi clinici per valutare il loro ruolo come strumenti diagnostici e agenti terapeutici in diverse patologie.

In oncologia, diversi studi clinici studiano le EV per lo screening del cancro, la diagnosi precoce, il monitoraggio delle risposte terapeutiche e la previsione delle recidive. Questi studi mirano ad analizzare l'utilità degli acidi nucleici, delle proteine e dei microRNA associati alle EV come biomarcatori non invasivi per diversi tipi di cancro, con l'obiettivo di migliorare l'accuratezza degli attuali biomarcatori e di migliorare la diagnosi precoce [33].

2. OBIETTIVI DELLA RICERCA: caratterizzazione e potenziale terapeutico delle EVs derivate da CAR-T anti-B7-H3

Lo scopo del presente studio è stato quello di caratterizzare, sotto il profilo morfologico e funzionale, le EVs rilasciate da cellule CAR-T dirette contro B7-H3, al fine di valutare il potenziale impiego delle EVs derivate da CAR-T anti-B7-H3 come strategia terapeutica innovativa per il trattamento dell'adenocarcinoma pancreatico.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Donatori: Le cellule CAR-T sono state generate a partire da campioni di aferesi ottenuti da due donatori sani, arruolati presso l'Unità di Ematologia dell'Ospedale "S. Spirito" di Pescara (Italia), previa acquisizione del consenso informato e in conformità con l'approvazione del Comitato Etico competente.

3.2 Colture Cellulari: La linea cellulare di adenocarcinoma pancreatico L3.6pl, esprime il B7H3, è stata coltivata in terreno RPMI 1640 e mantenuta a 37°C con 5% di CO₂.

3.3 Analisi Citofluorimetriche:

Espressione di B7-H3: Le cellule L3.6pl sono state

risospese in PBS e marcate con Anti-B7H3-Brilliant Violet (BV)711 per 20 minuti a 4°C, quindi analizzate in citometria a flusso mediante lo strumento FACSVerse (BD Biosciences) per valutare l'espressione di B7-H3. Le cellule sono state identificate attraverso i parametri fisici FSC (Forward Scatter) ed SSC (Side Scatter) e l'espressione di B7H3 mediante valutazione della fluorescenza sul canale BV711 rispetto al rispettivo controllo (cellule non marcate).

Analisi delle EVs da Surnatanti Cellulari:

EVs CAR+: Il surnatante di cellule CAR-T (100 µl), è stato colorato con 1 µl di colorante cationico lipofilico (LCD), 0,2 µl di falloidina (FITC) e 1 µl di anti-CAR B7-H3.

Granzima B e Perforina: Il surnatante di cellule CAR-T (100 µl), è stato colorato con LCD e falloidina, poi fissato e permeabilizzato con Cytofix/Cytoperm, e infine marcato con 5 µl di anti-Perforina e 5 µl di Granzima B.

Acquisizione delle EVs in citometria a flusso: I campioni colorati sono stati diluiti con PBS e acquisiti mediante FACSVerse, la soglia della fluorescenza è stata impostata sul canale APC (canale di emissione di LCD), registrando almeno 1x10⁶ eventi/campione. Sono stati utilizzati controlli FMO per ogni marcatore allo scopo di impostare correttamente il *gating*. La compensazione è stata calcolata utilizzando CompBeads o campioni marcati singolarmente. Le intensità di fluorescenza sono state riportate come rapporti di intensità di fluorescenza media (MFI). Queste misure sono state calcolate come rapporto tra l'intensità di fluorescenza del campione colorato e il controllo non colorato.

Metodo di calibrazione:

L'uso del sistema di calibrazione Rosetta ha permesso di introdurre il parametro dimensionale (in nm) all'interno dei metadati dei file FCS acquisiti. In questo modo è possibile monitorare direttamente le dimensioni delle particelle acquisite e si può stabilire il limite di risoluzione delle piattaforme citometriche usate [29].

3.4 Isolamento delle EVs:

Fluorescence Activated Cell Sorting: 500 µl di surnatante cellulare contenente EVs sono stati colorati con 1 µl di falloidina coniugata con FITC (Sigma) e 3 µl di LCD (BD Biosciences), dopo 45 minuti di incubazione i campioni sono stati diluiti con PBS e poi le EVs (falloidina-/LCD+) sono state isolate tramite cell sorting (FACS Aria III) utilizzando un nozzle da 100 µm. La soglia è stata impostata sul canale APC e, per tutti i parametri sono state utilizzate le modalità bi-esponenziale e i segnali di altezza (H)[21]. Le prestazioni dello strumento, la riproducibilità dei dati e le calibrazioni della fluorescenza sono state sostenute dal Cytometer Setup & Tracking Module (BD Biosciences).

Ultracentrifugazione: Le EVs sono state isolate dal terreno di coltura attraverso centrifugazioni sequenziali (300xg, 2.000xg, 12.000xg) per rimuovere cellule e detriti, seguite da ultracentrifugazione a 100.000xg per recuperare le EVs come pellet.

3.5 Concentrazione e Quantificazione delle EVs:

Precipitazione con PEG: Le EVs isolate con FACS sono state precipitate con una soluzione di polietilenglicole (PEG) 8000 (rapporto 1:4), incubate una notte a 4°C e centrifugate.

Filtrazione a Flusso Tangenziale (TFF): Il surnatante è stato concentrato utilizzando il sistema TFF

Minimate™ EVO con membrana da 300 kDa per pre-sorting e post-sorting.

Quantificazione Proteica: Il contenuto proteico delle EVs precipitate con PEG o concentrate con TFF è stato quantificato mediante BCA Protein Assay.

3.6 Caratterizzazione delle EVs:

Nanoparticle Tracking Analysis (NTA): Le dimensioni e concentrazioni delle EVs sono state analizzate con lo strumento ZetaView (Particle Metrix, Meerbusch, Germania) dotato di un laser blu (488 nm, 40 mW).

Microscopia a Forza Atomica (AFM): Le EVs sono state caricate su *wafers* di SiO₂, essiccate e analizzate in TappingMode™ con un microscopio MultiMode 8 AFM per esaminare morfologia e distribuzione dimensionale.

Western Blotting: Le proteine da cellule ed EVs sono state lisate, quantificate e separate tramite elettroforesi. Per la caratterizzazione delle EVs sono stati usati anticorpi anti-CD63, anti-CD81, anti-Flotillina e anti-Citocromo C.

3.7 Analisi Proteomica e Bioinformatica: Almeno 2x10⁶ EVs isolate tramite FACS sono state usate per analisi proteomica [34] tramite cromatografia liquida-tandem spettrometria di massa (LC-MS/MS). I dati sono stati elaborati con Proteome Discoverer e analizzati per arricchimento funzionale GO con Ingenuity Pathway Analysis e interazioni proteina-proteina (PPI) con STRING.

3.8 Esperimenti *in vitro*:

Saggio di Citotossicità delle B7-H3 CAR-T EVs: Le EVs da CAR-T sono state isolate tramite FACS e precipitate mediante PEG o UC, sono state incubate per 24 ore con cellule L3.6pl e le cellule sono state colorate con 7-Actinomycin D (7AAD). I campioni sono stati diluiti con PBS e acquisiti con il citofluorimetro FACSVerse. Sono stati acquisiti almeno 10.000 eventi per campione. La percentuale di killing è stata calcolata sul gate 7AAD+.

3.9 Statistica e Analisi dei Dati: L'analisi statistica è stata condotta con GraphPad Prism 9, considerando $p < 0.05$ come statisticamente significativo. L'analisi dei dati di citometria a flusso è stata eseguita con FlowJo V.10.1.

4 RISULTATI

4.1 Espressione di B7-H3

Da un'analisi approfondita della letteratura e da un successivo screening, risulta che B7-H3 è una molecola espressa sulle cellule di adenocarcinoma pancreatico e sembra essere un target promettente per il trattamento dell'adenocarcinoma pancreatico [32, 35]. Da uno screening pregresso di 4 linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico, è risultato che le cellule della linea L3.6pl esprimono elevati livelli di B7H3. Queste cellule sono state, pertanto, utilizzate per testare l'efficacia delle cellule B7-H3 CAR-T.

4.2 Saggio di citotossicità delle B7-H3 CAR-T

Sono state utilizzate cellule CAR-T ingegnerizzate per il target B7-H3 per trattare le cellule della linea di adenocarcinoma pancreatico L3.6pl. Le cellule B7-H3 CAR-T (cellule trasdotte) inducono un significativo aumento dell'attività citotossica sul target (cellule L3.6pl esprimenti il B7-H3), rispetto al controllo (cellule non trasdotte), a parità di rapporti cellule effettrici (E)/cellule target (T); (E/T 5:1, E/T 10:1) e rispetto al Medium (solo terreno), visibile sia dai dati citofluorimetrici rappresen-

tati in Figura 1 A-E, sia dagli istogrammi in Figura 1F che rappresentano i dati mediati di 3 esperimenti indipendenti. Complessivamente i dati ottenuti dimostrano che, in linea con la letteratura, le cellule B7-H3 CAR-T hanno una efficacia significativa sulle cellule target di adenocarcinoma pancreatico [32, 35].

4.3 CAR-T EVs come agenti terapeutici

Le EVs derivate dalle B7-H3 CAR-T sono state identificate e fenotipizzate utilizzando un protocollo di citometria a flusso sviluppato e brevettato nei laboratori del CAST. Nella Fig. 3 è illustrata la strategia di gating basata su questo protocollo e utilizzata per l'identificazione ed il conteggio delle EVs in citometria a flusso. In particolare, è stato tracciato un primo gate utilizzando un dot-plot che rappresenta i parametri di scatter (Forward Scatter – FSC/ Side Scatter – SSC) degli eventi che mostrano diametri inferiori a 1 µm, utilizzando le piastrine come riferimento dimensionale (le cui dimensioni sono di 1-3 µm). Come controllo dimensionale, oltre alle piastrine, sono state utilizzate le Rosetta Beads. Le EVs sono state identificate come LCD+/Falloidina-

4.4 Caratterizzazione delle EVs derivate da CAR-T

Le B7-H3 CAR-T EVs sono state isolate mediante *Fluorescence Activated Cell Sorting* (FACS, FACSaria III). Le EVs sono state identificate mediante una marcatura con il colorante cationico lipofilico (LCD) e la falloidina (LCD+/Falloidina-) e sono state separate mediante FACS. Successivamente sono state valutate le dimensioni e le concentrazioni mediante NTA e AFM, ed in seguito a precipitazione mediante Polietilenglicole (PEG) sono stati effettuati i saggi di citotossicità *in vitro*. Come raccomandato dalle linee guida del MISEV[5, 12], le EVs prodotte sono state analizzate per le loro dimensioni, e, come evidenziato in Figura 4B, i risultati ottenuti mediante NTA dimostrano che hanno diametri pari a 140.4 ± 64.5 nm, possono essere pertanto classificate come "small EVs". I risultati ottenuti mediante AFM, oltre a confermarne le dimensioni, dimostrano che hanno forma globulare (Figura 4A). Come, inoltre richiesto dalle linee guida vigenti, le EVs ottenute da cellule B7-H3 CAR-T sono state fenotipizzate e, come

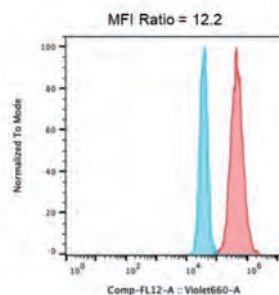


Fig. 1 - Istogramma normalizzato in cui sono state sovrapposte le curve del B7-H3 (rosso) e del controllo non colorato (blu), mostrando una elevata espressione di B7-H3 relativa alla linea cellulare L3.6pl.

mostrato in Figura 5A, i risultati ottenuti mediante western blotting (A) e citometria a flusso (B-F), esprimono CD63, flotillina-1, CD9 e CD81, i tipici marcatori delle EV. Al contrario si è osservata un'assenza del Citocromo C e un'espressione bassa di LAMP-1. Complessivamente, questi dati dimostrano che siamo riusciti a produrre ed isolare EVs, classificabili come "small" dalle cellule B7-H3 CAR-T. (6A) Grafico a

