

Vol. 33, Num. 2, 2024

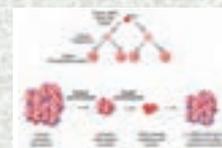
LETTERE GIC

Periodico della Società Italiana di Citometria

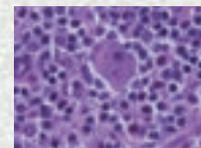
Il ruolo dell'analisi citometrica nella diagnostica delle Leucemie Linfoblastiche Acute



Caratterizzazione immunofenotipica di sottopopolazioni eterogenee di cellule staminali che coesistono in singoli casi di Glioblastoma Multiforme



Cellule tumorali e microambiente tumorale nel linfoma di Hodgkin: un gioco pericoloso e allo stesso tempo esaltanti prospettive terapeutiche



43^a CONFERENZA INTERNAZIONALE DI CITOMETRIA

AGGIORNAMENTI E INNOVAZIONI DELLA CITOMETRIA
NELLE APPLICAZIONI CLINICHE E DI RICERCA:
ANALISI, GESTIONE DEI DATI E LORO INTERPRETAZIONE

26-29 maggio 2025
Web Live Streaming

11-13 giugno 2025
Pontificia Università Lateranense
Roma-Città del Vaticano

NOW AVAILABLE



CytoFLEX SRT THE NEW BENCHTOP SORTER

Ready to take control of your cell purification workflows?
Want a dedicated instrument for your unusual cells?
Interested in a benchtop sorter but not willing to trade on performance?

Want all this, in a footprint that doesn't take up the room?
We've got you covered.

Built on the CytoFLEX platform, we've kept the APD detectors, the high sensitivity and ease-of-use you know and love in our analyzers, and put it in a benchtop sorter. Introducing: CytoFLEX SRT.

More info at: [beckl.co/cytoflexSRT](https://beckman.com/cytoflexSRT)

PREMIO DI STUDIO "Luigi Del Vecchio" La Citometria nelle tesi sperimentali 39^a Edizione 2025

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

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

I premi consistono in una borsa di partecipazione alla **43^a Conferenza Nazionale di Citometria** "Aggiornamenti e innovazioni della Citometria nelle applicazioni cliniche e di ricerca: analisi, gestione dei dati e loro interpretazione", **26-29 maggio 2025** in Web Live Streaming, **11-13 giugno 2025** Residenziale, presso la Pontificia Università Lateranense, Roma-Città del Vaticano, e ricevere i "Quaderni di Citometria".

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

Modalità di partecipazione

La domanda dovrà pervenire entro il **15 aprile 2025** alla Segreteria della Società Italiana di Citometria, all'indirizzo e-mail: gic@enea.it, specificando: nome, cognome, indirizzo, recapiti telefonici ed e-mail personali e del laboratorio, e l'impegno a citare il Premio, nell'Articolo che sarà pubblicato.

Alla domanda dovrà essere allegata:

- Un file con la Tesi in originale, **discussa tra il 1 gennaio 2024 e il 15 aprile 2025** e firmata dal Candidato e dal Relatore, completa in tutte le sue parti, in un unico file, in formato pdf, ed un certificato di laurea in carta semplice o copia conforme all'originale, in formato pdf.

Il Segretario
Raffaele De Vita

Il Presidente
Rosa Chianese

Per informazioni:



Società Italiana di Citometria

associazione scientifica senza fini di lucro

iscritta nell'Elenco delle Società Medico Scientifiche del Ministero della Salute

e/o Divisione Tecnologie e Metodologie per la Salvaguardia della Salute - ENEA Centro Ricerche Casaccia

Via Anguillarese, 301 - 00123 Roma - tel: 06 30484671

e-mail: gic@enea.it - <http://www.citometriagio.it>

Con il patrocinio di:



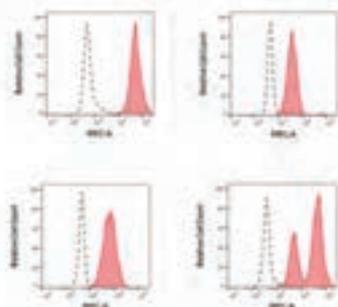
Agenzia nazionale per le nuove tecnologie,
l'energia e lo sviluppo economico sostenibile

exbio

FagoFlowEx Kit

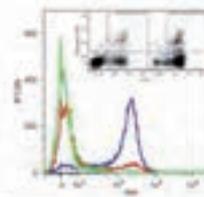
Cat.# ED7042
CE-IVD

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


www.sichim.com

Annexin V Kits Flow Cytometry

Code	Description	Size
IK-90314	Annexin V FITC	100 tests
IK-11150	Annexin V APC	100 tests
IK-11153	Annexin V PE	100 tests



JURKAT cells (human T cell leukemia) were treated with 200 ng/ml TRAIL (Apo2L, bacterially expressed extracellular domain of human TRAIL, corresponding to amino acids 95-291) for 6 hours or left untreated.

Highlights

Immunological Sciences' Annexin V allows for fluorescent detection of Annexin V bound to apoptotic cells to be used for quantitative determination by flow cytometry.

- Normal cells: Annexin V negative and PI negative;
- Early apoptotic cells: Annexin V positive and PI negative;
- Necrotic cells or late apoptotic cells: Annexin V and PI positive.

www.immunologicalsciences.com

A Cellular Antigen Stabilisation Reagent

TransFix®

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

Blood Collection

TransFix/EDTA Vacuum Blood Collection Tubes (TVT) for the stabilisation and anticoagulation of blood at the point of collection and for up to 14 days.

Cerebrospinal Fluid

TransFix/EDTA CSF Sample Storage Tubes Sample storage tubes optimised to stabilise CSF for up to 3 days.

Circulating Tumour Cells

Blood collection tubes prefilled with sufficient TransFix for the collection and stabilisation of circulating tumour cells

Sample Storage

TransFix Sample Storage Tubes

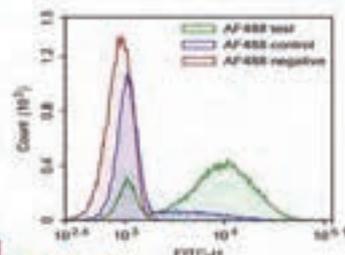
Sample storage tubes for stabilising 1 mL of sample. These tubes do not contain an anticoagulant, allowing the stabilisation of blood collected with an anticoagulant other than EDTA.

www.sichim.com

One Step TUNEL Apoptosis Kits

Flow Cytometry & Fluorescence Microscopy

Cat. No.	Product Name	Size
IK-9200	One-step TUNEL Apoptosis Kit (Green, FITC)	50 Assays
IK-11128	One-step TUNEL Apoptosis Kit (Green, AF488)	50 Assays
IK-9700	One-step TUNEL Apoptosis Kit (Red, AF555)	50 Assays
IK-11129	One-step TUNEL Apoptosis Kit (Red, AF594)	50 Assays
IK-9600	One-step TUNEL Apoptosis Kit (Red, AF647)	50 Assays
IK-9500	One-step TUNEL Apoptosis Kit (Blue, EV450)	50 Assays


www.immunologicalsciences.com

LETTERE GIC

Vol. 33, Num. 2

Agosto 2024

DIRETTORE RESPONSABILE
DIRETTORE SCIENTIFICO EDITORIALE
Raffaele De Vita

COMITATO SCIENTIFICO EDITORIALE
Giovanni DiArena
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. 33, num. 2 - Agosto 2024

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 CARLO PIGNANI
Zona Industriale Settevene - Nepi (VT)
csp.stampa@virgilio.it

Redazione:



c/o Divisione Tecnologie e Metodologie per la
Salvaguardia della Salute
ENEA Centro Ricerche Casaccia, s.p. 016
Via Anguillarese, 301 - 00123 ROMA
☎ 06/30484671
e-mail: gic@enea.it
http://www.citometriagic.it



SOMMARIO

Programma Preliminare

43ª Conferenza Nazionale di Citometria

Aggiornamenti e Innovazioni della Citometria
nelle Applicazioni Cliniche e di Ricerca:
analisi, gestione dei dati e loro Interpretazione

26-29 maggio 2025 Web Live Streaming

11-13 giugno 2025 Pontificia Università Lateranense
Roma-Città del Vaticano

6

Il ruolo dell'analisi citometrica nella diagnostica delle
Leucemie Linfoblastiche Acute

10

Giovanni Faggini, Francesca Cavagnero, Elena Varotto, Barbara Buldini

Caratterizzazione immunofenotipica di sottopopolazioni
eterogenee di cellule staminali che coesistono in singoli
casi di Glioblastoma Multiforme

16

Elena Casanova

Cellule tumorali e microambiente tumorale nel
linfoma di Hodgkin: un gioco pericoloso e allo stesso
tempo esaltanti prospettive terapeutiche

24

**Giovanni DiArena, Vincenzo Iorio, Marco Ciamarra, Filomena Cristiano,
Giuseppina DiAndrea, Caterina Miccoli, Antonio Pagano, Carmela Palladino,
Angelo Polito, Marianna Rizzo, Angela Tarasco, Luigi Rigacci**

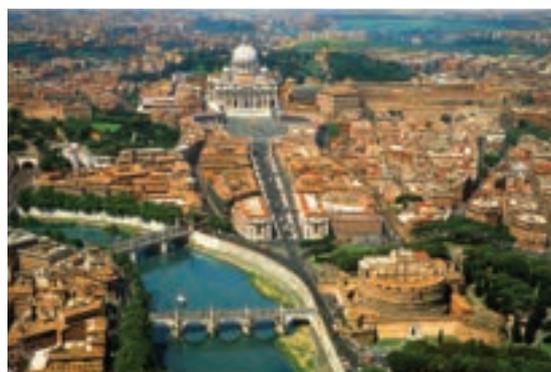
News in Bibliografia

30

Peer Review Journal

Quaderni GIC □ Fondamenti della Citometria □

31



In copertina: Roma sede della 43ª Conferenza Nazionale di Citometria 2025.



Società
Italiana di
Citometria

43^a CONFERENZA NAZIONALE DI CITOMETRIA

AGGIORNAMENTI E INNOVAZIONI DELLA CITOMETRIA NELLE APPLICAZIONI CLINICHE E DI RICERCA: ANALISI, GESTIONE DEI DATI E LORO INTERPRETAZIONE

26-29 maggio 2025
Web Live Streaming

11-13 giugno 2025
Pontificia Università Lateranense
Roma-Città del Vaticano

- * **Allergologia**
- * **Biologia della Riproduzione**
- * **Cellule Staminali e Terapie Cellulari**
- * **Ciclo Cellulare e Apoptosi**
- * **Citogenetica Molecolare**
- * **Covid 19**
- * **Ematologia Clinica e Sperimentale**
- * **EPN Emoglobinuria Parossistica Notturna**
- * **Immunologia Clinica e Sperimentale**
- * **Medicina Trasfusionale**
- * **Microbiologia Clinica e Sperimentale**
- * **Microscopia**
- * **Nuove Tecnologie e Metodologie Citometriche**
- * **Oncologia Clinica e Sperimentale**
- * **Patologia Veterinaria**
- * **Qualifiche e Certificazioni in Citometria**
- * **Scienze Ambientali e Biotecnologie**
- * **Tossicologia**
- * **Radiobiologia**

Comitato Organizzatore
Rosa Chianese (*Varese*)
Raffaele De Vita (*Roma*)
Ruggero De Maria (*Roma*)
Giuliano Mazzini (*Pavia*)
Concetta Quintarelli (*Roma*)

Comitato Scientifico
Chiara Agrati (*Roma*)
Stefano Amalfitano (*Roma*)
Rachele Amodeo (*Roma*)
Alessandra Battaglia (*Roma*)
Raffaella Casotti (*Napoli*)
Rosa Chianese (*Varese*)
Giuseppe Coppola (*Salerno*)
Igea Diagnano (*Milano*)
Giovanni Di Arena (*Salerno*)
Ruggero De Maria (*Roma*)
Raffaele De Vita (*Roma*)
Giuliano Mazzini (*Pavia*)
Claudio Pioli (*Roma*)
Concetta Quintarelli (*Roma*)
Giulia Scalia (*Napoli*)
Virginia Tirino (*Napoli*)
Silvestro Volpe (*Avellino*)

Segreteria Scientifica
Alessandra Battaglia (*Roma*)
Raffaella Casotti (*Napoli*)
Giulia Scalia (*Napoli*)
Virginia Tirino (*Napoli*)

I contributi scientifici saranno presentati sotto forma di relazioni su invito, comunicazioni orali e poster; gli **abstract** dovranno essere redatti in inglese e dovranno pervenire entro il **31 marzo 2025**.

L'Autore presentante l'abstract, iscritto alla Conferenza, potrà richiedere uno dei Quaderni GIC; gli abstract accettati saranno pubblicati in una rivista internazionale Peer Review e nella rivista **Lettere GIC**.
I Poster saranno esposti per tutta la durata della Conferenza.

Saranno assegnati Premi Poster GIC in diverse discipline.

INFORMAZIONI GENERALI

<http://www.citometriagic.it> - www.proeventifad.it

PROGRAMMA, REGISTRAZIONE E ISCRIZIONE NEL SITO:

<http://www.conferenzadicitometriagic.it>

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

La quota include:

- ◆ le colazioni di lavoro, le pause caffè
- ◆ le attività previste dal programma sociale
- ◆ gli Atti della Conferenza
- ◆ il materiale congressuale
- ◆ Attestato di partecipazione

È previsto un programma sociale, l'Annuale Assemblea Aperta dei Soci GIC, la consegna dei Premi di Studio GIC e la presentazione di materiale e di apparecchiature da parte delle principali Aziende del settore.

Calendario

- ◆ **Giovedì 22 maggio** 14:30-17:00 *Web Live Streaming*
Sessione di Apertura Multidisciplinare di Citometria

- ◆ **26-29 maggio** 14:30-17:00 *Web Live Streaming*

- **Lunedì 26 maggio** Analisi critiche nella diagnostica citometrica delle Malattie Linfoproliferative Croniche e delle Leucemie
- **Martedì 27 maggio** Analisi unbiased in Citometria: principi ed applicazioni
- **Mercoledì 28 maggio** Le vescicole extracellulari: piccoli messaggeri con una grande prospettiva nella prognosi e nella terapia del cancro
- **Giovedì 29 maggio** La Citometria per l'Ambiente e le Biotecnologie

- ◆ **Giovedì 5 giugno** 14:30-17:30 *Web Live Streaming*
Sessione Multidisciplinare Avanzamenti in Citometria

- ◆ **11-13 giugno 2025 Residenziale**
Pontificia Università Lateranense, Roma-Città del Vaticano

mercoledì 11 giugno

12:00 Registrazione e Allestimento dei Poster

14:00 Apertura Conferenza

14:15 Workshop Giovani Citometristi

15:15 Seminari di Immuno-Onco-Ematologia e Metodologie Analitiche

17:00 Lettura Magistrale di Apertura

giovedì 12 giugno

08:30-10:45 **Sessioni Parallele:**

- Le Nuove sfide della Citometria nella Diagnostica Onco-Ematologica
- La Citometria per l'Ambiente e le Biotecnologie

10:45-12:30 **Sessione Plenaria:**

- Nuove Frontiere della Citometria

14:00-15:45 **Sessioni Parallele:**

- La Citometria in Immunologia Traslazionale e Clinica
- L'Integrazione della Citometria nell'Oncologia traslazionale: nuove frontiere e prospettive cliniche nello studio e trattamento dei tumori

15:45-17:30 **Sessione Plenaria:**

- Nuove Frontiere della Citometria

17:30 Assemblea Aperta dei Soci

venerdì 13 giugno

08:30-10:00 **Sessioni Parallele:**

- Le Nuove sfide della Citometria nella Diagnostica Onco-Ematologica
- La Citometria in Immunologia Sperimentale e Traslazionale

10:30-12:00 **Sessione Plenaria**

- La Citometria Traslazionale dalla Ricerca alla Diagnostica

12:00 Lettura Magistrale Conclusiva

12:45 Conclusioni

Programma Sociale Preliminare

mercoledì 11 giugno

10:00 *Udienza generale del Santo Padre: Piazza San Pietro*

18:00 *Brindisi di Benvenuto*

giovedì 12 giugno

17:30 *Assemblea dei Soci*

18:00 *Degustazione "Sapere i Saperi" a Km 0*

venerdì 13 giugno

12:45 *Premiazione schede valutazione Conferenza*

13:00 *Light Lunch di saluto**

14:00 *Evento Culturale**

*è indispensabile la prenotazione entro il 31 marzo 2025.

