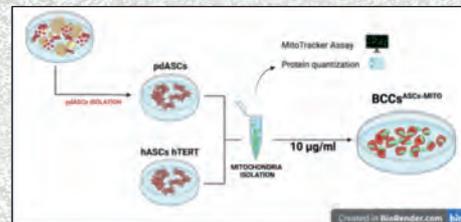


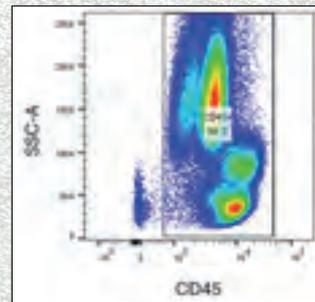
# LETTERE GIC

Periodico della Società Italiana di Citometria

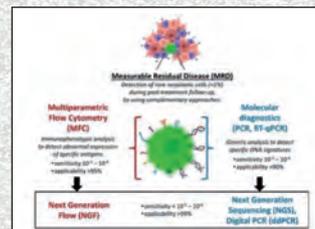
*Microscopia e Citometria nello studio del trasferimento di mitocondri dalle cellule staminali adipose alle cellule di carcinoma mammario: studio della resistenza farmacologica*



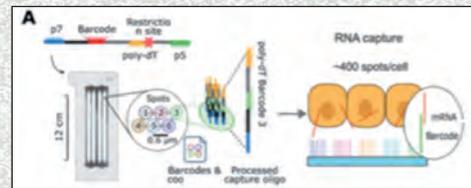
*Monitoraggio della persistenza e del fenotipo di cellule anti-CD19 CAR-T nei pazienti tramite citofluorimetria*



*Malattia Minima Residua nel Mieloma Multiplo con Next Generation Flow: l'importanza dell'alta sensibilità*



*Le Spatial Omics: mappare l'identità cellulare nel contesto dei tessuti*



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

**43<sup>a</sup> CONFERENZA NAZIONALE DI CITOMETRIA**

**AGGIORNAMENTI E INNOVAZIONI DELLA CITOMETRIA**

**NELLE APPLICAZIONI CLINICHE E DI RICERCA:**

**ANALISI, GESTIONE DEI DATI E LORO INTERPRETAZIONE**

**22-29 maggio / 5 giugno 2025 Web Live Streaming**

**11-13 giugno 2025**

**Pontificia Università Lateranense, Roma-Città del Vaticano**

**PROGRAMMA SCIENTIFICO**

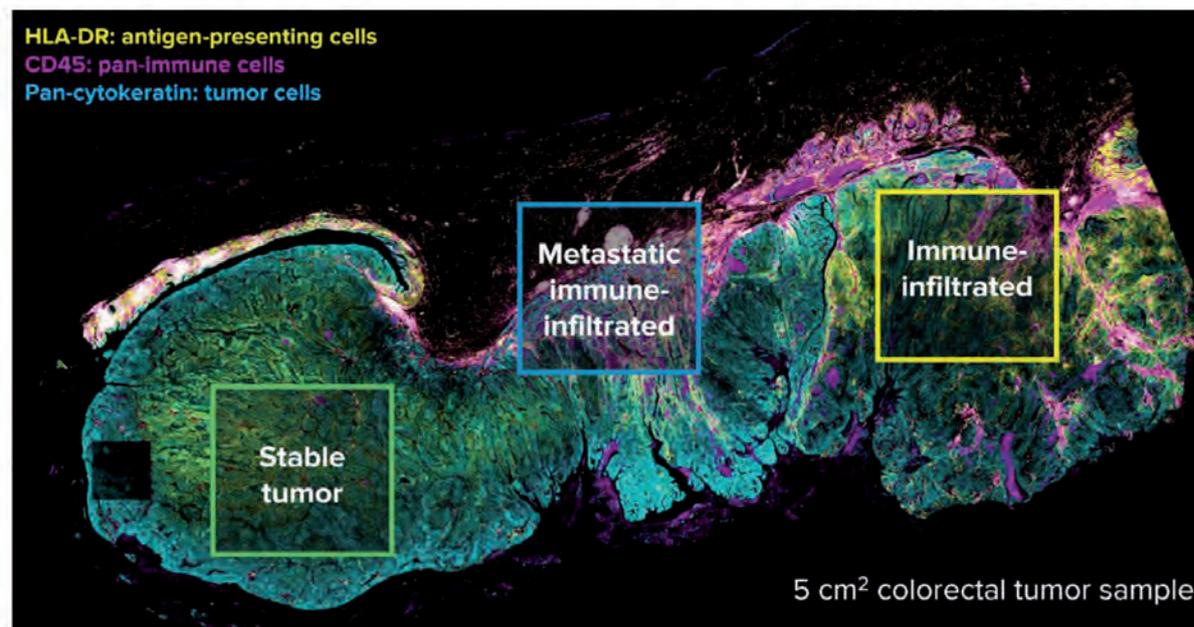
## Human Immuno-Oncology IMC Panels

# Capture the full complexity of tumor heterogeneity

Quickly develop a deep understanding of the tumor microenvironment with the fastest approach to multiplexed spatial mapping using ready-made, modular Imaging Mass Cytometry™ (IMC™) panels.

Choose from a suite of **12 carefully curated IMC panels** to create a **high-plex panel tailored to your research**. Characterize overall tissue architecture, cell interaction and single-cell phenotypic and functional markers to identify spatial biomarkers critical to assessing disease progression and immune response.

## Visualize the entire tissue landscape – from a single high-plex panel.



- Tissue architecture
- Immune cell phenotyping
- Stromal cell
- Epithelial and mesenchymal
- Cell function
- T cell exhaustion
- Neurophenotyping

**A 5 cm<sup>2</sup> colorectal cancer tumor sample was imaged on the Hyperion™ XTi Imaging System with whole slide imaging modes.** Stable tumor areas, areas with metastasis and immune filtration can be identified. Detection of metastatic tumor cells is a negative prognostic factor for patients. This information has the potential to inform treatment therapies to inhibit the migratory capabilities of the tumor cells to prevent metastatic dissem.

## Highlights

- Rapid high-plex panel design with ready-made panels that fit together
- Carefully curated targets to capture meaningful insights
- Visualize dynamic range of 40+ markers simultaneously with IMC

**High plexity** without the complexity

For more information, visit [standardbio.com/immuno-oncology-imc](https://standardbio.com/immuno-oncology-imc)

**For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.**

# Automate more. Get more done.

Reduce hands-on time with a true walkaway flow cytometry solution that frees up your team to:

focus on analysis

be more efficient

**keep up with testing demands**

focus on more critical lab tasks

make the most of the workday

Drive efficiency from sample to answer with the power of the fully automated BD FACSDuet™ Premium Sample Preparation System, offering cocktailing, washing, centrifugation and sample transfer to a physically integrated flow cytometer.

Get more done. Discover how at [bdbiosciences.com/duet](https://bdbiosciences.com/duet)



BD Flow Cytometers and BD FACSDuet™ Premium Sample Preparation System are Class 1 Laser Products.

BD, the BD Logo, BD FACSDuet and BD FACSLytic are trademarks of Becton, Dickinson and Company or its affiliates. © 2025 BD. All rights reserved. BD-91384 (05/25)



**Flow Cytometry  
Anti-Human & Anti-Mouse  
Antibodies**



**Catalogue 2025**

[www.immunologicalsciences.com](http://www.immunologicalsciences.com)

**CYTOTOXICITY &  
CELL PROLIFERATION  
FLOW CYTOMETRY**

**Cytotoxicity – Apoptosis & Necrosis**

**Annexin V**

Cat. N°	Description	Size
IK-90314	Annexin V (PI) FITC Kit	100 tests
IK-11150	Annexin V (PI) APC Kit	100 tests
IK-11153	Annexin V (PI) PE Kit	100 tests
IK-90315	Annexin V (7-AAD) FITC Kit	100 tests
IK-90316	Annexin V (7-AAD) APC Kit	100 tests
IK-90317	Annexin V (7-AAD) PE Kit	100 tests

**One-Step TUNEL**

Cat. N°	Description	Size
IK9200	One-step TUNEL Flow Cytometry Apoptosis Kit (Green, FITC)	50 Assays
IK9300	One-step TUNEL Flow Cytometry Apoptosis Kit (Green, Alexa Fluor 488)	50 Assays
IK9700	One-step TUNEL Flow Cytometry Apoptosis Kit (Red, Alexa Fluor 555)	50 Assays
IK9400	One-step TUNEL Flow Cytometry Apoptosis Kit (Red, Alexa Fluor 594)	50 Assays
IK9600	One-step TUNEL Flow Cytometry Apoptosis Kit (Red, Alexa Fluor 647)	50 Assays
IK9500	One-step TUNEL Flow Cytometry Apoptosis Kit (Blue, Violet 450)	50 Assays

**Caspase**

Cat. N°	Description	Size
IK-37831-100	Caspase 3/7 and Annexin V Double Staining Apoptosis Kit	100 Assays
IK-37832-100	Caspase 3/7 and PI Double Staining Kit	100 Assays
IK-37833-100	Caspase 3/7 and DAPI Double Staining Kit	100 Assays

**Mitochondrial**

Cat. N°	Description	Size
IS-10003	Mitochondrial Membrane Potential Assay Kit JC-1 Kit Assay Kit	100 Assays
IKA401	MitoBright Green Probe Assay Kit	100 Assays
IKA402	MitoBright Red Probe Assay Kit	100 Assays
IKA403	MitoBright Deep Red Probe Assay Kit	100 Assays

[www.immunologicalsciences.com](http://www.immunologicalsciences.com)

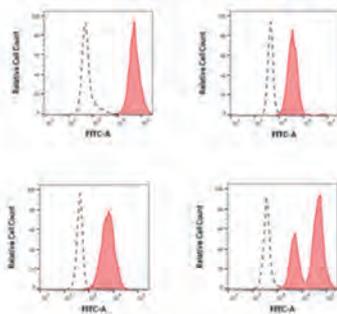
**exbio**

**FagoFlowEx Kit**

Cat.# ED7042

CE-IVD

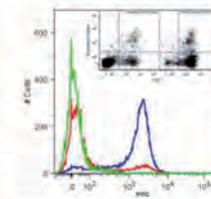
The FagoFlowEx Kit is intended for examination of phagocytic activity of neutrophil granulocytes by measuring the respiratory (oxidative) burst after their stimulation with E. coli bacteria in human heparinized whole blood using flow cytometry.



[www.sichim.com](http://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 95-281) for 6 hours or left untreated.

Green line: untreated and unstained cells.  
Red line: untreated and stained cells.  
Blue line: TRAIL treated and stained cells.

**Highlights**

Immunological Science's 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](http://www.immunologicalsciences.com)

# LETTERE GIC

Vol. 34, Num. 1, 2025

**DIRETTORE RESPONSABILE**  
**DIRETTORE SCIENTIFICO EDITORIALE**  
**Raffaele De Vita**

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

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

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

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

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

Vol. 34, num. 1 - Aprile 2025

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

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

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

Redazione:



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



Associato alla  
Unione Stampa  
Periodica Italiana

## SOMMARIO

Programma Scientifico

### 43<sup>a</sup> Conferenza Nazionale di Citometria

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

**22-29 maggio / 5 giugno 2025 Web Live Streaming**  
**11-13 giugno 2025 Pontificia Università Lateranense**  
**Roma-Città del Vaticano**

6

Microscopia e Citometria nello studio del  
trasferimento di mitocondri dalle cellule staminali  
adipose alle cellule di carcinoma mammario:  
studio della resistenza

24

**Vitale Del Vecchio, Ayesha Rehman, Sameer Kumar Panda,  
Martina Torsiello, Martina Marigliano, Maria Maddalena Nicoletti,  
Giuseppe Andrea Ferraro, Vincenzo De Falco, Rosamaria Lappano,  
Eva Lieto, Francesca Pagliuca, Carlo Caputo, Marcella La Noce,  
Gianpaolo Papaccio, Virginia Tirino, Nirmal Robinson,  
Vincenzo Desiderio, Federica Papaccio**

Monitoraggio della persistenza e del fenotipo di  
cellule anti-CD19 CAR-T nei pazienti tramite  
citofluorimetria

31

**Cristian Meli, Benedetta Rambaldi**

Malattia Minima Residua nel Mieloma Multiplo  
con Next Generation Flow:  
l'importanza dell'alta sensibilità

36

**Elona Saraci**

Le Spatial Omics: mappare l'identità cellulare nel  
contesto dei tessuti

43

**Elisabetta Ferretti and Elena Splendiani**



Società  
Italiana di  
Citometria

**43<sup>a</sup> CONFERENZA NAZIONALE DI CITOMETRIA**  
**AGGIORNAMENTI E INNOVAZIONI DELLA CITOMETRIA**  
**NELLE APPLICAZIONI CLINICHE E DI RICERCA:**  
**ANALISI, GESTIONE DEI DATI E LORO INTERPRETAZIONE**

**22-29 maggio / 5 giugno 2025 Web Live Streaming**

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



**PROGRAMMA SCIENTIFICO**

**Mercoledì 11 giugno**

12:00 **Registrazione e Allestimento Poster**

14:00 **APERTURA DELLA CONFERENZA** (Aula Pio XI)

Rosa Chianese (Varese), Raffaele De Vita (Roma), Giuliano Mazzini (Pavia)

14:15 **WORKSHOP** Giovani Citometristi

Moderatori: Claudio Pioli (Roma), Giulia Scalia (Napoli)

**COMUNICAZIONI ORALI**

**When morphology supports cytometry**

Avino D., Esposito A., **Di Rosa M.**, Iovino V., Di Palma A., Morelli G., Califano C.  
U.O.C. Diagnostica Ematologia, P.O. Andrea Tortora, Pagani (SA), Italy

### **Evaluation of Circulating Myeloid-Derived Suppressor Cells of Monocyte origin in classical Hodgkin Lymphoma patients at diagnosis using a robust, standardized Flow Cytometry Approach**

Battaglia A 2, Messina N 1, Maiolo E 1, Cimmino AC 3, Fossati M 3, Buzzonetti A 3, Ferrante A 3, Iacovelli C 4, Fattorossi A 3, Bellesi S 4, Hohaus S 1,4

1 Dip. di Scienze Radiologiche ed Ematologiche, Università Cattolica del Sacro Cuore Facoltà di Medicina e Chirurgia, Rome, 00168, 12 Sci and Public Health Dept, UCSC, Rome, 00168, 3 Facility di Citometria, Fondazione Policlinico Gemelli, IRCCS, Rome, 00168, 14 Ematologia, Dipartimento di Scienze di Laboratorio ed Ematologiche, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Rome, 00168, Italy

### **Luspatercept treatment affects immune regulatory subsets in subjects with MDS with Ring Sideroblasts**

Stefania Leone<sup>1,2</sup>, Francesco Grimaldi<sup>2</sup>, Mara Memoli<sup>2</sup>, Giulia Scalia<sup>3</sup>, Annamaria Vincenzi<sup>2</sup>, Maria di Perna<sup>4</sup>, Giuseppe Cerciello<sup>2,5</sup>, Antonio Vassallo<sup>6</sup>, Fabrizio Pane<sup>2</sup>, Alessandra Picardi<sup>1,7</sup>, Giuseppe Terrazzano<sup>6</sup>, Giuseppina Ruggiero<sup>8</sup>, Flavia Carriero<sup>6</sup> and Valentina Rubino<sup>8</sup>

1. Haematopoietic Stem Cell Transplantation Unit, Azienda Ospedaliera A. Cardarelli, Naples, Italy; 2. Division of Haematology, Department of Clinical Medicine and Surgery, University of Naples "Federico II", Naples, Italy; 3. Clinical and Experimental Cytometry Unit, Centre for Advanced Biotechnology Franco Salvatore, CEINGE, Naples, Italy; 4. Haematology, Hospital "Andrea Tortora", Pagani, Italy; 5. Haematology, "San Pio" Hospital of Benevento, Benevento, Italy; 6. Department of Health Sciences, University of Basilicata, Potenza, Italy; 7. Department of Biomedicine and Prevention, University of Tor Vergata, Rome, Italy; 8. Dep. of Translational Medical Sciences, University of Naples Federico II, Naples, Italy.

### **Evaluation of the antitumoral activity of copper complexes bearing amantadine-conjugated ligands via flow cytometry analysis**

Migani S.,<sup>1,2</sup> Dupuis M.L.,<sup>1</sup> Calcabrini A.,<sup>1</sup> Caviglia M.,<sup>1,2</sup> Colone M.,<sup>1</sup> Bozzuto G.,<sup>1</sup> Del Gobbo J.,<sup>2</sup> Pellei M.,<sup>2</sup> Santini C.,<sup>2</sup> Stringaro A.,<sup>1</sup>

1 National Center for Drug Research and Evaluation, Italian National Institute of Health, Viale Regina Elena, 299, 00161 Rome, Italy

2 School of Science and Technology, Chemistry Division, University of Camerino, via Madonna delle Carceri (ChIP), 62032 Camerino (MC), Italy

### **Apoptotic effect of Prunus spinosa ecotype Trigno extract on BRAF-mutated primary and metastatic melanoma cells**

Di Netta A.,<sup>1</sup> Di Pauli A.,<sup>2</sup> Vona R.,<sup>3</sup> Cittadini C.,<sup>3</sup> Meschini S.,<sup>1</sup> Condello M.<sup>1</sup>

1 National Institute of Health, National Center for Drug Research and Evaluation, Rome, Italy, 2 "Sapienza" University of Rome, Department of Anatomy, Histology, Forensic-Medicine and Orthopedics, Rome, Italy, 3 National Institute of Health, National Center for Gender-Specific Medicine, Rome, Italy

### **Extracellular vesicles from V $\delta$ 2 T cells inhibit viral replication and boost antiviral immune response by improving antigen presentation**

Guarracino F.,<sup>1</sup> Bordoni V.,<sup>1</sup> Quattrocchi L.,<sup>2</sup> Lorusso A.,<sup>1</sup> Minutolo A.,<sup>3</sup> Matteucci C.,<sup>3</sup> Battistelli C.,<sup>2</sup> Tripodi M.,<sup>2</sup> Locatelli F.,<sup>4,5</sup> Agrati C.,<sup>1</sup>

1 Department of Pediatric Hematology and Oncology, Pathogen Specific Immunity, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy;

2 Istituto Pasteur Italia-Fondazione Cenci Bolognetti, Department of Molecular Medicine, Sapienza University of Rome, Rome, Italy;

3 Department of Experimental Medicine, Microbiology and Clinical microbiology laboratory University of Rome "Tor Vergata" Rome, Italy;

4 Department of Pediatric Hematology and Oncology, Cell and Gene Therapy, Bambino Gesù Children's Hospital, IRCCS, Rome, Italy;

5 Department of Life Sciences and Public Health, Catholic University of the Sacred Heart, Rome, Italy

## **15:15 SEMINARI DI IMMUNO-ONCO-EMATOLOGIA E METODOLOGIE ANALITICHE**

Moderatori: Igea D'Agnano (Milano), Giuliano Mazzini (Pavia)

### **15:20 Meccanismi immunologici della comunicazione cuore-cervello nella patologia cardiovascolare**

Daniela Carnevale (Roma)

*supported by Cytex*

15:40 **Applicazione della Citometria di massa per lo studio dei gliomi pediatrici di alto grado: un approccio integrato tra clinica e modelli sperimentali**

Maria Vinci (Roma)

*supported by Standard BioTools*

Moderatori: Rachele Amodeo (Roma), Giuseppe Coppola (Salerno)

16:00 **Emopoiesi clonale molecolare vs emopoiesi clonale immunofenotipica: ruolo dei subcloni citometrici e delle varianti a significato incerto**

Valentina Giudice (Salerno)

*supported by Beckman Coulter*

16:20 **Studio delle regolazioni del compartimento dell'immunità innata in corso di infezione da SARS-CoV-2: dal paziente al modello in vitro**

Martina Severa (Roma)

*supported by BD Biosciences*

16:40 - 17:00 Discussione

17:00 **LETTURA MAGISTRALE DI APERTURA**

Moderatori: Rosa Chianese (Varese), Raffaele De Vita (Roma)

**CAR T cells dall'antigen discovery al monitoraggio della loro persistenza ed efficacia**

Franco Locatelli (Roma)

**Giovedì 12 giugno**

18:00 Brindisi di Benvenuto

08:30-10:15 **SESSIONE PARALLELA EMATOLOGIA**

(Aula Pio XI)

**NUOVE FRONTIERE DELLA CITOMETRIA NELLA DIAGNOSTICA ONCOEMATOLOGICA**

Moderatori: Rosa Chianese (Varese), Giovanni D'Arena (Salerno)

Introduzione

**Il contributo nella standardizzazione diagnostica della New Generation Flow**

Giovanni Rossi (San Giovanni Rotondo)

**COMUNICAZIONI ORALI**

Moderatori: Giuseppe Coppola (Salerno), Giovanni D'Arena (Salerno)

**Dual TRBC1 and TRBC2 staining for rapid evaluation of t-cell clonality by flow cytometry: a preliminary single center analysis**

**Bellesi S.** 1, Maiolo E. 2, Iacovelli C. 1, Puggioni P.L. 1, Campana F. 2, Schiaffini G. 2, D'Innocenzo S. 1, Toscano A. 1, Stamate M. 1, Fosso F. 1, Chiusolo P. 1,2, Larocca L.M. 3, Hohaus S. 1,2

1 Ematologia, Dip. di Scienze di Laboratorio ed Ematologiche, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Rome, 00168, Italy 2 Dip. di Scienze Radiologiche ed Ematologiche, Univ. Cattolica del Sacro Cuore Facoltà di Medicina e Chirurgia, Rome, 00168, Italy 3 Patologia Oncoematologica, Dip. di Scienze della Salute della donna, del bambino e di sanità pubblica, Fond. Pol. Univ. A. Gemelli IRCCS, Rome, 00168, Italy

**Quantification of new target therapy antigen on lymph node biopsies in patients with large BCell lymphoma at relapse using flow cytometry**

**Maiolo E.** 2, Campana F. 2, Iacovelli C. 1, Puggioni P.L. 1, Schiaffini G. 2, D'Innocenzo S. 1, Toscano A. 1, Stamate M. 1, Di Cesare G. 1, Larocca L.M. 3, Hohaus S. 1,2, Bellesi S. 1

1- Ematologia, Dip. di Scienze di Lab. ed Ematologiche, Fondazione Policlinico Univ. A. Gemelli IRCCS,

Rome, 00168, Italy; 2- Dip. di Scienze Radiologiche ed Ematologiche, Univ. Cattolica del Sacro Cuore, Facoltà di Medicina e Chirurgia, Rome, 00168, Italy; 3-Patologia Oncoematologica, Dip. di Scienze della Salute della donna, del bambino e di sanità pubblica, Fond. Pol. Universitario A. Gemelli IRCCS, Rome, 00168, Italy

### **Integrated Hematology Laboratory Diagnostics: High-Volume Testing for Hematologic Disorders**

**Gervasi F.**, D'Amelio L., Volpe N., Zanca M., Saltaformaggio F., Lombardo M.R., Aronica T.S.

U.O.C. Patologia Clinica, Az. di Rilievo Nazionale e di Alta Specializzazione "Civico, G. Di Cristina, Benifratelli", P.za Nicola Leotta 4, 90127 Palermo

### **Clinical Summary: Suspected Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS)**

**Rumi G.**, Petuso V., Profeta F., Del Gaudio A., Scaldaferrì F.

CEMAD (Centro malattie apparato digerente) - UOS Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali, IBD UNIT Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS - Università Cattolica del Sacro Cuore, L.go Gemelli 8 - 00168 Roma -Italy

## **SESSIONE PARALLELA AMBIENTE**

(Aula Paolo VI)

### **LA CITOMETRIA PER L'AMBIENTE E LE BIOTECNOLOGIE**

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

Introduzione

#### **Flow cytometric analysis of microgreens**

Carla Sandri (Roma)

#### **Spectral cytometry for fine-scale phytoplankton analysis**

Gerald Gregori (Marsiglia - Francia)

## **COMUNICAZIONI ORALI**

### **Assessing autotrophic and heterotrophic marine microbes through flow cytometry and Omic approaches**

**Coci Manuela**<sup>1</sup>, Amalfitano Stefano<sup>2</sup>, Campanelli Alessandra<sup>1</sup>, Penna Pierluigi<sup>1</sup>, Quero Grazia Marina<sup>1</sup>, Luna Gian Marco<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>CNR- IRBIM, CNR-IRBIM, Istituto per le Risorse Biologiche e le Biotecnologie Marine. Largo Fiera della Pesca 2, 60125 Ancona

<sup>2</sup>CNR- IRSA Istituto di Ricerca sulle Acque ,Area della Ricerca Roma 1 Via Salaria Km 29,300 C.P. 10 - 00015 Monterotondo Stazione (Roma)

### **Optimization of fluorescent staining for micro- and nanoplastic identification in flow cytometry**

Foladori P. <sup>1</sup>, **Torboli A.** <sup>1</sup>, Bruni L. <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Civil and Environmental Engineering, University of Trento, via Mesiano, 77, 38050 Trento, Italy

<sup>2</sup>ADEP, Agenzia per la Depurazione (Wastewater Treatment Agency), Autonomous Province of Trento, via Gilli 3, 38121 Trento, Italy

10:15-10:45 *Pausa caffè*

*e Visione Poster "obbligo di presenza di almeno un Autore"*

10:45-12:30 **SESSIONE PLENARIA**

(Aula Pio XI)

### **NUOVE FRONTIERE DELLA CITOMETRIA**

Moderatori: Andrea Fattorossi (Roma), Giuliano Mazzini (Pavia)

#### **Cell Sorting: Ottimizzazione del campione per approcci omici e metodologie avanzate**

Nicolò Panini (Milano)

discussione

## **Citometria, Citomica ed intelligenza artificiale**

Josè-Enrique O'Connor (Valencia)

discussione

## **Intelligenza artificiale spiegabile per la ricerca biomedica**

Andrea Ciardiello (Roma)

discussione

12:30-14:00 *Colazione di lavoro*  
*e Visione Poster "obbligo di presenza di almeno un Autore"*

14:00-15:15 **SESSIONE PARALLELA IMMUNOLOGIA** (Aula Pio XI)

### **LA CITOMETRIA IN IMMUNOLOGIA TRASLAZIONALE E CLINICA**

Moderatori: Chiara Agrati (Roma), Claudio Pioli (Roma)

Introduzione

#### **Utilizzo di tecniche single cell per studiare il ruolo dei linfociti B nella miastenia grave**

Raffaele Iorio (Roma)

#### **Ruolo della milza nell'immunità anti virale**

Chiara Agrati (Roma)

## **COMUNICAZIONI ORALI**

### **Patients with Transfusion-Dependent Thalassemia exhibit an activated immune profile and impaired T cell responses**

**Lorusso A.**,<sup>1</sup> Bordini V.,<sup>1</sup> Guarracino F.,<sup>1</sup> Gregori E.,<sup>1</sup> Algeri M.,<sup>2</sup> Locatelli F.,<sup>2</sup> Agrati C.,<sup>1</sup>.