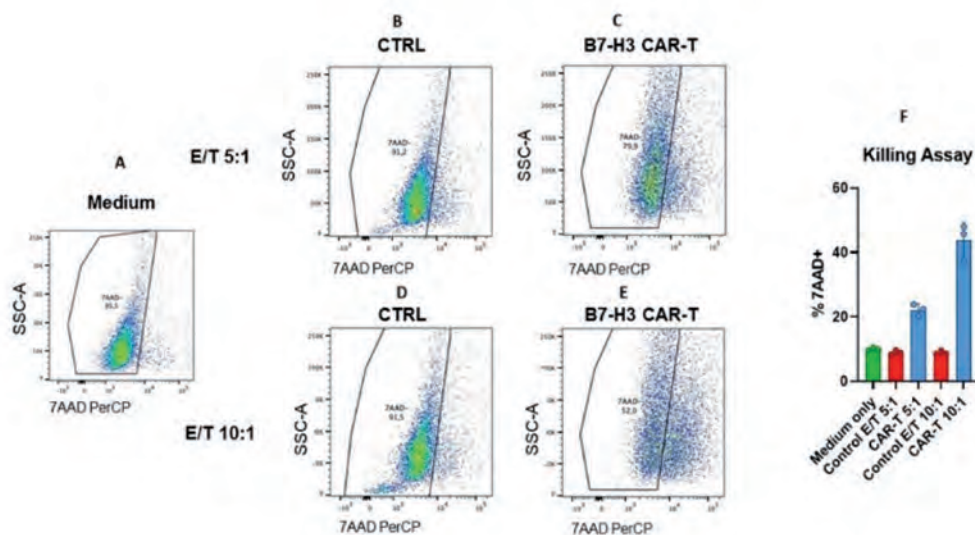


Fig. 2 - Saggio di citotossicità delle B7-H3 CAR-T, a confronto con i rispettivi controlli alle concentrazioni di effettore (E)/target (T) 5:1 e 10:1: (A) Medium (solo terreno); (B) CTRL (E/T 5:1) in cui la 7AAD colora le cellule vive (7AAD-); (C) B7-H3 CAR-T (E/T 5:1); (D) CTRL (E/T 10:1); (E) B7-H3 CAR-T (E/T 10:1), in cui si notano cellule prevalentemente morte (7AAD+). La positività per la 7AAD indica mortalità cellulare (E = cellule effettrici; T = cellule target). (F) Grafico a barre del saggio di citotossicità ottenuto in seguito all'analisi citometrica mediante marcatura con 7AAD, in cui è mostrata una % di citotossicità maggiore del 40% nelle cellule B7-H3 CAR-T (E/T 10:1). Mentre nelle cellule B7-H3 CAR-T (E/T 5:1) la % di citotossicità è intorno al 20%. I dati sono relativi a 3 esperimenti indipendenti.

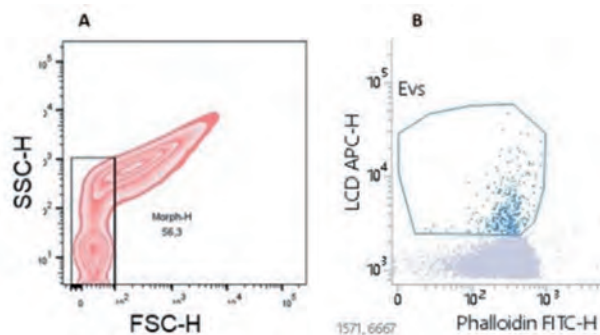


Fig. 3 - Identificazione delle EVs mediante citometria a flusso: (A) Strategia di gating per l'identificazione delle EVs utilizzando i parametri Forward Scatter - Height (FSC-H) e Side Scatter - Height (SSC-H); (B) Ulteriore analisi di LCD e Falloidina. Gli eventi LCD+/Pha- sono stati identificati come EVs.

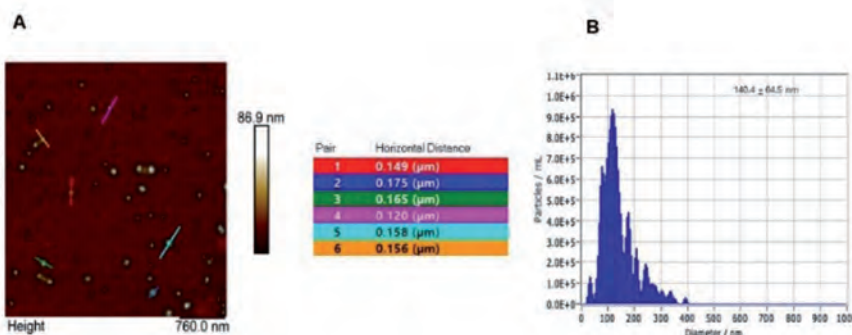


Fig.4 - Caratterizzazione delle EVs: (A) sono mostrate le vescicole (*small vesicles*) identificate mediante Microscopio a forza atomica (AFM) e le relative dimensioni sono mostrate nella tabella di fianco. (B) è rappresentata la caratterizzazione delle EVs mediante *Nanoparticle tracking Analysis* (NTA) in cui è riportato il diametro (asse delle x) rispetto alla concentrazione delle EVs (asse delle y). I dati sono relativi a 3 esperimenti indipendenti.

barre del saggio di citotossicità ottenuto in seguito all'analisi citometrica mediante marcatura con 7AAD, in cui è mostrata una % di citotossicità maggiore del 40% nelle cellule B7-H3 CAR-T (E/T 10:1). Mentre nelle cellule B7-H3 CAR-T (E/T 5:1) la % di citotossicità è intorno al 20%. I dati sono relativi a 3 esperimenti indipendenti.

Abbiamo, quindi, testato *in vitro* la capacità di killing delle B7-H3 CAR-T EVs. Abbiamo, pertanto, trattato le cellule L3.6pl con 30 B7-H3 CAR-T EVs (= 0.07 µg di proteine) per 24h, dopo aver stabilito dose e tempi ottimali di trattamento (non mostrato). Abbiamo, quindi analizzato la percentuale di cellule L3.6pl morte, utilizzando la marcatura con 7-AAD, e applicato la formula riportata nei metodi per la valutazione del killing. Come evidenziato in Figura 6, le B7-H3 CAR-T EVs inducono un significativo aumento della percentuale di killing rispetto alle EVs ottenute da una coltura di cellule non trasdotte dello stesso donatore (CTRL EVs).

In seguito alla colorazione effettuata con Perforina e Granzima B, sono state analizzate le EVs in relazione ai rispettivi controlli FMO. Come evidenziato dalla Figura 7, le B7-H3 CAR EV contengono elevati livelli di perforina (detectata sempre in più del 50% delle EVs) e Granzima B (detectato sempre in più del 10% delle EVs). Mentre la verifica morfologica delle B7-H3 CAR EVs permeabilizzate è stata effettuata mediante AFM come mostrato nelle Figura 8.

5. DISCUSSIONE

In questo studio, grazie al contributo della citometria a flusso abbiamo dimostrato che è possibile produrre *small* EVs da CAR-T B7-H3. Le EVs ottenute mostravano infatti le caratteristiche tipiche delle EVs (espressione di

CD63, Flotilina-1, CD9, CD81) rilevate mediante l'utilizzo della citometria a flusso, mentre risultavano negative per il citocromo C, come richiesto dalle linee guida MISEV[5, 12], inoltre come mostrato in figura 5, è stata analizzata l'espressione del marcatore lisosomiale LAMP-1, i cui livelli sono risultati bassi, confermando la qualità della procedura di isolamento e l'assenza di significative contaminazioni da compartimenti intracellulari. Inoltre, le loro dimensioni, misurate sia tramite NTA, sia mediante AFM, dimostrano che si tratta di EVs che possono essere dimensionalmente classificate come "small EVs"[5, 12]. Tramite citometria a flusso è stato possibile rilevare, inoltre, da parte delle EVs una significativa capacità di lisi del target cellulare (cellule di adenocarcinoma pancreatico) e, il fatto che contengano elevati livelli di perforina e granzima, ci permette di ipotizzare che la lisi del target possa essere indotta dal rilascio di queste molecole nelle cellule target.

6. CONCLUSIONI

Complessivamente i dati ottenuti dimostrano che le CAR-T B7-H3 producono "small EVs" efficaci nell'indurre il killing delle cellule target (linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico). Se confermati *in vivo*, questi risultati potrebbero porre solide basi per lo sviluppo di nuove terapie basate sull'utilizzo di EVs, che sono particolarmente promettenti sia perché consentirebbero la produzione di farmaci CAR-T based "off-the-shelf", sia perché consentirebbero di limitare ampiamente gli effetti collaterali attualmente associati all'utilizzo di cellule CAR-T. In conclusione, l'impiego della citometria a flusso è risultato indispensabile per la caratterizzazione e l'identificazione delle EVs derivate dalle CAR-T B7-H3.

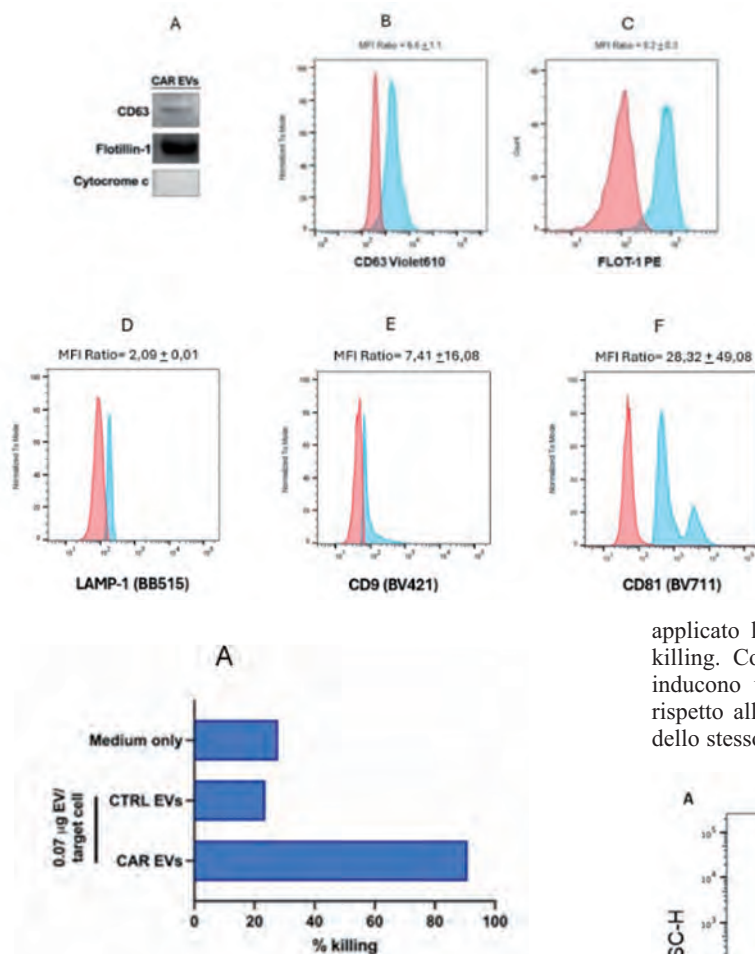
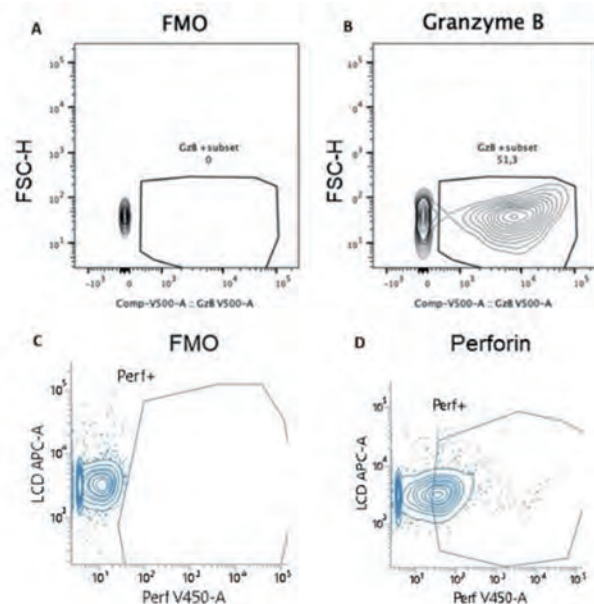


Fig. 5 - Caratterizzazione delle EVs: (A) sono mostrati i risultati dell'analisi eseguita mediante Western Blotting, in cui sono state riscontrate bande di positività per la tetraspanina CD63 e la Flotilina-1 (marcatori EV positivi) e la negatività al citocromo c (marcatore EV negativo). Gli istogrammi normalizzati (B-C) dell'analisi eseguita in citometria a flusso dei campioni colorati (istogramma rosso) e dei controlli FMO (istogramma blu) sono stati sovrapposti e mostrano l'espressione dei marcatori CD63 con MFI Ratio di 6.6 ± 1.1 (B) e Flotilina-1 con MFI Ratio di 8.2 ± 0.3 (FLOT-1) (C), inoltre sono stati analizzati anche i marcatori LAMP-1 (D) con MFI Ratio di 2.09 ± 0.01, il CD9 con MFI Ratio di 7.41 ± 16.08 (E) e il CD81 con MFI Ratio di 28.32 ± 49.08 (F). I dati sono relativi a 3 esperimenti indipendenti.