Quote d'iscrizione

	entro il 31 marzo 2025		dopo il 31 marzo 2025
Soci GIC*	160,00 + IVA 22%	Soci GIC*	200,00 + IVA 22%
non Soci	220,00 + IVA 22%	non Soci	260,00 + IVA 22%
non strutt Soci GIC*	90,00 + IVA 22%	non strutt Soci GIC*	140,00 + IVA 22%
non strutt non Soci	150,00 + IVA 22%	non strutt non Soci	190,00 + IVA 22%

*In regola con la quota associativa 2025

+ Quaderno GIC 10,00 + IVA 22%

+ 3 Quaderni GIC 20,00 + IVA 22%

- *I Fondamenti della Citometria*

- *La Citometria a Flusso per lo Studio della Proliferazione Cellulare*

- *Le Cellule Natural Killer: Biologia, Patologia e Rilevanza della Citometria*

- *Valutazione Citofluorimetrica della Malattia Minima Residua*

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

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

□ richiesta specifica con i dati fiscali dell'Ente e dati del referente amministrativo della pratica (telefono ed e-mail);

□ dichiarazione scritta (contenente tutti i dati fiscali dell'Ente), in cui si specifichi che il dipendente (indicare nome e cognome) per cui viene richiesta l'iscrizione è autorizzato a frequentare l'evento per aggiornamento professionale;

□ codice PA che identifica la Pubblica Amministrazione (codice alfanumerico composto da 6 caratteri);

□ ogni altra eventuale informazione che l'Ente stesso ritenga necessaria ed opportuna per facilitare l'identificazione del pagamento del servizio come da norma della fatturazione elettronica.

SEDE DELLA CONFERENZA

Pontificia Università Lateranense
Piazza San Giovanni in Laterano 4
00184 Roma- Città del Vaticano
<https://www.pul.va>



Come raggiungere la sede della Conferenza



Come arrivare dalla Stazione Termini a Piazza di San Giovanni in Laterano:

- **Metro:** Linea A - fermata San Giovanni
- **Bus:** Linea 714 - Linea 360
- **Auto:** Raccordo Anulare uscita n. 14

Per ulteriori informazioni turistiche: Turismo Roma: www.turismoroma.it

Segreteria Scientifica

Società Italiana di Citometria



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

Segreteria Organizzativa

ProEventi Srl

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



Il Ruolo dell'Analisi Citometrica nella Diagnostica delle Leucemie Linfoblastiche Acute

Giovanni Faggin^{1,2}, Francesca Cavagnero³, Elena Varotto³, Barbara Buldini^{1,3}

¹Istituto di Ricerca Pediatrica (IRP) - Città della Speranza, Padova

²Dipartimento di Medicina Molecolare, Università degli Studi di Padova, Padova

³Dipartimento di Salute della Donna e del Bambino, Università degli Studi di Padova, Padova

e-mail: barbara.buldini@unipd.it

Abstract

Acute leukemias (AL) are the most common malignancies in pediatric patients. Since the '60s, the treatment of AL has considerably improved, thanks to the increasing knowledge about the tumor biology, the optimization in the use of chemotherapy and the introduction of novel approaches such as hematopoietic stem cells transplantation (HSCT) and immunotherapy. Multiparametric flow cytometry plays a critical role in AL diagnosis, together with clinical features, morphology, cytogenetics and molecular biology. The use of flow cytometry allows a more precise definition of AL immunophenotype (IF), thanks to which it is possible to correctly describe blast population and identify the correct lineage. The evaluation of minimal residual disease (MRD) allows to early stratify patients into risk groups, allowing to choose the correct treatment. Moreover, the clinician is able to monitor the efficacy of the adopted therapy, identifying potential immunophenotypic shifts or early relapses. Multiparametric flow cytometry relies on being a very quick and specific technique, easy to be standardized and able to evaluate an increasing number of fluorophores, in a constant technical improvement. In the present work, we revise the role of flow cytometry in the settings of AL diagnosis, according to the latest indication from WHO and international consensus.

Introduzione

Le leucemie acute (LA) sono le neoplasie maligne più frequenti in età pediatrica, costituendo circa il 30% di tutti i tumori nei pazienti di età inferiore ai 15 anni. L'80% delle LA pediatriche è rappresentato dalle leucemie linfoblastiche acute (LLA). La sopravvivenza nelle LLA pediatriche è passata dal 20% a cinque anni dalla diagnosi negli anni Sessanta all'attuale, maggiore al 90%, in coorti selezionate di pazienti. Questo risultato rappresenta un esempio emblematico dello straordinario progresso raggiunto negli ultimi decenni in ambito oncoematologico grazie al miglioramento nell'uso della chemioterapia, alla gestione delle complicanze ad essa legate e all'introduzione dell'immunoterapia, incluso il trapianto di cellule staminali ematopoietiche. Fondamentali si sono inoltre dimostrati l'avanzamento nella conoscenza della biologia delle LLA, con l'identificazione di un numero sempre maggiore di sottogruppi associati a prognosi differenti, così come nella valutazione della risposta alla terapia attraverso il monitoraggio della malattia residua minima. La diagnosi di LLA richiede un approccio multidisciplinare, come previsto dalla classificazione WHO dei tumori dei tessuti ematopoietici e linfoidi pubblicata per la prima volta nel 2001 e seguita da multiple edizioni e revisioni, fino all'ultima,

quinta, pubblicata nel 2024¹. Al giorno d'oggi, la citomorfologia, la citometria a flusso multiparametrica, la citogenetica e la genetica molecolare, vengono affiancate a tecniche più innovative, come il sequenziamento globale (*genome-wide sequencing*) e la MLPA (*Multiple Ligation dependent Probe Amplification*).

La classificazione *French-American-British* (FAB) pubblicata nel 1976, che distingue diversi sottotipi di leucemia acuta sulla base dell'aspetto morfologico², reca con sé i limiti di essere estremamente operatore-dipendente e di non riuscire a distinguere il preciso *lineage* di appartenenza.

La successiva introduzione della citometria a flusso multiparametrica ha permesso di valutare l'espressione differenziale di diversi marker immunologici, alcuni dei quali caratteristici di *lineage*, altri di step maturativi, nonché di profili immunofenotipici potenzialmente associati a particolari genotipi o con possibile significato prognostico. La valutazione in citometria a flusso di marcatori a livello della superficie e del citoplasma delle cellule leucemiche prende il nome di immunofenotipo (IF). L'analisi dell'IF mediante citofluorimetria multiparametrica è oggi procedura standard nella valutazione di pazienti con neoplasia ematologica.

Diagnosi Immunofenotipo

Le LLA si distinguono a seconda del *lineage* in forme a precursori B e a precursori T, che nel pediatrico si manifestano rispettivamente nell'80-85% e nel 15-20% dei casi. La definizione del *lineage* è essenziale nella corretta diagnosi di un paziente e costituisce il primo step per un corretto iter terapeutico.

La valutazione immunofenotipica in citometria a flusso prevede la marcatura del campione di sangue midollare (o periferico nel caso di iperleucocitosi con impossibilità ad eseguire un aspirato midollare) con un ampio pannello di anticorpi monoclonali diretti verso antigeni di superficie ed intracitoplasmatici in grado di definire espressioni antigeniche aberranti per *lineage* e/o livello maturativo. Nella diagnosi tramite IF, il primo step consiste nell'isolamento della popolazione blastica dalle cellule normali tramite *gate* immunologico. Le caratteristiche morfologiche, definite mediante i parametri di *forward scatter* (FSC) e *side scatter* (SSC) sono insufficienti per riconoscere in modo adeguato le popolazioni blastiche, soprattutto se presenti in basse percentuali.

L'antigene pan-leucocitario CD45 (LCA, *leukocyte-common antigen*) è una glicoproteina integrale di membrana coinvolta nei processi di attivazione dei linfociti B e T. Il CD45 in associazione al SSC rappresenta il modo più semplice per discriminare le cellule normali da quelle neoplastiche. Tale combinazione permette infatti di iden-

tificare le principali popolazioni presenti nel campione di sangue midollare e/o periferico nei differenti stadi maturativi (Figura 1).

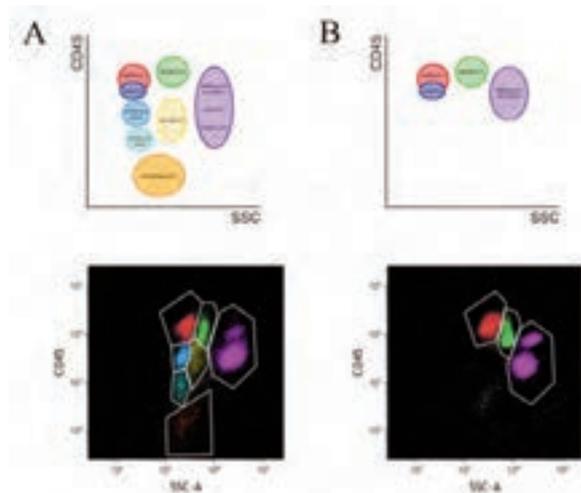


Figura 1. Normale espressione del CD45 in un campione di midollo osseo (A) o di sangue periferico (B). Il CD45 è un antigene pan-leucocitario che viene espresso da tutte le cellule ematopoietiche (linfociti, monociti, cellule della linea mieloide), ad eccezione della linea eritroide. L'espressione del CD45 diventa gradualmente più intensa nel corso della maturazione dei precursori ematopoietici midollari.

L'utilizzo di un approccio esclusivamente quantitativo (percentuale) per la descrizione dell'espressione antigenica nella popolazione selezionata, generalmente è insufficiente per definire il fenotipo della popolazione neoplastica, nonché spesso si rivela arbitrario e limitante per l'interpretazione finale dei risultati. Si preferisce l'utilizzo di un sistema semi-quantitativo, in cui si valuta lo *shift* di fluorescenza e il *pattern* di distribuzione nella popolazione di interesse in confronto a controlli interni appropriati (popolazioni di riferimento, quali ad esempio popolazioni linfoidi normali). Nei pannelli che vengono utilizzati è importante, perciò, includere combinazioni in grado di distinguere i blasti dalle normali cellule residue, che serviranno da controlli interni per la definizione dell'espressione antigenica nelle cellule patologiche.

Nel 2006, il *Bethesda International Consensus* ha proposto un sistema tripartito di valutazione dell'espressione antigenica. Esso suggerisce di riportare la distribuzione di fluorescenza per singolo anticorpo come "positivo", "negativo" o "espresso parzialmente", utilizzando come riferimento le normali popolazioni linfoidi residue nel campione. Oltre alla definizione di negatività o positività per un determinato antigene, l'intensità di espressione viene definita come *dim* (espressione debole), *bright* (espressione forte) o *heterogeneous* (eterogeneità nella distribuzione di fluorescenza).^{3,4}

La classificazione WHO per le neoplasie ematologiche prevede una definizione di positività antigenica come "debole" (*weak*) o "forte" (*strong*), a seconda della deviazione dal controllo negativo¹. Per una standardizzazione tra i laboratori, il gruppo europeo AIEOP-BFM⁵ nel 2016 ha elaborato una più precisa descrizione della distribuzione e dell'intensità dell'espressione antigenica in accordo con il sistema tripartito (*negative-weak-strong*) previsto dal WHO¹. L'espressione antigenica è definita dallo *shift* fenotipico e dal *pattern* di distribuzio-

ne della popolazione leucemica rispetto al controllo, come precedente descritto dalla *Consensus* di Bethesda. L'espressione antigenica viene pertanto definita come "debole" (*dim*), "media" (*medium*), "forte" (*bright*) ed "eterogenea" (*heterogeneous*). La parziale positività, qualora per un determinato antigene la popolazione di interesse presentasse due chiare popolazioni, negativa e positiva, viene classificata in due tipologie, a seconda che la popolazione negativa sia preponderante sulla positiva (*partial positive 1*) o viceversa (*partial positive 2*). Secondo i criteri AIEOP-BFM vi è corrispondenza tra espressione *strong*, secondo i criteri WHO, ed espressione *bright*, *heterogeneous*, *medium* e *partial positive 2*, così come tra espressione *weak* secondo WHO e *partial positive 1* e *dim* secondo AIEOP-BFM⁵.

Costruzione dei pannelli

Nella costruzione dei pannelli di diagnosi immunofenotipica da applicare alla diagnosi, ogni combinazione anticorpale deve essere creata al fine di rispondere ad una domanda o per uno scopo preciso, seguendo una serie di considerazioni generali. Il vantaggio di tale approccio consiste nella capacità di utilizzare una metodica multiparametrica, in cui l'utilizzo contemporaneo di almeno 6 fluorescenze è consigliabile. I pannelli devono includere un *backbone* contenente il CD45 e un marker di linea che insieme concorrono all'identificazione dei blasti e di popolazioni di riferimento che fungano da controllo nell'attribuzione delle positività per i marcatori. All'interno dei pannelli, inoltre, è necessario includere marker di linea, come previsti dai criteri classificativi utilizzati per la diagnosi di LA ed essenziali per la corretta assegnazione dell'IF del paziente. Per le leucemie di linea B, il CD19 è il principale marker di linea (Figura 2A), insieme al CD22 e al CD79a intracitoplasmatici, e al CD10 di superficie. Nelle leucemie di linea T, il CD7 viene gene-

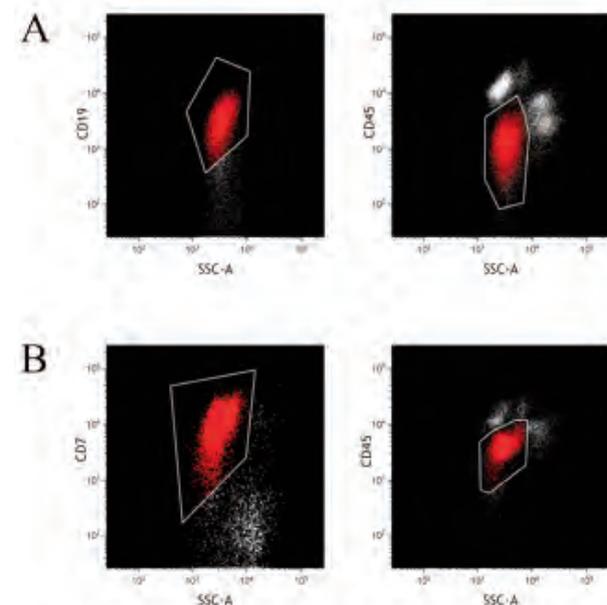


Figura 2. Esempi di dot plot citofluorimetrici in leucemie linfoblastiche acute all'esordio. L'utilizzo del CD45 insieme a marker di linea nei pannelli citofluorimetrici permette la corretta valutazione dell'IF. L'assegnazione del lineage dipende dall'espressione di determinati antigeni, quali CD19, CD10, iCD79a e iCD22 per le leucemie di linea B (A), e CD7, CD5 e iCD3 per le leucemie di linea T (B).

ralmente utilizzato come marker di linea (Figura 2B). Sebbene sia espresso nella quasi totalità di leucemie linfoblastiche di linea T, il CD7 può essere espresso anche da una quota di leucemie mieloidi acute, configurandosi pertanto come marker non completamente specifico di linea T. La concomitante positività per il marker CD3, sia esso intracitoplasmatico o di superficie rappresenta, pertanto, condizione necessaria per la definizione di *lineage* T. Il CD5 è generalmente espresso dalle LLA di linea T (negativo o positivo basso soltanto nel 10% dei casi).

La definizione dell'IF permette una classificazione più precisa delle leucemie acute linfoblastiche rispetto a quella originale FAB, che distingueva le forme L1-L2-L3 sulla base della sola citomorfologia.

Secondo il livello di differenziazione dei blasti e, di conseguenza, dell'espressione di determinati marcatori, la classificazione EGIL (*Group for the Immunological Characterization of Leukemias*) distingue le LLA di linea B e T in ulteriori sottogruppi⁶.

Le LLA B vengono classificate in quattro sottocategorie: B-I (pro-B), caratterizzate dall'assenza di espressione del CD10; B-II (common), CD10 positive e negative per l'espressione intracitoplasmatica di IgM; B-III (pre-B), caratterizzate dall'espressione delle IgM intracitoplasmatiche; B-IV (*mature*), tipicamente CD20 positive e caratterizzata da clonalità per catene leggere κ o λ .

Le T-ALL si classificano in tre gruppi: T-I/II (*early T*); T-III (*intermediate*), caratterizzate dall'espressione del CD1a; T-IV (*mature*), tipicamente CD3+ e con clonalità per il recettore T $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. In Tabella 1 sono schematizzati i diversi sottogruppi di LLA di linea B e T.

Nel 2009⁷ è stato descritto un sottogruppo di LLA di linea T definito ETP (*early T-cell precursor*), associato a prognosi infausta. La prognosi delle ETP-ALL è stata successivamente rivista nel 2016 da uno studio AIEOP⁸ dimostrando che questo sottogruppo di LLA-T ha prognosi sovrapponibile alle altre T-ALL se trattato con terapie a blocchi come da schema BFM, previste per le forme ad alto rischio. Le ETP si caratterizzano oltre all'espressione di CD7 di superficie e CD3 intracitoplasmatico, dall'assenza o debole espressione di CD5, negatività per CD8 e CD1a, e positività forte per almeno due fra i marcatori mieloidi o di immaturità CD34, CD117, CD33, HLA-DR, CD13, CD11b e CD65. Nel 2023 è stato descritto un ulteriore sottogruppo di LLA-T "near ETP", caratterizzato dal punto di vista fenotipico da una aumentata espressione del CD5 rispetto alle ETP, ma con bassa risposta alla terapia di induzione e prognosi simile alle classiche ETP, se trattate con protocolli MRM-based⁹.