1. Unità di immunità patogeno-specifica, Dipartimentodi Oncoematologia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù;  
2. Dipartimento di Oncoematologia, Ospedale Pediatrico Bambino Gesù.

### **T-cell immune dysfunction induced by SARS-CoV-2 infection persists in Long COVID in association with disease features**

**Petrone V.**<sup>1</sup>, Fanelli M.<sup>1</sup>, Chirico R.<sup>1</sup>, Coppola L.<sup>2</sup>, Teti E.<sup>2</sup>, Sorace C. <sup>2</sup>, Cipriani C.<sup>1</sup>, Malagnino V.<sup>2,3</sup>, Iannetta M.<sup>2,3</sup>, Balestrieri E.<sup>1</sup>, Lucas A.<sup>4</sup>, Grelli S.<sup>1,5</sup>, Sarmati L.<sup>2,3</sup>, Minutolo A.<sup>1</sup>, Matteucci C.<sup>1</sup>.

1. Department of Experimental Medicine, University of Rome Tor Vergata, Rome, 00133, Italy; 2. Infectious Diseases Clinic, Policlinic of Tor Vergata, Rome, 00133, Italy; 3. Department of Systems Medicine, University of Rome Tor Vergata, Rome, 00133, Italy; 4. We-Met platform, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires (I2MC), plateau We-Met, Inserm UMR1297 and Université Paul Sabatier, Toulouse, France  
5. Virology Unit, Policlinic of Tor Vergata, Rome, 00133, Italy

### **Relation between immune cells, neuronal cells and structural brain damages in psychosis**

**Fenoglio D**<sup>1,2</sup>, Altosole T<sup>2</sup>, Uras CM<sup>2</sup>, Marcenaro E<sup>3</sup>, Escelsior A<sup>2,4</sup>, Pereira B<sup>2,4</sup>, Inuggi A<sup>4</sup>, Guglielmo R<sup>2,4</sup>, Amore M<sup>4</sup>, Serafini G<sup>2,4</sup>, Filaci G<sup>1,2</sup>

1Dep Internal Medicine, University of Genoa; 2 IRCCS Ospedale Policlinico San Martino, Genoa; 3 Dep Experimental Medicine, University of Genoa; 4 Dep Neuroscience, Section of Psychiatry, University of Genoa University of Genoa

14:00-15:15 **SESSIONE PARALLELA ONCOLOGIA** (Aula Paolo VI)

### **L'INTEGRAZIONE DELLA CITOMETRIA NELL'ONCOLOGIA TRASLAZIONALE: NUOVE FRONTIERE E PROSPETTIVE CLINICHE NELLO STUDIO E TRATTAMENTO DEI TUMORI**

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

Introduzione

#### **Nuove prospettive nella medicina traslazione per il Non Small Cell Lung Cancer (NSCLC)**

Elena Levantini (Pisa)

## COMUNICAZIONI ORALI

### **Peripheral blood CD73/CD8+ T lymphocyte cells subpopulation as a potential biomarker of early response to treatment with immune checkpoint inhibitors in advanced NSCLC patients**

**Camerlingo R.1**, Marra L.2, Rea G.3, Cesarano M.1, Parisi I. A.1, Tufano S.1, Ignoto B.1, Quiccione M.S.1, Maiello M.R.1, Palumbo G.4, Esposito G.4, Morabito A.4, De Luca A.1, Frezzetti D.1

1 Cell Biology and Biotherapy Unit, Istituto Nazionale Tumori-IRCCS-Fondazione G. Pascale, Naples, Italy; 2 Clinical Pathology Unit, Azienda Sanitaria Locale, Potenza, Italy; 3 Microenvironment Molecular Targets Unit, Istituto Nazionale Tumori-IRCCS-Fondazione G. Pascale, Naples, Italy; 4 Department of Thoracic Medical Oncology, Istituto Nazionale Tumori-IRCCS-Fondazione G. Pascale, Naples

### **Identification of promising biomarkers to improve circulating tumor cells detection by exploiting the Image Stream flow cytometer**

**Montella A.**,1,2 Pascale E.,1,2 Benedetto M.,5 Pollasto F.,5 Aievola V.,1,2 Cerbone V.,2 Mugnano M.,3 Scalia G.,2 Damiano V.,4 Tagliaferri S.,5 Iolascon A.,1,2 Capasso M., 1,2 1,

1. Dipartimento di Medicina Molecolare e Biotecnologie Mediche, Università degli studi di Napoli Federico II, Napoli. 2, CEINGE Biotecnologie Avanzate Franco Salvatore, Napoli. 3, Dipartimento di Ingegneria Chimica, dei Materiali e della Produzione Industriale, Università degli studi di Napoli Federico II. 4, Oncologia Medica, Dipartimento ad Attività Integrata di Malattie Onco-Ematologiche, Anatomia Patologica e Malattie Reumatiche, AOU Federico II. 5, Kelyon S.r.l, Napoli

### **CXCR4-Targeting impact on lung metastatic niche**

**Rea G.** 1, Napolitano M. 1, Bello A. 1, D'Alterio C. 1, Santagata S.1, Camerlingo R. 2, ,Scala S.1

1. Microenvironment Molecular Targets, Istituto Nazionale Tumori - IRCCS - Fondazione G. Pascale, Napoli, Italy. 2. Cell Biology and Biotherapy Unit, Istituto Nazionale Tumori-IRCCS-Fondazione G. Pascale, 80131 Naples, Italy

### **Implementation of potency test in Anti-GD2 CAR T cell therapy: an overview**

**Trionfetti F.1**, Di Stefano A.1, Porzia A.1, D'Alicandro V.1, Crisantielli R.1, Bugianesi R.1, Gunetti M.1

1Department of Hematology/Oncology, Cell and Gene Therapy, Scientific Institute for Research, Hospitalization and Healthcare (IRCCS), Bambino Gesù Children's Hospital, Rome, Italy.

15:15-15:45 *Pausa caffè*

*e Visione Poster "obbligo di presenza di almeno un Autore"*

15:45-17:30 **SESSIONE PLENARIA**

(Aula Pio XI)

## **NUOVE FRONTIERE DELLA CITOMETRIA**

Moderatori: Alessandra Battaglia (Roma), Raffaele De Vita (Roma)

Introduzione

### **Single cell analysis: potenzialità e prospettive"**

Andrea Cossarizza (Modena)

Discussione

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

### **Lineage switch nella leucemia linfoblastica acuta: implicazioni per il monitoraggio della malattia residua minima in citofluorimetria**

Barbara Buldini (Padova)

Discussione

### **Epigenetica del cancro: dal laboratorio alla clinica e vice-versa**

Michele Maio (Siena)

Discussione

17:30 **Assemblea GIC**

(Aula Pio XI)

18:00 *Degustazione "Sapere i Sapori ... a Km 0"*

**Venerdì 13 giugno**

08:30-10:00 **SESSIONE PARALLELA EMATOLOGIA**

(Aula Pio XI)

### **ATTUALI SFIDE DELLA CITOMETRIA NELLA DIAGNOSTICA ONCOEMATOLOGICA**

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

Introduzione

#### **Analisi citometrica della Malattia Minima Misurabile: valutazione nella Hairy Cell Leukemia e problematiche nell'analisi del Liquido Cefalorachidiano**

Iole Cordone (Roma)

### **COMUNICAZIONI ORALI**

Moderatori: Giulia Scalia (Napoli), Silvestro Volpe (Avellino)

#### **Molecular alterations and leukemic subclones by flow cytometry: are we choosing the correct markers for minimal residual disease monitoring?**

**Gorrese M.**,<sup>1</sup> Bertolini A.,<sup>1,2</sup> Picone F.,<sup>1,2</sup> Serio B.,<sup>1</sup> Luponio S.,<sup>1</sup> Campana A.,<sup>1</sup> Della Corte A.M.,<sup>1</sup> Scala P.,<sup>1,2</sup> Morini D.,<sup>1</sup> Marcucci R.,<sup>1</sup> Langella M.,<sup>1</sup> De Leucio M.,<sup>1</sup> Selleri C.,<sup>1,2</sup> Giudice V.,<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Hematology and Transplant Center, University Hospital "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona", 84131 Salerno, Italy

<sup>2</sup> Department of Medicine, Surgery, and Dentistry, University of Salerno, 84081, Baronissi, Italy

#### **CD36 vs CD14 Monocyte Maturation Curve by Flow Cytometry as an Additional Specific and Sensitive Diagnostic Marker of Myelodysplastic Syndromes**

**Bertolini A.**,<sup>1,2</sup> Brescia A.,<sup>2</sup> Picone F.,<sup>1,2</sup> Ferrara I.,<sup>1</sup> Serio B.,<sup>1</sup> Luponio S.,<sup>1</sup> Campana A.,<sup>1</sup> Della Corte A.M.,<sup>1</sup> Scala P.,<sup>1,2</sup> Morini D.,<sup>1</sup> Marcucci R.,<sup>1</sup> Guariglia R.,<sup>1</sup> De Novellis D.,<sup>1</sup> Selleri C.,<sup>1,2</sup> Giudice V.,<sup>1,2</sup> Gorrese M.,<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Hematology and Transplant Center, University Hospital "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona", 84131 Salerno, Italy; <sup>2</sup> Department of Medicine, Surgery, and Dentistry, University of Salerno, 84081, Baronissi, Italy

#### **EpCAM phenotyping of non-hematological neoplasms in samples collected by minimally invasive techniques**

Doretto Paolo, Pivetta Eliana, Vattamattathil Kathreena, De Rosa Rita, Perlin Micol, Canal Liana, Buffo Gorgia, Corazza Tania, Lazzer Silvia, **Pratesi Chiara**

S.C Patologia Clinica, Azienda Sanitaria Friuli Occidentale, Pordenone

#### **A RARE CD4+ $\gamma\delta$ T-CELL LYMPHOMA WITH TCR V $\delta$ 1 RESTRICTION**

**Trombetta E.**<sup>1</sup>, Tornese M.<sup>1</sup>, Colombo FS.<sup>1</sup>, Cattaneo A.<sup>1</sup>, Fiori S.<sup>2</sup>, Croci GA.<sup>2</sup>, Porretti L.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IRCCS Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, Lab. Di Citofluorimetria, SC Patologia Clinica,

<sup>2</sup>IRCCS Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, SC Anatomia Patologica

08:30-10:00 **SESSIONE PARALLELA IMMUNOLOGIA**

(Aula Paolo VI)

### **LA CITOMETRIA IN IMMUNOLOGIA SPERIMENTALE E TRASLAZIONALE**

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

Introduzione

#### **I modelli murini come prima linea nella ricerca Immuno-Oncologica**

Daniela Fenoglio (Genova)

## COMUNICAZIONI ORALI

### **V52 T-cells response in people with Mpox infection: a three-month longitudinal assessment**

**Cimini E.**,<sup>1</sup> Tartaglia E.,<sup>2</sup> Messina F.,<sup>3</sup> Coppola A.,<sup>1</sup> Mazzotta V.,<sup>4</sup> Tempestilli M.,<sup>1</sup> Matusali G.,<sup>2</sup> Notari S.,<sup>1</sup> Mondì A.,<sup>4</sup> Prota G.,<sup>3</sup> Oliva A.,<sup>4</sup> Fontana C.,<sup>3</sup> Girardi E.,<sup>5</sup> Maggi F.,<sup>2</sup> Antinori A.,<sup>4</sup>

1. Laboratorio di Immunologia Cellulare e Farmacologia, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive “Lazzaro Spallanzani” IRCCS, Italy; 2. Laboratorio di Virologia e di Biosicurezza, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive “Lazzaro Spallanzani” IRCCS, Italy; 3. Laboratorio di Microbiologia e Biobanca, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive “Lazzaro Spallanzani” IRCCS, Italy ; 4. Unità HIV/AIDS, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive “Lazzaro Spallanzani” IRCCS, Italy; 5. Direzione Scientifica, Istituto Nazionale per le Malattie Infettive “Lazzaro Spallanzani” IRCCS, Italy

### **Characterization and monitoring of T cell-specific immune response in subjects at high risk of Monkeypox infection undergoing anti-smallpox vaccination**

**Maggi L.** 1, Vanni A. 1, Così Becchi V. 1, Lamacchia G.1, Salvati L. 1, Mazzoni A. 1-2, Capone M. 1, Matani F.1, Bartoli L. 1, Francalanci S. 1-2, Kiros S.T. 1-2, Lagi F.2, Bartoloni A. 1-2, Cosmi L. 1-2, Liotta F. 1-2, Sette A. 3, Annunziato F. 1-2

1 University of Florence, Florence, Italy; 2 AOUCareggi, Florence, Italy; 3 Center for Vaccine Innovation, La Jolla Institute for Immunology (LJI), La Jolla, CA 92037, USA

### **Development of a novel robust flow cytometry approach for identification of peripheral myeloid-derived suppressor cells of monocyte origin in cancer patients**

**Cimmino CA**<sup>1</sup>, Buzzonetti A<sup>1</sup>, Fossati M<sup>1</sup>, Ferrante A<sup>1</sup>, Schiavone V<sup>2</sup>, Vita E<sup>3</sup>, Fattorossi A<sup>1</sup>, Battaglia A<sup>2</sup>  
<sup>1</sup>Facility di Citometria, Fondazione Policlinico Universitario A.Gemelli, IRCCS, and <sup>2</sup>Scientific Directorate, Fondazione Policlinico Universitario A.Gemelli, IRCCS, Rome, Italy, <sup>3</sup>Medical Oncology, Università Cattolica del Sacro Cuore, Roma, Italy

### **Extracellular vesicles from acute t-cell leukemia alter monocyte function, leading to the inhibition of t-cell activation**

Sabatini A.,<sup>1</sup> **Ciolfi S.**,<sup>1</sup> Giannessi F.,<sup>1</sup> Grassi G.,<sup>2</sup> Percario Z.,<sup>1</sup> Affabris E.,<sup>1</sup> Sacchi A.,<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> Laboratorio di Virologia e Immunità antimicrobica, Dipartimento di Scienze, Università degli Studi Roma Tre. <sup>2</sup> Laboratorio di Immunologia Cellulare e Farmacologia, INMI Lazzaro Spallanzani, IRCCS, Roma

### **Role of PARP1-Mediated Modulation of HMGB1 during colitis: effects on the Treg / Th17 cell ratio**

**Vitali R.**,<sup>1</sup> Novelli F.,<sup>1</sup> Palone F.,<sup>1</sup> Cucchiara S.,<sup>2</sup> Stronati L.,<sup>3</sup> Pioli C.,<sup>1</sup>  
<sup>1</sup> ENEA, Division of Biotechnologies, Rome, Italy; <sup>2</sup> Sapienza University, Department of Maternal Infantile and Urological Sciences, Rome, Italy; <sup>3</sup> Sapienza University, Department of Molecular Medicine, Rome, Italy

10:00-10:30 *Pausa caffè*

*e Visione Poster “obbligo di presenza di almeno un Autore”*

10:30-13:00 **SESSIONE PLENARIA**

(Aula Pio XI)

## **LA CITOMETRIA TRASLAZIONALE DALLA RICERCA ALLA DIAGNOSTICA**

Moderatori: Rosa Chianese (Varese), Silvestro Volpe (Avellino)

Introduzione

### **Spotlight on technology: open ST spatial omics**

Elisabetta Ferretti (Roma)

Discussione

### **Approcci CAR-T per le patologie oncologiche e autoimmuni: le nuove sfide della terapia genica**

Concetta Quintarelli (Roma)

Discussione

## **Immunoterapia CAR-T nelle neoplasie linfoidi: dalla produzione al monitoraggio post-infusione**

Giuseppe Gaipa (Monza)

Discussione

### **LETTURA MAGISTRALE CONCLUSIVA**

Moderatori: Raffaele De Vita (Roma), Giuliano Mazzini (Pavia)

## **Sviluppo di nuove terapie immunologiche contro i tumori solidi**

Ruggero De Maria (Roma)

Conclusioni

R. Chianese (Varese), R. De Maria (Roma), R. De Vita (Roma),  
G. Mazzini (Pavia), C. Quintarelli (Roma)

12:45 Premiazione delle Schede di Valutazione della Conferenza

13:00 Light Lunch di saluto

### **PRESENTAZIONI POSTER**

#### **EMATOLOGIA**

- E1 Advantage of morphological and cytofluorimetric integration in aspiration cytologies and biopsies**  
Avino D., Di Rosa M., Esposito A., Iovino V., Di Palma A., Di Feo A., Califano C.  
U.O.C. Ematologia, P.O. Andrea Tortora, Pagani (SA), Italy
- E2 Morphological and immunophenotypic characteristics of systemic mastocytosis, a rare and underdiagnosed disease**  
Daniela Avino  
U.O.C. Ematologia, P.O. Andrea Tortora, Pagani (SA), Italy
- E3 Flow Cytometry Monitoring of CD4/CD8 lymphocytes in follicular lymphoma patients receiving anti-CD20 monoclonal antibodies as a predictive marker of cytomegalovirus reactivation**  
Bertolini A.,<sup>1,2</sup> Settembre L.,<sup>1,2</sup> Picone F.,<sup>1,2</sup> Pezzullo L.,<sup>1</sup> Gorrese M.,<sup>1</sup> Campana A.,<sup>1</sup> Rizzo M.,<sup>1</sup> Signorile G.,<sup>1</sup> Selleri C.,<sup>1,2</sup> Giudice V.,<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup> Hematology and Transplant Center, University Hospital "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona", 84131 Salerno, Italy  
<sup>2</sup> Department of Medicine, Surgery, and Dentistry, University of Salerno, 84081 Baronissi, Italy
- E4 Immunophenotypic Identification of Central Nervous System Involvement in Chronic Lymphocytic Leukemia by Multiparametric Flow Cytometry of Cerebrospinal Fluid Specimen**  
Bertolini A.,<sup>1,2</sup> Picone F.,<sup>1,2</sup> Pezzullo L.,<sup>1</sup> Gorrese M.,<sup>1</sup> Mettivier L.,<sup>1</sup> Guariglia R.,<sup>1</sup> Rizzo M.,<sup>1</sup> Campana A.,<sup>1</sup> Scala P.,<sup>1,2</sup> Coppola G.,<sup>3</sup> Selleri C.,<sup>1,2</sup> Giudice V.,<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup> Hematology and Transplant Center, University Hospital "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona", 84131 Salerno, Italy  
<sup>2</sup> Department of Medicine, Surgery, and Dentistry, University of Salerno, 84081, Baronissi, Italy  
<sup>3</sup> Transfusion Medicine Unit, University Hospital "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona", 84131 Salerno, Italy
- E5 Multiparametric Flow Cytometry Immunophenotyping of Cerebrospinal Fluid Specimens as diagnostic and prognostic tool of hematological malignancies**  
Bertolini A.,<sup>1,2#</sup> Picone F.,<sup>1,2#</sup> Rizzo M.,<sup>1</sup> Gorrese M.,<sup>1</sup> Pezzullo L.,<sup>1</sup> Serio B.,<sup>1</sup> Guariglia R.,<sup>1</sup> Campana A.,<sup>1</sup> Scala P.,<sup>1,2</sup> Marcucci R.,<sup>1</sup> Caputo A.,<sup>2,3</sup> Zeppa P.,<sup>2,3</sup> Selleri C.,<sup>1,2</sup> Giudice V.,<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup> Hematology and Transplant Center, University Hospital "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona", 84131 Salerno, Italy  
<sup>2</sup> Department of Medicine, Surgery, and Dentistry, University of Salerno, 84081 Baronissi, Italy  
<sup>3</sup> Anatomy Pathology Unit, University Hospital "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona", 84131 Salerno, Italy