Abbiamo, quindi, testato *in vitro* la capacità di killing delle B7-H3 CAR-T EVs. Abbiamo, pertanto, trattato le cellule L3.6pl con 30 B7-H3 CAR-T EVs (= 0.07 µg di proteine) per 24h, dopo aver stabilito dose e tempi ottimali di trattamento (non mostrato). Abbiamo, quindi analizzato la percentuale di cellule L3.6pl morte, utilizzando la marcatura con 7AAD, e applicato la formula riportata nei metodi per la valutazione del killing. Come evidenziato in Figura 6, le B7-H3 CAR-T EVs inducono un significativo aumento della percentuale di killing rispetto alle EVs ottenute da una coltura di cellule non trasdotte dello stesso donatore (CTRL EVs).

Fig. 6 - (A) Saggio di citotossicità delle CAR EVs *in vitro*: in seguito all'analisi citometrica, le EVs derivate dalle B7-H3 CAR-T hanno mostrato un netto aumento della mortalità delle cellule tumorali (% di killing) rispetto al CTRL (EVs) e al Medium (solo terreno di coltura).

Fig. 7 - Colorazione intravescicolare delle EVs per: il Granzima B (B), detectato in più del 50% delle EV; Perforina (D), detectata in più del 10 % delle EVs; (A) controllo FMO del Granzima B; (C) controllo FMO della Perforina; I dati sono relativi a 3 esperimenti indipendenti.



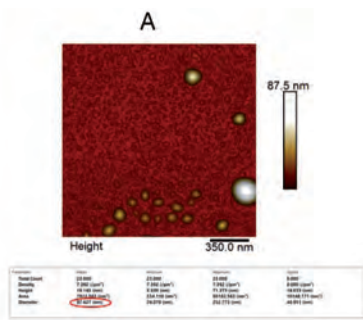


Fig. 8 (A) – AFM delle EVs permeabilizzate: verifica morfologica delle B7-H3 EVs.

Bibliografia

- Pagotto, S., Simeone, P., Brocco, D., Catitti, G., De Bellis, D., Vespa, S., ... Florio, R. (2023). CAR-T-Derived Extracellular Vesicles: A Promising Development of CAR-T Anti-Tumor Therapy. *Cancers*, 15(4), 1052. <https://doi.org/10.3390/cancers15041052>
- Yuana, Y., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2013). Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions. *Blood Reviews*, 27(1), 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2012.12.002>
- Wiklander, O. P. B., Brennan, M. Á., Lötvall, J., Breakefield, X. O., & El Andaloussi, S. (2019). Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Science Translational Medicine*, 11(492), eaav8521. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav8521>
- Zhang, X., Zhu, L., Zhang, H., Chen, S., & Xiao, Y. (2022). CAR-T Cell Therapy in Hematological Malignancies: Current Opportunities and Challenges. *Frontiers in Immunology*, 13, 927153. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.927153>
- Welsh, J. A., Goberdhan, D. C. I., O'Driscoll, L., Buzas, E. I., Blenkiron, C., Bussolati, B., ... Witwer, K. W. (2024). Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *Journal of Extracellular Vesicles*, 13(2), e12404. <https://doi.org/10.1002/jev2.12404>
- Clancy, J. W., Schmidtmann, M., & D'Souza-Schorey, C. (2021). The ins and outs of microvesicles. *FASEB BioAdvances*, 3(6), 399–406. <https://doi.org/10.1096/fba.2020-00127>
- Battistelli, M., & Falcieri, E. (2020). Apoptotic Bodies: Particular Extracellular Vesicles Involved in Intercellular Communication. *Biology*, 9(1), 21. <https://doi.org/10.3390/biology9010021>
- Meehan, B., Rak, J., & Di Vizio, D. (2016). Oncosomes – large and small: what are they, where they came from? *Journal of Extracellular Vesicles*, 5(1), 33109. <https://doi.org/10.3402/jev.v5.33109>
- Di Daniele, A., Antonucci, Y., & Campello, S. (2022). Migrasomes, new vesicles as Hansel and Gretel white pebbles? *Biology Direct*, 17(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13062-022-00321-1>
- Zhang, Y., Guo, W., Bi, M., Liu, W., Zhou, L., Liu, H., ... Xu, J. (2022). Migrasomes: From Biogenesis, Release, Uptake, Rupture to Homeostasis and Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2022/4525778>
- Zhang, Q., Jeppesen, D. K., Higginbotham, J. N., Graves-Deal, R., Trinh, V. Q., Ramirez, M. A., ... Coffey, R. J. (2021). Supermeres are functional extracellular nanoparticles replete with disease biomarkers and therapeutic targets. *Nature Cell Biology*, 23(12), 1240–1254. <https://doi.org/10.1038/s41556-021-00805-8>
- Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., ... Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>
- Joshi, B. S., De Beer, M. A., Giepmans, B. N. G., & Zuhorn, I. S. (2020). Endocytosis of Extracellular Vesicles and Release of Their Cargo from Endosomes. *ACS Nano*, 14(4), 4444–4455. <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b10033>
- Linares, R., Tan, S., Gounou, C., Arraud, N., & Brisson, A. R. (2015). High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4(1), 29509. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.29509>
- Paolini, L., Zandrini, A., Noto, G. D., Busatto, S., Lottini, E., Radeghieri, A., ... Bergese, P. (2016). Residual matrix from different separation techniques impacts exosome biological activity. *Scientific Reports*, 6(1), 23550. <https://doi.org/10.1038/srep23550>
- Doyle, L., & Wang, M. (2019). Overview of Extracellular Vesicles, Their Origin, Composition, Purpose, and Methods for Exosome Isolation and Analysis. *Cells*, 8(7), 727. <https://doi.org/10.3390/cells8070727>
- Böing, A. N., Van Der Pol, E., Grootemaat, A. E., Coumans, F. A. W., Sturk, A., & Nieuwland, R. (2014). Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3(1), 23430. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.23430>
- Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J., & Gao, Z. (2017). Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics*, 7(3), 789–804. <https://doi.org/10.7150/thno.18133>
- Chung, K. Y., Quek, J. M., Neo, S. H., & Too, H. P. (2020). Polymer-Based Precipitation of Extracellular Vesicular miRNAs from Serum Improve Gastric Cancer miRNA Biomarker Performance. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 22(5), 610–618. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.01.016>
- Brennan, K., Martin, K., Fitzgerald, S. P., O'Sullivan, J., Wu, Y., Blanco, A., ... Mc Gee, M. M. (2020). A comparison of methods for the isolation and separation of extracellular vesicles from protein and lipid particles in human serum. *Scientific Reports*, 10(1), 1039. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57497-7>
- Marchisio, M., Simeone, P., Bologna, G., Ercolino, E., Pierdomenico, L., Pieragostino, D., ... Lanuti, P. (2020). Flow Cytometry Analysis of Circulating Extracellular Vesicle Subtypes from Fresh Peripheral Blood Samples. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 48. <https://doi.org/10.3390/ijms22010048>
- Simeone, P., Celia, C., Bologna, G., Ercolino, E., Pierdomenico, L., Cilurzo, F., ... Lanuti, P. (2020). Diameters and Fluorescence Calibration for Extracellular Vesicle Analyses by Flow Cytometry. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 7885. <https://doi.org/10.3390/ijms21217885>
- Ren, T., Roberge, E. J., Csoros, J. R., Seitz, W. R., Balog, E. R. M., & Halpern, J. M. (2020). Application of Voltage in Dynamic Light Scattering Particle Size Analysis. *Scientific Reports*, 10(1), 1039. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57497-7>
- Parisse, P., Rago, I., Ulloa Severino, L., Perissinotto, F., Ambrosetti, E., Paoletti, P., ... Casalis, L. (2017). Atomic force microscopy analysis of extracellular vesicles. *European Biophysics Journal*, 46(8), 813–820. <https://doi.org/10.1007/s00249-017-1252-4>
- Meggiolaro, A., Moccia, V., Brun, P., Pierno, M., Mistura, G., Zappulli, V., & Ferraro, D. (2022). Microfluidic Strategies for Extracellular Vesicle Isolation: Towards Clinical Applications. *Biosensors*, 13(1), 50. <https://doi.org/10.3390/bios13010050>
- Buzas, E. I., György, B., Nagy, G., Falus, A., & Gay, S. (2014). Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, 10(6), 356–364. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.19>
- Welsh, J. A., Holloway, J. A., Wilkinson, J. S., & Englyst, N. A. (2017). Extracellular Vesicle Flow Cytometry Analysis and Standardization. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5, 78. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00078>
- Hough, K. P., & Deshane, J. S. (2020). Cutting edge approaches for rapid characterization of airway exosomes. *Methods*, 177, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2020.01.003>
- Chen, C., Cai, N., Niu, Q., Tian, Y., Hu, Y., & Yan, X. (2023). Quantitative assessment of lipophilic membrane dye-based labelling of extracellular vesicles by nano-flow cytometry. *Journal of Extracellular Vesicles*, 12(8), 12351. <https://doi.org/10.1002/jev2.12351>
- Czaplicka, A., Lachota, M., Pączek, L., Zagożdżon, R., & Kaleta, B. (2024). Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy for Pancreatic Cancer: A Review of Current Evidence. *Cells*, 13(1), 101. <https://doi.org/10.3390/cells13010101>
- Deng, T., Deng, Y., Tsao, S.-T., Xiong, Q., Yao, Y., Liu, C., ... Wang, H. (2024). Rapidly-manufactured CD276 CAR-T cells exhibit enhanced persistence and efficacy in pancreatic cancer. *Journal of Translational Medicine*, 22(1), 633. <https://doi.org/10.1186/s12967-024-05462-7>
- Yang, S., Wei, W., & Zhao, Q. (2020). B7-H3, a checkpoint molecule, as a target for cancer immunotherapy. *International Journal of Biological Sciences*, 16(11), 1767–1773. <https://doi.org/10.7150/ijbs.41105>
- Ghodasara, A., Raza, A., Wolfram, J., Salomon, C., & Popat, A. (2023). Clinical Translation of Extracellular Vesicles. *Advanced Healthcare Materials*, 12(28), 2301010. <https://doi.org/10.1002/adhm.202301010>
- Rossi, C., Cicalini, I., Cufaro, M. C., Agnifili, L., Mastropasqua, L., Lanuti, P., ... Pieragostino, D. (2019). Multi-Omics Approach for Studying Tears in Treatment-Naïve Glaucoma Patients. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(16), 4029. <https://doi.org/10.3390/ijms20164029>
- Chen, X., Li, J., Chen, Y., Que, Z., Du, J., & Zhang, J. (2022). B7 Family Members in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Attractive Targets for Cancer Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 15005. <https://doi.org/10.3390/ijms232315005>



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 capacità 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>

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 04B010050338500000004350 indicando nella causale: Cognome e Nome del Socio e quota associativa GIC: (anno).