Esistono, inoltre, casi di LA in cui l'assenza di espressione di marker di linea o la co-espressione di antigeni linfoidi e mieloidi rendono l'assegnazione del fenotipo finale particolarmente complessa.

Il WHO ha introdotto le definizioni di leucemia acuta indifferenziata (AUL) e leucemia acute a fenotipo misto (MPAL). Le AUL sono leucemie acute che non raggiungono alcun criterio di linea. Le MPAL includono sia le leucemie descritte in passato come "bifenotipiche", che esprimono antigeni linfoidi e mieloidi sulla superficie della stessa popolazione cellulare, sia "bilineari", che si configurano per la presenza di due diverse popolazioni una linfoide e una mieloide¹⁰.

Nei pannelli di immunofenotipizzazione, devono essere inclusi anche marcatori utili alla identificazione dei bla-

sti durante il monitoraggio della malattia residua minima (per esempio il CD58 e il CD123 per le leucemie di linea B¹¹, oppure il CD99 e il CD48 per le leucemie di linea T¹²), o che siano associati a specifiche anomalie genetiche e/o con potenziale significato prognostico per il paziente. L'immunofenotipo alla diagnosi è infatti utile, in casi selezionati, nel suggerire la possibile associazione a specifiche anomalie genetiche¹³.

La positività per il marcatore NG2 (o CD7.1), ad esempio, è suggestiva di riarrangiamenti che coinvolgono il gene *KMT2A* localizzato sul cromosoma 11q23¹⁴. Questo gruppo di riarrangiamenti è presente in circa il 10% dei pazienti pediatrici e, quando associato ad alcuni geni di fusione, come *AFF1*, è indicativo di prognosi più severa.

L'overespressione della proteina CRLF2, è suggestiva di un riarrangiamento del gene omonimo, presente in circa il 7% delle LLA pediatriche di linea B. È identificabile in citofluorimetria e spesso associata a mutazioni del gene *IKZF1*^{15,16}.

L'espressione della proteina GPI-80 (o VNN2) è stata descritta in associazione al trascritto di fusione *TCF3::HLF*, che definisce una rara forma di leucemia caratterizzata da aumentata resistenza alla chemioterapia e maggiore sensibilità alla immunoterapia¹⁷.

La citofluorimetria nello studio della malattia residua minima (MRM)

La risposta alla terapia costituisce uno dei principali fattori prognostici nel trattamento delle LLA pediatriche. La definizione precoce del gruppo di rischio (standard, intermedio o alto) permette un approccio terapeutico personalizzato, che ha l'obiettivo di modulare l'intensità del trattamento a seconda del possibile rischio di recidiva. La remissione completa morfologica, di solito raggiunta al termine del primo mese di chemioterapia, prevede meno del 5% di cellule blastiche in un midollo rigenerante valutato in citomorfologia. Questo approccio non è tuttavia sufficientemente sensibile per individuare eventuali cellule neoplastiche residue presenti in percentuale inferiore all'1%. La quota blastica che non è individuabile tramite morfologia viene chiamata malattia residua minima (MRM) e viene determinata tramite PCR (analisi sequenze *IG/TR*) o citofluorimetria. In particolare, diversi studi si sono concentrati sull'analisi della MRM mediante citofluorimetria in punti di rivalutazione precoci della terapia, per ottimizzare la definizione del gruppo di rischio ed il successivo trattamento^{18,19}. È stato dimostrato che la valutazione della MRM al giorno 15 della terapia di induzione permette di stratificare i pazienti affetti da LLA pediatrica in tre gruppi di rischio, alto (MRM>10%), medio (0,1%<MRM<10%) e basso (MRM<0,1%), in quanto associata a diversa *relapse-free survival* (RFS), rispettivamente del 7,5%, 17,5% e 47,2%¹⁹.

Oltre ai protocolli di terapia di prima linea, la citofluorimetria è critica nella identificazione delle ricadute, incluse le forme extramidollari, nonché per confermare la natura di una linfocitosi.

In considerazione dell'avanzamento tecnologico per l'identificazione della malattia residua minima nelle LLA, il gruppo internazionale Ponte-di-Legno ha pubblicato nel 2022 un *consensus* tra i maggiori consorzi internazionali, con i nuovi criteri per la definizione di remis-

sione completa, fallimento del trattamento e ricaduta. In particolare, una volta ottenuta la remissione completa (RC), la ricaduta viene definita con la presenza di malattia residua minima a livello midollare maggiore del 1%, con necessità di conferma in due prelievi diversi o con due metodiche diverse (MFC/PCR/NGS-based MRM o FISH/cariotipo/PCR)²⁰.

La valutazione della MRM in citofluorimetria prevede l'acquisizione di almeno 500,000 eventi, per raggiungere una sensibilità di 10^{-4} (1 cellula su 10,000). Per eliminare potenziali rumori di fondo, vengono considerati reali, e pertanto refertabili, cluster di almeno 10 cellule nucleate. L'utilizzo di un numero elevato di fluorescenze (almeno otto) e di una *nuclear dye* (come il SYTO16) permette una migliore "pulizia" del dato e lo scarto di ulteriori artefatti. Nell'analisi di MRM, si crea generalmente il *gate* immunologico principale sul marker di linea, selezionando quindi le cellule CD19 positive su SSC per le leucemie di linea B e quelle CD7 positive su SSC per le leucemie di linea T (Figura 3A-B). In molti casi, la terapia modula l'espressione di alcuni marcatori, come il CD10, CD34, il CD19, ed il CD20²¹. Negli ultimi anni, con l'introduzione di approcci immunoterapici abbiamo assistito alla possibile perdita di espressione di

importanti antigeni espressi dalle cellule tumorali (Figura 3C), in particolare il CD19 in seguito a terapia con Blinatumomab e cellule CAR T dirette verso il CD19 nelle LLA a precursori B^{22,23}. È pertanto essenziale l'introduzione di ulteriori marker di linea che possano sopperire alla *down*-regolazione dei marker usati per il *gate* immunologico. In particolare, per il monitoraggio delle LLA B in seguito a immunoterapia anti-CD19 è stato recentemente proposto il CD72 come *marker* di linea B alternativo in caso di perdita del CD19²⁴. Grazie al monitoraggio MRM in citofluorimetria, è inoltre possibile identificare possibili *switch* di fenotipo da linfoide a mieloide²³. Generalmente gli *switch* di linea sono permanenti, tuttavia esiste un sottogruppo di LLA a precursori B CD371-positivi alla diagnosi, caratterizzato da uno *switch* mielo-monocitario transitorio durante la fase di induzione, lenta risposta alla terapia, ma prognosi migliore rispetto alle LLA a precursori B CD371-negativi²⁵.

In generale, due sono gli approcci principali per la ricerca di cellule neoplastiche in citofluorimetria durante il *follow-up*. L'approccio maggiormente adottato è l'utilizzo di marcatori specifici per le cellule tumorali, o LAIP (*Leukemia-Associated ImmunoPhenotype*). Per esempio,

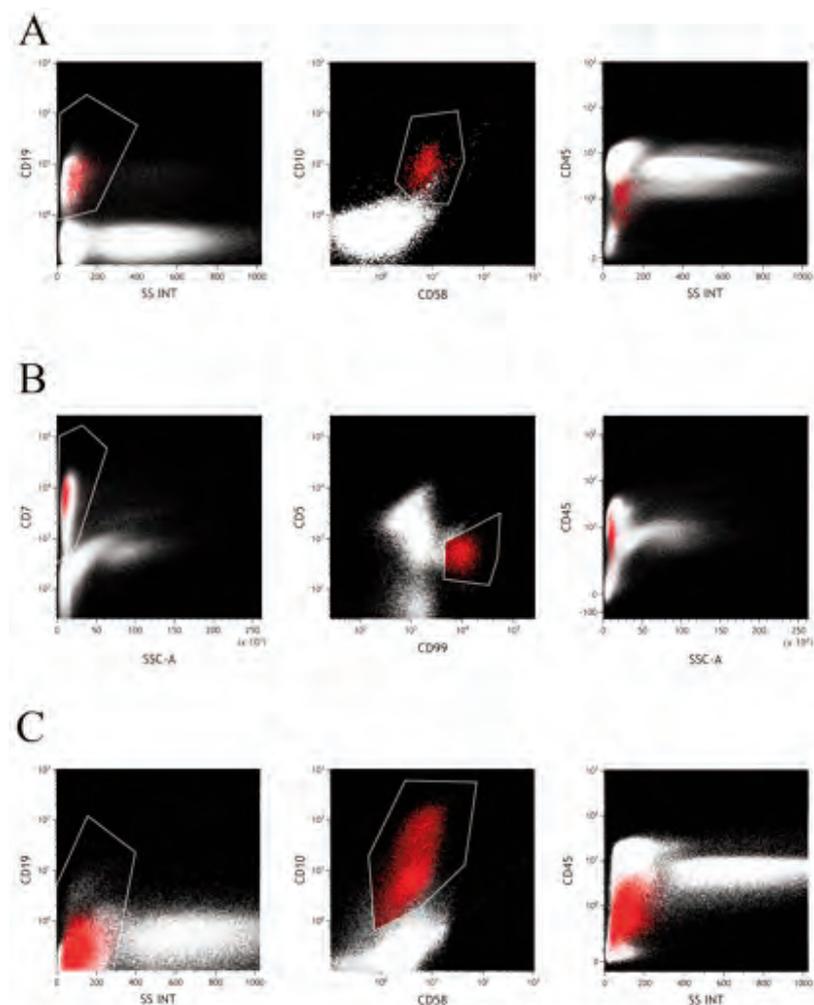


Figura 3. Analisi della malattia minima residua (MRM) in pazienti affetti da leucemie linfoblastiche acute di linea B (A) e T (B). Nei dot plot riportati sono evidenziate in rosso le cellule neoplastiche. L'utilizzo dei marcatori di linea per i primi gate immunologici può essere limitante per particolari casi di leucemie linfoblastiche caratterizzate dalla perdita di espressione degli stessi, come per il CD19 (C), occasionalmente riscontrata nei pazienti che stanno ricevendo o hanno ricevuto trattamento con immunoterapia anti-CD19.

il marker CD58 è *over*-espresso nella maggior parte delle LLA di linea B ed è fondamentale per l'identificazione delle cellule blastiche in MRM. Il secondo approccio consiste nell'analisi del DfN (*Different-from-Normal*). Il midollo osseo è la principale sede dell'ematopoiesi, ove le cellule staminali ematopoietiche si differenziano in linfociti B, monociti e cellule della linea mielo-monocitaria. In citofluorimetria è possibile lo studio di curve maturative di ogni serie cellulare grazie alla diversa espressione antigenica. Qualsiasi popolazione aberrante rispetto alle normali curve maturative rappresenta un fenotipo anomalo (DfN) potenzialmente compatibile con quello di popolazioni blastiche. I linfociti T maturano nel timo, pertanto l'espressione di marcatori di immaturità di linea T sulla superficie di cellule T a livello del sangue midollare e/o del sangue periferico, sono suggestivi di immunofenotipo blastico.

Il monitoraggio della MRM in citofluorimetria richiede personale con esperienza e in continua formazione, fondamentale, dal momento che l'interpretazione del risultato è, in una certa misura, operatore-dipendente. È inoltre indispensabile l'impegno sulla standardizzazione di ogni procedura, con appropriati controlli qualità (QC) intra- e inter-laboratorio e partecipazione a circuiti di valutazione esterna, come quelli forniti da UK NEQAS (*UK National External Quality Assessment Service*). Inoltre, consorzi quali AIEOP-BFM ed EuroFlow lavorano costantemente per la standardizzazione dell'intero

processo di monitoraggio della MRM, dalla manipolazione dei campioni alle strumentazioni e reagenti utilizzati per l'acquisizione, fino allo *step* finale di interpretazione dei risultati²⁶⁻²⁸

Conclusioni

L'incremento nell'utilizzo della citofluorimetria negli ultimi anni ha permesso una definizione sempre più accurata dell'immunofenotipo alla diagnosi, con l'identificazione del *lineage* e una precisa caratterizzazione dei blasti, fondamentali per una corretta gestione clinica dei pazienti affetti da LLA.

Il monitoraggio della MRM ha inoltre permesso una migliore stratificazione in fase di induzione con possibilità di distinguere pazienti ad alto rischio da quelli a basso rischio con programmi terapeutici differenziali.

Durante il trattamento, la citofluorimetria permette di verificare l'efficacia della strategia terapeutica, identificare *shift* immunofenotipici o perdita di antigeni *target*, nonché precocemente la ricaduta.

Metodica molto sensibile e specifica, rapida e poco costosa, utilizzabile nella maggioranza dei pazienti, facile nella standardizzazione, la citofluorimetria permette non solo la quantifica delle cellule blastiche ma anche la visualizzazione dello status della normale emopoiesi residua ed il grado di emodiluizione del campione, nonché potenziali caratteristiche importanti nella popolazione di interesse.

Tabella 1. Sottotipi di Leucemie Linfoblastiche Acute (LLA), secondo AIEOP BFM, EGIL, modificata⁵.

Sottotipo	Marcatori discriminanti	Note
<i>Leucemie acute linfoblastiche di linea B</i>		
B-I (pro-B)	CD10-	
B-II (B common)	CD10+	
B-III (pre-B)	cyIgM+	CD10 può essere debole o negativo
B-IV (B matura)	$\kappa+$ oppure $\lambda+$	può avere morfologia FAB L1/L2
<i>Leucemie acute linfoblastiche di linea T</i>		
T-I/II (early-T)	cyCD3+, CD7+	CD2, CD5 e CD8 possono essere espressi (T-II); sCD3 può essere debolmente positivo
T-III (T intermedia)	CD1a+	sCD3 può essere positivo debole
T-IV (T matura)	CD1a-, sCD3+	TCR+ (γ/δ oppure α/β) associato al CD3 positivo debole, oppure CD3 positivo forte

Il continuo progresso tecnologico e l'introduzione di un numero sempre maggiore di fluorescenze, il perfezionamento delle procedure di standardizzazione, rafforzano l'applicazione della valutazione in citofluorimetria nelle LLA pediatriche per un approccio sempre più accurato per l'ottimizzazione del trattamento delle LA pediatriche.

Bibliografia

1. WHO Classification of Tumours Editorial Board. Haematolymphoid tumours [Internet]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2024. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 11). Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/63>.
2. Bennett, J. M. *et al.* Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol* **33**, 451–8 (1976).
3. Wood, B. L. *et al.* 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia by flow cytometry: optimal reagents and reporting for the flow cytometric diagnosis of hematopoietic neoplasia. *Cytometry B Clin Cytom* **72 Suppl 1**, S14–22 (2007).
4. Davis, B. H. *et al.* 2006 Bethesda International Consensus recommendations on the flow cytometric immunophenotypic analysis of hematolymphoid neoplasia: Medical indications. *Cytometry B Clin Cytom* **72B**, S5–S13 (2007).
5. Dworzak, M. N. *et al.* AIEOP-BFM Consensus Guidelines 2016 for Flow Cytometric Immunophenotyping of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* **94**, (2018).
6. Bene, M. C. *et al.* Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia* **9**, 1783–6 (1995).
7. Coustan-Smith, E. *et al.* Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol* **10**, 147–56 (2009).
8. Conter, V. *et al.* Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia in children treated in AIEOP centres with AIEOP-BFM protocols: a retrospective analysis. *Lancet Haematol* **3**, e80–6 (2016).
9. Wood, B. L. *et al.* Prognostic significance of ETP phenotype and minimal residual disease in T-ALL: a Children's Oncology Group study. *Blood* **142**, 2069–2078 (2023).
10. Swerdlow, S. H. *et al.* The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms. *Blood* **127**, 2375–90 (2016).
11. Veltroni, M. *et al.* Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. *Haematologica* **88**, 1245–52 (2003).
12. Kowarsch, F. *et al.* FCM marker importance for MRD assessment in T-cell acute lymphoblastic leukemia: An AIEOP-BFM-ALL-FLOW study group report. *Cytometry A* **105**, 24–35 (2024).
13. Hrusák, O. & Porwit-MacDonald, A. Antigen expression patterns reflecting genotype of acute leukemias. *Leukemia* **16**, 1233–58 (2002).
14. Zangrando, A., Intini, F., te Kronnie, G. & Basso, G. Validation of NG2 antigen in identifying BP-ALL patients with MLL rearrangements using qualitative and quantitative flow cytometry: a prospective study. *Leukemia* **22**, 858–61 (2008).
15. Palmi, C. *et al.* CRLF2 over-expression is a poor prognostic marker in children with high risk T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget* **7**, 59260–59272 (2016).
16. Meyer, L. K. *et al.* CRLF2 rearrangement in Ph-like acute lymphoblastic leukemia predicts relative glucocorticoid resistance that is overcome with MEK or Akt inhibition. *PLoS One* **14**, e0220026 (2019).
17. Bornhauser, B. *et al.* The hematopoietic stem cell marker VNN2 is associated with chemoresistance in pediatric B-cell precursor ALL. *Blood Adv* **4**, 4052–4064 (2020).
18. Borowitz, M. J. *et al.* Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood* **111**, 5477–85 (2008).
19. Basso, G. *et al.* Risk of Relapse of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Is Predicted By Flow Cytometric Measurement of Residual Disease on Day 15 Bone Marrow. *Journal of Clinical Oncology* **27**, (2009).
20. Buchmann, S. *et al.* Remission, treatment failure, and relapse in pediatric ALL: an international consensus of the Ponte-di-Legno Consortium. *Blood* **139**, 1785–1793 (2022).
21. Dworzak, M. N. *et al.* Modulation of antigen expression in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia during induction therapy is partly transient: evidence for a drug-induced regulatory phenomenon. Results of the AIEOP-BFM-ALL-FLOW-MRD-Study Group. *Cytometry B Clin Cytom* **78**, 147–53 (2010).
22. Mejstriková, E. *et al.* CD19-negative relapse of pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia following blinatumomab treatment. *Blood Cancer J* **7**, 659 (2017).
23. Gardner, R. *et al.* Acquisition of a CD19-negative myeloid phenotype allows immune escape of MLL-rearranged B-ALL from CD19 CAR-T-cell therapy. *Blood* **127**, 2406–10 (2016).
24. Buldini, B. *et al.* CD72 is a pan-tumor antigen associated to pediatric acute leukemia. *Cytometry A* **103**, 1004–1009 (2023).
25. Buldini, B. *et al.* CD371-positive pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia: propensity to lineage switch and slow early response to treatment. *Blood* **143**, 1738–1751 (2024).
26. Dworzak, M. N. *et al.* Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible. *Cytometry B Clin Cytom* **74B**, (2008).
27. Kalina, T. *et al.* EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia* **26**, 1986–2010 (2012).
28. Maurer-Granofszky, M. *et al.* An Extensive Quality Control and Quality Assurance (QC/QA) Program Significantly Improves Inter-Laboratory Concordance Rates of Flow-Cytometric Minimal Residual Disease Assessment in Acute Lymphoblastic Leukemia: An I-BFM-FLOW-Network Report. *Cancers (Basel)* **13**, 6148 (2021).