- E6 ROR1 Expression Profiling in Aggressive B-Cell Non-Hodgkin Lymphomas: Flow Cytometry in the Era of Target Therapies – A Single-Center Experience**  
 Campana F. 2, Maiolo E. 2, Iacovelli C. 1, Puggioni P.L1, Schiaffini G. 2, D’Innocenzo S. 1, Toscano A. 1, Larocca L.M. 3, Hohaus S. 1,2, Bellesi S. 1  
 1- Ematologia, Dipartimento di Scienze di Laboratorio ed Ematologiche, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Rome, 00168,  
 2- Dipartimento di Scienze Radiologiche ed Ematologiche, Università Cattolica del Sacro Cuore Facoltà di Medicina e Chirurgia, Rome,  
 3. Patologia Oncoematologica, Dipartimento di Scienze della Salute della donna, del bambino e di sanità pubblica, Fondazione Policlinico Universitario A. Gemelli IRCCS, Rome, 00168, Italy
- E7 Advanced flow cytometry for phenotypic and functional characterization of aberrant CD3-CD4+ T cells: implication for the diagnostic workup of lymphocytic variant of HES (L-HES).**  
 Manuela Capone 1,2, Anna Vanni 1, Alessio Mazzoni 1,3, Laura Maggi 1, Giulia Lamacchia 1, Francesca Matani 1, Lucia Bartoli 1, Roberto Semeraro 1, Roberto Caporale 3, Benedetta Peruzzi 3, Sara Bencini 3, Sara Pratesi 3, Lorenzo Cosmi 1,3, Francesco Liotta 1,3, Francesco Annunziato 1,3  
 1 Department of Experimental and Clinical Medicine, University of Florence, Florence, Italy ;  
 2 Department of Laboratory Medicine, Azienda Usl Toscana Centro, Florence, Italy.; 3 Flow cytometric and immunological diagnostics, AOUCareggi, Florence, Italy
- E8 Optimization of CD34+ Hematopoietic Stem Cell Isolation in High White Blood Cell Count Samples**  
 Castaldi S.G.1,2, \*, Foglia A.1, Di Giacomo G.1, Moccia I.1, Annarumma F.1, Corradino M.1, Ardia P.1, Benincasa M.1, Todisco A.1, Giudice V.1,2, Gorrese M.1, Campana A.1, Vaccaro E. 1, Apicella S. 1, Coppola G 1,2,#.  
 1 Hematology and Transplant Center, University Hospital "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona", 84131 Salerno, Italy.  
 2 Department of Medicine, Surgery, and Dentistry, University of Salerno, 84081 Baronissi, Italy.
- E9 CD56+ CD3+ lymphocytes as a marker in MDS management – AORN caserta experience**  
 I. Cimmino1, C. Pascariello1, Luongo A.1, Della Monica S.1, Capasso C.1, S. A. Raimondi1  
 1Immunohematology and Transfusion Medicine, AORN Caserta, Italy
- E10 Use of anti-TRBC1 antibody (JOVI.1) to detect lymphocyte T clonality and its correspondence with TCR rearrangement**  
 Ciraolo A.,1 Lupo C.,1 Morabito L.,1 Pugliano M.T.,1 Lauricella C.,2 Scampini L.,1 Ripamonti R.,1 Lumia D.,1 Mandrisi C.,1 Barba C.,1 Volpato E.1  
 1. Laboratorio di Citometria - Servizio di Immunologia e Medicina Trasmfusionale, ASSTG.O.M. Niguarda, Milano.  
 2. Anatomia Patologica - Diagnostica molecolare somatica, ASST G.O.M. Niguarda, Milano.
- E11 The role of flow cytometry in predicting relapse in pemphigus vulgaris patients treated with rituximab: a retrospective study**  
 Fiore A.1, Liguori S.2, Adamo D.2, Ruoppo E.2, Manganiello R.1, Mauriello L.1, Mignogna M.D.2, Leuci S.2, Scalia G.1  
 1Clinical and Experimental Cytometry Unit, Centre for Advanced Biotechnology Franco Salvatore, CEINGE, Naples, Italy  
 2Department of Neuroscience, Reproductive and Odontostomatological Sciences, University of Naples Federico II, Naples, Italy
- E12 CD56 expression modulates NAD+ metabolic landscape and predicts sensitivity to anti-CD38 therapies in multiple myeloma**  
 Giorgetti G., 1,2,3; Maroto-Martin E., 3; Soncini D., 1; Fenoglio D., 2,4; Becherini P., 1,2; Benzi A., 5; Ravera S., 2,5; Traverso I., 1; Ladisa F., 1,2,3; Lai F., 2; Rivoli G., 6; Truffelli D., 1; Nahimana A., 7; Cagnetta A., 1,2; Guolo F., 1,2; Uras C.R.M., 3; Schavougouidze A., 3,8; Fong Ng J., 3,9; Nencioni A., 2,10; Bruzzone S., 2,5; Munshi N.C., 3,11; Lemoli R.M., 1,2; Fulciniti M., 3,11; Cea M., 1,2  
 1Clinic of Hematology, Dep. of Internal Medicine and Medical Specialties (DiMI), University of Genoa; 2IRCCS Osp. Pol. San Martino, Genoa; 3Jerome Lipper Multiple Myeloma Center, Dep. of Medical Oncology, Dana Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts; 4Centre of Excellence for Biomedical Research, Dep. of Internal Medicine, University of Genoa.; 5Dep. of Experimental Medicine (DIMES), University of Genoa; 6Hematology and Hematopoietic Stem Cell T transplantation Unit, IRCCS Osp. Pol. San Martino, Genoa, Italy; 7Service and Central Laboratory of

Hematology, Dep. of Oncology and Medical Laboratory and Pathology, Lausanne University Hospital and Univ. of Lausanne, Switzerland; 8Toulouse Cancer Research Center-Oncopole, Toulouse University, Toulouse, France; 9Univ. of Massachusetts Amherst; 10Geriatrics Clinic, Dep. of Internal Medicine and Medical Specialties (DIMI), University of Genoa; 11VA Boston Healthcare System (Boston, MA)

- E13 Platelet CD62 expression correlates with aggregation analysis in the identification of increased thrombotic risk of patients affected by myeloproliferative neoplasms**  
Vittorio Emanuele Muccio<sup>1</sup>, Alessandro Morotti<sup>2</sup>, Cristina Barale<sup>2</sup>, Marisa Pautasso<sup>1</sup>, Isabella Russo<sup>2</sup>  
1. Laboratorio Citofluorimetria, S.C.D.O. Laboratorio Analisi Chimico Cliniche e Microbiologiche, A.O.U. San Luigi Gonzaga, Orbassano, Torino  
2. Dipartimento di Scienze Cliniche e Biologiche, AOU San Luigi Gonzaga, Orbassano, Torino.
- E14 Label-Free Characterization of White Blood Cells Using Holographic Quantitative Phase Imaging in Flow Cytometry**  
Mugnano M.,<sup>1</sup> Pirone D.,<sup>2</sup> Behal J.,<sup>3,4</sup> Wang Z.,<sup>1,2</sup> Cerbone V.,<sup>5</sup> Giugliano G.,<sup>2,3</sup> Licitra F.,<sup>2</sup> Montella A.,<sup>5,6</sup> Scalia G.,<sup>5</sup> Capasso M.,<sup>5,6</sup> Iolascon A.,<sup>5,6</sup> Mari S.,<sup>7</sup> Ferranti F.,<sup>7</sup> Bianco V.,<sup>2</sup> Memmolo P.,<sup>2</sup> Miccio L.,<sup>2</sup> Ferraro P.,<sup>2</sup> Maffettone P.L.<sup>1</sup>  
1 DICMaPI, Department of Chemical, Materials and Production Engineering, University of Naples "Federico II", Piazzale Tecchio 80, 80125 Napoli,  
2 CNR-ISASI, Institute of Applied Sciences and Intelligent Systems "E. Caianiello", Via Campi Flegrei 34, Pozzuoli, Napoli, Italy; 3 Department of Mathematics and Physics University of Campania, Caserta 81100, Italy; 4 Department of Optics, Faculty of Science, Palacký University, 17. listopadu 12, 77146 Olomouc, Czechia; 5 CEINGE Biotechnologie Avanzate Franco Salvatore, Naples, Italy; 6 Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University of Naples "Federico II", Napoli, Italy 7 Italian Space Agency (ASI), Rome, Italy
- E15 Flow Cytometry as a preventive/predictive method for acute erythroid leukemia: a case report**  
C. Pascariello<sup>1</sup>, I. Cimmino<sup>1</sup>, G. Monaco<sup>2</sup>, Luongo A.<sup>1</sup>, Della Monica S.<sup>1</sup>, Capasso C.<sup>1</sup>, S. A. Raimondi<sup>1</sup>  
1Immunohematology and Transfusion Medicine, AORN Caserta, Italy;  
2Hematology Unit, AORN Caserta, Italy
- E16 Dual T-cell constant  $\beta$  chain TRBC1 and TRBC2 staining for the identification of reference ranges in body fluids by flow cytometry**  
Picone F.,<sup>1,2</sup> Bertolini A.,<sup>1,2</sup> Gorrese M.,<sup>1</sup> Campana A.,<sup>1</sup> Guariglia R.,<sup>1</sup> Serio B.,<sup>1,2</sup> Vecchione C.,<sup>2,4</sup> Carrizzo A.,<sup>2,4</sup> Selleri C.,<sup>1,2</sup> Giudice V.,<sup>1,2</sup>  
1 Hematology and Transplant Center, University Hospital "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona", 84131 Salerno, Italy  
2 Department of Medicine, Surgery, and Dentistry, University of Salerno, 84081, Baronissi, Italy  
3 Vascular Pathophysiology Unit, IRCCS Neuromed, Pozzilli, Italy
- E17 Flow Cytometry biomarkers of disease progression from monoclonal gammopathy of uncertain significance to multiple myeloma**  
Scala P.,<sup>1,2#</sup> Bertolini A.,<sup>1,2#</sup> De Novellis D.,<sup>1,2#</sup> Picone F.,<sup>1,2</sup> Della Sala B.,<sup>1,2</sup> Gorrese M.,<sup>1</sup> Campana A.,<sup>1</sup> Fontana R.,<sup>1</sup> Rizzo M.,<sup>1</sup> Malandrini A.,<sup>1,2</sup> Selleri E.,<sup>1,2</sup> Giudice V.,<sup>1,2</sup>  
1 Hematology and Transplant Center, University Hospital "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona", 84131 Salerno, Italy  
2 Department of Medicine, Surgery, and Dentistry, University of Salerno, 84081 Baronissi, Italy
- E18 Immature forms of low-density granulocytes are increased in hematological conditions**  
Scala P.,<sup>1,2</sup> Bertolini A.,<sup>1,2</sup> Picone F.,<sup>1,2</sup> Della Corte A.M.,<sup>1</sup> Ferrara I.,<sup>1</sup> Gorrese M.,<sup>1</sup> Campana A.,<sup>1</sup> Serio B.,<sup>1</sup> Martorelli M.C.,<sup>1</sup> Buonanno M.T.,<sup>1</sup> Luponio S.,<sup>1</sup> Morini D.,<sup>1</sup> Selleri E.,<sup>1,2</sup> Giudice V.,<sup>1,2</sup>  
1 Hematology and Transplant Center, University Hospital "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona", 84131 Salerno, Italy  
2 Department of Medicine, Surgery, and Dentistry, University of Salerno, 84081 Baronissi, Italy
- E19 A rare case of T-large granular lymphocytic leukemia: detection of two pathological T-cell clones by flow cytometry.**  
Soda M.,<sup>1</sup> Libonati R.,<sup>1</sup> Telesca A.,<sup>1</sup> Statuto T.,<sup>1</sup> Valvano L.,<sup>1</sup> D'Auria F.,<sup>2</sup> D'Arena G.,<sup>3</sup> Pietrantuono G.,<sup>4</sup> Villani O.,<sup>4</sup> Giovanna Mansueto G.,<sup>4</sup> D'Agostino S.,<sup>4</sup> Massimo Dante Di Somma M.D.,<sup>5</sup> and Vilella R.,<sup>1</sup>.  
1 Lab. of Clinical Research and Advanced Diagnostics, Centro di Riferimento Oncologico della

Basilicata (IRCCS-CROB), Rionero in Vulture, Italy. 2 Lab. of Clinical Pathology, Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata (IRCCS-CROB), Rionero in Vulture, Italy. 3 Immunohematology and transfusional medicine, "S. Luca" Hospital, ASL Salerno, Vallo della Lucania, Italy. 4 Hematology and Stem Cell Transplantation Unit, Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata (IRCCS-CROB), Rionero in Vulture, Italy. 5 Anatomical Pathology Department, Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata (IRCCS-CROB), Rionero in Vulture, Italy

**E20 Relevance of bcma immunohistochemical expression by bone marrow plasma cells in multiple myeloma**

Tarasco A.1, D'Arena G.1, Calice G.2, Pietrantuono G.3, Ciamarra M.1, Mansueto G.3, Villani O.3, D'Agostino S.3,, Di Somma M.D.4

1 U.O.S.D. Immunoematologia e Medicina Trasfusionale, Ospedale "San Luca", Vallo della Lucania, ASL Salerno; 2 Laboratorio di Ricerca Preclinica e Traslazionale, IRCCS Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata, Rionero in Vulture; 3. U.O di Ematologia e Trapianto di Cellule Staminali, IRCCS Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata, Rionero in Vulture; 4 U.O. di Anatomia Patologica, IRCCS Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata

**E21 Implementation of a 12-color flow cytometry panel for extensive immunophenotyping of T-cell malignancies**

Toma M.1, Scodes M.L. 1, Barbeta F. 1, Agnelli L. 1, Bozzi F.L.1, Lorenzini D. 1, Doderò A. 2, Pruneri G. 1, Aiello A.1

1S.C. Anatomia Patologica 2, Dipartimento Servizi e Diagnostica Avanzata; 2S.C. Ematologia, Dipartimento di Oncologia ed Ematologia Fondazione IRCCS Istituto Nazionale dei Tumori, Milano, Italy

**E22 Flow Cytometry evaluation of response to luspatercept in transfusion-dependent thalassemia**

Tornese M.1, Trombetta E.1, Colombo FS.1, Panziera DL.2, Scaramellini N.2, Brancaleoni V.2, Porretti L.1, Motta I.2

1 IRCCS Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, Lab. di Citofluorimetria, SC Patologia Clinica, 2 IRCCS Fondazione Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico di Milano, SC Anatomia Patologica

## IMMUNOLOGIA

**I1 Flow cytometric evaluation of activated CD8+ lymphocytes in a case of EBV-induced hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH): case reports**

Bassi M.1, Magrini E.1, Selva P.1, Alvisi R.1, Conti F.2, Baldini L.3, Mancini R.1

1 LUM Laboratory Metropolitan of Bologna, Italy; 2 Department of Medical and Surgical Sciences(DIMEC), University of Bologna, Italy.

3Pediatric Unit, IRCCS Azienda Ospedaliero-Universitaria di Bologna, Bologna, Italy

**I2 Impact of Siponimod on Lymphocyte Subsets in Multiple Sclerosis analyzed by Flow Cytometry**

Bruno C.1, Luca Spiezia A.2, Petracca M.3, Caliendo D.2, Moccia M.4, Fiore A.1, Cerbone V.1, Lanzillo R.2, Brescia Morra V.2, Carotenuto A.2, Scalia G.1

1 Clinical and Experimental Cytometry Unit, Centre for Advanced Biotechnology Franco Salvatore, CEINGE, Federico II University, Naples, Italy; 2 Multiple Sclerosis Clinical Care and Research Centre, Department of Neuroscience, Reproductive Science and Odontostomatology, Federico II University, Naples, Italy; 3 Department of Human Neurosciences, Sapienza University, Rome, Italy;

4 Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnology, Federico II University, Naples, Italy

**I3 B-cell phenotyping in psoriatic arthritis: a possible dynamism between circulating and tissue compartments**

Campobasso D.1, Di Mario C. 1, Bruno D.2, Coletto L.3, Perniola S.4, D'Agostino M.A.5, Alivernini S.5, Toluoso B.4,6, Gremese E.4,6

1Gemelli Science and Technology Park (G-STeP), Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS; 2Università di Verona;

3University of Glasgow; 4Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS; 5UOC di Reumatologia; 6Rheumatology and Clinical Immunology, IRCCS Humanitas Research Hospital

**I4 TR3-56 AND TREG regulatory T cell subsets as potential indicators of graft tolerance control in kidney transplant recipients**

Carriero F.1, Rubino V. 2, Palatucci A.T. 1, Giovazzino A.2, Salemi F. 3, Carrano R. 3, Sabbatini M.4, Ruggiero G. 2, Terrazzano G. 1

1Dip. di Scienze della Salute, Univ. della Basilicata, 85100 Potenza, Italy. 2Dipartimento di Scienze Mediche Traslazionali, Università di Napoli "Federico II", 80131 Napoli, Italy. 3Percorso Clinico Assistenziale in Nefrologia e Trapianto Renale, Az. Osp. Universitaria "Federico II", 80131 Napoli, Italy. 4 Dip. di Sanità Pubblica, Sezione di Nefrologia, Univ. di Napoli "Federico II", 80131 Napoli, Italy

- 15 **Umbilical cord blood Cytomegalovirus serostatus correlates with different NK cell subsets: preliminary findings**  
Cianflone Alessandra<sup>1</sup>, Madalese Donato<sup>3</sup>, Mirabelli Peppino<sup>1</sup>, Maisto Giovanna<sup>4</sup>, Rossitti Emanuela<sup>2</sup>, Nappo Stefania<sup>3</sup>, Penta de Vera D'Aragona Roberta<sup>3</sup>, Tambaro Francesco Paolo<sup>2</sup>.  
1Lab. di Ricerca Clinica e Biobanca, Dip. di Oncologia, Ematologia e Terapie Cellulari, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli, 2Trapianto di Cellule Ematopoietiche e Terapie Cellulari, Dip. di Oncologia, Ematologia e Terapie Cellulari, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli, 3Ba.S.C.O., Manipolazione cellulare e Immunogenetica, Dip.di Oncologia, Ematologia e Terapie Cellulari, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli, 4Medicina Trasfusionale, Dip. di Oncologia, Ematologia e Terapie Cellulari, AORN Santobono-Pausilipon, Napoli, Italia
- 16 **T cells profile in persons living with HIV (PLWH) with Progressive Multifocal Leucoencefalopathy (PML)**  
Cimini E.,<sup>1</sup> Chiuchiarelli M.,<sup>2</sup> Tartaglia E.,<sup>3</sup> Notari S.,<sup>1</sup> Casetti R.,<sup>1</sup> Mondì A.,<sup>4</sup> Cecilia F.,<sup>4</sup> Frondizi F.,<sup>2</sup> Matteini E.,<sup>2</sup> Torti C.,<sup>2-5</sup> Matusali G.,<sup>3</sup> Maggi F.,<sup>3</sup> Antinori A.,<sup>4</sup> Cingolani A.,<sup>2-5</sup> Pinnetti C.<sup>4</sup>  
1 Istituto Nazionale per le Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani IRCCS, Lab. Cellular Immunology and Pharmacology, Rome, Italy; 2 Fondazione Policlinico Universitario Agostino Gemelli IRCCS, Dip. di Scienze Mediche e Chirurgiche, Rome, Italy; 3 Istituto Nazionale per le Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani IRCCS, Lab. of Virology, Rome, Italy; 4 Istituto Nazionale per le Malattie Infettive Lazzaro Spallanzani IRCCS, Clinical and Research Infectious Diseases Department, Rome, Italy; 5 Univ. Cattolica del Sacro Cuore, Dip. di Sicurezza e Bioetica – Sezione di Malattie Infettive, Rome Italy
- 17 **Enhancement of electroporated Covid-19 DNA vaccine immunogenicity by a plant secretory sequence**  
O.C. Demurtas<sup>1</sup>, F. Novelli<sup>1</sup>, D. Triggiani<sup>1</sup>, C. Merla<sup>1</sup>, E. Pasquali<sup>1</sup>, S. Massa<sup>2</sup>, R. Franconi<sup>1</sup>, C. Pioli<sup>1</sup>.  
1Division of Biotechnologies, ENEA, Rome, Italy; olivia.demurtas@enea.it  
2Division of Sustainable Agrofood Systems, ENEA, Rome, Italy
- 18 **The application of flow cytometry to assess the sepsis heterogeneity: the contribution of immunophenotype and extracellular vesicles in disease progression**  
Fanelli M.<sup>1</sup>, Petrone V.<sup>1</sup>, Chirico R.<sup>1</sup>, Alessio G. <sup>2,3</sup>, Barbaresi M.<sup>2,3</sup>, Iannetta M.<sup>2,3</sup>, Cotugno N.<sup>2,3</sup>, Sarmati L. <sup>2,3</sup>, Grelli S.<sup>1,4</sup>, Matteucci C.<sup>1</sup>, Minutolo A.<sup>1</sup>  
1. Department of Experimental Medicine, University of Rome Tor Vergata, Rome, 00133, Italy; 2. Infectious Diseases Clinic, Policlinic of Tor Vergata, Rome, 00133, Italy; 3. Department of Systems Medicine, University of Rome Tor Vergata, Rome, 00133, Italy; 4. Virology Unit, Policlinic of Tor Vergata, Rome, 00133, Italy.
- 19 **Characterization of T cells subsets supporting Chronic Lymphocytic Leukemia cell survival/clonal expansion: a search for novel prognostic-predictive factors and therapeutic targets**  
Ferrero F<sup>1,2</sup>, Nano E.,<sup>1</sup> Bertola N<sup>1,1,2</sup>, Barducchi F<sup>1</sup>, Colombo M<sup>1</sup>, Massara R<sup>1</sup>, Capra C<sup>1</sup>, Altosole T<sup>1</sup>, Damele L<sup>3</sup>, Loiacono F<sup>3</sup>, Reverberi D<sup>1</sup>, Ibatì A<sup>1</sup>, Angelucci E<sup>1</sup>, Ferrarini M<sup>2</sup>, Morabito F<sup>3</sup>, Neri A,<sup>3</sup> Filaci G<sup>1,5</sup>, Fais F<sup>1,2</sup>, enoglio D <sup>1,5</sup>and Cutrona G<sup>1</sup>.  
fabiana.ferrero@edu.unige.it  
1IRCCS Ospedale Policlinico San Martino Genoa-Italy. 2 University of Genoa, Genoa-Italy, Department of Experimental Medicine. 3 Gruppo Amici Dell'Ematologia Foundation-GrADE, Reggio Emilia, Italy. 4 Azienda USL-IRCCS di Reggio Emilia, Reggio Emilia, Italy, Scientific Directorate, 5 University of Genoa, Genova, Italy, Department of Internal Medicine
- 110 **RASopathies and alterations of the immune system: systematic evaluation and clinical consequences**  
Federica Gentiluomo<sup>1</sup>, Maria Anna Siano<sup>1</sup>, Antonio Guerriero<sup>1</sup>, Federica D'Agostino<sup>1</sup>, Roberta Russo<sup>2</sup>, Daniela Concolino <sup>3</sup>, Simona Sestito<sup>3</sup>, Giuseppe Coppola<sup>4</sup>, Daniela Melis<sup>1</sup>  
1Department of Medicine, Surgery and Dentistry "Scuola Medica Salernitana", Section of Pediatrics,

University of Salerno, Via Salvador Allende, 43 84081 Baronissi (Salerno), Italy; 2Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University of Federico II of Naples, Naples, Italy. CEINGE; 3Pediatric Unit, AOU Mater Domini Catanzaro (Italy); 4Oncohematology department AOU San Giovanni di Dio e Ruggi D'Aragona (Salerno) Italy

- 111 **SARS-COV-2 spike protein and plasma from COVID-19 patients induce extracellular traps by myeloid-derived suppressor cells**  
Grassi G.1, Gili S.1, Casetti R.1, Percario Z.2, Tumino N 3, Vacca P.3, Notari S.1, Bordoni V.4, Cimini E.1, Cristofanelli F.1, Rubino D.1, Nonini F.5, Affabris E.2, Marchioni L.1, Agrati C.4, Sacchi A.2.  
1Laboratorio di Immunologia Cellulare e Farmacologia Istituto Nazionale per le Malattie Infettive "Lazzaro Spallanzani"  
2Roma Tre University Department of Science; 3 Immunology Research Area Innate Lymphoid Cells Unit IRCCS Bambino Gesù Children's Hospital Unit of Pathogen Specific Immunity Department of Pediatric Hematology and Oncology IRCCS Ospedale Pediatrico Bambino Gesù
- 112 **Patients derived organoids (PDOs) Immune Cells co-culture in ovarian cancer: the role of Tumor microEnvironment (PICTURE)**  
Mastrogiovanni S.,1 Ciucci A.,1 Di Mario C.,2 Battaglia A.,1 Buttarelli M.,1 Camarda F.,3 Cesari E.,3 Alivernini S.,4 Sette C.,5 Nero C.,3.  
1Università Cattolica del Sacro Cuore, Dipartimento Universitario Scienze della Vita e Sanità Pubblica, Sezione di Ginecologia ed Ostetricia, Rome, Italy; 2Fondazione Policlinico A. Gemelli IRCCS, Gemelli Science and Technology Park G-STeP, Rome, Italy; 3Fondazione Policlinico A. Gemelli IRCCS, Dipartimento della Salute della Donna e del Bambino e di Sanità Pubblica - UOC Ginecologia Oncologica, Rome, Italy 4Fondazione Policlinico A. Gemelli IRCCS, Dipartimento di Scienze dell'Invecchiamento, Ortopediche e Reumatologiche - UOC Reumatologia, Rome, Italy; 5Università Cattolica del Sacro Cuore, Dipartimento di Neuroscienze - Sezione di Anatomia Umana, Rome, Italy.
- 113 **Effects of radiotherapy and immune checkpoint inhibitors on mouse SHH medulloblastoma-infiltrating lymphocytes**  
Flavia Novelli<sup>1</sup>, Manolo Sambucci<sup>2</sup>, Daniela Giovannini<sup>1</sup>, Adriano Carboniero<sup>1</sup>, Simonetta Pazzaglia<sup>1</sup>, Luca Battistini<sup>2</sup>, Claudio Pioli<sup>1</sup>  
1Division of Biotechnologies, ENEA, Rome, Italy;  
2Neuroimmunology Unit, Santa Lucia Foundation IRCCS, Rome, Italy.
- 114 **Alterations in circulating T-cell subpopulations reflect disease activity in Ulcerative Colitis**  
Petito V.1, Rumi G.2, Profeta F.1, Masi L.1, Emoliv.1, Troisi S.1, Varuolo M.1, Capobianco I.2, Turchini L.2, Laterza L.2, Lopetuso L.R.2, Gasbarrini A.2, Scaldaferrì F.2  
1. CeMAD Translational Research Laboratories, Digestive Disease Center (CeMAD), Department of Medical and Surgical Sciences, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli" IRCCS, Rome, Italy; 2. IBD unit, CeMAD-Digestive Disease Center, Department of Medical and Surgical Sciences, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli" IRCCS, Rome
- 115 **Increased circulating NKT cells in patients with HCC: experience from a tertiary Italian center**  
Petito V.,<sup>1</sup> Huqi E.,<sup>1,2</sup> Emoli V.,<sup>1</sup> Creta E.,<sup>2</sup> Cerrito L.,<sup>2</sup> Palozzi M.,<sup>2</sup> Stella L.,<sup>2</sup> Gasbarrini A.<sup>1,2,3</sup> Ponziani F.R. <sup>1,2,3</sup>  
1. CeMAD Translational Research Laboratory, Digestive Disease center, Department of Medical and Surgical sciences, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli", IRCCS, Rome, Italy. 2. Liver Unit-CEMAD, Digestive Disease center, Internal Medicine and Gastroenterology, Fondazione Policlinico Universitario "A. Gemelli", IRCCS, Rome, Italy. 3. Department of Translational Medicine, Università Cattolica del Sacro Cuore, Largo F. Vito 1, 00168, Rome, Italy
- 116 **Flow cytometric immunological profiling of Sjögren's Syndrome patients is characterized by high prevalence of terminally differentiated and mature B and Natural Killer cells**  
Picone F.,<sup>1,2</sup> Bertolini A.,<sup>1</sup> Cardamone C.,<sup>2,3</sup> Vitale P.,<sup>2,3</sup> Scala P.,<sup>1,2</sup> Gorrese M.,<sup>1</sup> Campana A.,<sup>1</sup> Coppola G.,<sup>4</sup> Vecchione C.,<sup>2,5</sup> Carrizzo A.,<sup>2,5</sup> Selleri C.,<sup>1,2</sup> Triggiani M.,<sup>2,3</sup> Giudice V.<sup>1,2</sup>  
1 Hematology and Transplant Center, University Hospital "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona", 84131 Salerno, Italy; 2 Department of Medicine, Surgery, and Dentistry, University of Salerno, 84081 Baronissi, Italy; 3 Immunology and Rheumatology Unit, University Hospital "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona", 84131 Salerno, Italy; 4 Trasfusion Medicine Unit, Unit, University Hospital "San Giovanni di Dio e Ruggi d'Aragona", 84131 Salerno, Italy 5 Vascular Pathophysiology Unit, IRCCS Neuromed, Pozzilli, Italy