Con l'intento di favorire i cosiddetti "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

Valore prognostico delle sottopopolazioni linfocitarie analizzate mediante citofluorimetria alla diagnosi in campioni di sangue midollare di pazienti affetti da linfoma non-Hodgkin a cellule B

Luciana Valvano¹, Rocchina Vilella¹, Fiorella D'Auria², Giovanni D'Arena³, Rossana Libonati¹, Michela Soda¹, Alessia Telesca¹, Giuseppe Pietrantuono⁴, Giovanna Rosaria Mansueto⁴, Oreste Villani⁴, Simona D'Agostino⁴, Giovanni Calice⁵, and Teodora Statuto¹

¹Lab. of Clin. Res. and Advanced Diag., Centro di Rif. Onc. della Basilicata (IRCCS-CROB), Rionero in Vulture

²Lab. of Clini. Pathology, Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata (IRCCS-CROB), Rionero in Vulture

³Hematology, "S. Luca" Hospital, ASL Salerno, Italy.

⁴Hem. and Stem Cell Transplantation Unit, C. di Rif. Oncologico della Basilicata (IRCCS-CROB), Rionero in Vulture

⁵Lab. of Preclinical and Translational Research, C. di Rif. Onc. della Basilicata (IRCCS-CROB), Rionero in Vulture

email: luciana.valvano@crob.it

Abstract

Introduction. Non-Hodgkin lymphomas (NHLs) are the most common hematological malignancies worldwide. Among these, B-cell lymphomas (B-NHLs) are the second leading cause of death in hematologic neoplasms.

Material and methods. A detailed immunophenotypic analysis of lymphocytes in the bone marrow aspirate (BMA) of 75 patients with four different subtypes of B-NHLs was performed at diagnosis. The samples were analyzed by flow cytometry (FC) using a stain-lyse-no wash technique and a comprehensive six-color antibody panel.

Results. Our data showed a different trend in the percentage values of the distinct lymphocyte subsets, which did not seem to correlate with a worse prognosis, except for B cells in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), which were significantly higher in stage IV than in stages II and III. ROC curve analysis showed that the B-cell percentage value could be used to predict the stage of the disease. Total lymphocytes and B cells were greater in lymphomas that presented a lower percentage of disease progression, specifically mantle cell lymphoma (MCL) and marginal zone lymphoma (MZL). In contrast, natural killer (NK) and T cells showed higher values in DLBCL and follicular lymphoma (FL), which progressed more frequently. Interestingly, in DLBCL patients with higher percentage values of double positive (DPT) and helper T cells (Th), we observed a good prognosis. Specifically, univariate Cox regression analyses indicated that a higher value of Th cells at diagnosis was a better prognostic predictor in patients with DLBCL.

Conclusions. These preliminary findings encourage us to further investigate the role of lymphocyte subpopulations in B-cell NHL.

1. Introduzione

I linfomi non-Hodgkin (LnH) sono le più comuni neoplasie del sangue, rappresentati nell'85% dei casi da LnH a cellule B di basso grado e alto grado [Crees ZD, 2021]. Tra le forme più aggressive, maggiormente frequente è il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL), mentre il linfoma mantellare (MCL) insorge principalmente in maniera indolente e negli anziani [Crees ZD, 2021]. Al contrario, il linfoma follicolare (FL) e il linfoma della zona marginale (MZL) rappresentano i sottotipi più comuni di linfoma non-Hodgkin indolente [Wang H,

2024]. Tuttavia, questi ultimi, nonostante la loro natura indolente, manifestano un decorso recidivante-remittente per molti anni o decenni [Rivero A, 2023]. In particolare, circa il 15-20% dei pazienti con FL presenta un decorso clinico più aggressivo caratterizzato da progressione precoce della malattia, trasformazione istologica e morte prematura [Radtke AJ, 2024].

Nonostante i recenti progressi nel trattamento dei linfomi, gli esiti clinici dei pazienti con malattia recidivante o refrattaria rimangono scarsi [Tang L, 2023].

Numerose evidenze hanno dimostrato che le cellule immunitarie sono in grado di infiltrare il tumore esercitando una funzione pro- e antitumorigenica. Pertanto, è necessaria una conoscenza più approfondita dell'interazione tra le cellule linfomatose e le cellule immunitarie circostanti per comprendere meglio la patogenesi e la prognosi del cancro [García-Domínguez DJ, 2022].

Negli ultimi decenni, un crescente interesse è stato rivolto verso le sottopopolazioni minoritarie T, per il loro ruolo rilevante nell'immunosorveglianza tumorale: linfociti T doppi negativi (DNT), linfociti T doppi positivi (DPT) e i linfociti T natural killer (NKT-like). I DNT (1-5% dei linfociti periferici) [Chen X, 2022], si caratterizzano per l'espressione delle catene alfa-beta ($\alpha\beta$) o gamma-delta ($\gamma\delta$) del recettore delle cellule T (TCR), del CD3, e per l'assenza dei corecettori CD4 e CD8 [Li Y, 2020]. Svolgono un ruolo importante nella malattia da rigetto contro l'ospite, nei disturbi autoimmuni e nell'oncoterapia [Wu Z, 2022].

I DPT, identificati dalla co-espressione di CD4 e CD8 (CD4bright+ CD8dim+ e CD4dim+ CD8bright+), sono stati identificati nel sangue periferico (SP) di varie specie, compresi gli esseri umani (3%), con ruoli controversi citotossici o soppressivi specifici [Ortolani C, 1993; Overgaard NH, 2015; Carpenter AC, 2011; Shah DK, 2014].

Le cellule NKT-like sono un sottogruppo molto raro di linfociti T (meno dell'1% nel SP umano) [Jerud ES, 2006], esprimenti sia il TCR che il recettore delle cellule natural killer (NK) e partecipanti alla risposta immunitaria antitumorale [Courtney AN, 2023]. Diversi studi hanno documentato un'associazione positiva tra il numero e/o l'attività funzionale delle cellule NKT-like e gli esiti clinici dei pazienti oncologici [Spanoudakis E, 2009; Kotsianidis I, 2011].

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare il

valore prognostico delle cellule immunitarie dell'ospite, al fine di evidenziare il loro ruolo nella risposta immunitaria contro il cancro.

2. Materiali e Metodi

2.1 Pazienti

Questo studio, retrospettivo-monocentrico, è stato condotto secondo i principi della Dichiarazione di Helsinki e approvato dal Comitato Etico Unico Regionale per la Basilicata (numero di approvazione 20200034750). Previa firma del consenso informato scritto, i pazienti che soddisfacevano i criteri di eleggibilità (nuova diagnosi di LnH-B, integrità psicomotoria ed età > 18 anni) sono stati arruolati.

2.1.1 Caratteristiche dei pazienti

Questo studio retrospettivo ha coinvolto 75 pazienti (età mediana 66 anni, intervallo 31-86) affetti da quattro diversi sottotipi di LnH (40 DLBCL, 5 FL, 10 MCL e 20 MZL) [Alaggio R, 2022; Campo E, 2022] ricoverati presso il Centro Oncologico di Riferimento della Basilicata IRCCS-CROB da giugno 2011 a dicembre 2018. Lo stadio tumorale è stato definito utilizzando la classificazione di Ann Arbor modificata di Cotswolds [Kwee TC, 2008]. Le principali caratteristiche cliniche e biologiche dei pazienti sono riportate nella Tabella 1.

2.2 Citofluorimetria

Secondo le linee guida della normale pratica clinica, alla diagnosi è stata analizzata un'aliquota di aspirato midollare (MO) raccolto in un tubo con EDTA mediante tecnica citofluorimetrica. Mediante il metodo stain-lyse-no wash, è stato allestito un pannello completo di anticorpi a sei colori (coniugati fluorescenti FITC/PE/PerCP-Cy5-5/PE-Cy7/APC/APC-H7) su un BD FACS Canto™ II (BD Biosciences, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) o su un «Navios 10 colors /3 lasers» (Beckman Coulter, BC, Brea, CA, USA). Brevemente, gli anticorpi fluorescenti (BD o BC) sono stati aggiunti a 100 µl di MO ed incu-

bati per 15 minuti al buio e a temperatura ambiente. Successivamente, il campione è stato lisato con la soluzione di lisi (secondo le istruzioni del produttore) per essere poi acquisito ed analizzato mediante il software Kaluza versione 2.1 (BC).

La funzione di visualizzazione «rare event» è stata utilizzata per mostrare piccole sottopopolazioni, identificate da specifici marcatori. È stato impostato un numero minimo di eventi acquisibili di circa 15.000 nel gate dei linfociti. Il valore percentuale dei linfociti è stato riferito al numero totale di leucociti (CD45+), mentre il valore percentuale di ciascuna sottopopolazione linfocitaria è stato calcolato a partire dal gate linfocitario (SSC-CD45+). La strategia di gating (Figura 1) è stata precedentemente descritta in un nostro recente studio [Valvano L, 2023]. In sintesi, le cellule B sono state definite come CD19+, le T totali come CD3+, le T helper (Th) come CD3+ CD4+, le T citotossiche (Tc) come CD3+ CD8+, le DNT come CD3+ CD4- CD8- CD16/CD56-, le DPT come CD3+ CD4+ CD8+, le NKT-like come CD3+ CD16/CD56+, e le NK come CD3- CD16/CD56+.

2.3 Analisi statistica

Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software R e il pacchetto statistico IBM SPSS (International Business Machines Corporation, Armonk, NY, USA, versione 28). Tutti i grafici sono stati generati utilizzando GraphPad Prism V.8.0.1 (GraphPad Software). Le variabili continue sono state espresse come mediane e IQR. La maggior parte delle serie di dati è risultata discostarsi da una distribuzione normale (test di Kolmogorov-Smirnov). Pertanto, i confronti tra i gruppi sono stati eseguiti utilizzando il test di Kruskal-Wallis e il test U di Mann-Whitney a due code. Il test di correlazione di Spearman è stato utilizzato per valutare la possibile correlazione delle serie di dati. Le curve ROC (Receiver Operating Characteristic) e l'area sotto la curva (AUC) sono state utilizzate per analizzare la

Tabella 1. Caratteristiche clinico-biologiche dei pazienti con linfoma non-Hodgkin a cellule B.

Clinical-biological features	Age, M (R) ^a	Males, N (%) ^a	P% with MCC, N (%) ^a	WBC count (µL ⁻¹), M (IQR) ^a	Treatment, N treated patients (%) ^a	CR, N (%) ^a	PR, N (%) ^a	R, N (%) ^a	PD, N (%) ^a	OS mths, Mdn (IQR) ^a	PFS mths, Mdn (IQR) ^a	Cells Mdn, % (IQR) ^{a,b}	
												Ts B NK T	Tc Th DNT DPT NKT-like
N. Patients: 75	66 (31-86) ¹	46 (61.3) ¹	34 (45.3) ¹	7305 (4300) ¹	74 (98.7) ¹	51 (69.9) ²	15 (20.6) ²	12 (16.9) ²	5 (7.1) ²	36 (30)	29 (31.5)		
subtypes N (%) ¹													
stage, N (%) ²													
DLBCL 40 (53.3)				7480 (4510)	- R-Bendamustine, 2 (5) - R-CHOP, 11 (27.5) - R-CODOX-M/R-IVAC, 5 (12.5) - R-COMP, 17 (42.5) - R-CVP, 2 (5) - R-DHAP+FEAM, 1 (2.5) - R-GemOx, 1 (2.5) - R-MACOP-B, 1 (2.5)	28 (70)	7 (17.5)	6 (15)	3 (7.5)	32.5 (43)	28 (35)	13.19 (13.24) 8.76 (8.96) 9.39 (11.40) 77.19 (17.10)	32.94 (16.82) 37.00 (19.78) 1.82 (2.04) 1.06 (1.47) 8.93 (8.34)
FL 5 (6.6)				7630 (4135)	- R-Bendamustine, 1 (20) - R-CHOP, 3 (60) - R-CVP, 1 (20)	3 (60)	1 (20)	1 (20)	1 (20)	43 (44)	32 (36)	12.61 (5.89) 9.33 (9.07) 16.55 (18.19) 71.45 (20.92)	25.64 (16.04) 34.90 (14.56) 3.65 (3.91) 0.67 (0.74) 4.73 (7.99)
MCL 10 (13.3)				6950 (2170)	- Hyper-CVAD-R, 1 (10) - Ibrutinib, 2 (20) - R-BAC, 4 (40) ² - R-Bendamustine, 1 (10) - R-CHOP, 1 (10) - Hyper-CVAD, 1 (10)	8 (80)	1 (10)	3 (30)	1 (10)	36 (18)	34.5 (20)	24.23 (53.20) 21.61 (72.21) 7.72 (19.60) 56.33 (62.63)	27.16 (34.66) 17.53 (23.86) 1.70 (1.76) 0.41 (0.4) 4.19 (6.52)
MZL 20 (26.7)				5940 (5370)	- Rituximab, 5 (25) - R-Bendamustine, 3 (15) - R-CVP, 10 (50) - R-IEV, 1 (5) - n.a., 1 (5)	12 (63) ³	6 (31.6) ³	2 (10.5) ³	0 (0) ¹	38 (30)	15 (34.5)	24.48 (21.48) 27.13 (45.42) 6.94 (10.23) 62.40 (33.32)	22.50 (17.63) 30.56 (16.68) 1.57 (1.23) 0.49 (0.50) 4.05 (5.39)