Caratterizzazione Immunofenotipica di Sottopopolazioni Eterogenee di Cellule Staminali che Coesistono in Singoli Casi di Glioblastoma Multifforme

Elena Casanova

Laboratorio di Ricerca sulle Cellule Staminali del Cancro, Istituto di Candiolo, FPO-IRCCS, Candiolo

e-mail:elena.casanova@ircc.it

Introduction: Glioblastoma multifforme (GBM) is an extremely aggressive brain tumor, characterized by remarkable intratumoral genetic and phenotypic heterogeneity. Several studies have shown that GBM cells are hierarchically organized, with a subpopulation of cancer stem cells (GSCs) at the apex, responsible for tumor initiation, progression, resistance to conventional therapies and recurrence. GSCs are typically isolated from patient biopsies using a culture technique that produces “neurospheres” (NS) in serum-free medium supplemented with EGF and FGF2. The current methodology mostly relies on tissue samples of limited size, which may not fully capture the entire range of GBM heterogeneity (including subclones with different RTK expressions that can be located in separate GBM regions). Moreover, standard culture conditions may select for a limited number of subclones that have the highest fitness under those conditions, potentially leading to an incomplete picture of the multiple subclones composing the tumor. We developed a new methodology for GSC isolation aimed at better capturing GBM heterogeneity.

Material and Methods: We collected a cohort of human GBMs surgically removed as ultrasonic aspirates (UA; n=31), virtually allowing the recovery of the entire tumor mass. We identified UA GBM cells (by discriminating the CD45^{neg}/CD56^{pos} population of cells of neuroendocrine origin from residual CD45^{pos} leukocytes), and we established multiple parallel cultures of NS (“NS families”) by applying different positive selective pressures, represented by different cocktails of growth factors (EFG, FGF2, PDGFB, and HGF). Four representative NS families were characterized by transcriptional profiling and by flow-cytometry for expression of Receptor Tyrosine Kinase (RTK) and markers associated with different transcriptional profiles.

Results and Discussions: Starting from 31 patients, we derived 19 different GSC families, defining “family” the set of NS derived from a single GBM, and “family member” each NS culture belonging to the same family. Within each family, the members, although sharing the same driver genetic lesions are highly transcriptionally and biologically heterogeneous. Interestingly, we observed that features coexisting in original GBMs, such as concomitant expression of multiple RTKs, were segregated in different GSC family members, in association with different GBM transcriptional profiles and biological properties.

Conclusion: We designed a new methodology to derive multiple GSCs from single GBMs, each segregating distinctive molecular and biological aspects coexisting in the original tumor. RTK expression is consistently associated with different GBM molecular subtypes.

Tra più di 100 diverse neoplasie del sistema nervoso centrale (Louis D.N., 2021), il glioblastoma (GBM) è la forma più aggressiva e comune di tumore al cervello nell’adulto. E’ caratterizzato da una scarsa sopravvivenza (Ohgaki H., 2005), da un’eterogeneità tumorale notevolmente elevata (Patel A.P., 2014; Nefitel C., 2019; Nicholson J.G., 2021) e dalla mancanza di terapie efficaci (Zong H., 2012). Diversi studi hanno dimostrato che le cellule del GBM sono organizzate in modo gerarchico, con una sottopopolazione di cellule staminali tumorali (GSCs) all’apice, in grado di auto-rinnovarsi e dare origine a una progenie pseudo-differenziata (Singh S.K., 2003; Galli R., 2004). L’interesse suscitato dalle GSCs e la focalizzazione delle ricerche sulla loro caratterizzazione derivano dal fatto che esse sono ritenute essere verosimilmente responsabili dell’inizio, della progressione e della resistenza alle terapie convenzionali, favorendo l’emergere della recidiva (fig.1).

La citometria svolge un ruolo essenziale per l’identificazione delle GSCs, conducendo al tempo stesso a una migliore comprensione della biologia del tumore, al fine di sviluppare nuove terapie mirate. Le GSCs possono essere isolate mediante l’applicazione di due differenti approcci. Nel primo caso, le cellule staminali tumorali

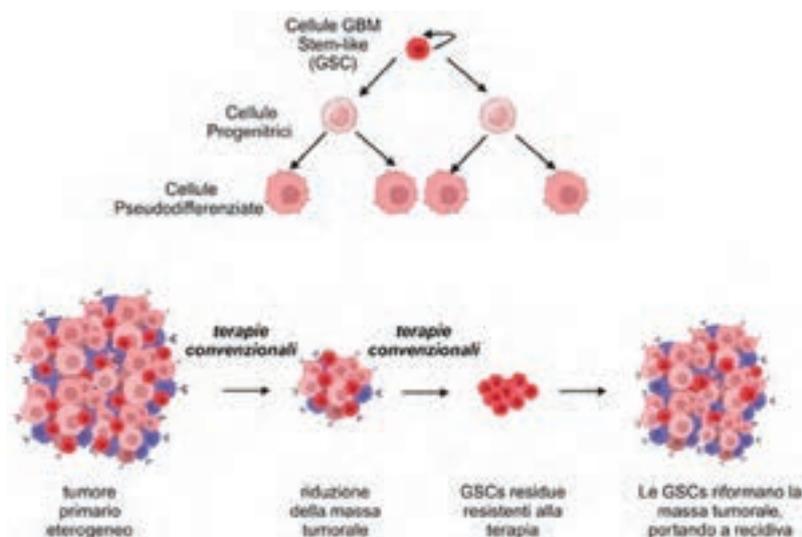


Figura 1. Le cellule del GBM sono organizzate gerarchicamente, con una sottopopolazione di cellule all’apice, in grado di auto-rinnovarsi e di dare origine a una progenie pseudo-differenziata. La somma di queste popolazioni forma la massa tumorale. Le terapie antitumorali convenzionali sono efficaci nel ridurre la massa tumorale, ma molto spesso una parte della sottopopolazione di GSCs sopravvive alle terapie e conduce infine alla recidiva del tumore. [Figura creata con Biorender.com]

vengono isolate mediante cell sorting, scegliendo specifici marcatori di superficie. Questa metodologia è stata spesso scelta in passato, soprattutto utilizzando la preferenziale espressione del CD133 sulla superficie delle cellule staminali tumorali rispetto alle cellule differenziate (Singh S.K., 2003; Brescia P., 2013; Lathia J.D., 2011; Zeppernick F., 2008; Pallini R., 2011). Sebbene questa tecnica si sia dimostrata estremamente efficace nelle neoplasie ematologiche, studi successivi hanno mostrato che la stessa non è altrettanto utile nei tumori solidi, compreso il GBM: è stato infatti dimostrato che anche le cellule che non esprimono il CD133, né talvolta altri marcatori di sottopopolazioni staminali, possono presentare le caratteristiche di staminalità (Beier D., 2007; Clément V., 2009; Lottaz C., 2010; Chen R., 2010; Beier C.P., 2011). Il secondo approccio prevede invece la messa in coltura di tutta la risospensione cellulare ottenuta dalla dissociazione del reperto chirurgico: la sottopopolazione staminale tumorale risulta selezionata dalle condizioni di coltura, in particolare dall'assenza di adesione e di siero e dalla sola presenza di EGF ed FGF2, condizioni permissive per le cellule staminali, dotate di capacità di autorinnovamento, ma non per le cellule stromali e differenziate (Galli R., 2004).

E' però necessario tenere presente che il campione chirurgico di partenza è di dimensioni limitate, e probabilmente non rappresenta completamente l'intera gamma di eterogeneità genetica e fenotipica intratumorale del GBM, descritta soprattutto a livello dei recettori tirosin chinasi (RTKs), i quali sembrano distribuirsi in regioni separate del tumore (Snuderl M., 2011; Szerlip N.J., 2012). Inoltre, le condizioni di coltura standard riescono a selezionare solo i sottocloni di GSC che si adeguano a

quelle condizioni, isolando potenzialmente un quadro incompleto dei molteplici sottocloni che compongono il tumore. Pertanto, nel nostro laboratorio abbiamo deciso di modificare il protocollo di derivazione, partendo da tumori rimossi mediante aspiratore ultrasonico, in modo da raccogliere la maggior parte delle cellule tumorali, e introducendo nuovi fattori di crescita, al fine di favorire la selezione dei diversi sottocloni di GSCs (fig.2).

Una volta ottenute colture multiple da uno stesso tumore di partenza, la loro caratterizzazione fenotipica diventa essenziale per l'identificazione dei diversi sottotipi cellulari inizialmente coesistenti nel tumore e separati dalle condizioni di coltura. In questo, la citometria è di fondamentale importanza perché permette di analizzare l'espressione di specifici marcatori molecolari associati a profili trascrizionali diversi e a fenotipi più o meno aggressivi, i quali potrebbero presentare una diversa risposta ai trattamenti standard favorendo la recidiva.

Raccolta dei campioni. Tenendo in considerazione l'alto grado di eterogeneità intratumorale, abbiamo raccolto una coorte di GBM umani (n=31) rimossi chirurgicamente come aspirati ultrasonici (UA), preferendoli a reperti biotici in quanto consentono virtualmente il recupero dell'intera massa tumorale, salvaguardandone l'eterogeneità intrinseca (Snuderl M., 2011; Kim H., 2020). I frammenti di tessuto tumorale e il mezzo di sospensione ottenuti sono stati centrifugati a 270g al fine di concentrare il campione, che è stato quindi sottoposto a lisi eritrocitaria in tampone ACK, composto da cloruro di ammonio (150 mM), bicarbonato di potassio (10 mM) e sale bisodico di EDTA (0.1 mM) in acqua distillata.

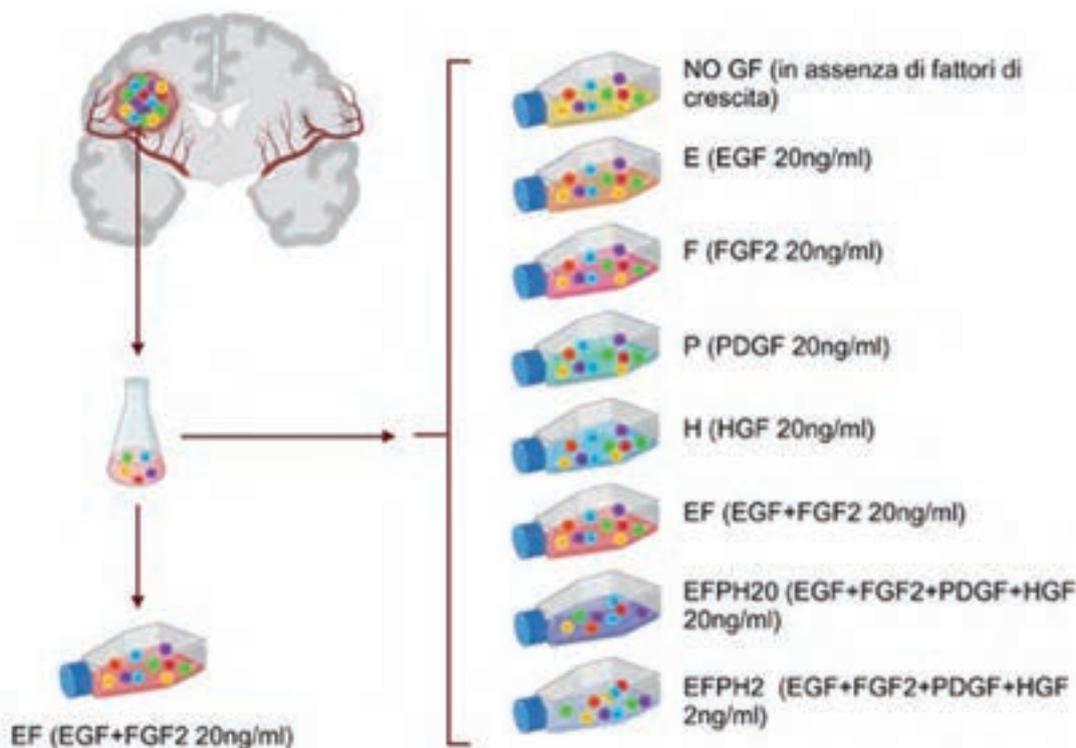


Figura 2. La procedura standard prevede la selezione in condizioni di bassa adesione e in un terreno privo di siero e fornito di EGF e FGF2. Tuttavia, il GBM presenta una vasta eterogeneità genetica, principalmente a livello di recettori tirosin chinasi. Arricchendo il terreno di coltura con diversi fattori di crescita, è favorita la selezione di differenti sottocloni staminali (GSCs) presenti nel tumore di partenza. [Figura creata con Biorender.com]

Dopo un'incubazione a +4 °C per 10 minuti, il campione è stato lavato, dissociato dapprima enzimaticamente in collagenasi, e quindi meccanicamente con aghi 18G. Infine è stato sottoposto a successive filtrazioni, utilizzando filtri di dimensioni gradualmente ridotte (100 µm-70 µm) (De Bacco, Cell Rep. 2023; De Bacco, STAR Prot. 2023).

Verifica del quantitativo di cellule tumorali ottenute.

Dopo una prima conta cellulare in vitale in camera di Burkner, è importante determinare la percentuale e la vitalità delle GSCs appena ottenute, valutando, mediante citometria a flusso, il fenotipo di una porzione di risospensione cellulare. Questo dato è essenziale per normalizzare le successive analisi di caratterizzazione del campione di partenza, dal momento che diventa mandatorio conoscere la quantità di cellule tumorali iniziali presenti nella risospensione cellulare. Per ottenere un'analisi attendibile, è consigliabile utilizzare una concentrazione non inferiore a 2×10^5 cellule per ogni tubo, risospese in 100 µl di PBS 1X arricchito con 1% di BSA, che evita il legame aspecifico dell'anticorpo attraverso i recettori Fc. Le cellule di origine tumorale neuroendocrina possono essere discriminate come popolazione $CD45^{neg}/CD56^{pos}$ dalle cellule residue di derivazione ematica (considerando i leucociti $CD45^{pos}/CD56^{neg}$ e le cellule Natural Killer $CD45^{pos}/CD56^{pos}$). La scelta di questi marcatori (CD45: marcatore pan-leucocitario; CD56: molecola di adesione delle cellule neurali) è stata validata dall'analisi fenotipica svolta in un gruppo di linee cellulari immortalizzate, tra cui tumori epiteliali (carcinoma polmonare: EBC-1; carcinoma ovarico:

A2780), tumori neuroectodermici (GBM: SNB19, U87MG e U251; melanoma: UACC257), e linee cellulari astrocitarie umane normali (NHA e SVGp12). Come si osserva in figura 3, il CD56 riconosce praticamente il 100% dei GBM umani (e le cellule di melanoma), essendo molto espresso in tumori di origine neuroectodermica, mentre non è rilevabile negli altri tipi di tumori solidi né nelle linee neurali normali, garantendo l'effettivo riconoscimento delle cellule di GBM all'interno della risospensione cellulare iniziale.