- I17 Lymphocyte Subset Perturbations during Tocilizumab Treatment in a Rare ROSAH Syndrome Patient**  
 Picone F.,<sup>1,2</sup> Moscato P.,<sup>3</sup> Bertolini A.,<sup>1,2</sup> Gorrese M.,<sup>1</sup> Campana A.,<sup>1</sup> Scala P.,<sup>1,2</sup> Serio B.,<sup>1,2</sup> Vecchione C.,<sup>2,4</sup> Carrizzo A.,<sup>2,4</sup> Selleri C.,<sup>1,2</sup> Giudice V.,<sup>1,2</sup>  
 1 Hematology and Transplant Center, University Hospital “San Giovanni di Dio e Ruggi d’Aragona”, 84131 Salerno, Italy. 2 Department of Medicine, Surgery, and Dentistry, University of Salerno, 84081, Baronissi, Italy. 3 Rheumatology Unit, University Hospital “San Giovanni di Dio e Ruggi d’Aragona”, 84131 Salerno, Italy. 4 Vascular Pathophysiology Unit, IRCCS Neuromed, Pozzilli, Italy
- I18 Suspected Autoimmune Lymphoproliferative Syndrome (ALPS): a case report**  
 Rumi G.<sup>1</sup>, Petito V.<sup>2</sup>, Profeta F.<sup>2</sup>, Masi L.<sup>2</sup>, Del Gaudio A.<sup>1</sup>, Gasbarrini A. <sup>1,2</sup>, Scaldaferrì F.<sup>1,2</sup>.  
 1. IBD Unit-CEMAD, Digestive Disease center, Internal Medicine and Gastroenterology, Fondazione Policlinico Universitario “A. Gemelli”; IRCCS, Rome, Italy; 2. CeMAD Translational Research Laboratory, Digestive Disease center, Department of Medical and Surgical sciences, Fondazione Policlinico Universitario “A. Gemelli”; IRCCS, Rome, Italy
- I19 Improvement of Amyotrophic Lateral Sclerosis disease progression in model mice by knocking down or in vivo inhibition of metabotropic glutamate receptor 5**  
 C. Usai<sup>1</sup>, M. Milanese<sup>2,3</sup>, T. Bonifacino<sup>2</sup>, C. Torazza<sup>2</sup>, F. Provenzano<sup>2</sup>, S. Ravera<sup>2</sup>, C. Rebosio<sup>2</sup>, M. Balbi<sup>2</sup>, G. Bonanno<sup>2,3</sup>  
 1Inst. of Biophysics, Nat. Res. Council, Genoa, Italy; 2Dept. of Pharmacy, Unit of Pharmacology and Toxicology, University of Genoa, Genoa, Italy; 3Centre of Excellence for Biomed. Res., University of Genoa, Genoa, Italy
- I20 Potential prognostic markers in diffuse large B cell lymphoma: a study of peripheral immune cells**  
 Luciana Valvano<sup>1</sup>, Michela Soda<sup>1</sup>, Rocchina Vilella<sup>1</sup>, Rossana Libonati<sup>1</sup>, Alessia Telesca<sup>1</sup>, Fiorella D’Auria<sup>2</sup>, Giuseppe Pietrantuono<sup>3</sup>, Giovanna Mansueto<sup>3</sup>, Oreste Villani<sup>3</sup>, Simona D’Agostino<sup>3</sup>, Giovanni Calice<sup>4</sup> and Teodora Statuto<sup>1</sup>.  
 1Laboratory of Clinical Research and Advanced Diagnostics, Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata (IRCCS-CROB), Rionero in Vulture, Italy. 2Laboratory of Clinical Pathology, Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata (IRCCS-CROB), Rionero in Vulture, Italy.  
 3Hematology and Stem Cell Transplantation Unit, Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata (IRCCS-CROB), Rionero in Vulture, Italy  
 4Laboratory of Preclinical and Translational Research, Centro di Riferimento Oncologico Basilicata (IRCCS-CROB), Rionero in Vulture, Italy

## ONCOLOGIA

- O1 A flow cytometric methodology to study dna repair mechanisms that mediate resistance to chemotherapy**  
 Casanova E.,<sup>1</sup> Prelli M.,<sup>1,2</sup> De Bacco F.,<sup>1,2</sup> Reato G.,<sup>1,2</sup> Orzan F.,<sup>1,2</sup> and Boccaccio C.<sup>1,2</sup>  
 1Candiolo Cancer Institute, FPO-IRCCS, Laboratory of Cancer Stem Cell Research, 10060 Candiolo, Turin, Italy - 2University of Turin Medical School, Department of Oncology, 10060 Candiolo, Turin, Italy
- O2 Hypoxia-Induced Chromatin Decondensation and G2/M Cell Cycle Arrest**  
 Cavallo M.<sup>1</sup>, Casali C.<sup>1</sup>, Giulini L.<sup>1</sup>, Diaf A.<sup>1</sup>, Pelloni E.<sup>1</sup>, Milanese G.<sup>1</sup>, Mazzini G.<sup>2</sup>, Biggiogera M.<sup>1</sup>  
 1. Laboratory of Cell Biology and Neurobiology, Department of Biology and Biotechnology “L. Spallanzani”, University of Pavia, Italy.  
 2. Institute of Molecular Genetics, National Research Council (IGM-CNR), Italy
- O3 Pomegranate extract obtained by hydrodynamic cavitation as an adjuvant in HPV cervical cancer-related therapies**  
 Chirico R.<sup>1</sup>, Fanelli M.<sup>1</sup>, Petrone V.<sup>1</sup>, Di Marco G.<sup>2</sup>, Canini A.<sup>2</sup>, Criscuolo A.<sup>3</sup>, Ciotti M. <sup>4</sup>, Gismondi A.<sup>2</sup>, Grelli S.<sup>1,4</sup>, Meneguzzo F.<sup>5</sup>, Matteucci C.<sup>1</sup>, Minutolo A.<sup>1</sup>.  
 1. Department of Experimental Medicine, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy; 2. Department of Biology, University of Rome 'Tor Vergata', via della Ricerca Scientifica 1, Rome, Italy; 3. Department of Obstetrics and Gynecology, Policlinico Tor Vergata, University of Rome 'Tor Vergata', Rome, Italy; 4. Virology Unit, Policlinic of Tor Vergata, Rome, Italy; 5. Institute of Bioeconomy, National Research Council (CNR), via Madonna del Piano 10, Sesto Fiorentino, Italy

- O4 **Electrochemotherapy: a new strategy against solid tumors**  
 Condello M.,<sup>1</sup> Vona R.,<sup>2</sup> Meschini S.,<sup>1</sup> Spugnini E.P.,<sup>3</sup>  
 1National Institute of Health, National Center for Drug Research and Evaluation, Rome, Italy  
 2National Institute of Health, National Center for Gender-Specific Medicine, Rome, Italy, 3Biopulse Srl, Rome
- O5 **The Central Nervous System in Osteogenesis Imperfecta: unravelling hippocampal changes in the Brlt1<sup>-/-</sup> mouse model**  
 Lugli E. 1, Besio R. 2, Gaiaschi L. 1, Pelloni E. 1, Mazzini G. 3, Gola F. 1, Perez Franco W. 2, Forlino A. 2, De Luca F. 1, Bottone M.G. 1  
 1 Lab. Biologia Cellulare e Neurobiologia, Dip. di Biologia e Biotecnologie 'L. Spallanzani', Univ. di Pavia, Via Ferrata 9, 27100, Pavia, Italy;  
 2 Dipartimento di Medicina Molecolare, Unità Biochimica, Università di Pavia, Via Ferrata 9, 27100, Pavia, Italy; 3 Istituto di Genetica Molecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche (IGM-CNR), Italy
- O6 **A flow cytometry study of plasma cells subclones in multiple myeloma**  
 Luciana Valvano<sup>1</sup>, Fiorella D'Auria<sup>2</sup>, Michela Soda<sup>1</sup>, Rossana Libonati<sup>1</sup>, Alessia Telesca<sup>1</sup>, Gabriella Bianchino<sup>2</sup>, Giuseppe Pietrantuono<sup>3</sup>, Giovanna Mansueto<sup>3</sup>, Oreste Villani<sup>3</sup>, Simona D'Agostino<sup>3</sup>, Emanuela Zifarone<sup>5</sup>, Rocchina Vilella<sup>1</sup> and Teodora Statuto<sup>1</sup>.  
 1Laboratory of Clinical Research and Advanced Diagnostics, Centro di Rif.Oncologico della Basilicata (IRCCS-CROB), Rionero in Vulture,  
 2Laboratory of Clinical Pathology, Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata (IRCCS-CROB), Rionero in Vulture, Italy.  
 3Hematology and Stem Cell Transplantation Unit, Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata (IRCCS-CROB), Rionero in Vulture, Italy.  
 4Laboratory of Preclinical and Translational Research, Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata (IRCCS-CROB), Rionero in Vulture,  
 5Trial Office, Centro di Riferimento Oncologico della Basilicata (IRCCS-CROB), Rionero in Vulture, Italy

#### AMBIENTE

- A1 **Decadal trend in picoplankton dynamics in the Gulf of Naples**  
 Mario Affuso, Eugenia Tramontin, Cecilia Balestra, Anna Chiara Trano, Raffaella Casotti\*  
 Dipartimento di Ecologia Marina Integrata, Stazione Zoologica Anton Dohrn, Villa Comunale 80121 Napoli
- A2 **Flow cytometry as a tool to track microbial community shifts in constructed wetlands treating Aquaculture Effluents**  
 Davide Corso<sup>1</sup>, Marco Melita<sup>1,2</sup>, Naomi Massaccesi<sup>3,4</sup>, Grazia Marina Quero<sup>3,5</sup>, Marco Basili<sup>3</sup>, Stefano Fazi<sup>1,5</sup>, Gian Marco Luna<sup>3,5</sup>, Stefano Amalfitano<sup>1,5</sup>  
 1 National Research Council - Water Research Institute, Rome, Italy; 2 University of Rome "Tor Vergata", Italy; 3 National Research Council - Institute for Marine Biological Resources and Biotechnology, (CNR-IRBIM); 4 University of Bologna, Alma Mater Studiorum, Italy;  
 5 National Biodiversity Future Center (NBFC), 90133 Palermo, Italy
- A3 **The antioxidant effect of the Voghera pepper during aging: an in vivo study in the cerebellum of a murine model**  
 Emma Lugli<sup>1</sup>, Anna De Gaspari<sup>1</sup>, Ludovica Gaiaschi<sup>1</sup>, Federica Gola<sup>1</sup>, Enrico Pelloni<sup>1</sup>, Giuliano Mazzini<sup>1,2</sup>, Gloria Milanesi<sup>1</sup>, Elisa Roda<sup>3</sup>, Maria Grazia Bottone<sup>1</sup>, Fabrizio De Luca<sup>1</sup>.  
 1 Department of Biology and Biotechnology "L. Spallanzani", University of Pavia, Pavia, 27100, Italy  
 2 Institute of Molecular Genetics, CNR (National Research Council), Pavia, 27100, Italy  
 3 Laboratory of Clinical & Experimental Toxicology, Pavia Poison Centre, National Toxicology Information Centre, Toxicology Unit, Istituti Clinici Scientifici Maugeri IRCCS, Pavia, 27100, Italy

#### ALTRI

- AL1 **Fast and Convenient Human Immune Profiling of Fresh and Long-Term Stabilized Whole Blood**  
 Daniela Natale, Standard BioTools Italy Srl,
- AL2 **An Integrated Flow Cytometry assay for Investigating the Trafficking of Antibody Therapeutics-Target Complexes**  
 Ruii R.,<sup>1</sup> Caslini G.,<sup>1</sup> Fraone T.,<sup>1</sup> Malisan A.,<sup>1</sup> Cowan K.,<sup>2</sup> Riccardi Sirtori F.,<sup>1</sup> Balestra. P1  
 1NBE-DMPK Innovative Bioanalytics, Merck RBM S.p.a. Ivrea, Italy  
 2NBE-DMPK, Merck Healthcare KGaA Darmstadt, Germany

## Comitato Organizzatore

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

## Segreteria Scientifica

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

## Comitato Scientifico

**Chiara Agrati** (*Roma*)  
**Stefano Amalfitano** (*Roma*)  
**Rachele Amodeo** (*Roma*)  
**Alessandra Battaglia** (*Roma*)  
**Raffaella Casotti** (*Napoli*)  
**Rosa Chianese** (*Varese*)  
**Giuseppe Coppola** (*Salerno*)  
**Igea D'Agnano** (*Milano*)  
**Giovanni D'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

### 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](mailto:citometriagic@proeventi.it)



## PROGRAMMA SOCIALE

### mercoledì 11 giugno

18:00 Brindisi di Benvenuto

### giovedì 12 giugno

17:30 Assemblea dei Soci

18:00 Degustazione "Sapere i Sapori ... a Km 0" "Degustazioni del Lazio"

### venerdì 13 giugno

12:45 Premiazione schede valutazione Conferenza

13:00 Light Lunch di saluto

## SPONSOR PLATINUM



## SPONSOR GOLD



# Microscopia e Citometria nello studio del trasferimento di mitocondri dalle cellule staminali adipose alle cellule di carcinoma mammario: studio della resistenza farmacologica

Vitale Del Vecchio<sup>1</sup>, Ayesha Rehman<sup>1</sup>, Sameer Kumar Panda<sup>1</sup>, Martina Torsiello<sup>1</sup>,  
Martina Marigliano<sup>1</sup>, Maria Maddalena Nicoletti<sup>2</sup>, Giuseppe Andrea Ferraro<sup>3</sup>, Vincenzo De Falco<sup>1</sup>,  
Rosamaria Lappano<sup>4</sup>, Eva Lieto<sup>5</sup>, Francesca Pagliuca<sup>2</sup>, Carlo Caputo<sup>6</sup>, Marcella La Noce<sup>1</sup>,  
Gianpaolo Papaccio<sup>1</sup>, Virginia Tirino<sup>1</sup>, Nirmal Robinson<sup>2</sup>, Vincenzo Desiderio<sup>1</sup>, Federica Papaccio<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale, Università degli Studi della Campania, Napoli

<sup>2</sup>Dipartimento di Medicina mentale, fisica e preventiva, Università degli Studi della Campania, Napoli

<sup>3</sup>Dipartimento Multidisciplinare di Scienze mediche, chirurgiche e dentali, Università degli Studi della Campania, Napoli

<sup>4</sup>Dipartimento di Farmacia, Università degli Studi della Calabria, Cosenza

<sup>5</sup>Dipartimento di Medicina Traslazionale, Università degli Studi della Campania, Napoli

<sup>6</sup>Dipartimento di Medicina di Precisione, Università degli Studi della Campania, Napoli

<sup>7</sup>Dipartimento di Medicina, Chirurgia ed Odontoiatria, Università degli Studi di Salerno

e-mail: virginia.tirino@unicampania.it

## Abstract

### Background.

Breast cancer (BC) is a complex disease, showing heterogeneity in the genetic background, molecular subtype, and treatment algorithm. Historically, treatment strategies have been directed towards cancer cells, but these are not the unique components of the tumor bulk, where a key role is played by the tumor microenvironment (TME), whose better understanding could be crucial to obtain better outcomes.

**Methods.** We evaluated mitochondrial transfer (MT) by co-culturing Adipose stem cells with different Breast cancer cells (BCCs), through MitoTracker assay, Mitoception, confocal and immunofluorescence analyses. MT inhibitors were used to confirm the MT by Tunneling Nano Tubes (TNTs). MT effect on multi-drug resistance (MDR) was assessed using Doxorubicin assay and ABC transporter evaluation. In addition, ATP production was measured by Oxygen Consumption rates (OCR) and Immunoblot analysis.

**Results.** We found that MT occurs via Tunneling Nano Tubes (TNTs) and can be blocked by actin polymerization inhibitors. Furthermore, in hybrid co-cultures between ASCs and patient-derived organoids we found a massive MT. Breast Cancer cells (BCCs) with ASCs derived mitochondria (ADM) showed a reduced HIF-1 $\alpha$  expression in hypoxic conditions, with an increased ATP production driving ABC transporters-mediated multi-drug resistance (MDR), linked to oxidative phosphorylation metabolism rewiring.

**Conclusions.** We provide a proof-of-concept of the occurrence of Mitochondrial Transfer (MT) from Adipose Stem Cells (ASCs) to BC models. Blocking MT from ASCs to BCCs could be a new effective therapeutic strategy for BC treatment.

## 1. Introduzione

Il carcinoma mammario (CM) è il secondo tumore più diffuso nella popolazione femminile a livello mondiale. Nonostante i grandi passi avanti nella chemioterapia [Cardoso F, 2019; Gennari A, 2021], molte pazienti non rispondono al trattamento a causa di una resistenza primaria o acquisita [Kinnel B, 2023]. Le cellule tumorali

mammarie sono circondate da tessuto adiposo e da una varietà di cellule quali cellule staminali adipose (ASCs), cellule staminali mesenchimali (MSCs), fibroblasti associati al tumore (CAFs), cellule endoteliali e immunitarie, che costituiscono il microambiente tumorale [Mittal S, 2018]. È interessante notare come la componente adiposa risulti alterata nelle pazienti affette da CM, a causa di un'importante infiltrazione di cellule immunitarie e di uno stato infiammatorio cronico [Ritter A, 2022]. Le MSCs/ASCs giocano un ruolo predominante nel rimodellamento di tale microambiente, promuovendo la transizione epitelio-mesenchimale (EMT) e sostenendo le cellule staminali tumorali [Malla R, 2022]. Le cellule tumorali e le MSCs/ASCs possono comunicare tramite diversi meccanismi, come nanotunnel (TNTs), fusione cellulare e traffico di vescicole extracellulari [Amari L, 2021]. Questi meccanismi permettono alle cellule di scambiarsi numerosi componenti intracellulari, inclusi mitocondri. Le cellule di CM con respirazione compromessa possono acquisire mitocondri sani dalle cellule stromali, ristabilendo così una respirazione funzionale [Herst PM, 2018]. Uno studio recente ha mostrato che l'ATP mitocondriale è la principale fonte energetica per l'efflusso dei farmaci nelle cellule tumorali chemio-resistenti [Giddings EL, 2021]. Inoltre, si sa che le cellule staminali tumorali resistenti al trattamento dipendono maggiormente dalla fosforilazione ossidativa (OXPHOS) e quindi possiedono mitocondri più funzionali e una maggiore quantità di ATP rispetto alle cellule differenziate da cui derivano [Sancho P, 2016]. Così scopo di questo lavoro è quello di valutare possibili meccanismi di trasferimento mitocondriale (TM) e valutazione degli effetti dei mitocondri derivati dalle ASCs sulle cellule tumorali di carcinoma mammario.

## 2. Materiali e metodi

### 2.1 Cellule e colture cellulari

Le cellule MCF-7, MDA-MB.231 e hASC52telo hTERT sono state acquistate dall'ATCC. La linea cellulare di carcinoma mammario naturalmente immortalizzata BCAFHC-1 è stata donata dal Dipartimento di Farmacologia dell'Università della Calabria. Le cellule MCF-7 e MDA-MB.231 sono state coltivate in DMEM

al 10% di FBS. Le cellule BCAHC-1 sono state coltivate in DMEM/F-12 con FBS. Le cellule hASC hTERT sono state coltivate in Mesenchymal Stem Cell Basal Medium addizionato con il Mesenchymal Stem Cell Growth Kit per MSCs adipose (ATCC, Manassas, Virginia). Per le condizioni di ipossia, dove previsto, le cellule sono state trattate con cloruro di cobalto (CoCl<sub>2</sub>) 100  $\mu$ M (Merck, Milano, Italia). Tutte le linee cellulari sono state mantenute a 37 °C in un'atmosfera umidificata con 5% di CO<sub>2</sub>.

## 2.2 Isolamento delle cellule staminali adipose

Le ASCs derivate da pazienti (pdASCs) sono state isolate da tessuto adiposo sottocutaneo di pazienti sane consenzienti. Il tessuto è stato digerito con collagenasi di tipo I/dis-pasi e le cellule sono state validate fenotipicamente secondo quanto descritto nel nostro precedente articolo [Paino F, 2017]. Le cellule sono state incubate a 37 °C al 5% di CO<sub>2</sub>.

## 2.3 Modello di co-cultura per valutare il trasferimento mitocondriale (TM)

MCF-7, MDAMB. 231 e BCAHC-1 colorate con CellTracker™ Blue sono state co-coltivate con cellule pdASC/hASC hTERT colorate con MitoTracker™ Green/Red in rapporto 2:1, con o senza inserti per coltura cellulare con pori da 0,4  $\mu$ m per 24 ore. Per l'inibizione del trasferimento mitocondriale, le co-culture sono state trattate con Antimicina A (100 nM), Citocalasina B (Cyt-B 2,5  $\mu$ M), CCCP (5  $\mu$ M) ed MdiVi-1 (10  $\mu$ M) e valutate mediante microscopia a fluorescenza e citometria a flusso (FACS).

## 2.4 Isolamento di mitocondri, mitoception (MCP)

I mitocondri sono stati isolati da pdASCs/hASCs hTERT incubando le cellule con un buffer di estrazione mitocondriale (220 mM mannitolo, 70 mM saccarosio, 10 mM HEPES/KOH pH-7.4, 1 mM EDTA), con 1 mM di PMSF (fluoruro di fenilmetilsolfonile), 1X *Halt™ Protease Inhibitor Cocktail* e 0.2% BSA [Caicedo A, 2015]. La qualità dell'isolamento mitocondriale è stata valutata con *MitoTracker™ Green* (100 nM). Sono stati ottenuti mediamente 100  $\mu$ g di mitocondri per 10<sup>6</sup> ASCs. I mitocondri erano aggiunti alle cellule MCF-7 e MDA-MB.231 alla concentrazione di 10  $\mu$ g/ml [Caicedo A, 2015].

## 2.5 Microscopia a fluorescenza e confocale

Per valutare qualitativamente il TM, le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 4% e colorate con *falloidina-FITC*, anticorpi anti-beta actina ed anti-beta tubulina. I campioni sono stati incubati per 2 ore con Chk pAB to Rb IgG FITC (Abcam). Le immagini sono state acquisite con il sistema *EVOS M5000 Cell Imaging System*.

La valutazione del TM nei modelli di co-cultura è stata eseguita mediante microscopia confocale. Le immagini sono state acquisite con un *Microscopio Confocale a Scansione Laser Zeiss LSM 700* (Zeiss, Oberkochen, Germania) tramite un obiettivo 63x/1.4 PlanApo a immersione e analizzate con *ImageJ* per la ricostruzione ortogonale in vista Z-stach.