Vengono riportati la mediana (Mdn) e l'intervallo interquartile (IQR) dei valori percentuali. ¹ Dati disponibili per 75 pazienti, ² dati disponibili per 74 pazienti, ³ dati disponibili per 19 pazienti ⁴. Il valore percentuale dei linfociti è stato calcolato sul totale dei leucociti, mentre il valore percentuale di ciascuna sottopopolazione linfocitaria è stato calcolato a partire dal gate linfocitario. Dati relativi al numero di pazienti in ciascun gruppo di LnH a cellule B., pazienti deceduti. Abbreviazioni: WBC, conta dei globuli bianchi; Ly, linfociti; CR, risposta completa; PR, risposta parziale; R, recidiva; PD, progressione della malattia; OS, sopravvivenza globale; PFS, sopravvivenza libera da progressione; M, media; MCC, Complicanza Maggiore e Comorbidità; mths, mesi; n.a., non assegnato; R-CHOP, rituximab, ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisone; R-CODOX-M/R-IVAC, rituximab-ciclofosfamide, vincristina, doxorubicina, metotrexato ad alte dosi/rituximab-ifosfamide, etoposide, citarabina ad alte dosi; R-COMP, rituximab, ciclofosfamide, doxorubicina liposomiale non PEGilata, vincristina e prednisone; Hyper-CVAD-R, ciclofosfamide iperfrazionata, vincristina, doxorubicina, desametasone – rituximab; R-BAC, rituximab-bendamustina e citarabina; R-CVP, rituximab-ciclofosfamide, vincristina, prednisone; R-DHAP+ FEAM, rituximab-desametasone, citarabina, cisplatino + fotemustina, etoposide, ARA-C e melfalan; R-GemOx, rituximab-gemcitabina e oxaliplatino; R-MACOP-B, rituximab-metotrexato, leucovorina (LV), doxorubicina, ciclofosfamide, vincristina, prednisone-bleomicina; R-IEV, rituximab-ifosfamide, epirubicin and etoposide

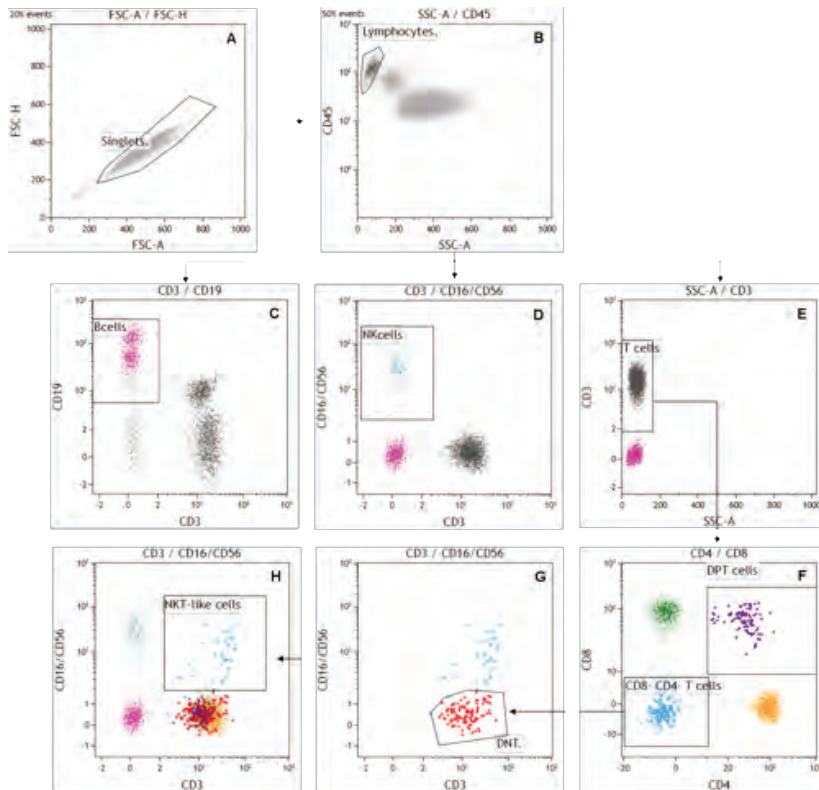


Figura 1. Strategia di gating.

I debris, le cellule morte, i cluster e i doppietti sono stati esclusi utilizzando i parametri fisici forward scatter-altezza (FSC-H) vs FSC-Area (FSC-A) (A, "singlets"). I linfociti CD45+ sono stati identificati plottando CD45 vs side-scatter- area (SSC-A) nel gate dei singoletti (B). Dal gate dei linfociti abbiamo identificato sequenzialmente le cellule B (CD19+) (C), le cellule CD3-CD16+/CD56+ (NK) (D) e le cellule T totali (CD3+) (E). Dal gate delle cellule T totali, abbiamo identificato le cellule T citotossiche CD8+CD3+ (Tc), le cellule T helper CD4+CD3+ (Th), i DPT CD8+CD4+CD3+ (DPT) e i DNT CD8-CD4-CD3+ (F). Le DNT sono state ottenute selezionando le cellule T CD8-CD4-CD3+ su CD16/CD56- (G), mentre le cellule NKT-like sono state ottenute da linfociti CD3+ e CD16/CD56+ (H). Le percentuali delle singole popolazioni (mediana \pm IQR) sono state calcolate sulle cellule CD45+.

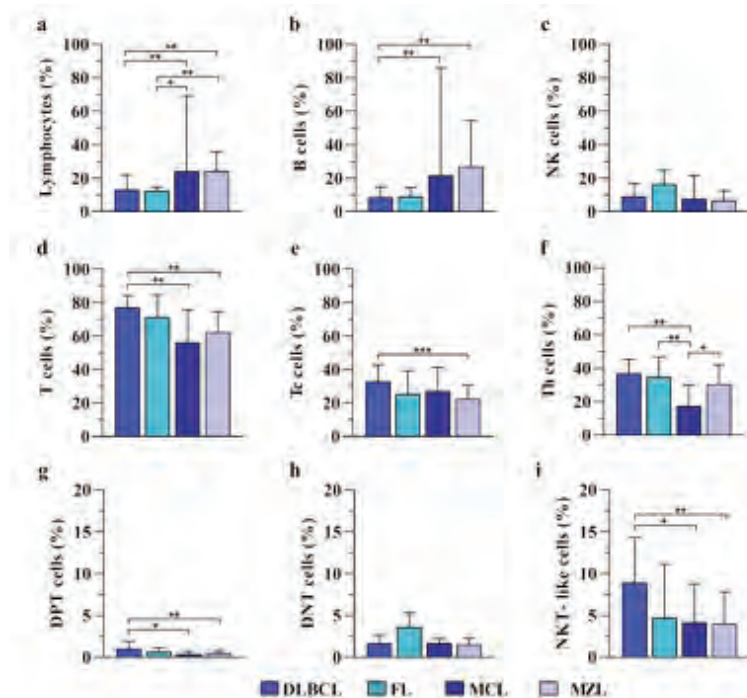


Figura 2. Analisi delle sottopopolazioni immunitarie nel linfoma non-Hodgkin a cellule B. Gli istogrammi mostrano la mediana \pm IQR di: (a) linfociti totali; (b) cellule B; (c) cellule NK; (d) cellule T totali; (e) cellule Tc; (f) cellule Th; (g) cellule DPT; (h) cellule DNT e (i) cellule NKT-like misurate in pazienti con DLBCL (n=40), FL (n=5), MCL (n=10) e MZL (n=20). *p<0,05; **p<0,01; *** p<0,001 (test di Kruskal-Wallis seguito dal test U di Mann-Whitney).

rilevanza dei sottogruppi linfocitari nella previsione dello stadio della malattia. Utilizzando il metodo di Kaplan-Meier, sono stati stimati la sopravvivenza globale (Overall Survival, OS) e la sopravvivenza libera da progressione (Progression Free Survival, PFS), e le differenze tra i gruppi sono state valutate utilizzando il test del log-rank. L'OS è stata definita come l'intervallo dalla diagnosi alla morte per qualsiasi causa o all'ultimo follow-up; la PFS è stata definita come l'intervallo dall'inizio del trattamento all'evidenza di progressione di malattia, morte o all'ultima data in cui il paziente risultava libero da progressione o vivo. Il modello di regressione Cox è stato utilizzato per analizzare le associazioni tra le caratteristiche dei pazienti e le variabili dipendenti dal tempo.

Le differenze sono state considerate statisticamente significative a $p < 0,05$.

3. Risultati

3.1 Analisi delle sottopopolazioni linfocitarie del MO in pazienti con LnH a cellule B

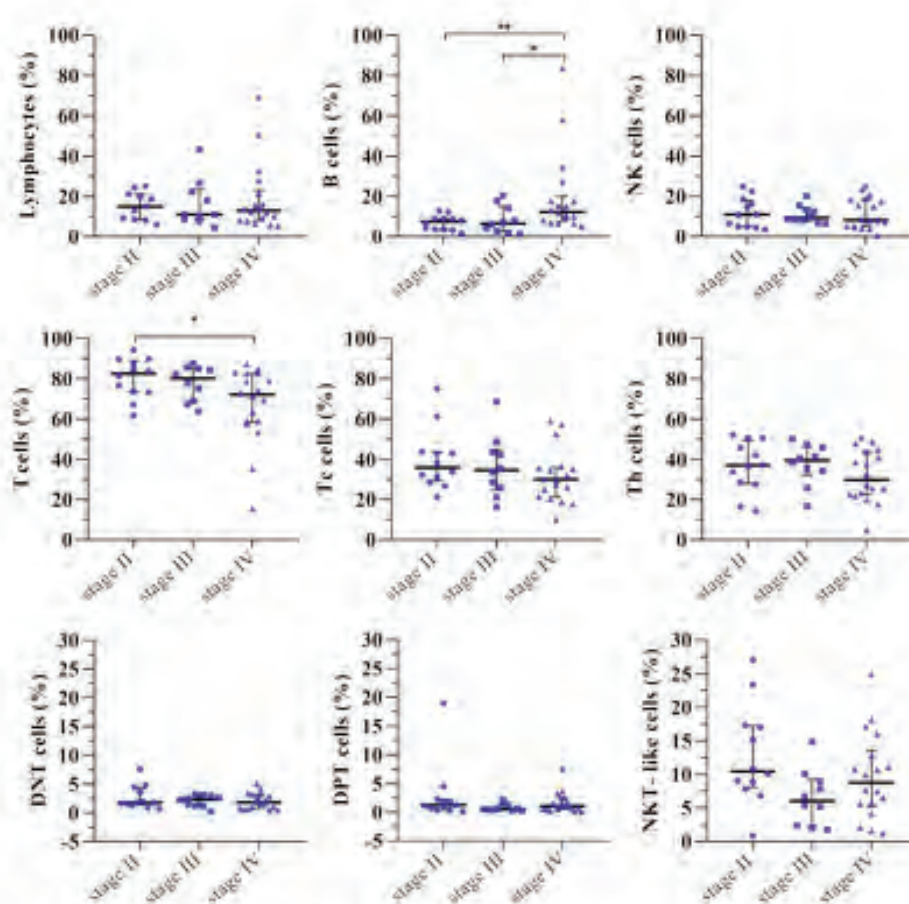
Per ogni sottotipo di LnH a cellule B, è stata valutata la percentuale delle seguenti sottopopolazioni: cellule B, T, NK, Tc, Th, DNT, DPT e NKT-like. Confrontando ogni sottopopolazione, abbiamo documentato una variazione significativa tra i sottotipi di LnH, ad eccezione delle cellule NK e DNT, risultate aumentate solo nel FL e nel DLBCL (Figura 2 a-i). Nel dettaglio, il test di Mann-Whitney U ha evidenziato un aumento significativo delle percentuali totali di linfociti nei gruppi MCL e MZL rispetto ai gruppi di DLBCL e FL (Figura 2a). È stata osservata una diminuzione del valore delle cellule B nei

gruppi DLBCL e FL, raggiungendo la significatività statistica solo nel gruppo di DLBCL rispetto ai gruppi di MCL e MZL (Figura 2b). Al contrario, una percentuale maggiore di cellule T totali (Figura 2d), cellule DPT (Figura 2g) e cellule NKT-like (Figura 2i) è stata osservata nei pazienti con DLBCL, con differenze statisticamente significative rispetto a quelli con MCL e MZL. Nel gruppo DLBCL è stato osservato anche un valore più elevato di cellule Tc, significativo solo rispetto ai valori MZL (Figura 2e). Al contrario, la percentuale di cellule Th era significativamente più bassa nel gruppo MCL rispetto agli altri sottotipi di linfoma (Figura 2f).