Le cellule della risospensione cellulare iniziale sono quindi state incubate per 20 minuti al buio con gli anticorpi anti-CD45 (CD45 FITC, clone ALB12, # IM0647, Beckman Coulter) e anti-CD56 (CD56 PE-Cy7, clone N901-NKH-1, #A21692, Beckman Coulter), accuratamente titolati per questa concentrazione cellulare. Per favorire una colorazione omogenea del campione, l'incubazione è stata svolta su una piattaforma basculante, al fine di evitare la precipitazione delle cellule tumorali, più pesanti, e la formazione di aggregati tra cellule naturalmente più vischiose. Tutta la procedura è avvenuta a temperatura ambiente, in considerazione del fatto che era stato precedentemente osservato che le cellule di GBM perdono in vitalità quando sottoposte a incubazioni svolte a basse temperature; avevamo peraltro verificato con prove ripetute che tempi ridotti di incubazione degli anticorpi abbattano il rischio di colorazioni aspecifiche. È stato previsto un controllo negativo, costituito da sole cellule non colorate, per determinare il livello di autofluorescenza delle cellule tumorali e per impostare in modo appropriato la gating strategy. Si è provveduto ad allestire una singola incubazione per ogni anticorpo, al

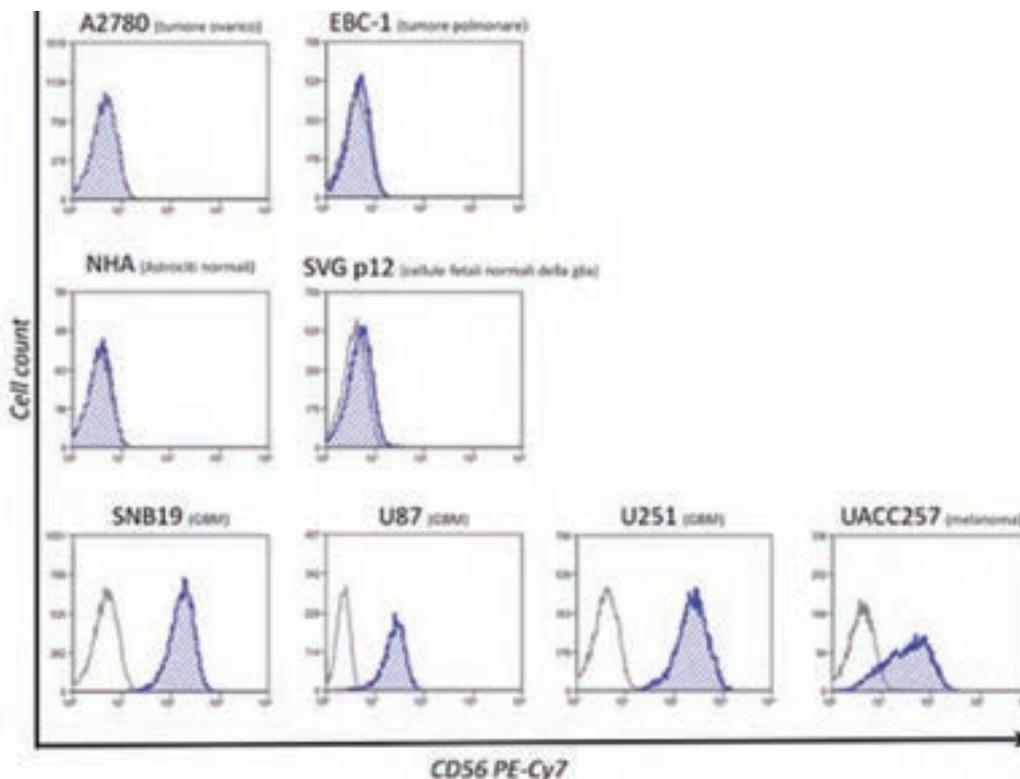


Figura 3. L'analisi tramite citometria a flusso dell'espressione del CD56 su diverse linee cellulari immortalizzate indica che il CD56 è ampiamente espresso, approssimativamente al 100%, nelle cellule di GBM come SNB19, U87MG e U251 (e sulle cellule di melanoma UACC257, essendo anche loro di origine neuroectodermica). Al contrario, non è rilevabile su altre linee tumorali come il carcinoma polmonare EBC-1 e il carcinoma ovarico A2780. Inoltre, non viene rilevato su linee cellulari umane normali di astrociti come NHA e SVG.

fine di rilevare il livello di spillover di ciascun fluoroforo (secondo il metodo “Fluorescence Minus One”, FMO). Infine, tramite la doppia colorazione, abbiamo potuto distinguere la popolazione tumorale CD45^{neg}/CD56^{pos} (fig.4). Onde evitare artefatti, eventuali eccessi di anticorpo sono stati lavati in PBS 1X al termine dell’incubazione. Al fine di escludere dall’analisi le cellule morte, il campione è stato risospeso in una soluzione DAPI 0,2X (in PBS 1X), per rilevare la popolazione vitale (DAPI^{neg}). Prima dell’acquisizione al citofluorimetro, eventuali aggregati sono stati eliminati tramite passaggio in filtro da 50 µm.

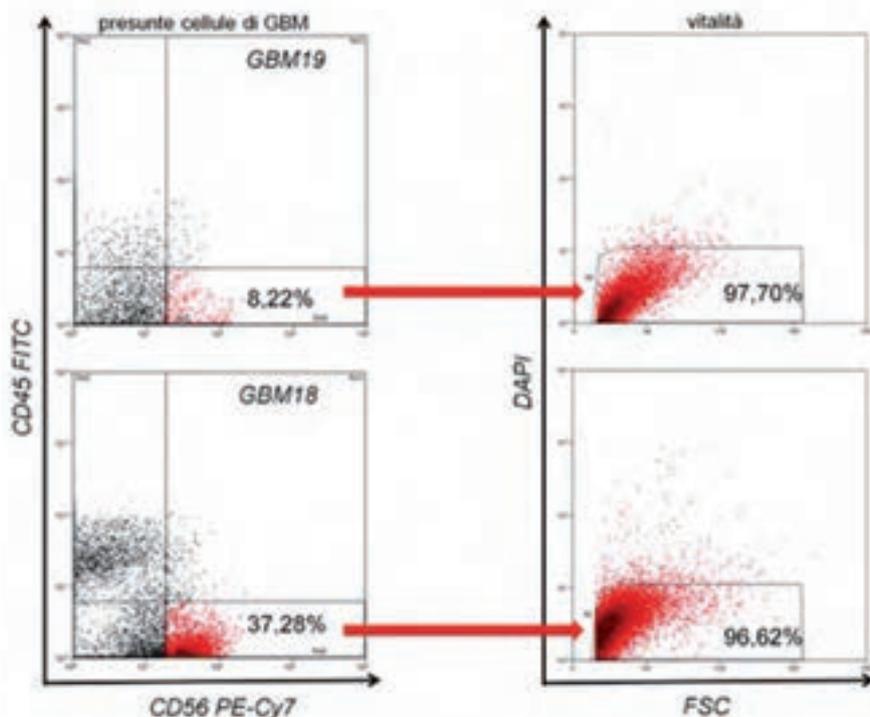


Figura 4. Citometria a flusso di due campioni di aspirati ultrasonici rappresentativi (GBM19, bassa cellularità e alta vitalità; GBM18, alta cellularità e vitalità). Sono riportate le percentuali di cellule GBM totali CD45^{neg}/CD56^{pos} (a sinistra) e di cellule GBM vitali CD45^{neg}/CD56^{pos} (a destra: colorazione DAPI^{neg} delle cellule vitali). Le cellule CD45^{pos} corrispondono ai leucociti e, tra queste, le cellule CD45^{pos}/CD56^{pos} corrispondono ai linfociti Natural Killer.

Culture cellulari selettive. Le cellule ottenute dai campioni freschi sono state immediatamente coltivate in fiasche da 75cm² a basso livello di aderenza, utilizzando terreno di coltura DMEM/F12 arricchito con eparina (2 µg/ml) e B-27, senza l’aggiunta di siero. In questo modo, sono state identificate e selezionate le cellule che mostravano caratteristiche più verosimilmente staminali, le quali crescono in sospensione sotto forma di neurosfere (NS) (Galli R., 2004). Come pressioni selettive, sono stati impiegati i fattori di crescita EGF, FGF2, PDGFB e HGF, sia singolarmente (condizioni E, F, P, H) che in diverse combinazioni (EF, EFPH20, EFPH2). Questi fattori di crescita, che supportano la proliferazione e la propagazione a lungo termine delle GSCs, sono fortemente espressi nel microambiente del GBM, e i corrispondenti RTKs sono espressi in modo mutualmente esclusivo nei tumori e nelle GSCs. La concentrazione standard dei fattori nel terreno di coltura è stata di 20 ng/ml quando utilizzati singolarmente o nelle combinazioni EF ed EFPH20. Nella condizione EFPH2, è stata utilizzata una concentrazione ridotta (2 ng/ml) di ciascun fattore per evitare la controselezione dell’amplificazione di EGFR e PDGFRA, fenomeno osservato nelle NS convenzionali

(De Bacco, 2012). In considerazione della capacità delle cellule staminali tumorali altamente aggressive di essere selezionate anche in assenza completa di fattori di crescita, è stato impiegato anche un terreno privo di fattori di crescita (NO GF) (De Bacco, Cell Rep. 2023; De Bacco, STAR Prot. 2023). Il tempo di derivazione è altamente variabile tra le famiglie di GSCs. Si prevede che i membri della famiglia selezionati dai mezzi più ricchi (EF o EFPH20) si stabiliscano entro 6 mesi; i membri selezionati dagli altri mezzi potrebbero richiedere tempi più lunghi (De Bacco, STAR Prot. 2023).

Caratterizzazione immunofenotipica delle cellule staminali isolate. Abbiamo osservato che, a causa dell’uso della collagenasi in fase di dissociazione della risospensione tumorale iniziale, è impossibile rilevare tutti gli epitopi presenti sulle membrane cellulari immediatamente dopo la messa in coltura. Tuttavia, pochi giorni dopo la messa in coltura, quando ancora la selezione indotta dalle condizioni colturali non è cominciata, è possibile effettuare un fenotipo completo delle cellule mediante citometria a flusso. Allo scopo, le NS sono state raccolte mediante centrifugazione a 150g per 5 minuti, quindi sono state disgregate meccanicamente mediante l’uso di una pipetta elettronica. La dissociazione enzimatica in tripsina/EDTA è stata quanto più possibile evitata, al fine di ridurre il rischio di perdita di epitopi di superficie. Dopo aver verificato al microscopio l’effettiva dissociazione delle NS a singola cellula ed aver proceduto alla conta vitale, le cellule sono state risospese, come in precedenza, in concentrazione pari a 2x10⁶ cell/ml in PBS 1X arricchito con 1% di BSA, e incubate con gli anticorpi prescelti per 20 minuti, al riparo dalla luce, a temperatura ambiente e su piattaforma basculante. Nuovamente, le cellule morte sono state escluse median-

Marker	Antigene	Clone	Clonalità	Isotipo	Coniugazione	Company	Diluizione
Pan-leucocitario	CD45	HI30	Ms mAb	IgG1	FITC	BeckmanCoulter	1:20
Cellule neurali	CD56	N901	Ms mAb	IgG1	PE-Cy7	BeckmanCoulter	1:20
Cellule staminali	CD133/2	293C3	Ms mAb	IgG2b	APC	Miltenyi	1:20
	Notch-1	527425	Ms mAb	IgG1	APC	R&D	1:20
	CD271	ME20.4-1-H4	Ms mAb	IgG1	PE-Cy7	Immunological Sciences	1:50
	Vimentina	RV202	Ms mAb	IgG1	AlexaFluor488	Santa Cruz	1:25
	Nestina	196/908	Ms mAb	IgG1	APC	R&D	1:20
	Sox-2	245610	Ms mAb	IgG2a	APC	R&D	1:10
	CD15	MC-480	Ms mAb	IgM	PE	R&D	1:20
	ABCG2	5D3	Ms mAb	IgG2b	FITC	Biolegend	1:20
	Bmi-1	384515	Ms mAb	IgG2a	PE	R&D	1:10
	CD44	MEM261	Ms mAb	IgG1	FITC	Immunological Sciences	1:20
	Nanog		Gt poAb		PE	R&D	1:10
Olig-2	21111.1	Ms mAb	IgG2a	AlexaFluor488	Merck	1:20	
Recettori Tirocina chinasi	EGFR	AF13	Ms mAb	IgG1	AlexaFluor488	Biolegend	1:20
	PDGFRa	PRa292	Ms mAb	IgG1	PE	Biolegend	1:20
	PDGFRb	PR7212	Ms mAb	IgG1	APC	Biolegend	1:20
	HGF R/c-MET	95106	Ms mAb	IgG1	PE-Cy7	R&D	1:100
	erbB2	24D2	Ms mAb	IgG1	FITC	Biolegend	1:20
	erbB3	184C3	Ms mAb	IgG2a	PE/APC	Miltenyi	1:20
	erbB4	182818	Ms mAb	IgG2a	PE	R&D	1:20
	FGFR1		Rb poAb		PE-Cy7	Immunological Sciences	1:100
	FGFR2	98725	Ms mAb	IgG1	APC	R&D	1:20
	FGFR3	136334	Ms mAb	IgG1	FITC/APC	R&D	1:20
FGFR4	240929	Rt mAb	IgG2a	PE/APC	Miltenyi/R&D	1:20	
Differenziazione	O4	O4	Ms mAb	IgM	AlexaFluor488	Merck	1:20
	MBP		Rb poAb		PE	Merck	1:20
	Sox-10	Sox10/991	Ms mAb	IgG2b	APC	Novus	1:20
	GFAP		Gt poAb		PE	Miltenyi	1:20
	β-III Tubulin	Tuj-1	Ms mAb	IgG2a	AlexaFluor488	BD	1:20
CD24	SN3	Ms mAb	IgG1	FITC	Immunological Sciences	1:20	

Tabella 1. Selezione degli anticorpi per l'immunofenotipizzazione dei campioni, utilizzati nella diluizione indicata, raccomandata per 2×10^5 cellule in 100 ml totali. Vimentina, Nestina, Sox-2, Oct-4, Bmi-1, Olig-2, O4, MBP, Sox-10, GFAP, beta-III Tubulin (Tuj-1) richiedono sempre una colorazione intracellulare. Ms: Mouse; Gt: Goat; Rb: Rabbit; Rt: Rat; mAb: anticorpo monoclonale; poAB: anticorpo policlonale.

te l'uso del DAPI. Per la rilevazione dei marcatori intracellulari, le cellule dissociate sono state innanzitutto incubate con LIVE/DEAD (ThermoFisher), in concentrazione pari a $1 \mu\text{l} / 1 \times 10^6$ cellule risospese in 1 ml PBS 1X, per discriminare la frazione vitale. Quindi i campioni sono stati fissati e permeabilizzati mediante l'uso di FIX & PERM[®] (ADG), secondo le istruzioni del produttore. Il pannello anticorpale è stato allestito includendo marcatori che caratterizzano le GSCs (CD133/2, CD44, CD15, Notch-1, CD271, Vimentina, Nestina, Sox-2, ABCG2) e la loro capacità di autorinnovamento (Oct-4, Bmi-1), e marcatori che ne evidenziano lo pseudodifferenziamento (O4, MBP, Sox-10, GFAP, Tuj-1, CD24). E' stata poi considerata l'espressione di RTKs genericamente coinvolti nella proliferazione e sopravvivenza delle GSCs (famiglia ErbB, PDGFRA, PDGFRB, MET, FGFRs); questi ultimi sono stati analizzati avendo osservato in NS convenzionali e rappresentative di diversi GBM come siano spesso mutualmente esclusivi e quindi adatti all'identificazione di popolazioni distinte all'interno di uno stesso tumore (fig.5; De Bacco Cell Rep. 2023).

In tabella 1 sono riportati gli anticorpi utilizzati nelle diluizioni indicate. Queste prove sono state ripetute nel

tempo, verificando il mantenimento del fenotipo espresso nel corso di successivi passaggi. Oltre al consueto controllo negativo, costituito da cellule non incubate con anticorpi, per l'analisi multiparametrica sono stati allestiti i controlli di FMO. L'acquisizione del campione è stata eseguita, previa filtrazione con filtri Filcons ($50 \mu\text{m}$, BD Biosciences), su un CyAn ADP (Beckman Coulter) dotato di laser a stato solido 488 nM, 405 nM e 642 nM. I dati sono stati raccolti ed elaborati tramite il software Summit 4.3 (Beckman Coulter), applicando le matrici di compensazione disponibili, compreso l'algoritmo di scalatura VisiComp per evitare errori di overcompensazione.