Per la valutazione qualitativa del MCP, le cellule MCF-7 e MDA-MB.231 colorate con *CellTracker Blue Dye* sono state osservate con microscopia confocale dopo la MCP, seguita da analisi statistica di co-localizzazione.

Per la valutazione dei trasportatori ABC, le cellule sono state trattate con Doxorubicina (DOX) (1  $\mu$ M per MDA-

MB.231; 2  $\mu$ M per MCF-7) per 6 ore a 37 °C. Successivamente, sono stati aggiunti gli anticorpi contro P-Glicoproteina, ABCG2 e ABCB1 (incubati a 4 °C per tutta la notte. Le cellule sono state lavate, incubate con Chk pAB to Rb IgG FITC (Abcam) e colorate con *Hoechst 33342*. Le immagini sono state acquisite con *EVOS M5000 Cell Imaging System*.

## 2.6 Saggio alla Doxorubicina

La sensibilità delle cellule MCF-7 e MDA-MB.231 alla Doxorubicina (DOX) è stata valutata con un saggio DOX [Dei S, 2019], misurando l'intensità media di fluorescenza (MFI) della cellula (fluorocromo PE), direttamente correlata alla ritenzione cellulare di DOX. Le cellule sono state preventivamente sottoposte a MCP e successivamente trattate con DOX (1  $\mu$ M per MDA-MB.231; 2  $\mu$ M per MCF-7), Verapamil (VER) (5  $\mu$ M), D-Glucosio (D-Glu) (25 mM) e Rotenone (50  $\mu$ M) per 24 ore. I campioni sono stati osservati con ingrandimento 20X su EVOS o analizzati con BD *FACS CANTO II*.

## 2.7 Saggio di vitalità cellulare

La vitalità cellulare delle cellule MCF-7, MDA-MB.231 e BCAHC-1 è stata valutata mediante il saggio colorimetrico MTT. Le cellule sono state seminate in triplicato in piastre da 96 pozzetti e trattate con Citocalasina B (Cyt-B) (0,5–10  $\mu$ M), Docetaxel (DTX) (50 nM) e Cisplatino (CIS) (10  $\mu$ M) per 24 ore. Successivamente, le cellule sono state colorate con MTT ed è stata misurata l'assorbanza a 540 nm con un lettore ELISA per micropiastre.

## 2.8 Microscopia olografica digitale

Per il saggio cinetico dose-risposta è stato utilizzato un microscopio *Holomonitor M4* (Phase Holographic Imaging AB, Lund, Svezia). Le cellule sono state seminate a una densità di 10<sup>4</sup> cellule/pozzetto e poi sottoposte a MCP prima del trattamento con DOX (1  $\mu$ M per MDA-MB.231; 2  $\mu$ M per MCF-7). Le cellule sono state monitorate continuamente per 24 ore in modalità time-lapse (una volta all'ora), in più posizioni per pozzetto, usando un piatto motorizzato ad alta precisione. L'analisi delle immagini è stata effettuata con il software *Holomonitor App Suite*, valutando parametri di vitalità cellulare (densità cellulare = #cellule/cm<sup>2</sup>; percentuale di confluenza = %confluence). I risultati sono espressi come variazione rispetto al tempo zero, per ciascuna area monitorata, e presentati come media  $\pm$  SE.

## 2.9 Citometria a flusso

Il fenotipo staminale delle pdASCs è stato periodicamente caratterizzato utilizzando i seguenti anticorpi: CD90 (FITC), CD105 (FITC), CD44 (FITC), CD56 (PE Cy7-A), CD29 (PE Cy7-A), CD19 (PECy5.5), HLA-DR (V500), CD324 (PE-A), CD34 (PE-A), CD45 (APC). L'apoptosi è stata valutata con il kit *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit* (BD Pharmingen, NJ, USA). Per la valutazione dell'espressione/attività dei trasportatori ABC, le cellule sono state trattate per 6 ore con DOX (1  $\mu$ M per MDA-MB.231; 2  $\mu$ M per MCF-7), fissate e permeabilizzate con il kit *FIX & PERM Cell Fixation & Cell Permeabilization* (BD, NJ, USA). Gli anticorpi contro la P-glicoproteina, ABCG2 e ABCB1 sono stati aggiunti al pellet cellulare, seguiti dall'anticorpo secondario Chk pAB to Rb IgG FITC per 1 ora a 4 °C, e l'e-

spressione è stata valutata mediante BD *FACS CANTO II*. L'analisi è stata eseguita con il software *FlowJo V10*.

### 2.10 Analisi del flusso extracellulare

Il tasso di consumo di ossigeno (OCR) è stato analizzato in condizioni basali e in risposta a iniezioni sequenziali di Oligomicina (2  $\mu$ M), FCCP (2  $\mu$ M), e Rotenone + Antimicina A (0,1  $\mu$ M ciascuno), utilizzando il saggio *Mito Stress Test XF Cell Mitochondrial* di Agilent. Le valutazioni OCR sono state effettuate con il sistema *Agilent Seahorse XF Analyzer* 24 ore dopo MCP e 2 ore dopo ipossia. L'analisi è stata eseguita con il software *Agilent Seahorse Wave Pro* e i dati analizzati con *Agilent Seahorse Analytics*.

### 2.11 Analisi statistica

I dati sulla vitalità cellulare e la citometria a flusso sono stati analizzati con un modello *Ordinary Two-Way ANOVA*, corretto con il test di Bartlett, seguito dal test di confronto multiplo di Tukey. L'analisi del MCP è stata eseguita con il modello statistico di Li, basato sulla valutazione del quoziente di correlazione di intensità (ICQ) [Li Q, 2004], ottenuto conteggiando i voxel positivi e normalizzandoli sul numero totale di voxel (relativi alla confluenza cellulare). Per ciascun campione sono stati analizzati cinque campi visivi. La significatività statistica per i dati del *Holomonitor* è stata determinata con il modello ANOVA Two-Way, corretto con il test di confronto multiplo di Sidak. Salvo diversa indicazione, tutte le analisi statistiche sono state eseguite con *GraphPad Prism 9*. Valori di  $p < 0,05$  (a due code) sono stati considerati statisticamente significativi.

## 3. Risultati

### 3.1 Le cellule staminali adipose derivate da pazienti trasferiscono i loro mitocondri alle cellule di carcinoma mammario tramite nanotubi

Il TM è stato valutato co-coltivando le pdASCs con le cellule MCF-7) e MDA-MB.231. Le pdASCs sono state isolate da tessuto adiposo sulla base del loro fenotipo: CD90<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD324<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>-</sup>) [Paino F, 2017]. Abbiamo dimostrato che i mitocondri delle pdASCs sono trasferiti alle cellule tumorali attraverso una complessa rete di comunicazione costituita da nanotunnel (TNTs). Questi sono prolungamenti della membrana cellulare delle pdASCs, ricchi di F-actina e  $\beta$ -tubulina, e mostrano una notevole presenza di mitocondri lungo tutta la loro lunghezza. Attraverso queste strutture, le pdASC veicolano i loro mitocondri pre-marcati (MitoTracker-FITC/PE) verso le cellule di carcinoma colorate di blu (CellTracker-DAPI). I mitocondri pre-marcati esogeni sono stati osservati in MCF-7 (Fig. 1a) e MDA-MB.231 (Fig. 1b), 24 ore dopo la co-coltura (Fig. 1a-b frecce gialle) e quantificati mediante analisi FACS (Fig. 1c-d; Fig. 1b-c supplementari). La MT non si è verificata quando le cellule sono state separate fisicamente da inserti per coltura cellulare (Fig. 1c-d) e quando trattate con gli inibitori. In particolare, abbiamo riscontrato che MdiVi-1 e Antimicina-A riducono significativamente la MT in MCF-7 (\*\*\*\* $P \leq 0,0001$ ). Inoltre, anche CCCP inibisce la TM (\*\*\*\* $P \leq 0,0001$ ), ma l'effetto è più evidente in MCF-7 (%MFI=13,6%) rispetto a MDA-MB.231 (%MFI=44,7%) (Fig. 1e-f). Anche l'inibitore della

polimerizzazione dell'actina Cyt-B blocca la MT (\*\*\*\* $P \leq 0,0001$ ) a dosi subletali (Fig. 1g), sebbene le cellule MCF-7 siano risultate più sensibili (%MFI=9,5% vs 48,7%, rispettivamente). Cyt-B fortemente inibisce l'impalcatura dei nanotubi (Fig. 1h-k), con effetti drammatici sulla morfologia cellulare: morfologia più piccola, forma arrotondata, invaginazioni di membrana e accumulo di aggregati di F-actina (Fig. 1j-k).

### 3.2 Il trasferimento mitocondriale avviene anche nei modelli primari derivati da pazienti

Abbiamo verificato il MT anche tra pdASC e modelli tumorali derivati da paziente: BCAHC-1. Nelle BCAHC-1 abbiamo osservato formazione di nanotunnel tra pdASC e cellule tumorali (Fig. 2a), confermati anche tramite citometria a flusso (Fig. 2b). Il tasso di TM è ridotto in modo significativo da CCCP (5  $\mu$ M, %MFI=39,3%) e da Cyt-B (%MFI=27,2%) (Fig. 2c-d). Anche in questo caso la Cyt-B blocca la formazione di TNT (Fig. 2e-f).

### 3.3 La MitoCeption (MCP) aumenta l'acquisizione mitocondriale

Per essere sicuri che gli effetti prodotti nelle cellule tumorali siano dovuti ai mitocondri esogeni, abbiamo applicato la MitoCeption (MCP): un metodo che forza l'internalizzazione mitocondriale da cellule donatrici a cellule riceventi. Mitocondri marcati delle pdASC sono stati trasferiti a MCF-7 e MDA-MB.231 (Fig. 3a). Dopo 24ore, la MCP è stata confermata mediante immagini confocali Z-stack (Fig. 3b). L'efficienza della MCP è stata confermata da analisi statistica della co-localizzazione (Fig. 3c).

### 3.4 I mitocondri derivati da ASCs aumentano la resistenza ai farmaci (MDR)

Per caratterizzare gli effetti funzionali del TM, abbiamo trattato le cellule riceventi con chemioterapici: Cisplatino (CIS) e Docetaxel (DTX). Noi troviamo che i mitocondri derivati da ASCs (ADM) inducono una riduzione della citotossicità di CIS e DTX, sia in condizioni normossiche che ipossiche già dopo 24 ore in entrambe le linee cellulari (Fig.4).

### 3.5 I mitocondri delle ASCs aumentano la produzione di ATP nelle cellule di carcinoma mammario

Poiché i mitocondri svolgono un ruolo fondamentale nell'omeostasi energetica, abbiamo valutato l'effetto dei ADM sul metabolismo delle cellule tumorali. ADM inducono un aumento della produzione di ATP, associata alla respirazione mitocondriale. Infatti, nelle MCF-7 con ADM abbiamo riscontrato una respirazione basale (OCR>18%) e massimale (OCR>10%) significativamente più elevata, con un aumento relativo della produzione di ATP ( $\Delta$ ATP>35 pmol/min; \*\*\*\* $P \leq 0,0001$ ) (Fig. 4). Inoltre, abbiamo riscontrato una significativa riduzione della respirazione (OCR<18%), principalmente dovuta all'aumento del consumo basale di ossigeno mediato dai mitocondri esogeni. Al contrario, in ipossia i mitocondri non influenzano la respirazione basale né quella massimale, tuttavia la capacità di consumo totale di ossigeno è aumentata, portando ad un aumento rilevante della produzione di ATP. In MDA-MB.231 l'effetto sul metabolismo mitocondriale era

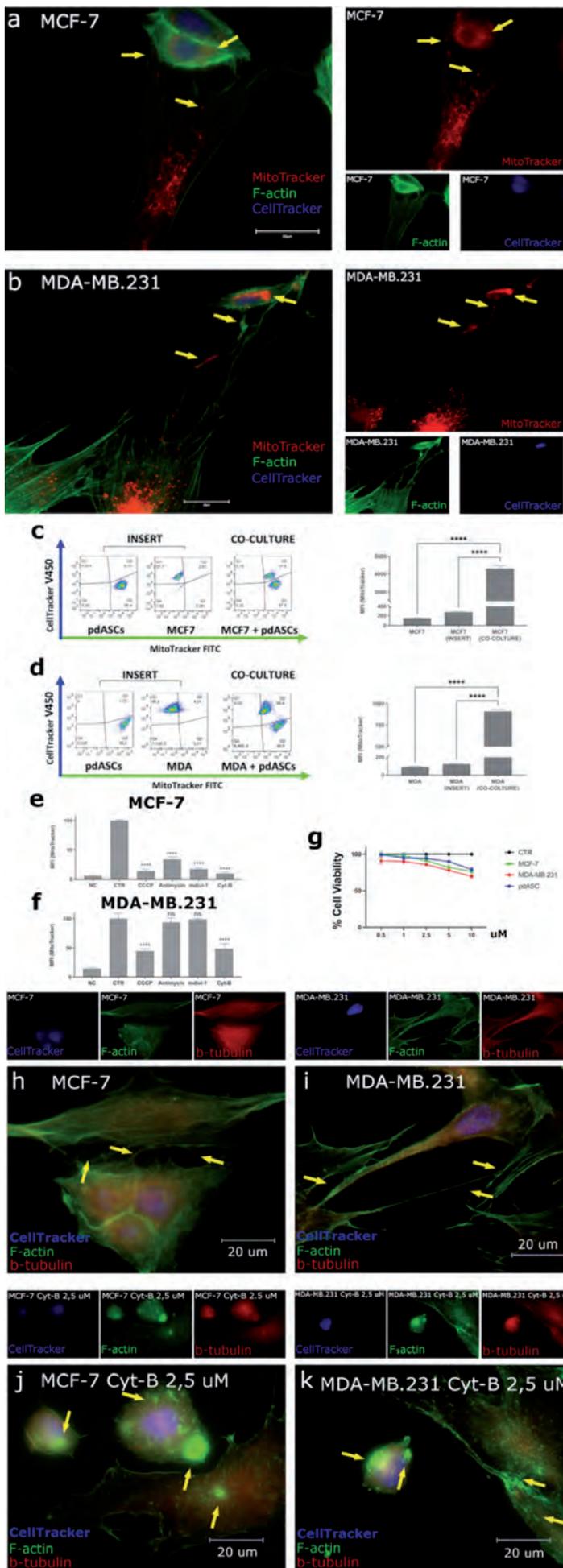


Figura 1. Il TM si verifica tra pdASC e cellule di carcinoma mammario tramite TNT e l'inibizione della polimerizzazione dell'actina interrompe i TNT che inibiscono la MT. (a-b) Microscopia a fluorescenza di MCF7 o MDA-MB.231 pre-marcate (CellTracker-Blue) e pdASC precolorate (MitoTracker-Red) con F-actina (Phalloidin-FITC). Le frecce gialle indicano i mitocondri delle pdASC lungo i TNT e all'interno delle cellule riceventi; (c-d) Analisi citofluorimetrica della fluorescenza per la quantizzazione del TM che si verifica dalle pdASC pre-colorate con MitoTracker-FITC alle MCF7 o MDAMB. 231 pre-marcate con CellTracker-Blue. La co-cultura è stata allestita con e senza meno inserto multi-pozzetto che evitava il contatto cellula cellula ( $****P \leq 0.0001$ ); (e-f) Analisi citofluorimetrica della fluorescenza dopo il trattamento con Antimicina A, Cyt-B, CCCP e MdiVi-1; (g) Saggio MTT per la valutazione della vitalità delle cellule dopo trattamento con Cyt-B. (h-i) Microscopia a fluorescenza della co-cultura con MCF7 pre-marcato con CellTracker-Blue o (j-k) MDA-MB.231, per F-actina (FITC) e  $\beta$ -tubulina (TRITC) in presenza di Cyt-B. Le frecce gialle indicano le strutture di TNT tra i due tipi di cellule (h-i) o gli aggregati citoplasmatici di F-actina (j-k).

molto simile (Fig.4). Così i mitocondri derivati dalle ASCs inducono un aumento della produzione di ATP.

### 3.6 I mitocondri derivati dalle ASCs attivano i trasportatori ABC

Poiché i trasportatori ABC sono coinvolti nella resistenza farmacologica del carcinoma mammario, abbiamo valutato P-gp, ABCG2 e ABCC1 [Dei S, 2019] mediante microscopia a fluorescenza e citometria a flusso 8 ore dopo l'induzione dell'ipossia e il successivo trattamento con DOX. Nelle MCF-7, abbiamo osservato che l'espressione di P-gp e ABCC1 aumentava dopo il trattamento con DOX in tutte le condizioni, mentre ABCG2 aumentava dopo DOX solo in condizioni di normossia. Nelle MDA-MB.231, l'espressione di P-gp risultava aumentata dopo DOX e solo in condizioni di ipossia. ABCG2 non era influenzata dall'ipossia ed aumentava solo con il trattamento con DOX in entrambe le condizioni di ossigeno, mentre ABCC1 aumentava solo in condizioni di normossia dopo il trattamento con DOX. Successivamente, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sul possibile effetto dell'ADM sull'attività dei trasportatori ABC. Noi valutiamo la citotossicità della DOX sulle cellule di carcinoma dopo MCP e dimostriamo che MCP induce un aumento della vitalità cellulare monitorata mediante l' Holomonitor  $***P \leq 0.001$ , anche in ipossia ( $**P \leq 0.01$ ). In MDA-MB231, abbiamo ottenuto gli stessi risultati in normossia ( $\#cells/cm2 = ***P \leq 0.001$ ;  $\%confluence = **P \leq 0.01$ ) e ipossia ( $\#cells/cm2 = **P \leq 0.01$ ;  $\%confluence = *P \leq 0.05$ ) (Fig.5). Successivamente, abbiamo valutato la ritenzione citoplasmatica di DOX misurando il DOX MFI. Il verapamil, inibitore dei trasportatori ABC, ha aumentato l'accumulo citoplasmatico di DOX [Yin W, 2021]. Tuttavia, il metabolismo dell'ATP è stato cruciale nella regolazione dell'attività di questi trasportatori. Infatti, il rotenone, inibitore della sintesi di ATP, ha fortemente ridotto la

capacità di efflusso dei trasportatori ABC, e questo effetto è stato significativamente invertito da D-Glu (Fig. 5e-h);). Questi risultati evidenziano che l'attività del trasportatore ABC è strettamente dipendente dalla disponibilità di ATP, indipendentemente dalla respirazione cellulare. Le MCF-7 con i mitocondri derivati dalle ASCs mostravano un ridotto accumulo di DOX ( $DOX_{MFI} < 16\%$ ;  $***P \leq 0.001$ ), anche dopo trattamento con VER ( $DOX_{MFI} < 9\%$ ;  $*P \leq 0.05$ ), ciò non era osservato dopo trattamento con Rotenone (Fig. 5e). Tuttavia, la somministrazione di D-Glu nuovamente potenziava l'effetto mediato da mitocondri esogeni ( $DOX_{MFI} < 27\%$ ;  $****P \leq 0.0001$ ). In ipossia, MCP era molto più efficace. È interessante notare che, sebbene il blocco della sintesi di ATP mediato dal Rotenone abbia influenzato la capacità di detossificazione cellulare, i mitocondri derivati dalle ASCs hanno invertito significativamente questa condizione ( $DOX_{MFI} < 27\%$ ;  $****P \leq 0.0001$ ); lo stesso effetto è stato osservato dopo il trattamento con D-Glu (Fig. 5f). In MDA-MB231 l'effetto della MCP era più evidente in condizioni di ipossia (Fig.5). Considerando tutti questi risultati, abbiamo dimostrato che i mitocondri derivati dalle ASCs sono in grado di

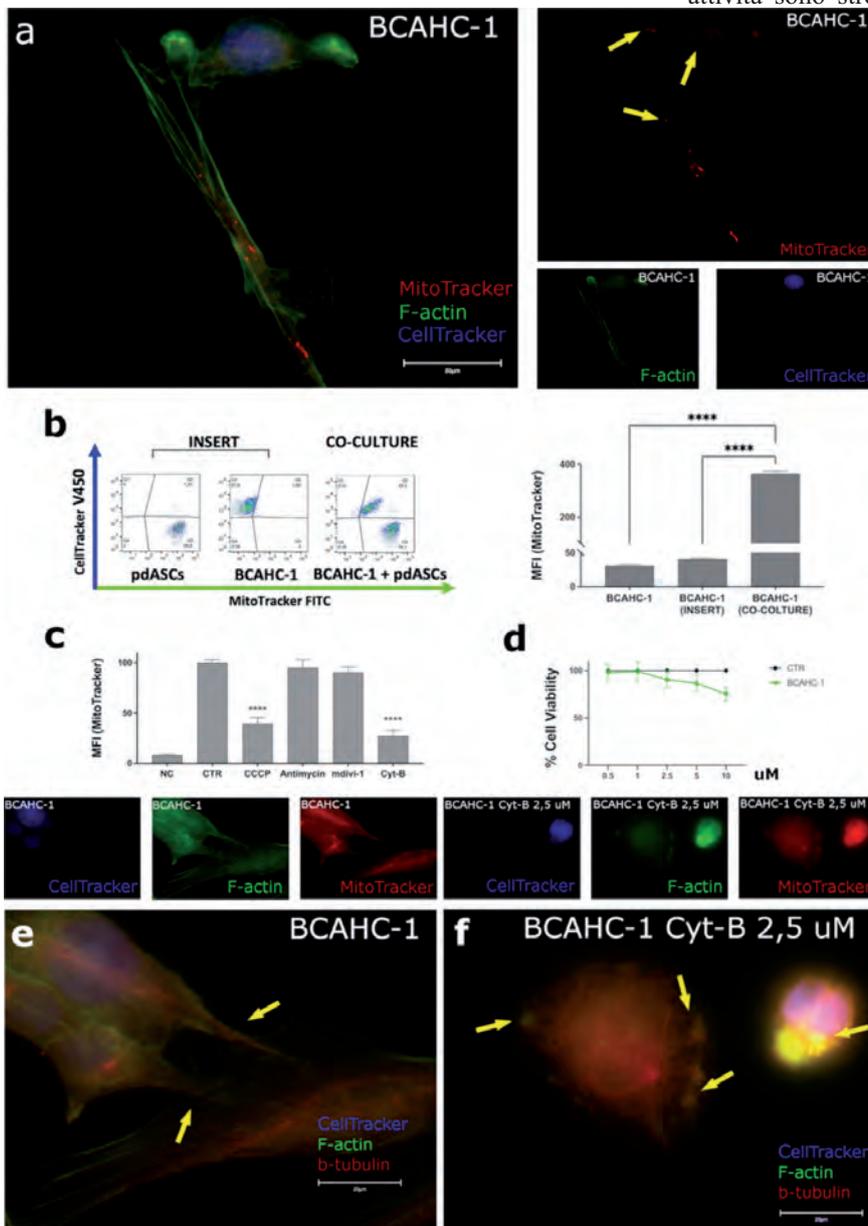
attivare i trasportatori ABC nelle linee cellulari MCF7 e MDA-MB.231, determinando una significativa riduzione dell'accumulo del farmaco nel citoplasma e impedendo la citotossicità indotta dalla chemioterapia.