3.2 Sottotipi di cellule immunitarie e stadiazione del linfoma non-Hodgkin a cellule B

Per ogni gruppo di LnH analizzato, è stata valutata la distribuzione dei sottogruppi linfocitari negli stadi II, III e IV. Nello specifico, solo nei pazienti con DLBCL abbiamo documentato un aumento significativo della percentuale di cellule B nello stadio avanzato (stadio IV) rispetto agli stadi II e III e una significativa riduzione del valore totale delle cellule T tra gli stadi II e IV. Per le restanti popolazioni non è stato osservato un cambiamento significativo in relazione alla malattia (Figura 3). Nella tabella 2 sono riportati solo i valori delle popolazioni relative ai restanti LnH analizzati, risultate significativamente differenti tra i diversi stadi analizzati.

L'analisi della curva ROC ha mostrato che il valore percentuale delle cellule B misurato alla diagnosi poteva distinguere i pazienti con DLBCL in stadio IV e stadio II/III con una sensibilità del 72% e una specificità del 24% (AUC=0,780). Il valore di cut-off ottimale per la percentuale di cellule B è risultato di 9,32% (Figura 4).



3.3 Sottotipi di cellule immunitarie ed esiti clinici

Per determinare la correlazione tra i sottogruppi linfocitari e gli esiti clinici, sono stati valutati i valori percentuali per ciascuna sottopopolazione stratificati per la risposta terapeutica: risposta completa (RC), risposta parziale (RP) e recidiva/progressione della malattia (R/PD). Essendo il gruppo dei FL e MCL piuttosto ridotto (limite all'analisi statistica) sono stati riportati solo i risultati per i gruppi dei DLBCL e MZL. Risultati significativi sono stati osservati solo per la

Figura 3. Sottopopolazioni linfocitarie e stadiazione nei pazienti con DLBCL. I grafici a dispersione mostrano il valore percentuale di ciascuna sottopopolazione linfocitaria esaminata nei pazienti con DLBCL di stadio I, stadio II e stadio IV. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (test di Kruskal-Wallis seguito dal test U di Mann-Whitney).

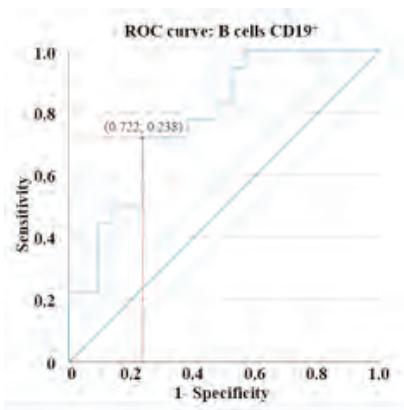


Figura 4. Analisi curva ROC nel DLBCL. La curva ROC mostra la relazione tra il valore percentuale dei linfociti B misurato per singolo paziente ed il relativo stadio di malattia. Nel grafico sono indicate le coordinate relative al cut-off ottimale identificato mediante l'indice di Youden.

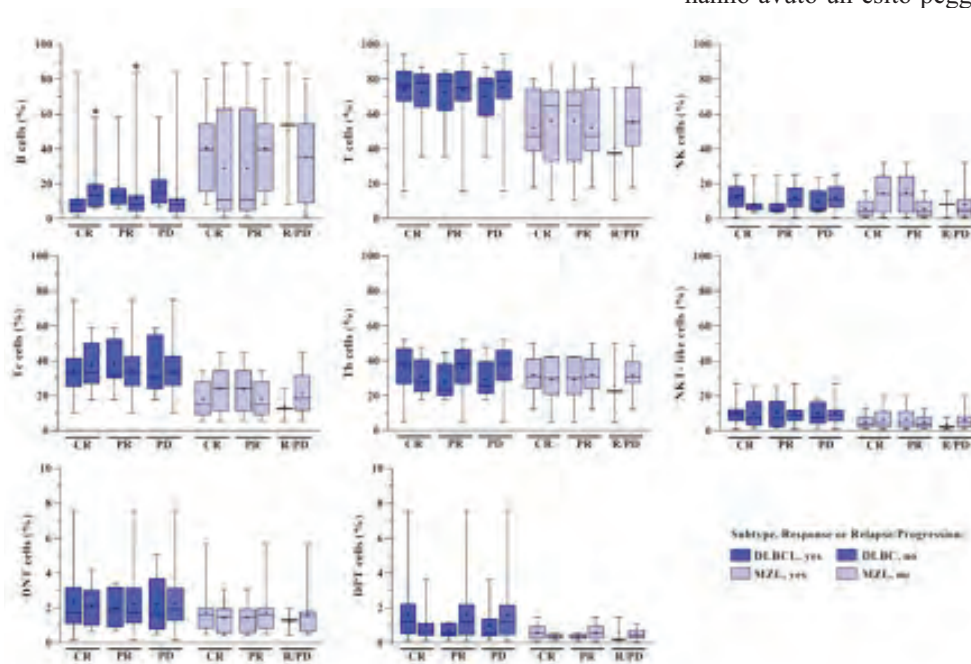


Figura 5. Impatto del valore percentuale delle sottopopolazioni linfocitarie sulla risposta terapeutica. I box plot mostrano i valori percentuali delle sottopopolazioni linfocitarie in relazione alle diverse risposte alla terapia nei gruppi DLBCL e MZL. * $p < 0,05$ (test di Mann-Whitney U). Abbreviazioni: RC, Risposta Completa; RP, Risposta Parziale; R/PD: Malattia Ricaduta/Progressione.

popolazione B nel DLBCL, risultate aumentate nei pazienti con progressione della malattia e/o in quelli che non hanno ottenuto una risposta completa (Figura 5). Sebbene non statisticamente significativo, nei pazienti con DLBCL, la percentuale di cellule DPT è risultata dimezzata nel gruppo RP e R/PD e raddoppiata in quelli che successivamente raggiungono la RC. Nel gruppo dei MZL, è stato osservato un dimezzamento delle cellule DPT nei pazienti che hanno avuto una RP, ulteriormente ridotta nei pazienti che hanno avuto una R/PD (Figura 5).

In base al valore percentuale mediano delle popolazioni linfocitarie, i pazienti con DLBCL e MZL sono stati suddivisi in due sottogruppi: alto e basso. Nella coorte di 59 pazienti (40 DLBCL e 19 MZL), solo nel gruppo DLBCL le curve di Kaplan-Meier hanno documentato una PFS a 6 anni più lunga nei pazienti con un'alta percentuale di cellule Th alla diagnosi (Figura 6a); al contrario, i pazienti con una percentuale più alta di cellule B hanno avuto un esito peggiore (Figura 6b). L'analisi di regressione di Cox ha identificato le cellule T CD4 come fattore prognostico-predittivo positivo nei pazienti con DLBCL; tuttavia, non è stato osservato un impatto statisticamente significativo sulla sopravvivenza globale (Figura 6c).

3.4 Th, cellule T totali e DPT: correlazioni

Dato il ruolo prognostico delle cellule T helper e l'aumento del valore delle cellule DPT osservato nei pazienti con DLBCL in RC, si è proceduto ad indagare la possibile correlazione di queste popolazioni con le cellule T totali, risultate aumentate in questo sottotipo di linfoma rispetto al MZL.

L'analisi non ha mostrato correlazioni significative nel gruppo dei DLBCL (Figura 7a). Al contrario, è stata osservata una correlazione significativa tra T totale vs. Th e T totale vs. cellule DPT nel gruppo dei MZL (Figura 7b). Inoltre, le cellule T totali erano significativamente correlate anche con le restanti sottopopolazioni T (DNT, NKT-like e Tc) sia nel gruppo dei DLBCL che in quello dei MZL.

Tabella 2. Confronto tra sottopopolazioni linfocitarie e stadiazione tra i linfomi non-Hodgkin a cellule B.

	lymphocyte subsets	DLBCL	MCL		MZL	
		median (%)	median (%)	p-value	median (%)	p-value
Stage II	B cells	6.83	Not evaluable		14.90	0.03*
Stage III	B cells	6.54	83.60	0.03*	36.81	0.03*
	T cells	80.08	13.60	0.01*	42.00	0.01*
Stage IV	Tc cells	34.59	7.29	0.12	12.61	0.01*
	Lymphocytes	12.93	24.23	0.02*	28.33	0.05*
	DPT cells	1.06	0.33	0.02*	0.43	0.03*

4. Discussione

I meccanismi di interazione tra le cellule neoplastiche e il sistema immunitario, così come tra distinti sottogruppi intratumorali delle stesse cellule, sono alla base dell'immunoterapia del cancro. È stato suggerito che le cellule immunitarie svolgano un ruolo essenziale in queste interazioni [Bracci L, 2014]. In diverse neoplasie, è stata documentata la presenza di un massivo infiltrato immunitario nel microambiente tumorale la cui importanza prognostica positiva è stata ben stabilita. La citometria a flusso multicolore (FC) è una tecnologia affidabile e semplice per monitorare il fenotipo delle cellule immunitarie e tracciare regolarmente lo stato immunologico. Per chiarire eventuali fenomeni di attivazione immunitaria secondaria alla malattia, è stato eseguito un profilo immunologico retrospettivo mediante citometria a flusso multiparametrica ad alta sensibilità su una coorte longitudinale di LnH, con l'obiettivo di delineare le sottopopolazioni linfocitarie del midollo osseo e identificare

possibili pattern distintivi dei quattro sottotipi.

L'approccio analitico adottato ha permesso di delineare differenze significative nelle distribuzioni percentuali delle sottopopolazioni cellulari tra i vari tipi di linfoma, confermando la sensibilità del metodo nel cogliere variazioni fenotipiche anche sottili.

I linfociti totali e le cellule B erano significativamente più numerosi nel MCL e nel MZL, sottotipi caratterizzati da una minore percentuale di progressione della malattia.

In contrasto, nei DLBCL e FL è stato riscontrato un significativo aumento dei linfociti T, in linea con una maggiore frequenza di progressione della malattia. È interessante notare come nel FL, rispetto agli altri LnH considerati, è stato osservato un maggior incremento del valore percentuale delle cellule NK e DNT, sebbene non significativo, in controtendenza alle restanti popolazioni analizzate. L'unico dato significativo relativo al gruppo FL riguardava le percentuali di linfociti Th, significativamente più alte rispetto al MCL.