Risultati e discussioni. Partendo da GBM raccolti mediante aspirato ultrasonico, abbiamo applicato le diverse pressioni selettive descritte in precedenza (diversi cocktails di fattori di crescita) ottenendo colture multiple parallele di NS. Non tutte le condizioni utilizzate ci hanno permesso di ottenere una coltura soddisfacente dal punto di vista qualitativo e quantitativo. I terreni contenenti i fattori di derivazione standard EGF e FGF2 a 20 ng/ml (EF e EFP20) hanno mostrato un tasso di derivazione comparabile e pari a $\sim 61\%$. I terreni contenenti EGF o FGF2 da soli o i quattro fattori di crescita selezionati a una concen-

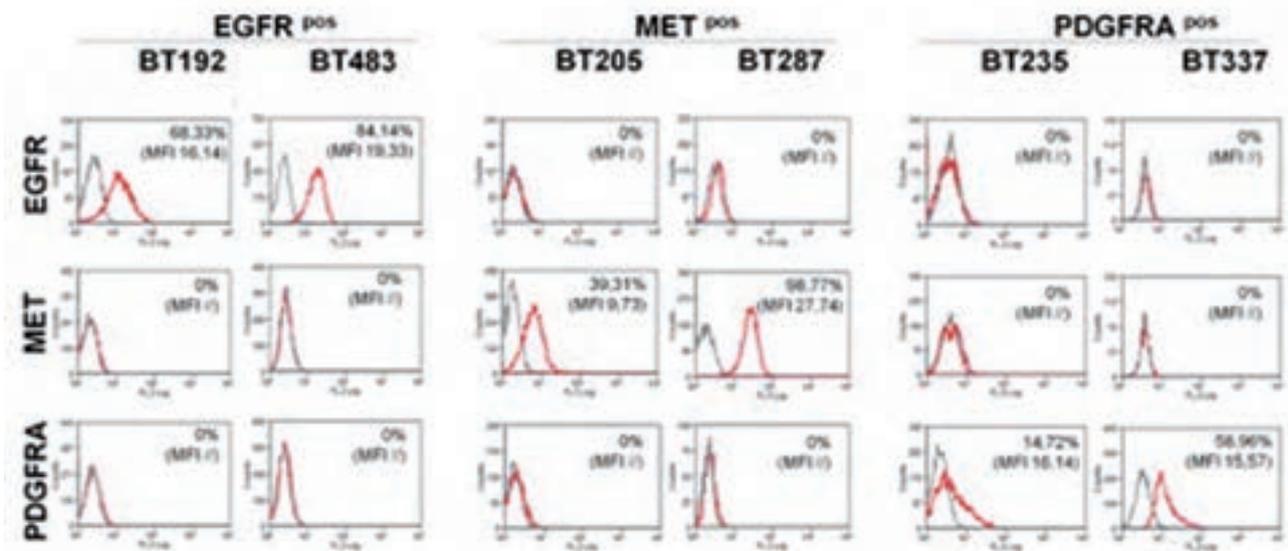


Figura 5. L'espressione degli RTKs EGFR (comunemente associata al fenotipo classico del GBM), PDGFRA (associata al fenotipo proneurale) e MET (associata al fenotipo mesenchimale) evidenzia la variabilità intertumorale delle GSCs nelle NS derivate da pazienti diversi, sebbene coltivate nelle stesse condizioni e nello stesso terreno di coltura (EF).

trazione inferiore (EFPH2) hanno avuto un tasso di derivazione ridotto (~48%), ma sono risultati importanti per preservare amplificazioni geniche e profili trascrizionali eterogenei (De Bacco, Cell Rep. 2023). Infine, i terreni privi di EGF e FGF2 (NO GF, H e P) hanno mostrato un tasso di derivazione significativamente ridotto (~13%), ma si sono dimostrati utili per selezionare le GSCs più aggressive (De Bacco, Cell Rep. 2023).

Da 31 GBM processati, abbiamo ottenuto 19 diverse famiglie di GSCs, definendo «famiglia» l'insieme di NS derivate da un singolo GBM e «membro della famiglia» ogni coltura di NS appartenente alla stessa famiglia (De Bacco, Cell Rep. 2023). All'interno di ogni famiglia, i membri sono risultati condividere le stesse lesioni genetiche principali, con evidente eterogeneità solo a livello delle amplificazioni. Ciononostante, sono risultati eterogenei dal punto di vista trascrizionale, soprattutto quan-

do stratificati in classico, mesenchimale e proneurale tramite il classificatore attualmente in uso (Wang Q., 2018). È interessante notare che questa eterogeneità trascrizionale si è poi riflessa anche in una significativa eterogeneità biologica (De Bacco Cell Rep. 2023).

Mediante la citometria a flusso, quattro famiglie rappresentative di eterogeneità genetica, fenotipica e biologica sono state caratterizzate per l'espressione di marcatori di staminalità e marcatori associati ai diversi profili trascrizionali, e per l'espressione dei diversi RTKs (De Bacco, Cell Rep. 2023, fig.6-7). Nonostante i dati biologici abbiano mostrato simili proprietà staminali in tutti i membri derivanti da una stessa famiglia, i marcatori di staminalità più frequentemente usati, CD15, CD133 e CD44, sono risultati espressi in modo eterogeneo e correlabile alla classificazione secondo profilo trascrittomico (fig.6).

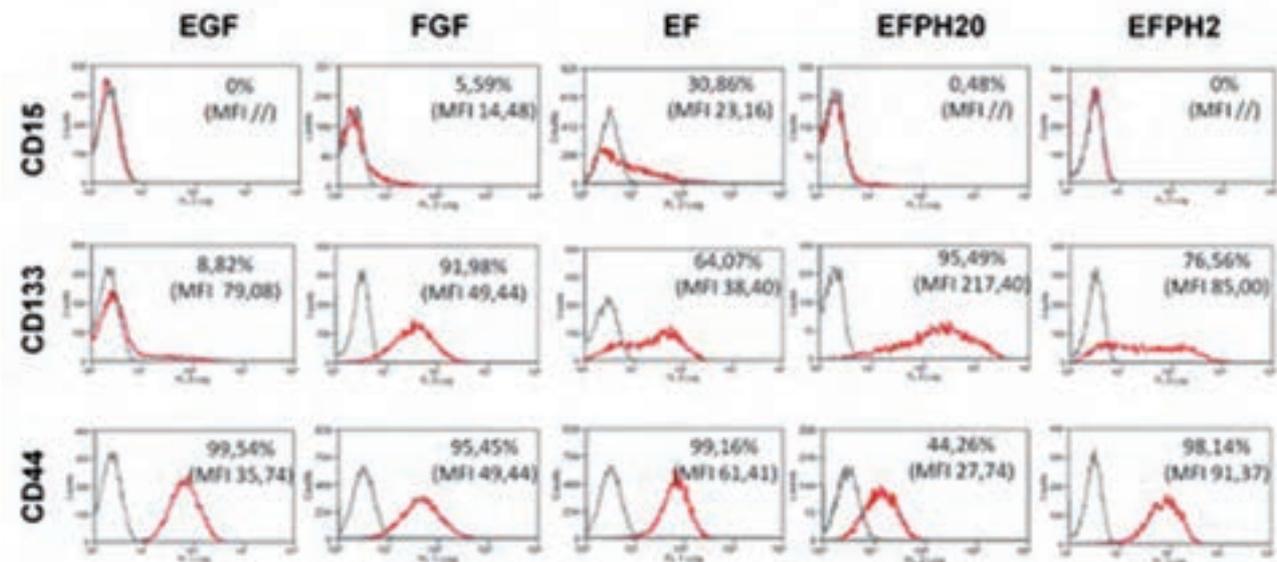


Figura 6. Sebbene le cellule derivino dallo stesso paziente, questo pannello citometrico evidenzia l'eterogeneità intratumorale quando si valuta la variabilità dell'espressione dei marcatori staminali in membri della stessa famiglia selezionati in diverse condizioni di coltura.

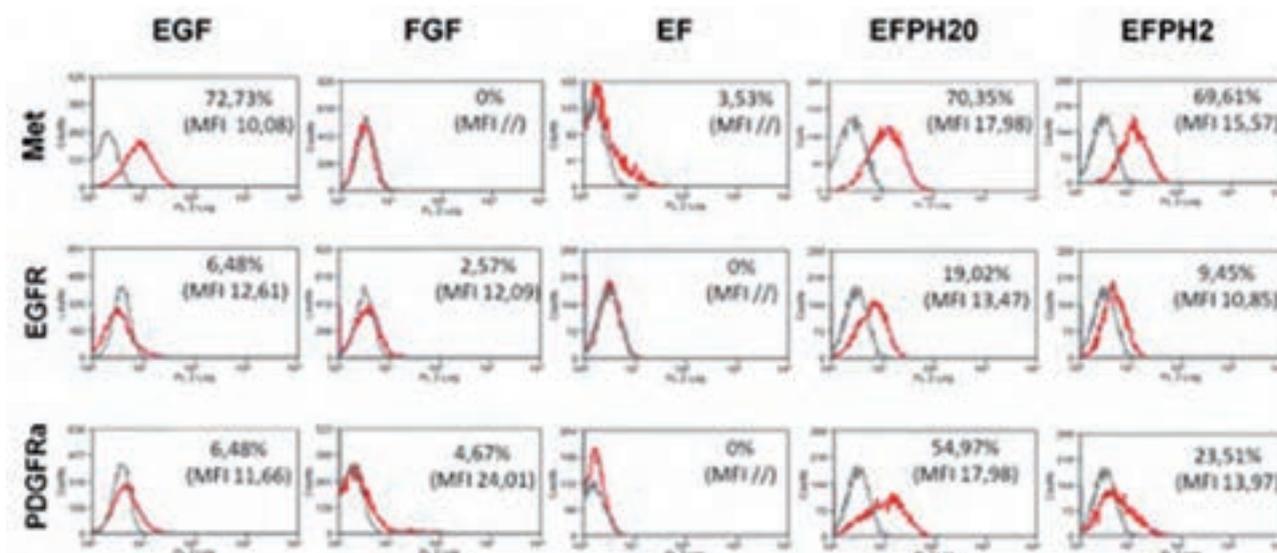


Figura 7. L'eterogeneità intratumorale è evidente anche nell'espressione dei recettori tirosin chinasi (RTKs), i quali sono legati ai differenti fenotipi tumorali: proneurale (PDGFRa), classico (EGFR) e mesenchimale (MET).

Di maggiore interesse, gli RTKs analizzati, in particolare EGFR, MET e PDGFRa, scelti perché più frequentemente alterati nel GBM, sono risultati coespressi nel tumore originario (De Bacco, Cell Rep. 2023), ma segregati in diversi membri della famiglia di GSCs, in base alle cellule prevalenti al momento della stabilizzazione (tendenza all'esclusione reciproca tra EGFR e MET: $p=0,7$, tra EGFR e PDGFR: $p=0,4$; tendenza alla co-occorrenza tra MET e PDGFR: $p=0,1$) (fig.7).

Questi dati hanno permesso di concludere che gli aspetti eterogenei coesistenti nei tessuti di GBM sono singolarmente ricapitolati da distinti sottogruppi di GSCs, grazie a pressioni selettive differenziali esercitate su marcatori funzionali critici, in primis proprio gli RTKs. Questi sono stati e sono ancora oggi oggetto di innumerevoli studi in quanto possibili bersagli di farmaci mirati, per cui la loro distribuzione nei diversi sottocloni di GSCs diventa rilevante per il corretto disegno di possibili terapie sperimentali.

Conclusioni. Sebbene ulteriori studi siano necessari per approfondire la comprensione dei meccanismi molecolari legati all'eterogeneità del GBM, l'uso di modelli *in vitro* come le GSC derivate da singoli tumori offre un prezioso strumento per perseguire questo obiettivo e per sviluppare nuove strategie terapeutiche per migliorare l'esito clinico dei pazienti affetti da questa malattia. Tuttavia, i protocolli convenzionali di derivazione delle GSC non riescono a preservare la loro eterogeneità. Il prelievo eseguito in UA ci ha fornito un campione maggiormente rappresentativo dal punto di vista dell'eterogeneità intratumorale in partenza, oltre ad aver consentito una migliore conservazione della vitalità cellulare, sia durante l'espianto sia durante le successive procedure per la messa in coltura. In questo modo abbiamo ottenuto un tasso di derivazione di circa il 60%, superiore a quello ottenuto con il protocollo standard da singola biopsia (Galli, 2004). Abbiamo quindi sviluppato una nuova metodologia al fine di derivare GSC multiple da singoli GBM, ciascuna delle quali segrega aspetti molecolari e biologici distintivi che coesistono nel tumore ori-

ginale. La derivazione di GSC multiple da singoli campioni di tumore cerebrale apre la strada alla ricerca di terapie personalizzate: dall'analisi citometrica fenotipica, infatti, l'espressione di RTK è risultata coerentemente associata a diversi sottotipi molecolari di GBM. Questi risultati aprono la strada allo sviluppo di terapie mirate specificamente contro i sottotipi di tumore più comuni e aggressivi: la capacità di derivare GSC multiple e di caratterizzare i loro profili molecolari offre una prospettiva promettente per la medicina personalizzata nel trattamento del GBM, conducendo alla selezione di terapie più efficaci in base alle caratteristiche molecolari specifiche di ciascun paziente.

Bibliografia

1. Beier C.P., Beier D., CD133 negative cancer stem cells in glioblastoma. *Front. Biosci.* 3(2):701-710. (2011)
2. Beier D. et al., CD133⁺ and CD133⁻ Glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.* 67(9):4010-4015. (2007)
3. Brescia P. et al., CD133 is essential for Glioblastoma stem cell maintenance. *Stem Cells* 31:857-869. (2013)
4. Chen R. et al., A hierarchy of self-renewing tumor-initiating cell types in glioblastoma. *Cancer Cell* 17(4):362-375. (2010)
5. Clément V. et al., Limits of CD133 as a marker of glioma self-renewing cells. *Int. J. Cancer* 125(1):244-248. (2009)
6. De Bacco F. et al., Protocol for in vitro establishment of heterogeneous stem-like cultures derived from whole human glioblastoma tumors. *STAR Protocols* 4 (4) (2023)
7. De Bacco F. et al., Coexisting cancer stem cells with heterogeneous gene amplifications, transcriptional profiles and malignancy can be isolated from single glioblastomas. *Cell Rep.* 42(8):112816. (2023)
8. De Bacco, F. et al., The MET Oncogene Is a Functional Marker of a Glioblastoma Stem Cell Subtype. *Cancer Res* 72, 4537-4550. (2012)
9. Galli R. et al., Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.*, 64(19):7011-7021. (2004)
10. Kim H. et al., Extrachromosomal DNA is associated with oncogene amplification and poor outcome across multiple cancers. *Nat Genet* 52, 891-897. (2020)
11. Lathia J.D. et al., Distribution of CD133 reveals glioma stem cells self-renew through symmetric and asymmetric cell divisions. *Cell Death Dis.* 2, e200. (2011)
12. Lottaz C. et al., Transcriptional profiles of CD133⁺ and CD133⁻ glioblastoma-derived cancer stem cell lines suggest different cells of origin. *Cancer Res.* 70(5):2030-40. (2010)
13. Louis D.N. et al., The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol.* 23(8):1231-1251. (2021)

14. Neftel C. et al., An integrative model of cellular states, plasticity and genetics for Glioblastoma. *Cell* 178:835-49. (2019)
15. Nicholson J.G. et al., Diffuse Glioma heterogeneity and its therapeutic implications. *Cancer Discov.* 11:575-90. (2021)
16. Ohgaki H. et al., Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 64(6):479-489. (2005)
17. Pallini R. et al., Expression of the stem cell marker CD133 I recurrent Glioblastoma and its value for prognosis. *Cancer* 117(1):162-174. (2011)
18. Patel A.P. et al., Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 344 (6190):1396-1401. (2014)
19. Singh S.K. et al., Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63(18):5821-5828. (2003)
20. Snuderl M. et al., Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell.* 20(6):810-7. (2011)
21. Szerlip N.J. et al., Intratumoral heterogeneity of receptor tyrosine kinases EGFR and PDGFRA amplification in glioblastoma defines subpopulations with distinct growth factor response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (8):3041-6. (2012)
22. Wang Q., et al., Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell.* 32(1):42-56.e6 (2017)
23. Zeppernick F. et al., Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in Glioma patients. *Clin. Cancer Res.* 14(1):123-129. (2008)
24. Zong H. et al., The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 12(4):383-394. (2012)



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 2025
<http://www.citometriagic.it>

Cellule Tumorali e Microambiente Tumorale nel Linfoma di Hodgkin: un Gioco Pericoloso e allo Stesso Tempo Esaltanti Prospettive Terapeutiche

Giovanni D’Arena (1), Vincenzo Iorio (2), Marco Ciamarra (1), Filomena Cristiano (1), Giuseppina D’Andrea (1), Caterina Miccoli (1), Antonio Pagano (1), Carmela Palladino (1), Angelo Polito (1), Marianna Rizzo (1), Angela Tarasco (1), Luigi Rigacci (3)

1) U.O.S.D. Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, P.O. “San Luca”, ASL Salerno;

2) U.O. Anatomia Patologica, P.O. “San Luca”, ASL Salerno;

3) U.O.C. Ematologia e Trapianto Cellule Staminali, Università Campus Bio-Medico, Roma

e-mail: g.darena@aslsalerno.it

Il linfoma di Hodgkin (HL) è una neoplasia rara con una incidenza stimata di circa 3 casi per 100.000 individui per anno ed un caratteristico picco bimodale di distribuzione per quanto riguarda l’età di insorgenza, un primo tra i 20 e i 35 anni ed un secondo oltre i 55 anni. Più di un terzo dei pazienti, all’esordio di malattia, presenta non solo una linfoadenopatia indolente ma anche i cosiddetti sintomi B (febbre superiore a 38°C senza causa infettiva, sudorazioni profuse notturne, perdita di peso del 10% del peso corporeo negli ultimi sei mesi).