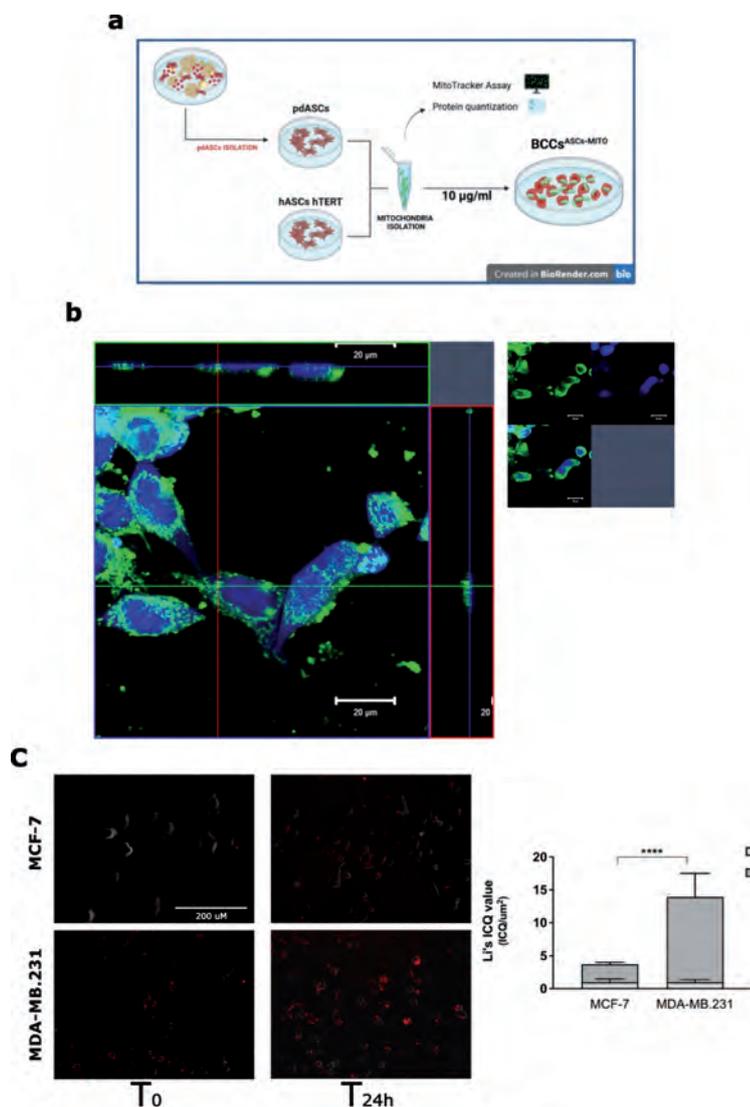
#### 4. Discussione

Studi recenti hanno dimostrato che lo sviluppo e la progressione del CM, così come la risposta al trattamento, dipendono dal suo complesso microambiente [Wang M,2017; Galland S, 2020]. Le MSC vengono reclutate nel sito di formazione del tumore, dove promuovono un fenotipo più aggressivo, in termini di infezione acquisita/ staminalità arricchita, chemioresistenza [Liu S, 2011] e disseminazione a distanza. Le ASCs influenzano il microambiente attraverso la secrezione di citochine, chemiochine e/o fattori di crescita coinvolti nella proliferazione e migrazione cellulare, nell'infiammazione e nell'angiogenesi [Ritter A, 2018]. Inoltre, le ASCs interagiscono anche con le cellule tumorali attivando un intenso traffico vescicolare [Abels E, 2016] o direttamente tramite connessioni "cellula-cellula". I mitocondri sono organelli citoplasmatici che forniscono numerosi processi bioenergetici e biosintetici, la cui dinamica e attività sono strettamente regolate. Svolgono un ruolo

fondamentale nel mantenimento dell'omeostasi delle cellule tumorali, durante la progressione tumorale, a causa della loro capacità di favorire

Figura 2. Il TM si verifica tra pdASC e cellule primarie di carcinoma mammario tramite TNT e l'inibizione della polimerizzazione dell'actina interrompe i TNT che inibiscono la MT. (a) Microscopia a fluorescenza per F actina (faloidina FITC) di BCAHC-1 precolorite (CellTracker-Blue) e pdASC precolorate (MitoTracker-Red). Le frecce gialle indicano i mitocondri delle pdASC lungo i TNT e all'interno della cellula ricevente BCAHC-1; (b) Analisi citofluorimetrica della fluorescenza cellulare, per la quantizzazione della MT che si verifica dalle pdASC precolorate con MitoTracker-FITC alle BCAHC-1 premarcate con CellTracker-Blue. La co-cultura è stata allestita con e senza inserto per evitare il contatto cellula-cellula ( $****P \leq 0.0001$ ); (c) Inibizione del TM in co-cultura tra pdASC e BCAHC-1 mediante citometria a flusso dopo trattamento con Antimicina A, Cyt-B, CCCP e MdiVi-1; (d) Saggio MTT per la valutazione della vitalità di BCAHC-1 dopo trattamento con Cyt-B; (e-f) Microscopia a fluorescenza per F-actina (FITC) e  $\beta$ -tubulina (TRITC) in presenza di Cyt-B nella co-cultura con BCAHC-1 pre-marcato con CellTracker-Blue. Le frecce gialle indicano le strutture di TNT tra i due tipi di cellule (e) o gli aggregati citoplasmatici di F-actina (f) sia in BCAHC-1 che in pdASC ( $****P \leq 0.0001$ ).





la risposta cellulare adattativa a condizioni avverse, come lo stress ossidativo, l'ambiente ipossico o la citotossicità indotta dalla chemioterapia [Han Y, 2019]. In questo studio, abbiamo dimostrato il verificarsi del trasferimento mitocondriale dalle cellule staminali adipose alle cellule tumorali di carcinoma mammario, promuovendo una risposta metabolica adattativa e chemioresistenza nelle cellule riceventi. Noi abbiamo dimostrato che la TM dipendeva dalla formazione di TNT, come evidenziato dalla sua abolizione quando si interrompeva la polimerizzazione dell'actina. Nel nostro studio, li mitocondri esogeni promuovono un cambiamento metabolico nelle cellule riceventi con un aumento dell'attività respiratoria mitocondriale basale sia in condizioni normossiche che ipossiche con un aumento della produzione di ATP, che alimenta l'attività di efflusso dei trasportatori ABC,

Figura 3. Sviluppo e validazione del modello di MitoCeption (MCP). (a) Flow chart della MCP, dall'isolamento dei mitocondri derivati da pdASC/hASC hTERT all'internalizzazione nelle cellule di carcinoma (BCC). (b) Ricostruzione ortogonale 3D mediante microscopia confocale, con tecnologia z-stack, delle cellule premarcate CellTracker-Blue (MCF-7) dopo la MCP con mitocondri derivati da pdASC premarcati con MitoTracker-FITC. (c) Analisi statistica e co-localizzazione spaziale delle cellule e dei mitocondri derivati da pdASC colorati con MitoTracker ai tempi 0 e 24 ore (analisi del valore ICQ di Li normalizzata sull'area totale delle cellule; \*\*\*\* $P \leq 0.0001$ )

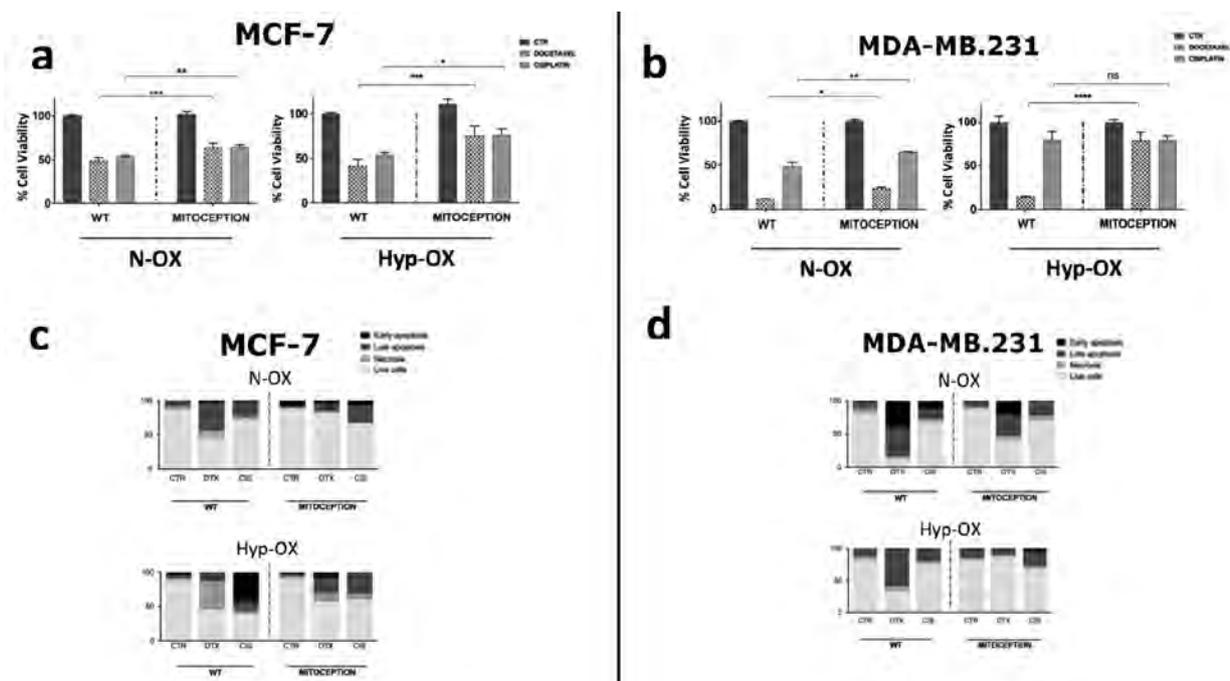


Figura 4. L' MCP aumenta la vitalità delle cellule di carcinoma mammario (BCC) sottoposte a chemioterapia e influisce sul loro metabolismo, modificando la respirazione mitocondriale. (a-d) Saggio di vitalità cellulare e apoptosi delle cellule BCC sottoposte a MCP, dopo trattamento con DTX ( $*P \leq 0.05$ ,  $**P \leq 0.01$ ,  $***P \leq 0.001$ ;  $****P \leq 0.0001$ ).

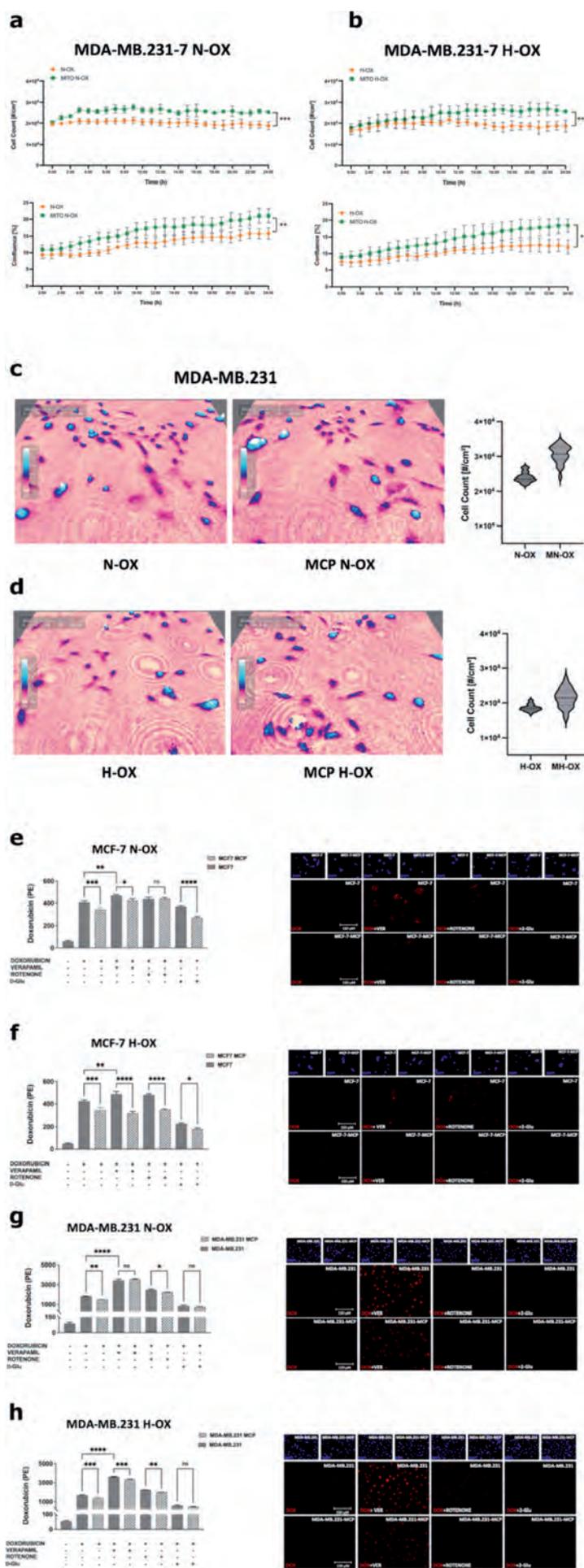


Figura 5. L' MCP ha un effetto protettivo in MDA-MB.231 trattato con doxorubicina e promuove l'attività di efflusso dei trasportatori ABC nelle cellule di carcinoma mammario. In MDA-MB.231 (a-b) trattati con DOX (1  $\mu$ M), il conteggio cellulare e la confluenza aumentano significativamente.

contribuendo così alla resistenza farmacologica. Il blocco del TM ripristina la sensibilità ai farmaci, evidenziandolo come un nuovo potenziale bersaglio per lo sviluppo di farmaci contro il carcinoma mammario.

### Referenze

- Cardoso F, et al. Early breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2019;30:1194–1220.
- Gennari A, et al. ESMO Guidelines Committee Electronic address: clinicalguidelines@esmo.org ESMO Clinical Practice Guideline for the diagnosis, staging and treatment of patients with metastatic breast cancer. *Ann Oncol.* 2021;32(12):1475–1495.
- Kinnel B, et al. Targeted Therapy and Mechanisms of Drug Resistance in Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2023;15(4):1320.
- Mittal S, et al. The breast tumor microenvironment: role in cancer development, progression and response to therapy. *Expert Rev Mol Diagn.* 2018;18(3):227–243.
- Ritter A, et al. Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stromal/Stem Cells, Obesity and the Tumor Microenvironment of Breast Cancer. *Cancers (Basel).* 2022;14(16):3908.
- Malla R, et al. Cancer Stem Cells and Circulatory Tumor Cells Promote Breast Cancer Metastasis. *Clin Breast Cancer.* 2022;22(6):507–514.
- Amari L, et al. Mitochondrial Extracellular Vesicles - Origins and Roles. *Front Mol Neurosci.* 2021;14:767219.
- Dei S, et al. Recent advances in the search of BCRP- and dual P-gp/BCRP-based multidrug resistance modulators. *Cancer Drug Resist.* 2019;2(3):710–743.
- Herst PM, et al. Intercellular Communication in Tumor Biology: A Role for Mitochondrial Transfer. *Front Oncol.* 2018;8:344.
- Giddings EL, et al. Mitochondrial ATP fuels ABC transporter-mediated drug efflux in cancer chemoresistance. *Nat Commun.* 2021;12(1):2804.
- Sancho P, et al. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br J Cancer.* 2016;114(12):1305–12.
- Paino F, et al. Human adipose stem cell differentiation is highly affected by cancer cells both in vitro and in vivo: implication for autologous fat grafting. *Cell Death Dis.* 2017;8(1):e2568.
- Caicedo A, et al. MitoCeption as a new tool to assess the effects of mesenchymal stem/stromal cell mitochondria on cancer cell metabolism and function. *Sci Rep.* 2015;5:9073.
- Li Q, Lau A, et al. A syntaxin 1, Galpha(o), and N-type calcium channel complex at a presynaptic nerve terminal: analysis by quantitative immunocolocalization. *J Neurosci.* 2004;24(16):4070–81.
- Yin W, et al. The inhibition of ABCB1/MDR1 or ABCG2/BCRP enables doxorubicin to eliminate liver cancer stem cells. *Sci Rep.* 2021;11(1):10791.
- Wang M, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer.* 2017;8(5):761–773.
- Galland S, et al. Mesenchymal stromal cells in cancer: a review of their immunomodulatory functions and dual effects on tumor progression. *J Pathol.* 2020;250(5):555–572.
- Liu S, et al. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res.* 2011;71(6):2407.
- Ritter A, et al. Subcutaneous and Visceral Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Commonality and Diversity. *Cells.* 2019;8(10):1288.
- Abels ER, et al. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. *Cell Mol Neurobiol.* 2016;36(3):301–12.
- Han Y, et al. Mitochondrial fission causes cisplatin resistance under hypoxic conditions via ROS in ovarian cancer cells. *Oncogene.* 2019;38(45):7089–7105.

# Monitoraggio della persistenza e del fenotipo di cellule anti-CD19 CAR-T nei pazienti tramite citofluorimetria

Cristian Meli, Benedetta Rambaldi

Hematology and Bone Marrow Transplant Unit, Azienda Socio-Sanitaria Territoriale  
Papa Giovanni XXIII, Bergamo, Italy.

e-mail: brambaldi@asst-pg23.it

## Abstract

CD19-targeted Chimeric Antigen Receptor T (CAR-T) cell therapy has shown unprecedented results in patients with B cell relapsed/refractory acute lymphoblastic leukaemia (R/R-ALL) and B cell non-Hodgkin lymphomas where no other curative options are available. In vivo monitoring of CAR-T cell kinetics is fundamental to understand the correlation between CAR-T cells expansion and persistence with treatment response and toxicity development. The aim of this study was to integrate the CAR-T cell detection using flow cytometry within multiparametric panels to better characterize the T cells maturation and activation/exhaustion phenotype. For CAR staining, we used a recombinant histidine human CD19 protein fragment recognized by the single chain variable fragment of the CAR construct and a secondary antibody anti-histidine APC-conjugated. We combine the CAR-T cell detection within two different flowcytometry panels, one for the T cell subset memory/naive and one for T cell activation/exhaustion. These data demonstrate the feasibility of the integration of the CAR-T cell detection by flow cytometry within multiparametric panels. This approach will offer new insight of this innovative cellular therapy.

## INTRODUZIONE

Le cellule T con recettore chimerico per antigene (CAR-T) rappresentano un nuovo cardine della terapia di pazienti affetti da differenti neoplasie ematologiche. Il trattamento con cellule CAR-T anti-CD19 è stato approvato in Italia pazienti recidivi/refrattari (R/R) al trattamento di prima linea in caso di leucemia B linfoblastica acuta (B-LLA) e linfomi non Hodgkin B (B-NHL). I dati degli studi clinici basati sulle cellule CAR-T anti-CD19 per adulti e bambini con R/R B-LLA mostrano tassi promettenti di remissione completa (CR) e di remissione parziale (PR)<sup>1-3</sup>. Similmente, la terapia con cellule CAR-T anti-CD19 ha mostrato grandi effetti in alcuni pazienti con linfoma follicolare (FL) recidivante e/o refrattario avanzato e linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL)<sup>4-6</sup>.

Questa efficace terapia cellulare è tuttavia gravata da diverse tossicità, che talvolta possono anche compromettere il risultato del trattamento, incrementando il tasso di mortalità dei pazienti. Le due tossicità più comuni correlate alla terapia con cellule CAR-T sono la sindrome da rilascio di citochine (CRS) e la sindrome da neurotossicità associata alle cellule immuno-effettrici (ICANS).

La CRS è guidata dall'attivazione dipendente dal bersaglio delle cellule CAR-T dopo l'infusione, che induce il rilascio di citochine come IL-2, INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Queste citochine sono in grado di attivare i macrofagi, che a loro volta producono citochine pro-infiammatorie incremen-

tando lo stato infiammatorio del paziente. Durante la CRS le citochine elevate più significative sono IL-6, IL-10 e INF- $\gamma$ <sup>7</sup>. L'ICANS può avere diverse manifestazioni, tra cui l'encefalopatia tossica. Possibili meccanismi alla base dell'insorgenza dell'ICANS sono la diffusione delle citochine nel cervello o la migrazione delle cellule CAR-T attraverso la barriera ematoencefalica<sup>8</sup>.

L'unico effetto collaterale *on-target* clinicamente rilevante dopo l'infusione di cellule CAR-T anti-CD19 è rappresentato dall'aplasia delle cellule B, in quanto le cellule CAR-T anti-CD19 eliminano in maniera indiscriminata cellule B sane e cellule tumorali, entrambi esprimenti l'antigene bersaglio. Tuttavia, l'aplasia delle cellule B, a differenza dell'aplasia delle cellule T, è compatibile con la vita e può essere gestita con infusioni di immunoglobuline.

Al fine di monitorare l'effetto e la tossicità delle cellule CAR-T, la società europea di trapianto (EBMT) raccomanda il monitoraggio dell'espansione e della persistenza delle cellule CAR-T a medio e lungo termine dopo l'infusione, tuttavia senza specificarne la metodologia da utilizzare<sup>9</sup>. Il raggiungimento di una metodica universale e standardizzata che possa essere utilizzata in laboratori diversi è auspicabile e permetterebbe di armonizzare i dati ottenuti in pazienti trattati in diversi centri<sup>10</sup>.

In quest'ottica, il nostro gruppo ha pubblicato la validazione e l'ottimizzazione di un metodo di monitoraggio nei pazienti trattati con cellule CAR indotte da citochine (CAR-CIK) anti-CD19<sup>11</sup>. Inoltre, il monitoraggio delle cellule CAR-T può essere inserito all'interno di diversi pannelli citofluorimetrici che possano rispondere ad altre necessità, quali la caratterizzazione dell'immuno-ricostituzione post-linfodeplezione o lo stato di attivazione/esaurimento delle cellule T. Qui riportiamo la nostra esperienza sull'utilizzo di due diversi pannelli con integrato il monitoraggio citofluorimetrico di cellule CAR-T anti-CD19.

## MATERIALI E METODI

### Pazienti e raccolta dei campioni

Per l'ottimizzazione di questi pannelli sono stati utilizzati campioni di sangue periferico ottenuti da pazienti trattati con CAR-T anti-CD19 ad uso commerciale (CYTB323A12101 - Rapcabtagene Autoleucel, Novartis). L'analisi delle cellule CAR-T circolanti è stata effettuata su sangue periferico prelevato in provetta contenenti EDTA a specifici tempi dopo l'infusione delle cellule, come da pratica clinica del nostro centro. Il consenso all'analisi dei campioni biologici è stato ottenuto prima della collezione del campione in accordo con la Dichiarazione di Helsinki.

### Curva di titolazione anticorpale

Per determinare la concentrazione migliore di anticorpo

per garantire la migliore risoluzione nell'analisi abbiamo eseguito delle curve di titolazione, tramite una rappresentazione grafica che mette in correlazione lo "Stain Index" (SI) in funzione delle diverse concentrazioni di anticorpo testate. A tal fine abbiamo eseguito delle diluizioni seriali consecutive dell'anticorpo di interesse comprese tra la concentrazione suggerita dalla ditta produttrice e l'assenza dell'anticorpo come segue: 1, 1:2, 1:4, 1:8; 1:16; 1:32, 1:64, 1:128.

Lo SI è stato poi calcolato utilizzando la formula seguente:

$$\text{Stain Index} = \frac{(\text{Mediana del segnale positivo} - \text{Mediana del Segnale Negativo})}{(2 * \text{Deviazione Standard del Segnale Negativo})}$$

La diluizione scelta è stata quella che presentava SI maggiore.

### Colorazione del CAR

La colorazione del CAR anti-CD19 prevede un metodo indiretto basato sull'utilizzo di una proteina ricombinante CD19 istidinata (Cat. No. CD9-H52H2,  $C_{\text{aliquota}} = 0,2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) e un anticorpo secondario diretto contro l'istidina e coniugato a un fluorocromo (Order no. 130-119-782, Clone GG11-8F3.5.1).

### Preparazione dei pannelli multiparametrici a 12 colori

Il monitoraggio delle cellule CAR-T anti-CD19 viene effettuato mediante due pannelli a 12 colori che prevedono rispettivamente l'analisi dei marcatori di esaurimento/attivazione T (Pannello 1, Tabella 1) e dei marcatori di maturazione delle sottopopolazioni T (Pannello 2, Tabella 1).

Per il fenotipo, 1 ml di sangue periferico è stato lisato con 14 ml di BD Pharm Lyse 1x (Cat no. 555899) a temperatura ambiente (TA). Dopo aver effettuato la lisi dei globuli rossi, si è proceduto all'aggiunta di 5 uL di proteina CD19His incubando per 15 min a TA e poi aggiunto 2 uL di anticorpo anti-His in APC per 15 min a TA. Infine, sono stati aggiunti gli altri anticorpi del pannello con un'incubazione finale di altri 15 minuti in ghiaccio. L'acquisizione è stata eseguita mediante il citofluorimetro BD FACSLyric™, sfruttando il software BD FACSuite™. In questa tipologia di pannelli, uno degli aspetti fondamentali è rappresentata dal numero di even-

ti che risulta necessario acquisire per poter rilevare anche gli eventi più rari. Per questo motivo si è impostata l'acquisizione di 50.000 eventi CD3+ e un tempo di acquisizione di non oltre dieci minuti per evitare l'aspirazione dell'intero volume in caso di campioni con meno di 50.000 eventi CD3+. L'analisi dei file fcs esportati dal software BD FACSuite™ al termine dell'acquisizione è stata effettuata tramite l'utilizzo del software FlowJo.