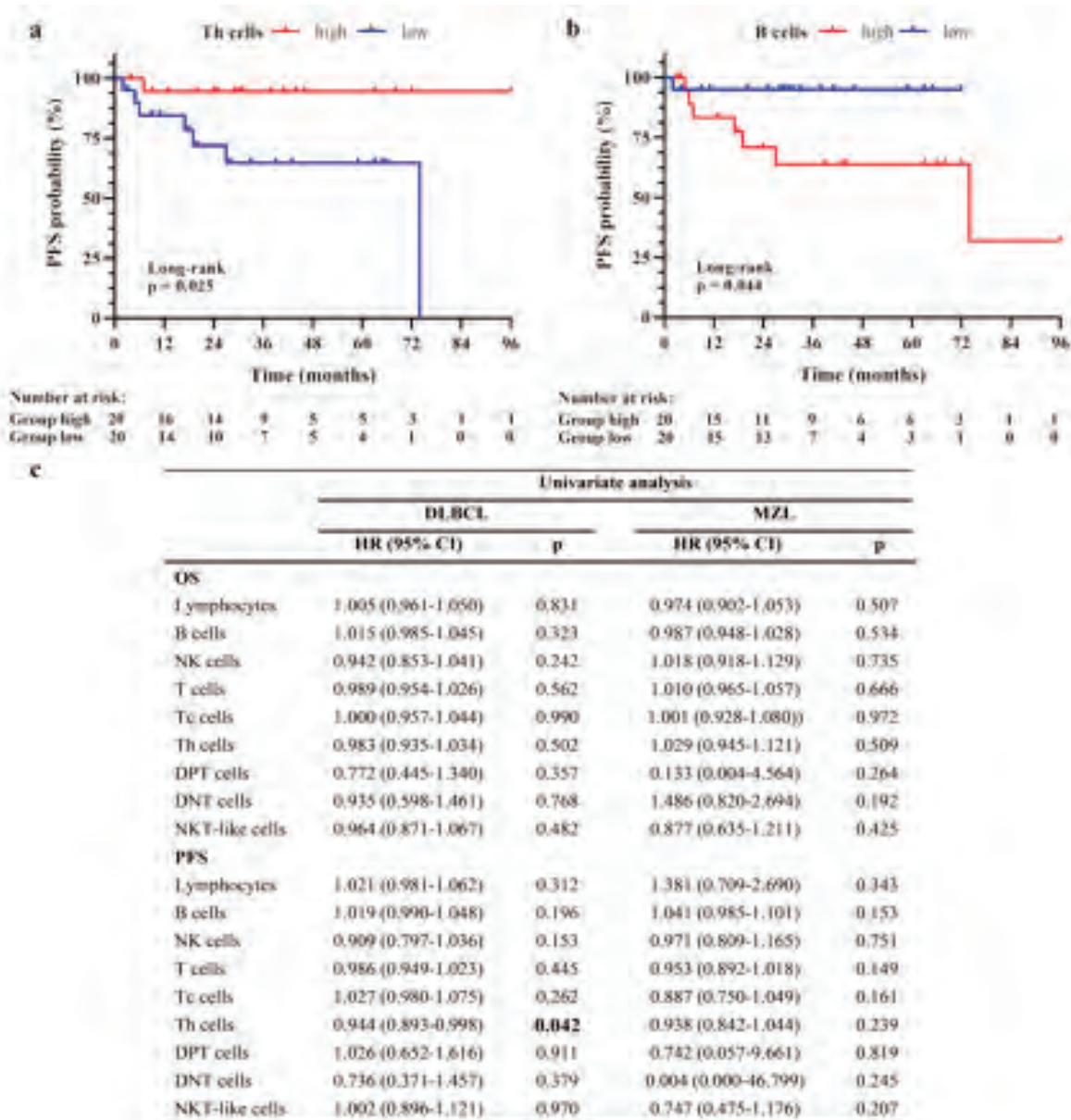


Figura 6. Valore prognostico delle sottopopolazioni linfocitarie nel DLBCL e MZL. Le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier mostrano il ruolo prognostico della percentuale di cellule Th (a) e B (b), stratificate in funzione alla mediana di espressione, sulla PFS nel gruppo DLBCL. Sotto ogni curva è riportato il numero dei soggetti a rischio negli specifici intervalli di tempo considerati. Analisi Cox eseguita in DLBCL e MZL (c). Variabili continue: cellule linfocitarie, cellule B, cellule NK, cellule T, cellule Tc, cellule Th, cellule DPT, cellule DNT, cellule NKT-like. I risultati statistici con $p < 0,05$ sono in grassetto.

Le osservazioni sulle cellule NK, DNT e Th nel FL suggeriscono possibili differenze nel profilo immunitario, ma l'esiguo numero di pazienti costituisce un limite importante che ha impedito di ottenere risultati solidi e statisticamente robusti. Pertanto, è utile una conferma in studi con coorti più ampie.

In sintesi, questi primi dati confermano differenze nel profilo immunitario del midollo osseo tra linfomi aggressivi e indolenti, suggerendo che i sottotipi linfocitari potrebbero avere un ruolo complesso nella modulazione dell'evoluzione dei LnH.

Un nostro recente studio sulla leucemia linfatica cronica a cellule B (LLC-B) supporta il concetto che la sorveglianza immunitaria delle cellule DNT nella LLC-B è

tra il numero di cellule CD19+ nel MO e lo stadio della malattia [Zhang L, 2011].

Utilizzando l'analisi ROC, è stato identificato un valore limite ipotetico per le cellule B: se la percentuale di CD19+ sul totale dei linfociti era $\geq 9,32\%$, avevamo una probabilità del 72% di identificare correttamente lo stadio IV rispetto agli stadi II/III.

Inoltre, nel DLBCL, valori percentuali più elevati di linfociti B alla diagnosi sono associati ad un fallimento della risposta completa e/o a una recidiva/progressione della malattia, portando ad una prognosi peggiore. Contrariamente alle cellule B, un'alta percentuale di cellule Th sembra essere un fattore prognostico/predittivo favorevole nel DLBCL. In accordo ad un recente studio,

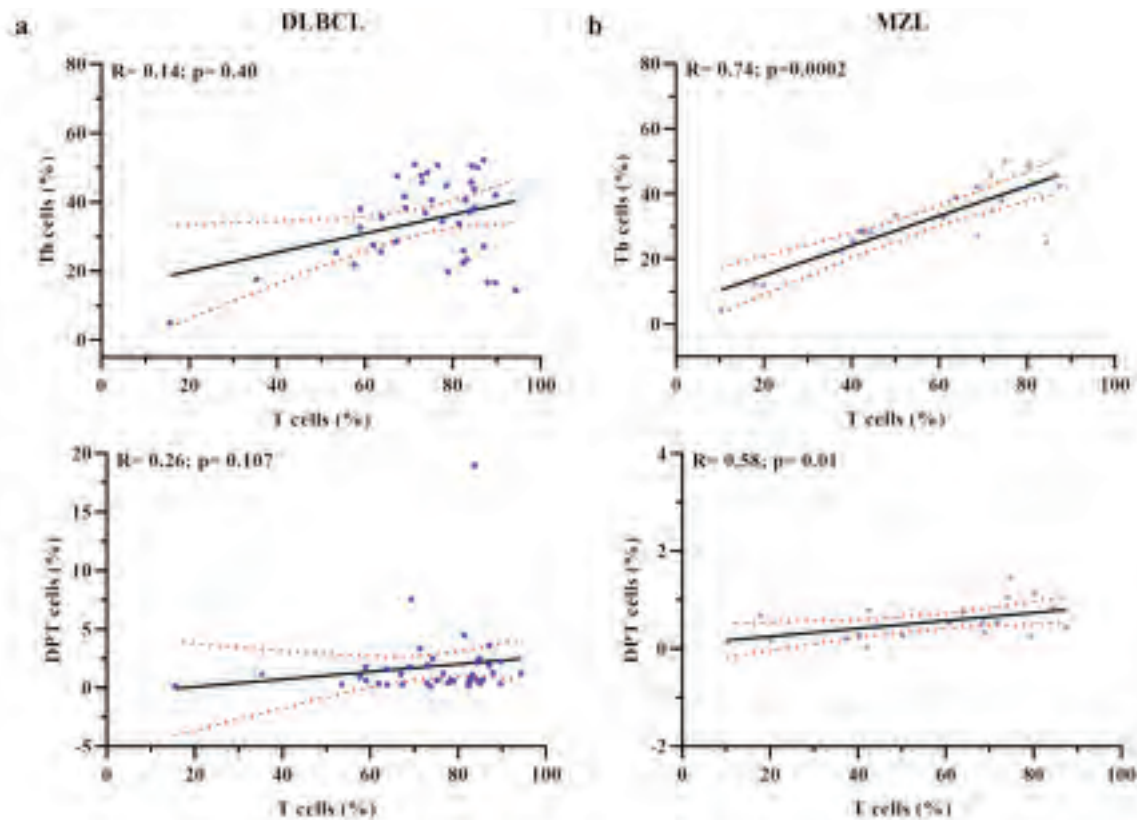


Figura 7. Correlazione tra CD3, CD4 e DPT nei pazienti con DLBCL e MZL. Analisi del coefficiente di correlazione di Spearman tra le cellule T totali, le cellule Th e le cellule DPT nel DLBCL (a) e nel MZL (b).

indipendente dallo stadio della malattia. Al contrario, le cellule DPT e NKT-like sembrano aumentare significativamente solo con il progredire della malattia [Valvano L, 2023]. In questo studio, le cellule DPT hanno mostrato un cambiamento significativo nello stadio IV tra gruppi di DLBCL, MCL e MZL. All'interno della stessa patologia, non sono state riscontrate differenze nei valori percentuali in relazione agli stadi prognostici. Le uniche sottopopolazioni che variavano significativamente con gli stadi prognostici erano le cellule T e B nel DLBCL. Nel dettaglio, i linfociti B erano significativamente più alti solo nel gruppo di DLBCL allo stadio IV rispetto allo stadio II e III, che avevano valori simili. Questo risultato suggerisce che la percentuale di cellule B nel MO valutata mediante citometria a flusso possa essere utilizzata come fattore prognostico nella stadiazione del DLBCL. A supporto della nostra ipotesi, altri studi nel campo dell'oncoematologia identificano la correlazione

nei pazienti con DLBCL l'aumento selettivo dei linfociti, in particolare delle cellule T CD4+ e NK, determina un miglioramento dell'effetto terapeutico e della prognosi [Yang Z, 2023]. Kusano et al. hanno esaminato il numero di cellule T CD4+ e CD8+ nel sangue periferico di individui con DLBCL e hanno trovato una correlazione negativa tra un basso numero assoluto di cellule T CD4+ alla diagnosi e la sopravvivenza libera da malattia (DFS) a 5 anni [Kusano Y, 2017]. Nel nostro studio, è interessante notare che mentre l'andamento dei Th nei DLBCL e negli MZL era paragonabile, nei DLBCL non è risultato correlato all'andamento totale dei linfociti T, contrariamente agli MZL. Entro i limiti della significatività, un andamento simile per i DPT è stato osservato nei pazienti con DLBCL. Queste osservazioni suggeriscono che le cellule Th e DPT svolgono un ruolo nella risposta immunitaria nel DLBCL.

I risultati di questo studio dovrebbero essere interpretati nel contesto dei loro limiti. Innanzitutto, il diverso

numero di pazienti tra i LnH e/o i gruppi prognostici non ha fornito risultati statistici chiari. Inoltre, a causa della natura retrospettiva dello studio ed alla difficoltà di reclutare MO di controlli sani, non è stato possibile fornire dati di controllo.

In conclusione, i dati di questo studio sul DLBCL suggeriscono che la valutazione alla diagnosi potrebbe influenzare le decisioni terapeutiche o le valutazioni prognostiche in contesti clinici. I CD19+ e i Th potrebbero offrire indicazioni rapide per la stadiazione e la prognosi della malattia, spingendo il clinico ad accelerare il processo diagnostico (ad esempio, analisi istologiche, esami di imaging medico) e ad intensificare il monitoraggio del paziente (ad esempio, controlli ravvicinati) al fine di identificare precocemente i pazienti con scarsa o nessuna risposta indirizzandolo verso un cambio o intensificazione del trattamento, nel tentativo di massimizzare la loro PFS e OS.

Per confermare ed ampliare i nostri risultati, è attualmente in corso uno studio di immunofenotipizzazione delle cellule periferiche, che include valori assoluti e una casistica di pazienti ampliata, evidenziando il potenziale della citometria a flusso nella valutazione della funzione immunitaria in clinica, a partire da un semplice campione di sangue midollare.