L’HL viene generalmente distinto in una forma classica (cHL), che costituisce circa il 95% dei casi, e una forma nodulare a predominanza linfocitaria (NLPHL), che ne rappresenta il rimanente 5%.

Una peculiarità unica del cHL è rappresentata dal fatto che le cellule neoplastiche, le cosiddette cellule di Hodgkin e Reed-Sternberg (HRS), che lo caratterizzano e ne consentono, in buona sostanza, la diagnosi, costituiscono dall’1% al 3% della popolazione cellulare totale e sono immerse in quello che viene definito microambiente tumorale le cui caratteristiche, tra l’altro, ne definiscono i vari sottotipi istologici: sclerosi nodulare (80% dei casi), cellularità mista (15%), ricco in linfociti e a deplezione linfocitaria (tutte e due circa il 5%) (Fig.1, Tab. 1)

Le cellule HRS hanno ampie dimensioni e citoplasma eosinofilo, sono in genere binucleate e macronucleolate, con aspetto caratteristico a “occhi di civetta”.

E’ ormai dimostrato che nel HL le cellule neoplastiche prendono origine dalle cellule B del centro germinativo. Esse esprimono sulla loro superficie il CD30 (Fig. 2), il CD40 e spesso il CD15 mentre generalmente sono negative per il CD45 e il CD20. Ci sono delle differenze significative tra il cHL e la forma nodulare a predominanza linfocitaria non solo per quel che riguarda l’ontogenesi ma anche per l’immunofenotipo, la morfologia, la composizione del microambiente tumorale e la presenta-

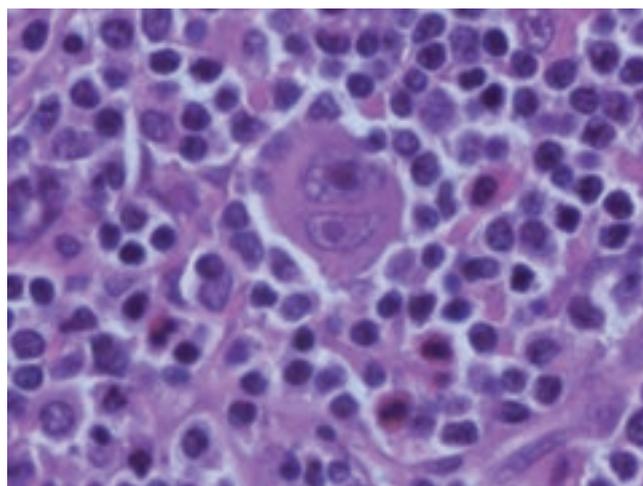


Fig. 1. Cellula di Hodgkin e Reed-Sternberg

Tab. 1

Classificazione WHO delle neoplasie ematolinfopoietiche (V edizione)

Proliferazioni B-cellulari e linfomi

Neoplasie dei linfociti B maturi
Linfoma di Hodgkin
Linfoma di Hodgkin Classico (cHL)
<i>Sclerosi nodulare</i>
<i>Cellularità mista</i>
<i>Ricco in linfociti</i>
<i>Deplezione linfocitaria</i>
Linfoma di Hodgkin nodulare a predominanza linfocitaria

zione clinica, tanto è vero che è molto dibattuto se quest'ultimo debba essere ridefinito come una entità a se stante: linfoma nodulare con predominanza dei linfociti B. Al contrario delle cellule neoplastiche del cHL, quelle del NLPHL esprimono il CD45, il CD20, il CD19 e il CD79a.

Il CD30 è un biomarker chiave nella diagnostica del linfoma di Hodgkin, evidenziando positività di membrana, seppure non esclusivamente, nelle cellule HRS e negli elementi cellulari pre-Sternberghiani.

In Tab. 2 è riportato l'immunofenotipo delle cellule di HRS nelle varie sottoclassi di HL.

In Tab. 3 sono schematizzate le caratteristiche morfologiche, immunofenotipiche e genotipiche delle cellule neoplastiche e di quelle del microambiente tumorale che aiutano nella diagnosi differenziale del cHL e NLPHL rispetto ad altre forme quali il linfoma a grandi cellule B ricco in linfociti T ed istiociti, il linfoma anaplastico a grandi cellule ed alcuni linfomi T periferici.

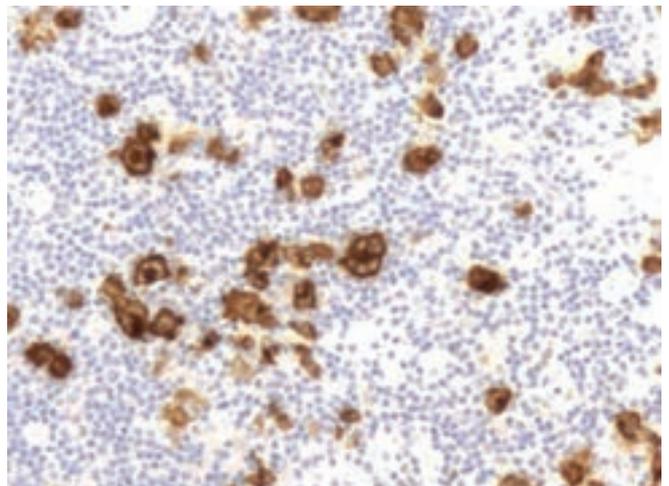


Fig. 2. Positività per il CD30 delle cellule HRS

Tab. 2

Immunofenotipo delle cellule di Reed Sternberg

Biomarker	SN	CM	DL	RL	NLPHL
CD30	+	+	+	+	-
CD15	+ (80%)	+ (80%)	+ (80%)	+ (80%)	-
IRF4	+	+	+	+	+
CD20	+ (20%) Intensità variabile	+ (20%) Intensità variabile	+ (20%) Intensità variabile	+ (20%) Intensità variabile	+
PAX5	+	+	+	+	+
B cell transcription factors	-	-	-	+/-	+
EBV	+ (10-20%)	+ (75%)	+ (75%)	+ (30%)	-

Legenda: SN: sclerosi nodulare; CM: cellularità mista; DL: deplezione linfocitaria; RL: ricco in linfociti; NLPHL: linfoma non-Hodgkin a predominanza linfocitaria nodulare; EBV: virus di Epstein-Barr.

Tab. 3

Diagnosi differenziale tra cHL, NLPHL, linfoma a grandi cellule B ricco in linfociti T ed istiociti e il linfoma anaplastico a grandi cellule.

	cHL	NLPHL	THRLBL	ALCL
Architettura	Nodulare (SN, RL) Diffusa (CM)	Nodulare	Diffusa	Diffusa; infiltrazione sinusoidale
Cellule neoplastiche	Reed-Sternberg Lacunare (SN) Cellule LP (LRCHL)	Cellule LP	Grandi cellule blastiche atipiche; RS-like cells	RS-like cells
Fenotipo	CD30+, CD15+, CD20+/-, CD79a-, CD45-, PAX5+ weak, EMA-EBV+/-, Oct2+/-	CD2+/-/CD79a+, Oct2+, CD45+, EMA+/-, CD30+ raramente, CD15-, BOB1+, EBV-	CD20+, CD79a+, EMA+, CD45+, CD30-, CD15-, EBV-, restrizione clonale delle catene leggere Ig	CD30+, CD15+/-, CD20-, CD4+, CD45+/-, PAX5-, EMA+, ALK1+/-, markers linfodi T+
Microambiente tumorale	Linfociti T (SN, CM) Linfociti B (LR nodulare), FDC+/-	Linfociti B, cellule CD57/PD1+, FDCs	Linfociti T, piccoli linfociti B, FDCs; rari linfociti CD57/PD1+	Possibili plasmacellule e istiociti
Genotipo	Linfociti T e B policlonali	Policlonali	Cellule monoclonali	Riarrangiamento clonale T (80-90%)

Legenda: cHL: linfoma di Hodgkin classico; NLPHL: linfoma di Hodgkin nodulare a predominanza linfocitaria; THRLBCL: linfoma a grandi cellule B ricco in linfociti T e istiociti; ALCL: linfoma anaplastico a grandi cellule; NS: sclerosi nodulare; LR: lymphocyte rich; LRCHL: linfoma di Hodgkin classico, ricco in linfociti; CM: cellularità mista; RS: cellule di Reed-Sternberg; FDC: cellule dendritiche follicolari; EBV: Epstein-Barr virus.

Nel HL il microambiente tumorale è costituito da cellule non neoplastiche, per lo più appartenenti al sistema immunitario (neutrofili, eosinofili, mastociti, macrofagi, linfociti B e T, plasmacellule e cellule natural killer) nel cui ambito sono disperse le poche cellule tumorali che influenzano la funzione cellulare (Fig. 3 e Fig. 4) e la

In questo caso si repertano linfociti di piccola taglia, eosinofili, neutrofili e centroblasti, questi ultimi due tipi a destra nella foto.

Sebbene le cellule di HRS costituiscano una piccola minoranza del tessuto tumorale esse sono in grado di reclutare, attraverso la secrezione di citochine, chemo-

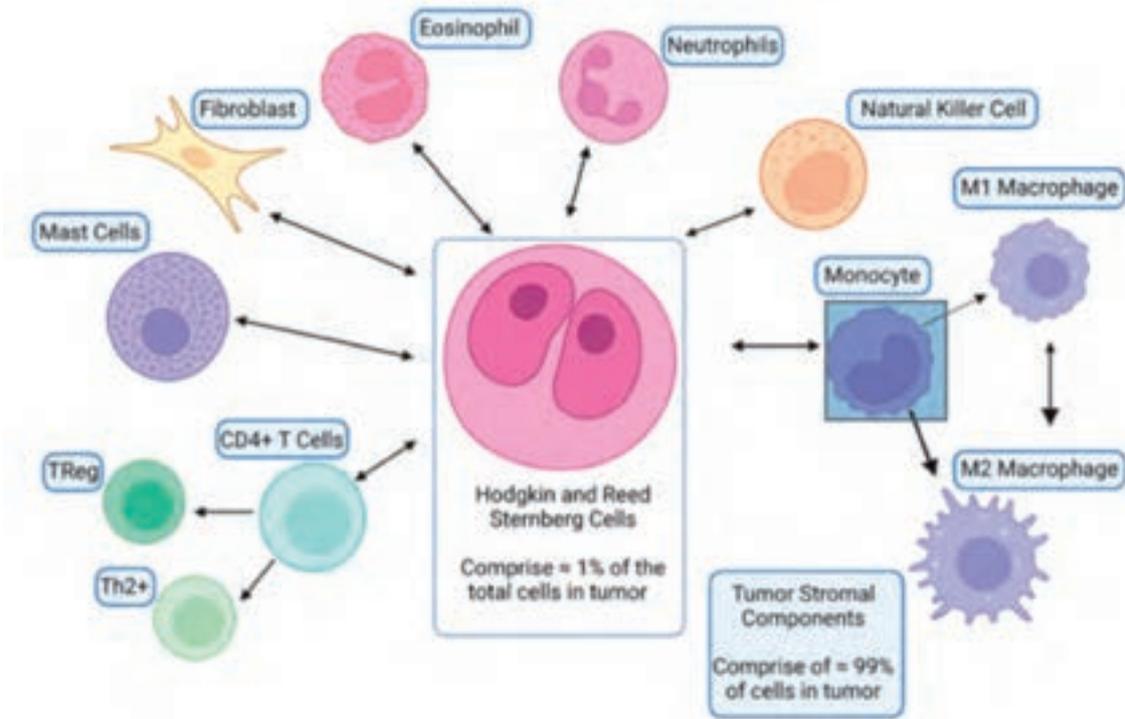


Fig. 3 Cellula di Hodgkin e Reed-Sternberg e microambiente tumorale *

*Da Masel R et al, 2023

composizione del microambiente stesso inducendo uno stato di immunosoppressione che consente la cosiddetta "cancer immune evasion". Questo stato di sostanziale immunoparalisi è inoltre alimentato dal reclutamento di cellule quali i macrofagi e i mastociti attraverso la produzione di citochine, chemochine e fattori di crescita. Il microambiente tumorale è costituito da cellule non neoplastiche, per lo più appartenenti al sistema immunitario, nel cui ambito sono disperse le poche cellule di HRS.

chine e fattori di crescita, varie cellule del sistema immunitario inibendone al contempo la loro funzione di immunosorveglianza.

Un ruolo particolare nel fenomeno della *immune evasion* è svolto dai macrofagi associati al tumore presenti nel microambiente tumorale. I macrofagi sono frutto dell'attivazione dei monociti che si trovano nel torrente circolatorio in forma inattiva e, una volta stimolati da citochine prodotte in seguito ad uno stimolo infiammatorio migrano nella sede del processo flogistico differenziandosi in cellule funzionalmente attive ad azione macrofagica. Sono state descritte due sottopopolazioni di macrofagi: M1, attivati per la via classica, e M2, attivati per via alternativa, con una sorta di polarizzazione della risposta immunitaria ed una sostanziale plasticità tra le due forme. Dal punto di vista citofluorimetrico queste due sottopopolazioni possono essere distinte dalla espressione dei markers CD80 e CD163, per il fenotipo M1 e M2, rispettivamente. In breve, i macrofagi M1 possono indurre l'apoptosi delle cellule maligne mentre quelli M2 hanno un'azione inibente il sistema immune adattativo attraverso la secrezione di citochine e fattori di crescita che inducono resistenza all'apoptosi. Le cellule linfomatose sono in grado di attrarre nel microambiente tumorale i monociti circolanti del sangue periferico e di secernere citochine che, in ultima analisi, sono in grado di determinare uno shift verso la polarizzazione M2 (Fig. 5). Un outcome sfavorevole è tra l'altro associato a una aumentata presenza di macrofagi tumor-associated con una maggiore rappresentazione di M2.

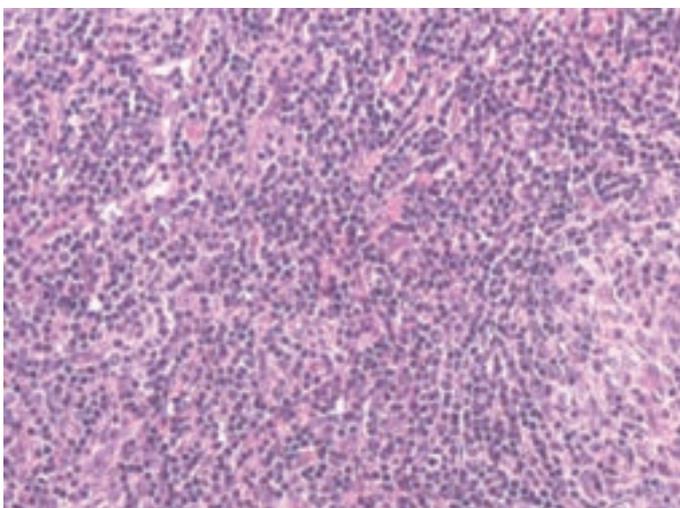


Fig. 4 Microambiente tumorale nel cHL

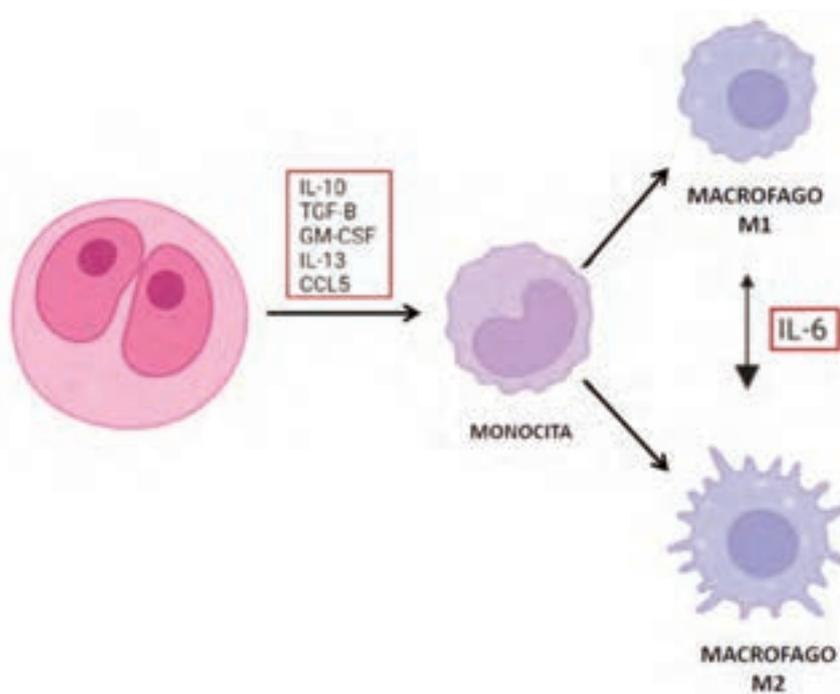


Fig. 5 Polarizzazione M2 dei macrofagi del microambiente tumorale*

Spiegazione nel testo.