## RISULTATI

### Scelta dei marcatori, dei fluorocromi e curve di titolazione

Per lo sviluppo dei pannelli abbiamo proceduto inizialmente alla selezione dei marcatori di interesse. Basandoci sulle informazioni presenti in letteratura abbiamo scelto i seguenti marcatori per la caratterizzazione delle cellule di interesse (Tabella 1)<sup>12,13</sup>. In particolare, ai marcatori di linea T abbiamo aggiunto:

- CD45RA: isoforma dell'antigene CD45 espresso in modo specifico su linfociti T Naive, linfociti T Stem Cell Memory e linfociti T Terminal Effector Memory.
- CD62L: lectina calcio-dipendente che media l'adesione dei linfociti T alle cellule endoteliali delle venule endoteliali alte nei linfonodi periferici, promuovendo il legame iniziale e il successivo rotolamento dei linfociti negli endoteli. Viene principalmente espresso dai linfociti T Naive e dai linfociti T Central Memory.
- CD25: recettore per l'interleuchina-2, coinvolto nella tolleranza immunitaria mediante l'attività delle cellule T regolatorie (Treg). Inoltre, il CD25 è un marcatore di attivazione in quanto risulta espresso ad alti livelli su linfociti T attivati.
- CD127: recettore dell'interleuchina-7, citochina essenziale per lo sviluppo, sopravvivenza e omeostasi dei linfociti T. Consente di identificare le cellule Treg in combinazione con il CD25.
- CD279 (PD-1): recettore inibitorio espresso sulla superficie dei linfociti T che agisce limitando l'attivazione dei linfociti T per evitare risposte eccessive o autoimmuni<sup>14</sup>.
- CD223 (LAG-3): proteina di membrana espressa sui linfociti T che agisce riducendo l'attivazione e la proliferazione dei linfociti T<sup>15,16</sup>.
- CD272 (BTLA): proteina inibitoria di membrana

CAR-T EXHAUSTION				
ANTIGENE	FLUOROCROMO	CLONE	CAT NO.	QUANTITÀ
CD3	FITC	SK7	340542	2,5 µL
CAR	APC	GG11-8F3.5.1	130-119-782	2 µL
CD25	BV421	M-A251	562442	0,625 µL
CD279	PE	EH12.1	560795	2,5 µL
CD223	APC-R700	T47-530	565774	0,3125 µL
CD62L	BV711	SK11	565040	0,15625 µL
CD272	BB700	J168-540	746166	0,3125 µL
CD8	APC-Cy7	SK1	348793	2,5 µL
CD4	BV605	RPA-T4	562658	2,5 µL
CD45RA	PE-Cy7	L48	337167	5 µL
CD127	BV786	HIL-7R-M21	563324	1,25 µL
CD45	V500-C	2D1	647449	5 µL

CAR-T Naive/Stem Cell Memory				
ANTIGENE	FLUOROCROMO	CLONE	CAT NO.	QUANTITÀ
CD3	FITC	SK7	340542	2,5 µL
CAR	APC	GG11-8F3.5.1	130-119-782	2 µL
CD197	BV421	2-L1-A	566743	5 µL
CD279	PE	EH12.1	560795	2,5 µL
CD25	APC-R700	M-A251	567065	5 µL
CD62L	BV711	SK11	565040	0,15625 µL
CD95	BB700	DX2	566542	2,5 µL
CD8	APC-Cy7	SK1	348793	2,5 µL
CD4	BV605	RPA-T4	562658	2,5 µL
CD45RA	PE-Cy7	L48	337167	5 µL
CD56	BV786	NCAM16.2	564058	0,625 µL
CD45	V500-C	2D1	647449	5 µL

Tabella 1. Marcatori presenti nel pannello 1 di valutazione del fenotipo T di esaurimento/attivazione e nel pannello 2 per il fenotipo T memoria.

espressa sui linfociti T che inibisce l'attivazione e la proliferazione dei linfociti T, limitando l'infiammazione e mantenendo la tolleranza periferica<sup>17,18</sup>.

- CD95: recettore di morte appartenente alla famiglia TNF-R che una volta attivato, induce morte cellulare programmata mediante la via estrinseca dell'apoptosi.

- CD56: glicoproteina di adesione cellulare coinvolta nell'interazione cellula-cellula che può essere espressa su popolazioni di linfociti T non convenzionali con un profilo citotossico "NK-Like".

- CD197 (CCR7): recettore per chemochine, appartenente alla famiglia dei recettori accoppiati a protein G (GPCR). Guida la migrazione di linfociti T verso le zone T dei linfonodi. In combinazione con il CD95, consente di discriminare i linfociti T *Naive* dai linfociti T *Stem Cell Memory* (Tscm).

Successivamente abbiamo valutato la scelta dei fluorocromi tenendo in considerazione la sovrapposizione di spettro, per ridurre al minimo la quantità di interferenza spettrale e quindi la compensazione che sarà necessario applicare. Inoltre, abbiamo prediletto l'utilizzo di fluorocromi brillanti laddove disponibili per marcatori a bassa espressione (per esempio PD-1, LAG-3 e BTLA), al fine di migliorare la risoluzione delle popolazioni cellulari. La figura 1 riporta le curve di titolazione per ciascun fluorocromo e la concentrazione finale anticorpale scelta.

### Strategia di "gating" cellulare

L'analisi dei "gate" cellulari consente di dividere le cellule acquisite in diverse popolazioni cellulari in base all'espressione dei marcatori scelti, con la possibilità di perfezionare i gate e i grafici più e più volte senza perdere le cellule analizzate. L'analisi è stata eseguita in modo gerarchico come segue (Figura 2).

Sfruttando una combinazione di FSC-A vs FSC-H prima e SSC-A vs SSC-H poi, è stato possibile rimuovere la presenza di doppietti cellulari. L'utilizzo del FSC e del SSC consente di rimuovere i detriti e di identificare le

cellule di interesse in base alle dimensioni e/o alla complessità. Successivamente si è proceduto ad isolare i globuli bianchi riconoscibili per la positività al CD45. All'interno dei globuli bianchi si sono isolati i linfociti T definiti come cellule CD3 positive. L'espressione del CAR è stata valutata sui linfociti T in correlazione con il CD25. Le popolazioni CAR+ e CAR- sono suddivisibili ulteriormente sulla base dell'espressione del CD8 e del CD4. Ciascuna sottopopolazione è stata studiata anche sulla base del CD45RA e del CD62L per indentificare i subset Naive/Memoria. Ogni sottopopolazione cellulari è stata valutata anche per l'espressione di PD-1 (CD279), LAG-3 (CD223) e BTLA (CD272). Infine, le Treg sono state identificate all'interno delle cellule CAR-CD3+CD4+, per l'espressione del CD25+ e del CD127+/- . Per distinguere Naive e Tscm, la popolazione CD45RA+CD62L+ è stata valutata per l'espressione del CCR7 (CD197), CD95 e PD-1. Le cellule Naive risultano CD197+CD95-PD-1-, mentre le cellule Tscm risultano CD197+CD95+PD-1+.

### Discussione e conclusioni

In questo lavoro abbiamo mostrato come sia possibile inserire la misurazione di cellule CAR-T anti-CD19 all'interno di pannelli citofluorimetrici multi-parametrici. Tali pannelli permettono di identificare sottopopolazioni di cellule CAR+ e CAR-, quali linfociti CD4, CD8, Treg, Tnaive, CM, EM, TEMRA, Tscm. Inoltre, tramite il pannello di attivazione/esaurimento è stato possibile identificare cellule esprimenti CD25, PD1, LAG3 e BTLA sia nella popolazione di linfociti T CAR+ che CAR-.

La validazione del monitoraggio citofluorimetrico tramite correlazione con altre metodiche capaci di misurare la quantità di CAR circolanti (PCR) è di fondamentale importanza<sup>19</sup>. In ogni caso l'utilizzo della citofluorimetria permette di ottenere risultati in tempi rapidi e quindi utili anche nel contribuire ad eventuali decisioni cliniche di gestione dei pazienti. Per questa ragione, come noi,

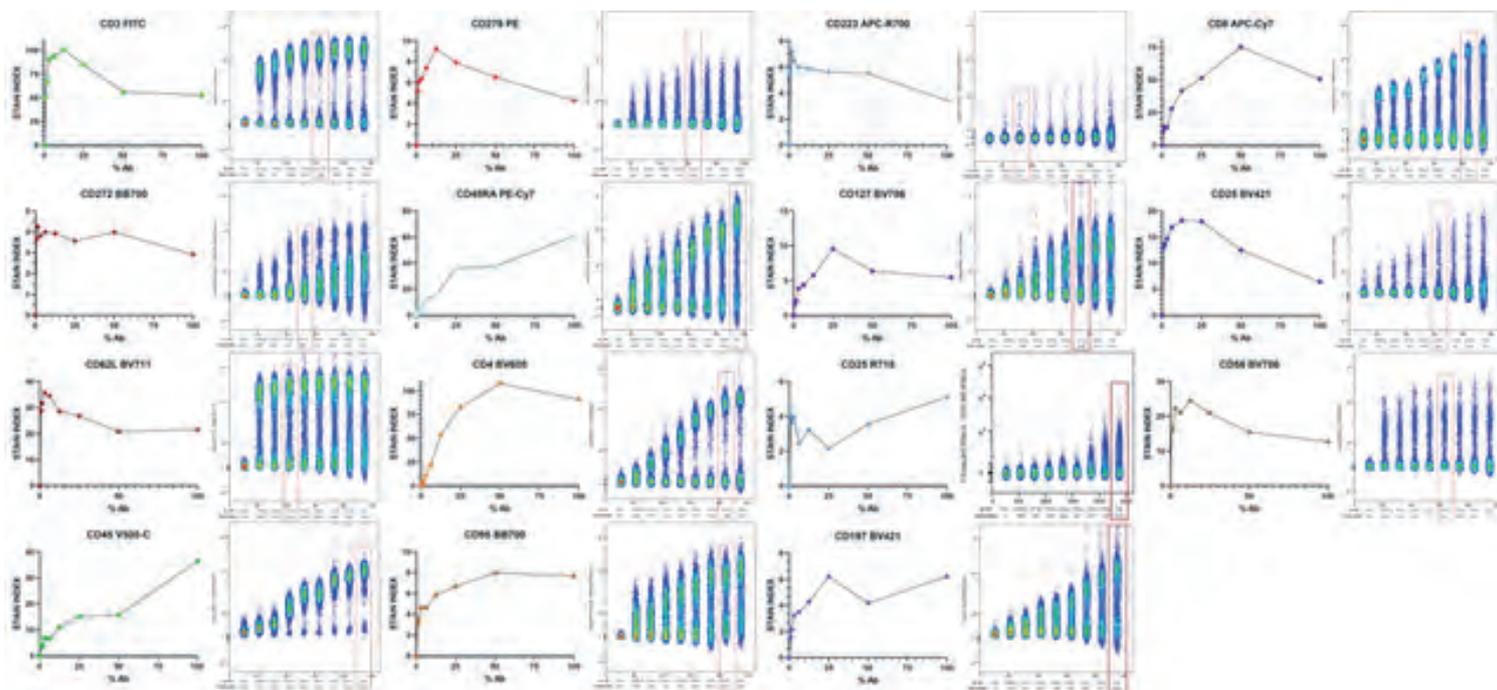
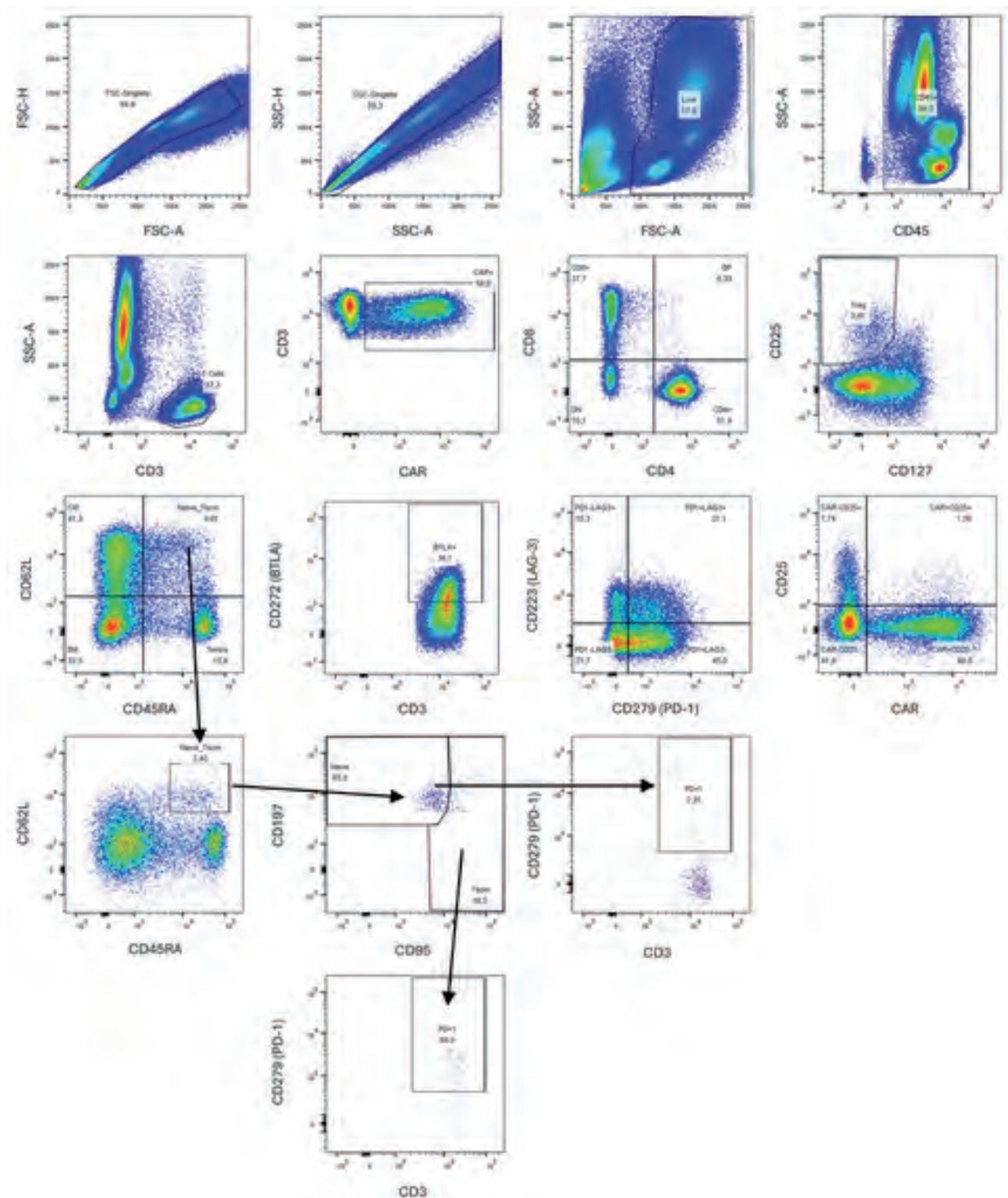


Figura 1. Curve di titolazione anticorpale eseguite per lo sviluppo dei pannelli a 12 colori.



**Figura 2.** Strategia di analisi dei “gate” implementata per la caratterizzazione delle cellule CAR-T anti-CD19.

altri gruppi hanno pubblicato le loro esperienze, dimostrando come l’approccio citofluorimetrico sia ormai parte integrante nella gestione clinica di questi pazienti<sup>20,21</sup>.

Ad oggi diversi studi hanno dimostrato l’importanza del monitoraggio delle cellule CAR-T circolanti per valutare sia la risposta al trattamento che le tossicità<sup>22–24</sup>. L’inserimento della misurazione delle cellule CAR-T all’interno di pannelli multiparametrici permetterà di ottenere informazioni più dettagliate per migliorare la conoscenza degli effetti a breve e lungo termine di que-

ste terapie cellulari. Infine, tali informazioni potranno essere utilizzate allo scopo di ricercare nuovi marcatori di tossicità o di risposta alla terapia.

### Bibliografia

1. Park JH, Rivière I, Gonen M, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018;378(5):449-459. doi:10.1056/NEJMoa1709919
2. Shah NN, Lee DW, Yates B, et al. Long-Term Follow-Up of CD19-CAR T-Cell Therapy in Children and Young Adults With B-ALL. *J Clin Oncol.* 2021;39(15):1650-1659. doi:10.1200/JCO.20.02262
3. Shah BD, Ghobadi A, Oluwole OO, et al. KTE-X19 for relapsed or

- refractory adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: phase 2 results of the single-arm, open-label, multicentre ZUMA-3 study. *Lancet*. 2021;398(10299):491-502. doi:10.1016/S0140-6736(21)01222-8
4. Neelapu SS, Locke FL, Bartlett NL, et al. Axicabtagene Ciloleucel CAR T-Cell Therapy in Refractory Large B-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2017;377(26):2531-2544. doi:10.1056/NEJMoa1707447
  5. Abramson JS, Palomba ML, Gordon LI, et al. Lisocabtagene maraleucel for patients with relapsed or refractory large B-cell lymphomas (TRANSCEND NHL 001): a multicentre seamless design study. *Lancet*. 2020;396(10254):839-852. doi:10.1016/S0140-6736(20)31366-0
  6. Morschhauser F, Dahiya S, Palomba ML, et al. Lisocabtagene maraleucel in follicular lymphoma: the phase 2 TRANSCEND FL study. *Nat Med*. 2024;30(8):2199-2207. doi:10.1038/s41591-024-02986-9
  7. Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy — assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol*. 2018;15(1):47-62. doi:10.1038/nrclinonc.2017.148
  8. Titov A, Petukhov A, Staliarova A, et al. The biological basis and clinical symptoms of CAR-T therapy-associated toxicities. *Cell Death Dis*. 2018;9(9):897. doi:10.1038/s41419-018-0918-x
  9. Yakoub-Agha I, Chabannon C, Bader P, et al. Management of adults and children undergoing chimeric antigen receptor T-cell therapy: best practice recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT (JACIE). *Haematologica*. 2020;105(2):297-316. doi:10.3324/haematol.2019.229781
  10. Sarikonda G, Pahuja A, Kalfoglou C, et al. Monitoring CAR-T cell kinetics in clinical trials by multiparametric flow cytometry: Benefits and challenges. *Cytometry B Clin Cytom*. 2021;100(1):72-78. doi:10.1002/cyto.b.21891
  11. Zaninelli S, Meli C, Borleri G, et al. Optimization and validation of in vivo flow cytometry CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR T cell detection method using CD19HIS indirect staining. *Cytometry Pt A*. Published online September 27, 2023:cyto.a.24796. doi:10.1002/cyto.a.24796
  12. Rambaldi B, Kim H, Arihara Y, et al. Phenotypic and functional characterization of the CD6-ALCAM T-cell co-stimulatory pathway after allogeneic cell transplantation. Published online 2022. doi:10.3324/haematol.2021.280444
  13. Rambaldi B, Kim HT, Reynolds C, et al. Impaired T- and NK-cell reconstitution after haploidentical HCT with posttransplant cyclophosphamide. *Blood Adv*. 2021;5(2):352-364. doi:10.1182/bloodadvances.2020003005
  14. Nishimura H, Agata Y, Kawasaki A, et al. Developmentally regulated expression of the PD-1 protein on the surface of double-negative (CD4-CD8-) thymocytes. *Int Immunol*. 1996;8(5):773-780. doi:10.1093/intimm/8.5.773
  15. Anderson AC, Joller N, Kuchroo VK. Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity*. 2016;44(5):989-1004. doi:10.1016/j.immuni.2016.05.001
  16. Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DAA. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev*. 2017;276(1):80-96. doi:10.1111/imr.12519
  17. Watanabe N, Gavrieli M, Sedy JR, et al. BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1. *Nat Immunol*. 2003;4(7):670-679. doi:10.1038/ni944
  18. Stienne C, Virgen-Slane R, Elmén L, et al. Btla signaling in conventional and regulatory lymphocytes coordinately tempers humoral immunity in the intestinal mucosa. *Cell Rep*. 2022;38(12):110553. doi:10.1016/j.celrep.2022.110553
  19. Sarikonda G, Mathieu M, Natalia M, et al. Best practices for the development, analytical validation and clinical implementation of flow cytometric methods for chimeric antigen receptor T cell analyses. *Cytometry B Clin Cytom*. 2021;100(1):79-91. doi:10.1002/cyto.b.21985
  20. Cheng J, Mao X, Chen C, et al. Monitoring anti-CD19 chimeric antigen receptor T cell population by flow cytometry and its consistency with digital droplet polymerase chain reaction. *Cytometry A*. 2023;103(1):16-26. doi:10.1002/cyto.a.24676
  21. Peinelt A, Bremm M, Kreyenberg H, et al. Monitoring of Circulating CAR T Cells: Validation of a Flow Cytometric Assay, Cellular Kinetics, and Phenotype Analysis Following Tisagenlecleucel. *Front Immunol*. 2022;13:830773. doi:10.3389/fimmu.2022.830773
  22. Blumenberg V, Busch G, Baumann S, et al. Early quantification of anti-CD19 CAR T cells by flow cytometry predicts response in R/R DLBCL. *Blood Adv*. 2023;7(22):6844-6849. doi:10.1182/bloodadvances.2023010364
  23. Mueller KT, Maude SL, Porter DL, et al. Cellular kinetics of CTL019 in relapsed/refractory B-cell acute lymphoblastic leukemia and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2017;130(21):2317-2325. doi:10.1182/blood-2017-06-786129
  24. Locke FL, Rossi JM, Neelapu SS, et al. Tumor burden, inflammation, and product attributes determine outcomes of axicabtagene ciloleucel in large B-cell lymphoma. *Blood Adv*. 2020;4(19):4898-4911. doi:10.1182/bloodadvances.2020002394.

## 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 2025 e quelle arretrate è di € 25,00 annuale e potrà essere versata tramite assegno circolare o bancario, non trasferibile, intestato a Società Italiana di Citometria oppure tramite versamento in contanti alla Segreteria oppure mediante bonifico bancario: c/c n. 4350 c/o Banca Nazionale del Lavoro 6385 Roma Casaccia, Via Anguillarese 301 - 00123 Roma.

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

Con l'intento di favorire i cosiddetti "non strutturati" (studenti, borsisti, etc.) la quota sociale è ridotta a € 15,00, chi si trova in questa condizione dovrà esplicitamente dichiararlo mediante autocertificazione contestualmente all'invio della quota annuale.

Fiduciosi della tua collaborazione e partecipazione, cogliamo l'occasione per inviarti i nostri più cari saluti.

LA SEGRETERIA

# Malattia Minima Residua nel Mieloma Multiplo con Next Generation Flow: l'importanza dell'alta sensibilità

Elona Saraci

Università degli Studi di Torino

e-mail: e.saraci@unito.it

## Abstract

Recently, the introduction of new therapeutic regimens and monoclonal antibodies, has significantly improved the treatment for Multiple Myeloma (MM) patients, by enhancing treatment responses and increasing overall survival (OS). In addition, increased depth of response to treatment has been associated to longer OS and progression-free survival (PFS) by different studies, highlighting the importance of high sensitivity in the evaluation of Minimal Measurable Disease (MRD) in Multiple Myeloma (MM) patients. However, the future introduction of MRD in clinical practice, as prognostic factor or to modulate therapy, requires standardization across laboratories. International Myeloma Working Group (IMWG) updated in 2016 response criteria for patients with MM, incorporating the evaluation of MRD. They recommend the standardized Next Generation Flow technique (or equivalent standardized techniques) and Next Generation Sequencing for MRD evaluation in bone marrow. NGF, despite is a highly sensitive standardized technique, can be affected by various factors that impact the quality of the data. Consequently, careful attention must be paid during sample preparation to ensure optimal results. Each step can affect the quality of the flow cytometric data and may lead to significant cell loss, which can impact final MRD sensitivity. Therefore, it is essential to carefully adhere to the standard operational procedures (SOPs) and taking some precautions during sample preparation can make a substantial difference in the quality of the final results.

Il Mieloma Multiplo (MM) è una neoplasia caratterizzata dalla proliferazione incontrollata di plasmacellule (PC) patologiche all'interno del midollo osseo, e raramente in tessuti extramidollari, che sintetizzano e accumulano immunoglobuline monoclonali (componente monoclonale (CM)) nel sangue e/o urine portando alla manifestazione di sintomi clinici come lesioni osteolitiche e danno d'organo (Palumbo A. et al. 2011). Grazie ai progressi nella terapia, una percentuale elevata di pazienti con MM riesce a raggiungere una remissione completa (CR). Tuttavia, sebbene i pazienti raggiungano la CR, recidivano dopo un periodo di tempo variabile. Nei pazienti in CR è pertanto importante utilizzare tecniche ad alta sensibilità che possano identificare e quantificare le cellule tumorali responsabili della recidiva, che possono rimanere in circolo dopo il trattamento. Queste cellule, difficilmente identificabili con le tecniche convenzionali, sono definite Malattia Minima (Misurabile) Residua (MMR) (Paiva B. et al. 2015).

Diversi studi hanno evidenziato un'importante differenza nella sopravvivenza libera da progressione (PFS) e soprav-

vivenza globale (OS) tra i pazienti in CR. In particolare, i pazienti in CR con MMR hanno una PFS e OS significativamente inferiore rispetto a quelli in cui non viene identificata e quantificata la MMR. Questi studi evidenziano l'importanza della MMR come uno strumento sensibile per misurare in modo appropriato la risposta nei pazienti con MM e il raggiungimento della MMR negatività è ora considerato uno dei fattori prognostici più rilevanti, indipendentemente dal metodo utilizzato per la sua rilevazione (Munshi NC. et al 2017; Munshi NC. et al 2020).