Bibliografia

1. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. 2022 Jul;36(7):1720-1748.
2. Bracci L, Schiavoni G, Sistigu A, Belardelli F. Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer. *Cell Death Differ*. 2014 Jan;21(1):15-25.
3. Campo E, Jaffe ES, Cook JR, et al. The International Consensus Classification of Mature Lymphoid Neoplasms: a report from the Clinical Advisory Committee. *Blood*. 2022 Sep 15;140(11):1229-1253.
4. Carpenter AC, Bosselut R. Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol*. 2010. Aug;11(8):666-673. doi: 10.1038/ni.1887 Erratum in: *Nat Immunol*. 2011 Mar;12(3):271.
5. Chen X, Wang D, Zhu X. Application of double-negative T cells in haematological malignancies: recent progress and future directions. *Biomark Res*. 2022;10(1):11.
6. Courtney AN, Tian G, Metelitsa LS. Natural killer T cells and other innate-like T lymphocytes as emerging platforms for allogeneic cancer cell therapy. *Blood*. 2023 Feb 23;141(8):869-876.
7. Crees ZD and Ghobadi A. Cellular Therapy Updates in B-Cell Lymphoma: The State of the CAR-T. *Cancers (Basel)* 2021 Oct 15;13(20):5181.
8. García-Domínguez DJ, Hontecillas-Prieto L, Palazón-Carrión N, et al. Tumor Immune Microenvironment in Lymphoma: Focus on Epigenetics. *Cancers (Basel)*. 2022 Mar 13;14(6):1469.
9. Jerud ES, Bricard G, Porcelli SA. CD1d-restricted natural killer T cells: roles in tumor immunosurveillance and tolerance. *Transfus Med Hemother*. 2006;33:18-36.
10. Kotsianidis I, Nakou E, Spanoudakis E, et al. The diagnostic value of CD1d expression in a large cohort of patients with B-cell chronic lymphoproliferative disorders. *Am J Clin Pathol*. 2011 Sep;136(3):400-8.
11. Kusano Y, Yokoyama M, Terui Y, et al. Low absolute peripheral blood CD4+ T-cell count predicts poor prognosis in R-CHOP-treated patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cancer J*. 2017 Apr 21;7(4):e558. Erratum in: *Blood Cancer J*. 2017 May 12;7(5):e561.
12. Kwee TC, Kwee RM, Nievelstein RA. Imaging in staging of malignant lymphoma: a systematic review. *Blood*. 2008 Jan 15;111(2):504-16.
13. Li Y, Dong K, Fan X, et al. DNT Cell-based Immunotherapy: Progress and Applications. *J Cancer*. 2020 Mar 31;11(13):3717-3724.
14. Ortolani C, Forti E, Radin E, et al. Cytofluorometric Identification of Two Populations of Double Positive (CD4+, CD8+) T Lymphocytes in Human Peripheral Blood. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1993, 191, 601-609.
15. Overgaard NH, Jung JW, Steptoe RJ, Wells JW. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J Leukoc Biol*. (2015) 97:31-8.
16. Radtke AJ, Roschewski M. The follicular lymphoma tumor microenvironment at single-cell and spatial resolution. *Blood*. 2024 Mar 21;143(12):1069-1079.
17. Rivero A, Mozas P, Magnano L, López-Guillermo A. Novel targeted drugs for follicular and marginal zone lymphoma: a comprehensive review. *Front Oncol*. 2023 May 3;13:1170394.
18. Shah DK, Zúñiga Pflücker JC. An overview of the intrathymic intricacies of T cell development. *J Immunol*. 2014;192(9):4017-4023. doi: 10.4049/jimmunol.1302259
19. Spanoudakis E, Hu M, Naresh K, et al. Regulation of multiple myeloma survival and progression by CD1d. *Blood*. 2009 Mar 12;113(11):2498-507.
20. Tang L, Huang Z, Mei H, Hu Y. Immunotherapy in hematologic malignancies: achievements, challenges and future prospects. *Signal Transduct Target Ther*. 2023 Aug 18;8(1):306.
21. Valvano L, Nozza F, D'Arena G, et al. Preliminary analysis of double-negative T, double-positive T, and natural killer T-like cells in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Med*. 2023 Jun;12(12):13241-13255.
22. Wang H, Wan X, Zhang Y, et al. Advances in the treatment of relapsed/refractory marginal zone lymphoma. *Front Oncol*. 2024 Jan 25;14:1327309.
23. Wu Z, Zheng Y, Sheng J, et al. CD3(+)CD4(-)CD8(-) (double-negative) T cells in inflammation, immune disorders and cancer. *Front Immunol*. 2022 Feb 10;13:816005.
24. Yang Z, Yu W. Clinical significance of circulating neutrophils and lymphocyte subsets in newly diagnosed patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Clin Exp Med*. 2023 Jul;23(3):815-822.
25. Zhang L, Zhou ZH, Li XY, Ouyang J, Su C, Li J, Luo SK. [Correlation of CD19 positive cell counts in bone marrow with therapeutic efficacy in patients with multiple myeloma]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2011 Feb;19(1):64-7. Chinese. PMID: 21362223.



News in Bibliografia

Peer Review Journal

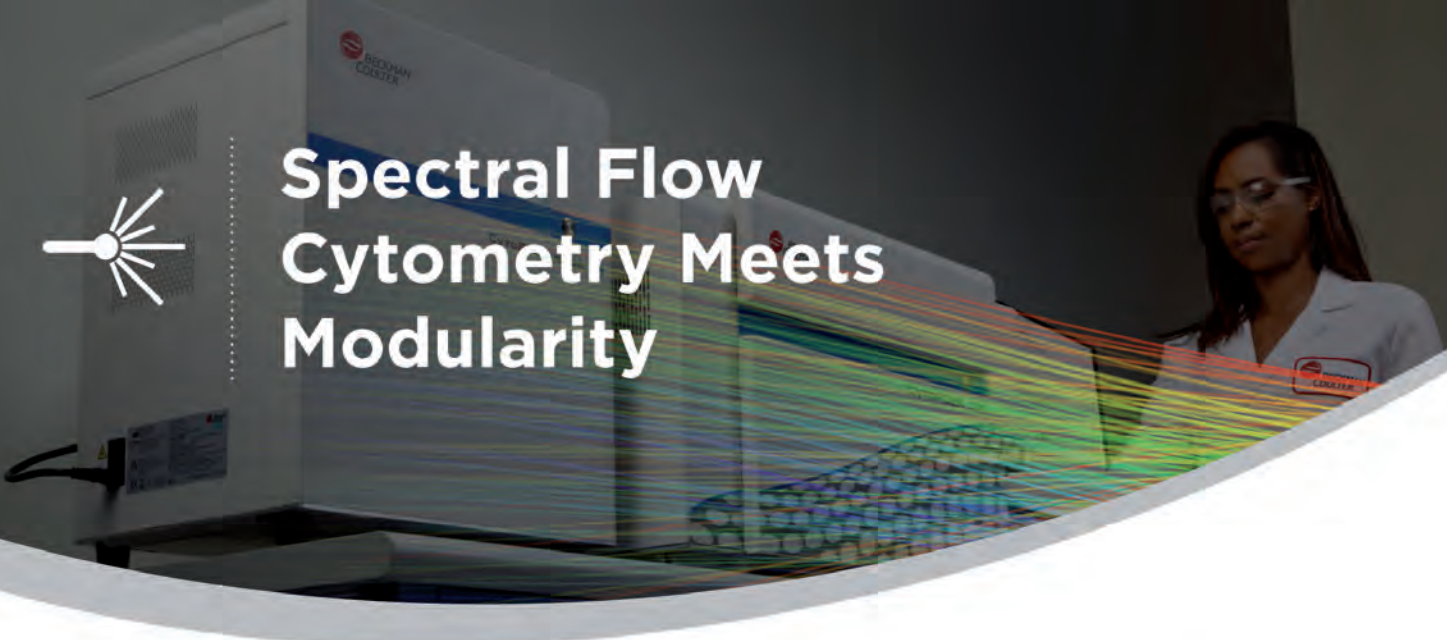
1. Robinson JP, Gmyrek GB, Rajwa B. **Flow Cytometry: Advances, Challenges and Trends** *BioEssays* 2026 Jan; 48(1): e70091 · DOI: 10.1002/bies.70091
Review panoramica sullo stato dell'arte e le prospettive future della Citometria a Flusso: Citometria spettrale, di massa, imaging, nano-citometria per vescicole extracellulari e analisi AI-driven.
2. Locatelli F, Pagliara D, ... Quintarelli C#, Del Bufalo F#. **GD2-targeting CAR T cells in high-risk neuroblastoma: a phase 1/2 trial** *Nature Medicine* 2025 Nov; 31(11): 3689–3699 · DOI: 10.1038/s41591-025-03874-6
Il monitoraggio immunologico post-infusione mediante Citometria Multiparametrica è centrale nella valutazione della persistenza e dell'efficacia delle cellule CAR-T di terza generazione. Trial clinico GD2-CART01 su bambini con neuroblastoma metastatico ad alto rischio recidivato/refrattario.
3. Quintarelli C*, Del Bufalo F*, ... Locatelli F#. **Donor-derived GD2-specific CAR T cells in relapsed or refractory neuroblastoma** *Nature Medicine* 2025 Mar; 31(3): 849–860 · DOI: 10.1038/s41591-024-03449-x
Prima dimostrazione dell'efficacia delle CAR-T allogeneiche GD2-specifiche (ALLO_GD2-CART01) nel neuroblastoma recidivato. La Citometria Multiparametrica è il principale strumento di immunomonitoraggio per la caratterizzazione del prodotto cellulare e della risposta immunitaria del paziente.
4. Lim YJ et al. **High-throughput fluorescence lifetime imaging flow cytometry** *Nature Communications* 2025 Jan; 16: 645 · DOI: 10.1038/s41467-024-51125-y
Prima integrazione completa della Microscopia a Tempo di Vita di Fluorescenza (FLIM) nella Citometria a Flusso, superando i limiti di velocità precedenti con oltre 10.000 cellule al secondo analizzate. Il sistema distingue sottopopolazioni in modelli di Glioma e rileva modificazioni nucleari indotte da farmaci antitumorali: apre nuove possibilità di analisi funzionale label-free.
5. De Angelis B, D'Amore ML, ..., Locatelli F, Negre H, Quintarelli C. **European survey on CAR T-Cell analytical methods from apheresis to post-infusion immunomonitoring** *Frontiers in Immunology* 2025; 16: 1567582 · DOI: 10.3389/fimmu.2025.1567582
Survey europea (consorzio T2Evolve/IMI) sui Metodi Analitici Citometrici utilizzati nei centri CAR-T europei, dall'aferesi al monitoraggio post-infusione. Identifica le lacune di standardizzazione e i biomarcatori predittivi di efficacia e tossicità.
6. Holl E, Kapinsky M, Larbi A. **An Update on Flow Cytometry Analysis of Hematological Malignancies: Focus on Standardization** *Cancers* 2025 Jun 19; 17(12): 2045 · DOI: 10.3390/cancers17122045
Analisi critica delle fonti di variabilità nella Citometria Clinica per leucemie, linfomi e MRD. Propone soluzioni pratiche per ridurre la variabilità inter-operatore e inter-laboratorio, tema cruciale per la riproducibilità dei dati clinici.
7. Spies NC, Rangel A, English P, Morrison M, O'Fallon B, Ng DP. **Machine Learning Methods in Clinical Flow Cytometry** *Cancers* 2025 Feb 1; 17(3): 483 · DOI: 10.3390/cancers17030483
Review sistematica sull'integrazione di supervised, unsupervised e weakly supervised learning nell'Analisi dei Dati Citometrici Clinici in emopatie maligne. Analizza anche le considerazioni operative, logistiche e regolatorie per l'implementazione clinica.
8. Wang YF, Chu EP, Lin FC, ... Wallace PK, Ko BS. **A machine learning framework for cross-institute standardized analysis of flow cytometry in differentiating AML from non-neoplastic conditions** *Computers in Biology and Medicine* 2025 Jul; 193: 110394 · DOI: 10.1016/j.compbiomed.2025.110394
Framework validato di Machine Learning per la classificazione cross-pannello della Leucemia Mieloide Acuta, basato su Parametri Citometrici Comuni condivisi tra protocolli eterogenei. Dati da 215 campioni (110 AML, 105 non-neoplastici) di più istituti internazionali.

Per rimanere sempre aggiornato sulle iniziative del GIC seguici sui nostri canali social





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