*Da Masel R et al, 2023 (modificato)

La maggior parte dei linfociti T del microambiente tumorale è costituita dai linfociti CD4+ helper e dalle cellule T regolatorie con una azione immunosoppressiva che influenza la sopravvivenza delle cellule HRS stesse.

Un altro meccanismo noto della *immune evasion* è la cosiddetta T cell exhaustion, attraverso il quale le cellule T citotossiche vengono rese non funzionali. Le cellule di HRS presentano sulla propria superficie il ligando del PD-1 (*programmed cell death protein*) che è iperespresso sui linfociti T presenti nel microambiente tumorale. Dal legame tra PD-1 e PDL-1 ne consegue un fenotipo *exhausted* dei linfociti T citotossici. Inoltre l'Epstein Barr virus (EBV) induce una iperespressione dei ligandi PDL-1 e PDL-2 sulla superficie della cellula di HRS ed è ben noto che l'EBV è frequentemente associato all'HL influenzando lo sviluppo della forma classica attraverso l'amplificazione del gene 9p24.1. Di questo herpesvirus è stato suggerito un ruolo patogenetico quale evento precoce nello sviluppo dell'HL. Infatti, la dimostrazione della presenza di genoma monoclonale EBV nelle cellu-

le HRS indica proprio che l'infezione si è verificata prima della espansione clonale della malattia.

L'espressione sulla superficie della cellula HRS del CD30 e la disponibilità di un anticorpo monoclonale in grado di legarsi specificamente ad esso ha portato alla realizzazione del brentuximab vedotin (BV) un anticorpo monoclonale anti CD30 coniugato con monometilauristatina E (MMAE). L'agente antimicrotubulare MMAE è legato in modo covalente all'anti CD30. L'anticorpo coniugato viene rapidamente internalizzato dalla cellula, dopo il legame con il CD30, e trasportato ai lisosomi dove il peptide linker è selettivamente clivato. La tossina è quindi rilasciata nella cellula e legata alla tubulina provocando l'arresto del ciclo cellulare tra G2/M. Ciò conduce, infine, all'apoptosi. L'anti-CD30 è stato introdotto in terapia dapprima nei pazienti che avevano effet-

tuato l'autotrapianto di cellule staminali (approccio terapeutico di "salvataggio") ed erano recidivati/refrattari, poi come consolidamento post trapianto ed infine in prima linea in associazione alla chemioterapia con ottimi risultati in un campo già caratterizzato da eccellenti risultati (più dell'85% dei pazienti in fase precoce di malattia e più del 75% di quelli in fase avanzata vengono letteralmente guariti con la chemioterapia associata o meno alla radioterapia standard). Più recentemente si stanno utilizzando gli inibitori di PD-1 (nivolumab e pembrolizumab) che sono anticorpi in grado di legarsi a tale recettore impedendo il legame PD-1/PDL-1 in tal modo liberando il linfocita T dalla sua morsa inibente e ripristinando l'azione di sorveglianza immunologica normalmente espletata da tali cellule nei confronti delle cellule neoplastiche con risultati davvero esaltanti (Fig. 6).

L'antigene di superficie CD30 e il legame del PD-1 al suo recettore PDL-1 costituiscono il target, rispettivamente, delle terapie con brentuximab vedotin e inibitori di PD-1.

Infine, nuovi approcci terapeutici centrati sulla immunoterapia si stanno sperimentando nel setting dei pazienti recidivati/refrattari combinando tra di loro vari farmaci con diversi target e i risultati sembrano davvero interessanti facendo intravedere possibilità finora impensabili nel trattamento di questa patologia. Inoltre, ulteriori trial attualmente in corso stanno esplorando la possibilità di utilizzare in prima linea anti-CD30 e/o anti-PD-1 sia in stadi precoci che avanzati di malattia e in particolari setting, quali pazienti anziani o fragili (Tab. 4). Interessanti

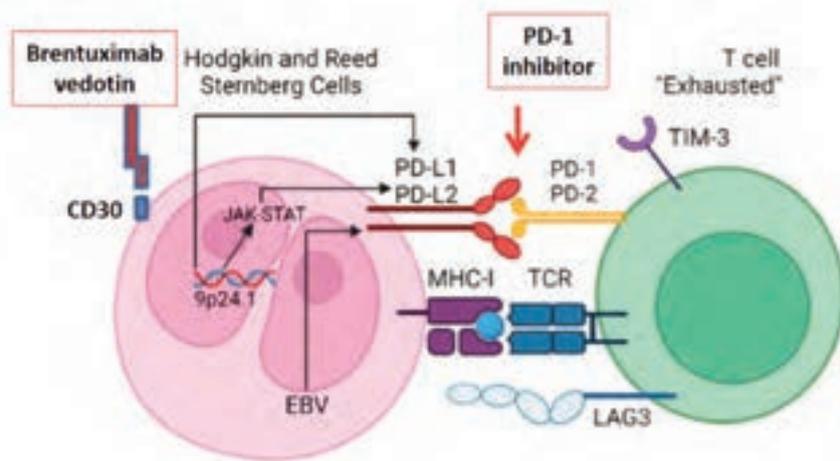


Fig. 6

Target molecolari delle terapie del cHL

*Da Masel R et al, 2023 (modificato)

ma ancora molto preliminari sono anche i risultati che si ottengono, in pazienti pesantemente pre-trattati, con le CAR-T e con gli anticorpi bi specifici.

effetti collaterali rispetto alla chemioterapia convenzionale, migliorando la qualità di vita dei pazienti.

Tab. 4

Nuovi approcci di immunoterapia per pazienti con cHL recidivato/refrattario

Terapia	Target terapeutico	ORR (%)	CRR (%)	PFS mediana (mesi)	Follow-up mediano (mesi)
Nivo + ipilimumab	PD-1 + CTLA4	74	23	NR	18
Nivo + ipilimumab + BV	PD-1 + CTLA4 + CD30	82	73	NR	20
Pembro + favezelimab	PD-1 + LAG3	80	33	19,4	32
Nivo + lenalidomide	PD-1 + CELMoD	70	30	NR	-
Nivo + ibrutinib	PD-1 + BTKi	52	29	17,3	9
Nivo + ruxolitinib	PD-1 + JAK1/2	42	26	17,3	9
Camrelizumab + decitabina	PD-1 + HMA	95	71	NR	15
Pembro + vorinostat	PD-1 + HDACi	72	34	8,9	33
Pembro + entinostat	PD-1 + HDACi	86	45	NR	8
Camidanlumab tesirine	CD25	71	42	6,8	9

Legenda: ORR: risposte globali; CRR: risposte complete; PFS: progressione libera da malattia.

In conclusione, negli ultimi anni il panorama terapeutico del linfoma di Hodgkin è stato rivoluzionato dalla introduzione in terapia dell'anticorpo monoclonale anti-CD30 e dagli anticorpi anti-PD-1. Dapprima utilizzati quale approccio di "salvataggio" nei pazienti recidivati o refrattari alle prime linee di terapia essi sono stati anche valutati in studi randomizzati come approccio di prima linea come ad esempio nello studio ECHELON-1 che ha portato alla registrazione dell'associazione BV-AVD (Brentuximab Vedotin – Adriablastina, Vinblastina, Dacarbazina) per i pazienti in IV stadio. Un altro studio randomizzato recentissimo ha confrontato questo nuovo standard BV-AVD con l'associazione Nivolumab AVD (N-AVD) e sono di recente pubblicazione i dati, a due anni di follow-up, che evidenziano un notevole miglioramento dei risultati in termini di Progression Free Survival (PFS) per i pazienti trattati con N-AVD. Tutto ciò porterà probabilmente a tassi di guarigione ancora più elevati di quelli, già brillanti, in questo peculiare istotipo di linfoma. Queste nuove prospettive terapeutiche non solo rappresentano, quindi, un'evoluzione significativa nel trattamento del linfoma di Hodgkin, ma offrono anche un vantaggio importante in termini di risparmio di

Bibliografia

1. Abbas AK, Lichtman AL, Pillai S. Immunologia cellulare e molecolare, VII Edizione, Elsevier 2012.
2. Avvisati G. (a cura di). Ematologia di Mandelli, Piccin 2019
3. Aldinucci D, Gloghini A, Pinto A, et al. The classical Hodgkin's lymphoma microenvironment and its role in promoting tumour growth and immune escape. J Pathol 2010; 221: 248-263.
4. Ambinder RF. Epstein-Barr virus and Hodgkin lymphoma. Proceeding of ASH, Hematology 2007: 204-209.
5. Ansell SM: Hodgkin lymphoma: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. Am J Hematol 2022; 97: 1478-88.
6. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of hematolymphoid tumours: lymphoid neoplasms. Leukemia 2022; 36: 1720-1748.
7. Bertazzi C, Sabattini E, Agostinelli C. Immune Microenvironment Features and Dynamics in Hodgkin Lymphoma. Cancers 2021; 13 (14): 3634.
8. Burton C, Allen P, Herrera AF. Paradigm shifts in Hodgkin lymphoma treatment: from frontline therapies to relapsed disease. ASCO Educational Book; 44 (3): 1- 13.
9. Carbone A, Gloghini A. Epstein Barr virus-associated Hodgkin lymphoma. Cancers 2018; 10: 163.
10. Carbone A, Gloghini A, Carlo-Stella C. Tumor microenvironment contribution to checkpoint blockade therapy: lessons learned from Hodgkin lymphoma. Blood 2023; 141: 2187-2193.
11. Castoldi G e Liso V. Malattie del sangue e degli organi ematopoietici. IV Edizione 2004, McGraw-Hill
12. Connors JM, Jurczak W, Straus DJ et al. Brentuximab vedotin with

- chemotherapy for stage III or IV Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 2018; 378.
13. D'Arena G, Vitale C, Coscia M, et al. Regulatory T cells and their prognostic relevance in hematologic malignancies. *J Immunol Res* 2017; 1832968.
 14. El-Galaly TC, Cottreau AS, Condoluci A, et al. Hodgkin lymphoma: recent progress in overall management. In: Gallarmini A, Juwied M editors. *Lymphoma*. Brisbane (AU): Exon Publications. Online first 2021 Nov 21: 83-116.
 15. Herrera AF, LeBlanc M, Castellino SM et al. Nivolumab+AVD in Advanced-Stage Classic Hodgkin's Lymphoma. *N Engl J Med* 2024; 391: 15.
 16. Hudig D, Hunter KW, Diamond WJ, Redelman D. Properties of human blood monocytes. II. Monocytes from healthy adults are highly heterogeneous within and among individuals. *Cytometry B Clin Cytom.* 2014; 86: 121-34
 17. Masel R, Roche ME, Martinez-Outschoorn U. Hodgkin lymphoma: a disease shaped by the tumor micro- and macroenvironment. *Best Practice Res Clin Haematol* 2023; 36: 101514.
 18. Massini G, Siemer D, Hohaus S. EBV in Hodgkin lymphoma. *Med J Hematol Inf Dis* 2009; 1 (2): e2009013.
 19. Moy RH & Younes A. Immune checkpoint inhibition in Hodgkin lymphoma. *HemaSphere* 2018; 2:1 (e20).
 20. Momotow J, Borchmann S, Eichenauer DA et al. Hodgkin lymphoma – Review on pathogenesis, diagnosis, current and future treatment approaches for adult patients. *J Clin Med* 2023, 10, 1125.
 21. Radhakrishnan VS, Longley J, Johnson PWM. Antibody based therapies in Hodgkin lymphoma. *Cancer Treat Rev* 2024; 102647.
 22. Randall MP & Spinner MA. Optimizing treatment for relapsed/refractory classic Hodgkin lymphoma in the era of immunotherapy. *Cancers* 2023; 15, 4509
 23. Renner C & Stenner F. Cancer immunotherapy and the immune response in Hodgkin lymphoma. *Front Oncol* 2018; 8: 193.
 24. Roswarski JL & Longo DL. Hodgkin lymphoma: focus on evolving treatment paradigms. *Best Practice & Res Clin Haematol* 2023; 36, 101510
 25. Skinnider BF & Mak TW. The role of cytokines in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 2002; 99: 4283-97.
 26. Tomarchio V, Rigacci L. Role of CD68 in the tumor immune microenvironment in Hodgkin's lymphoma. *Expert Rev Clin Immunol* 2024; 20:811-819
 27. Wein F, Kuppers R. The role of T cells in the microenvironment of Hodgkin lymphoma. *J Leukoc Biol* 2016; 99: 45-50.
 28. Vassilakopoulos TP, Liaskas A, Pereyra P et al. Incorporating monoclonal antibodies into the first-line treatment of classical Hodgkin lymphoma. *Int J Mol Sci* 2023; 24: 13187.

QUOTA ASSOCIATIVA GIC 2025... 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 2024 e per il 2025 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



News in Bibliografia

Peer Review Journal

Guidelines for establishing a cytometry laboratory.

Cytometry A. 2024 Feb;105(2):88-111. doi: 10.1002/cyto.a.24807.

Automation in flow cytometry: Guidelines and review of systems.

Cytometry B Clin Cytom. 2024 Jul;106(4):308-320. doi: 10.1002/cyto.b.22125.

Standardization of flow cytometric detection of antigen expression.

Cytometry B Clin Cytom. 2024 Jan;106(1):25-34. doi: 10.1002/cyto.b.22155.

Recommendations for using artificial intelligence in clinical flow cytometry.

Cytometry B Clin Cytom. 2024 Jul;106(4):228-238. doi: 10.1002/cyto.b.22166.

Optimization and intra-assay validation of a multiparametric flow cytometric test for monitoring circulating TREGs.

Methods Cell Biol. 2024;189:169-188. doi: 10.1016/bs.mcb.2024.06.005.

European flow cytometry quality assurance guidelines for the diagnosis of primary immune deficiencies and assessment of immune reconstitution following B cell depletion therapies and transplantation.

Cytometry B Clin Cytom. 2024 Jun 28. doi: 10.1002/cyto.b.22195.

Autofluorescence: From burden to benefit.

Cytometry A. 2024 Aug;105(8):563-567. doi: 10.1002/cyto.a.24885.

Label-free cell detection of acute leukemia using ghost cytometry.

Cytometry A. 2024 Mar;105(3):196-202. doi: 10.1002/cyto.a.24821.

The challenge of standardizing CAR-T cell monitoring: A comparison of two flow-cytometry methods and correlation with qPCR technique.

Cytometry A. 2024 May;105(5):368-375. doi: 10.1002/cyto.a.24825.

The impact of exosomes derived from B-cell acute lymphoblastic leukemia as a growth factor on bone marrow mesenchymal stromal cells.

Mol Biol Rep. 2024 Jun 14;51(1):749. doi: 10.1007/s11033-024-09674-4.

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



Società Italiana di Citometria
Scuola Nazionale di Citometria

QUADERNI GIC

I FONDAMENTI DELLA CITOMETRIA

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. Il Quaderno “I fondamenti della Citometria” è dedicato ai concetti di base delle tecniche citometriche e fra questi, particolare rilievo è stato dato ai concetti di interazione fra luce e materia e quindi ai fenomeni di “scattering” e di fluorescenza che stanno veramente alla base di ogni analisi citometrica. L’obiettivo del GIC è infatti anche quello di curare scrupolosamente la formazione delle nuove generazioni di Citometristi a garanzia della qualità dei risultati, con particolare riferimento alle applicazioni citometriche in ambito clinico. 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/>

NOW AVAILABLE



CytoFLEX SRT THE NEW BENCHTOP SORTER

Ready to take control of your cell purification workflows?
Want a dedicated instrument for your unusual cells?
Interested in a benchtop sorter but not willing to trade on performance?
Want all this, in a footprint that doesn't take up the room?
We've got you covered.

Built on the CytoFLEX platform, we've kept the APD detectors, the high sensitivity and ease-of-use you know and love in our analyzers, and put it in a benchtop sorter. Introducing: CytoFLEX SRT.

More info at: beckl.co/cytoflexSRT

© 2020 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.

For Beckman Coulter's worldwide office locations and phone numbers, please visit "Contact Us" at beckman.com
2020-EMEA1-FLOWR-CM0063-2109