I due approcci complementari più utilizzati nei trial clinici per valutare la MMR nel midollo osseo sono la biologia molecolare e la citofluorimetria.

Negli ultimi anni i progressi tecnologici hanno consentito di mettere a punto metodiche di nuova generazione, Next Generation Sequencing (NGS) e Next Generation Flow (NGF), ottenendo risultati più precisi e raggiungendo sensibilità maggiori, andando a migliorare il monitoraggio della MMR e la valutazione dell'efficacia del trattamento (Fig. 1) (Riva G. et al. 2021).

Nel 2016 l'International Myeloma Working Group (IMWG) ha aggiornato i criteri di risposta alla terapia nei pazienti con MM, inserendo anche la valutazione della MMR. (Kumar S. et al. 2016). In particolare, viene consigliato di utilizzare la metodica standardizzata NGF (o metodiche equivalenti standardizzate) e l'NGS per la valutazione della MMR. E' importante che in concomitanza venga fatta anche la valutazione della MMR con la PET/CT (Tomografia ad Emissioni di Positroni e della

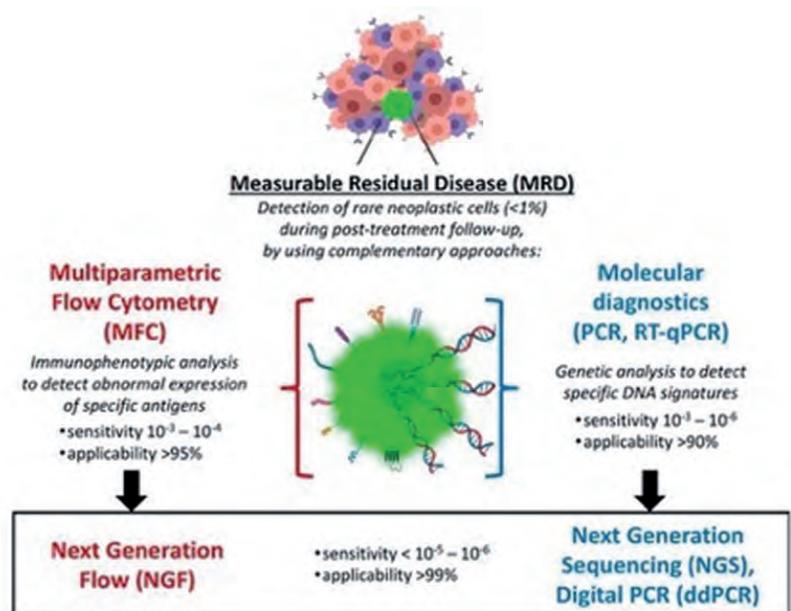


Figura 1. Tecniche complementari immunofenotipiche e molecolari per la valutazione della Malattia Misurabile Residua (da Riva G. et al. 2021).

Tomografia Computerizzata) in caso di malattia extra-midollare. Inoltre, si raccomanda di raggiungere sensibilità di almeno  $10^{-5}$  per la valutazione della MMR nel midollo osseo, per entrambe le tecniche.

### L'importanza dell'alta sensibilità

In diversi studi e meta-analisi (Munshi NC. et al.2017; Munshi NC. et al. 2020) è stato osservato che una maggiore profondità di risposta al trattamento è associata a una OS e PFS più lunga. Quindi risulta fondamentale la tecnica utilizzata per la valutazione della MMR e la sensibilità raggiunta. Con la citofluorimetria di 2° generazione si osserva un'eterogeneità nella valutazione dei marcatori e nelle strategie analitiche utilizzate dai vari laboratori. Questo può portare a interpretazioni cliniche dei risultati che non sono sempre coerenti.

È importante che i laboratori seguano protocolli standardizzati per migliorare l'affidabilità e la comparabilità dei risultati, soprattutto se la valutazione della MMR verrà utilizzata in futuro, non solo come fattore prognostico, ma anche per modulare la terapia (Derman BA. et al. 2024).

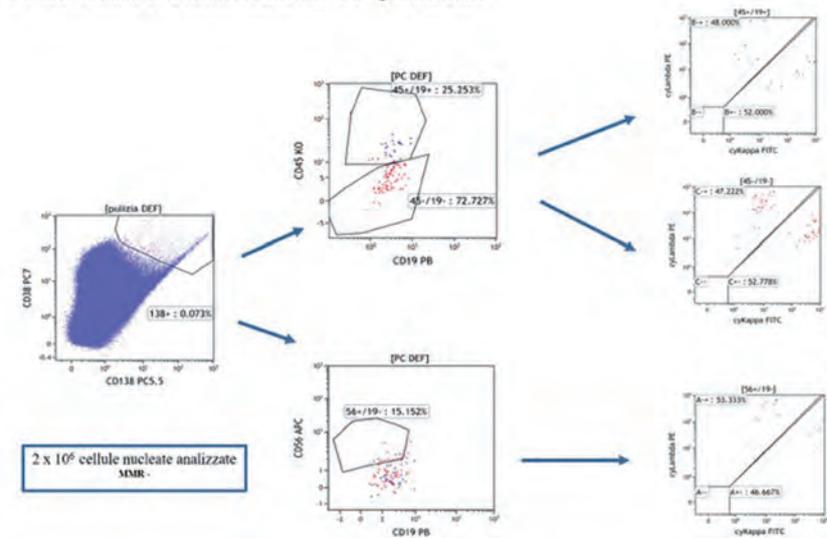
Il Consorzio EuroFlow ha ideato e pubblicato la metodica NGF (Flores- Montero J. et al. 2017). Con il termine NGF si intende una metodica standardizzata che ci consente di ottenere una sensibilità mai raggiunta prima con la citofluorimetria di 1° e 2° generazione. Con l'NGF siamo in grado di valutare la MMR con una sensibilità di circa  $2 \times 10^{-6}$ .

Nella Fig. 2a e 2b viene mostrato un confronto tra la citofluorimetria di 2° generazione e l'NGF in un paziente con MM.

È interessante notare come con la citofluorimetria di 2° generazione, pur analizzando un numero significativo di cellule ( $2 \times 10^6$ ), non si riesce a quantificare MMR. Invece, utilizzando una tecnica più sensibile come NGF, analizzando più di  $8 \times 10^6$  di cellule, sia possibile identificare e quantificare una popolazione plasmacellulare monoclonale (popolazione indicata in rosso), seppure in percentuale molto bassa (0.0012%).

In una pubblicazione del 2019 il gruppo spagnolo (Paiva B. et al 2019) ha evidenziato come una percentuale molto bassa di MMR, valutata con l'NGF, può avere un'importanza clinica. Infatti, i pazienti con una percentuale di MMR compresa tra 0.0002% e 0.001% mostrano una PFS migliore rispetto a quelli con percentuali più elevate di MMR. Tuttavia, la loro PFS è comunque inferiore rispetto a quello dei pazienti che risultano completamente negativi per MMR (Fig.3).

### MMR valutata con citofluorimetria di 2° generazione



### MMR valutata con NGF

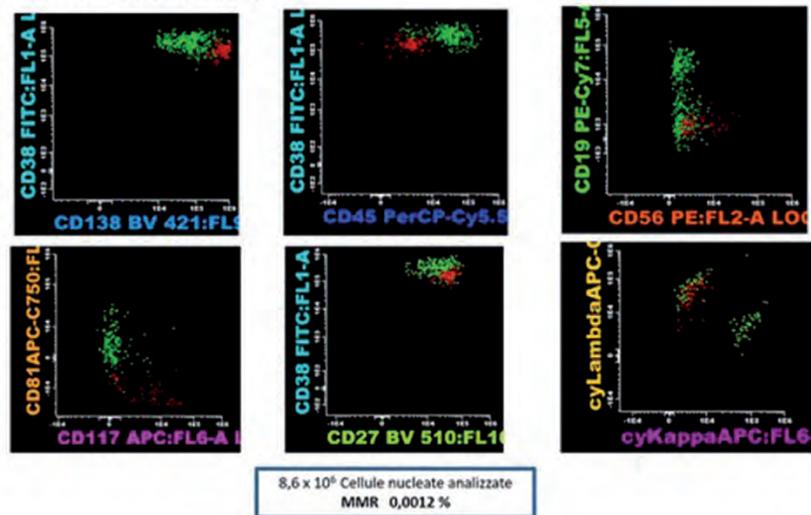


Figura 2. a) Valutazione della MMR con la citofluorimetria di seconda generazione. Non identificata MMR con una sensibilità di  $10^{-5}$ . b) Valutazione della MMR, nello stesso paziente, con l'NGF. Identificata una piccola percentuale di plasmacellule patologiche, evidenziate in rosso.

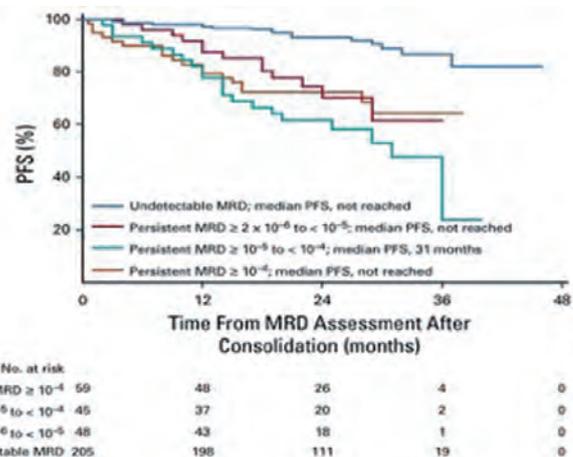


Figura 3. Sopravvivenza libera da progressione, dopo terapia di consolidamento, nei pazienti con MMR negativa rispetto ai pazienti con MMR rilevabile con diversi range logaritmici (da Paiva B. et al. 2019).

Questo esempio sottolinea l'importanza della sensibilità delle tecniche utilizzate per il monitoraggio della MMR. La differenza nei risultati ottenuti, con metodi che raggiungono sensibilità diverse, evidenzia che, anche se un test non mostra segni di malattia, ciò non significa necessariamente che il paziente sia privo di MMR. Infatti, negli ultimi anni, viene utilizzato sempre di più il termine malattia residua misurabile, perché non è realmente la malattia minima residua ma quella parte della malattia che possiamo effettivamente misurare, a seconda della sensibilità della metodica utilizzata.

Risulta quindi importante includere nel referto i limiti di rivelabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ) della metodica utilizzata. Ciò fornisce al clinico informazioni sulla sensibilità con cui è stata valutata la MMR. In questo modo, si garantisce una comprensione chiara e accurata dei risultati, a supporto delle decisioni cliniche. In particolare, in citofluorimetria LOD e LOQ sono proporzionali al numero di cellule analizzate. LOD viene calcolato come il rapporto tra 20 e il numero totale di cellule analizzate, mentre LOQ è il rapporto tra 50 e il numero totale di cellule acquisite. Esistono diversi studi che indicano che un valore di 20 eventi è considerato significativo per la rilevazione di una popolazione piccola e omogenea in un file di dati di citometria a flusso, quan-

do i dati vengono analizzati da operatori esperti. Quindi 20 è il numero minimo di PC aberranti necessarie per poter identificare una popolazione patologica reale e cinquanta il numero minimo di PC aberranti per poter quantificare con precisione ed accuratezza accettabile questa popolazione (Arroz M. et al. 2016).

#### Next Generation Flow

L'NGF rappresenta un grande passo avanti nella citometria a flusso. La standardizzazione in tutte le fasi della procedura, dalla fase preanalitica a quella post-analitica, è fondamentale per garantire risultati affidabili e riproducibili tra i vari centri.

È importante seguire le procedure operative standard (SOP) in ogni fase dell'NGF, anche piccole deviazioni dalle raccomandazioni possono influenzare significativamente i risultati finali, compromettendo la precisione e l'affidabilità dei dati ottenuti. Tutte le SOP sono pubblicate sulla pagina internet del consorzio euroflow e sono consultabili da tutti gli operatori (<https://euroflow.org/protocols/>).

#### Fase preanalitica

Nella fase preanalitica, diversi fattori possono influenzare i risultati del dato citofluorimetrico: la qualità del midollo,

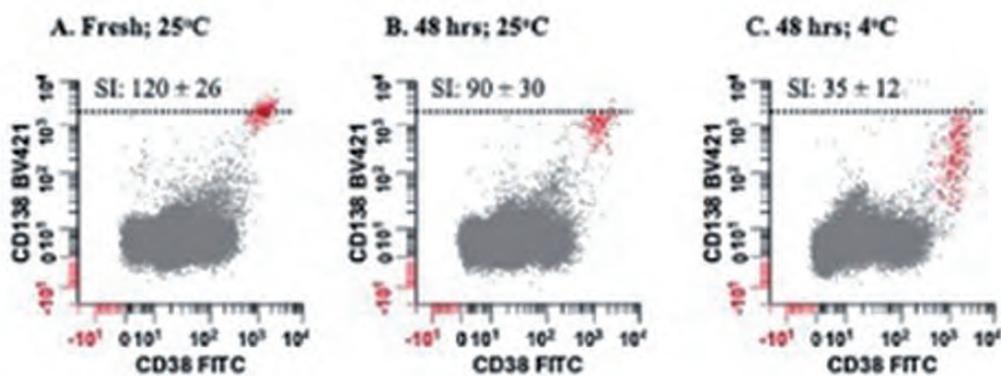


Figura 4. Impatto della temperatura di conservazione dei campioni sul livello di espressione di CD138 nelle plasmacellule (da SOH KT. et al. 2021).

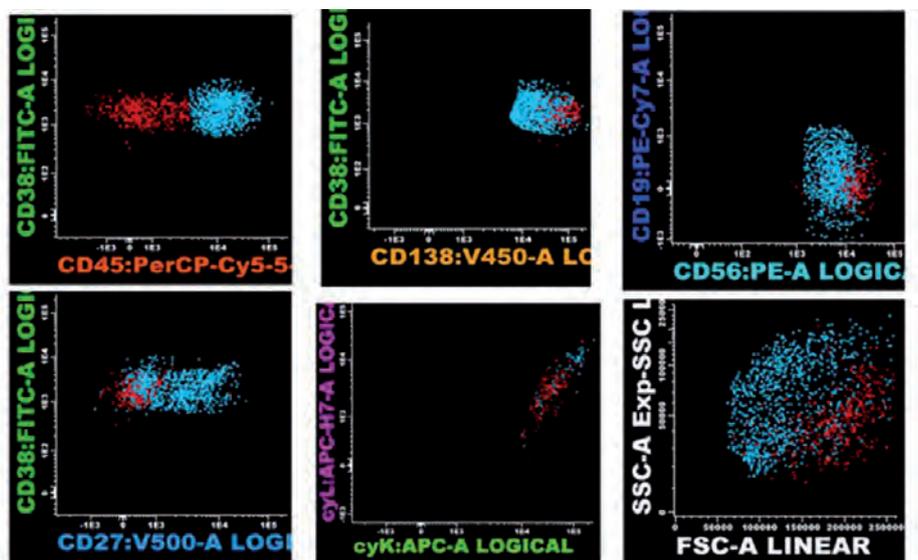


Figura 5. Effetto della temperatura di trasporto (troppo bassa o troppo alta), sulla sopravvivenza cellulare (parametri fisici ridotti) e sul legame aspecifico degli anticorpi.

la raccolta e le condizioni di trasporto del campione. La qualità del campione è essenziale per garantire risultati accurati nella valutazione della MMR. Eseguire l'analisi sul primo campione di aspirato midollare (first pull) è importante perché aiuta a ridurre il rischio di emodiluizione, che rappresenta una delle cause di risultati falsi negativi, e quindi compromette la capacità di rilevare la MMR (Oskarsson JP. et al. 2023) (<https://euroflow.org/protocols/>).

Inoltre, è fondamentale raccogliere il midollo osseo in una provetta contenente EDTA, poiché altri anticoagulanti possono interferire con l'intensità dell'espressione del CD138, il marcatore principale per l'identificazione e quantificazione delle PC. L'uso di anticoagulanti inappropriati può non solo alterare i risultati, ma anche compromettere la vitalità delle cellule, rendendo difficile l'analisi (<https://euroflow.org/protocols/>).

Infine, la temperatura di trasporto è fondamentale per mantenere l'integrità del campione.

Quando un laboratorio riceve campioni da altri centri è

questo effetto, come evidenziato dalla popolazione colorata in azzurro. Quindi è consigliabile utilizzare per il trasporto dei campioni dei contenitori con uno strato isolante, allo scopo di mantenere una temperatura stabile e proteggere i campioni da sbalzi termici che potrebbero influenzare la loro qualità e integrità.

È fondamentale processare il campione entro le prime 24-48 ore dalla raccolta: questo intervallo di tempo è importante per garantire che la qualità dell'esame non venga compromessa. Trascorso questo tempo, i campioni possono subire alterazioni che potrebbero influenzare i risultati, rendendoli meno affidabili.

#### Fase analitica

Il progetto EuroFlow si è concentrato inoltre sulla standardizzazione delle impostazioni strumentali attraverso la definizione di SOP, che è fondamentale per ottenere misurazioni che siano riproducibili e comparabili, indipendentemente dal momento in cui vengono effettuate o dal tipo di strumento utilizzato. In questo modo, si migliora l'affi-

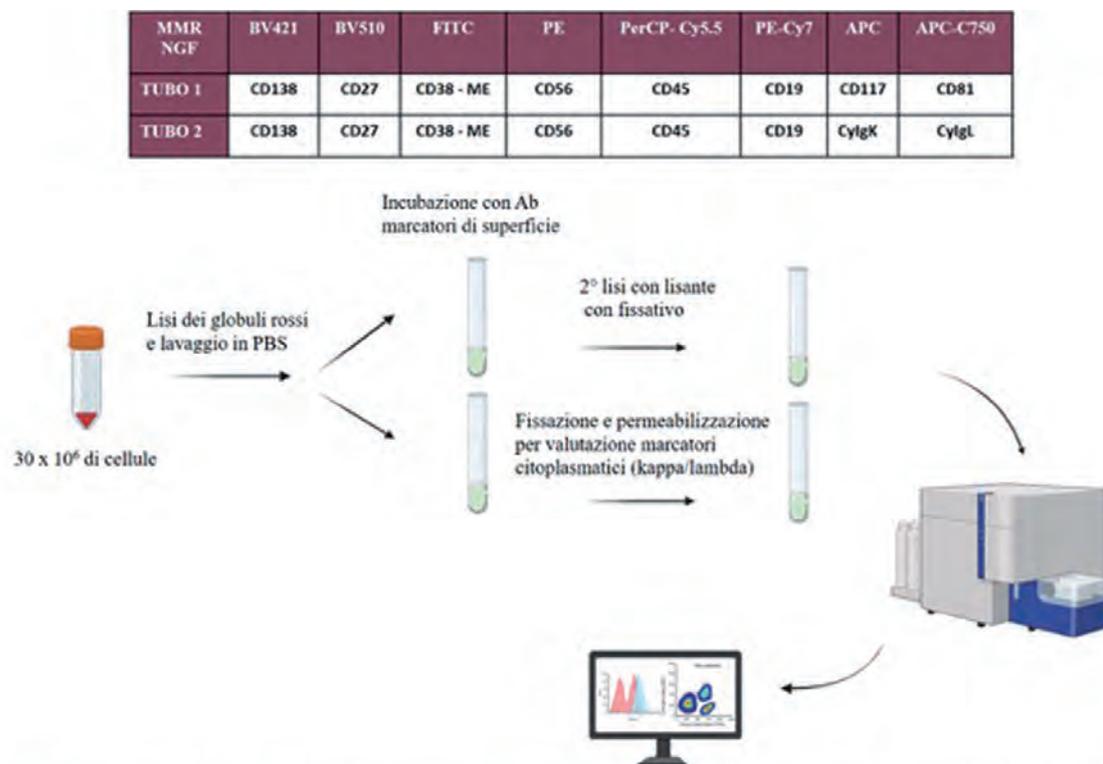


Figura 6. Rappresentazione schematica della preparazione del campione e il pannello di anticorpi utilizzato per la valutazione della MMR con l'NGF. Immagine creata con Biorender.com.

fondamentale che il trasporto avvenga a temperatura ambiente controllata. Questo aiuta a preservare le caratteristiche cellulari, inclusa l'espressione del CD138, che è fondamentale per l'analisi. Temperature più basse possono influenzare negativamente questa espressione, portando a risultati che potrebbero non essere accurati (Fig.4) (Soh KT. et al. 2021). Assicurarsi che i campioni siano trasportati nelle condizioni appropriate è essenziale per garantire l'affidabilità delle analisi eseguite.

Le temperature esterne, sia troppo basse che troppo alte, possono avere un impatto significativo sulla qualità del campione e quindi sulla vitalità cellulare. Queste condizioni possono portare a un aumento del legame aspecifico degli anticorpi monoclonali, il che può compromettere l'accuratezza dei risultati. La figura 5 dimostra proprio

l'importanza di questo effetto, come evidenziato dalla popolazione colorata in azzurro. Quindi è consigliabile utilizzare per il trasporto dei campioni dei contenitori con uno strato isolante, allo scopo di mantenere una temperatura stabile e proteggere i campioni da sbalzi termici che potrebbero influenzare la loro qualità e integrità.

È fondamentale processare il campione entro le prime 24-48 ore dalla raccolta: questo intervallo di tempo è importante per garantire che la qualità dell'esame non venga compromessa. Trascorso questo tempo, i campioni possono subire alterazioni che potrebbero influenzare i risultati, rendendoli meno affidabili.

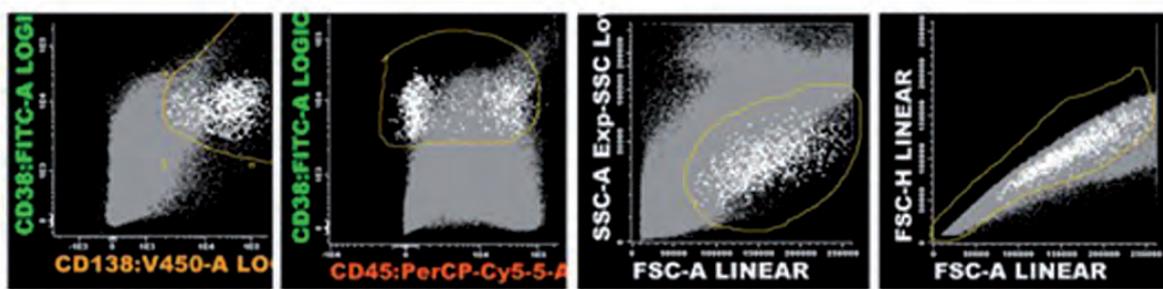
Per riconoscere il CD38 viene utilizzato un anticorpo anti CD38 multiepitopo che è fondamentale nei pazienti

che fanno terapia con anticorpi monoclonali anti CD38, quale daratumumab. Con l'introduzione di questo farmaco nella pratica clinica è diventato fondamentale avere nel pannello per la rivalutazione del paziente con MM un anticorpo anti CD38 multiepitopo, cioè che riconosca epitopi diversi da quello riconosciuto dall'anticorpo monoclonale del farmaco. Si può pertanto ottenere una valutazione più accurata delle PC, anche in presenza di terapie che potrebbero mascherare la loro presenza.

Inoltre, questo pannello presenta anticorpi necessari per valutare la qualità del campione, valutando e quantificando le tre popolazioni normalmente assenti nel sangue periferico, come mastociti (CD117<sup>high</sup>, CD45<sup>dim</sup>), linfociti b rigeneranti (CD19<sup>+</sup>, CD45<sup>dim</sup>, CD38<sup>high</sup>, CD81<sup>high</sup>, CD27<sup>-</sup>) ed eritroblasti (CD45<sup>-</sup>, CD38<sup>-</sup>, CD117<sup>-/+</sup>, SSC<sup>low</sup>) (Puig N. et al. 2021). In aggiunta la valutazione delle plasmacellule con due tubi separati permette di avere un doppio controllo ed essere sicuri che la popolazione patologica identificata non sia una popolazione aspecifica.

(Phosphate Buffered Saline) le cellule vengono suddivise in due tubi da facs e successivamente si procede con la marcatura (pannello anticorpale mostrato nella Fig. 6). Nel primo tubo si valutano gli antigeni di superficie, in particolare il CD38, CD138, CD27, CD56, CD19, CD45, CD117 e CD81, mentre nel tubo due, oltre agli antigeni di superficie (CD38/CD138/CD45/CD19/CD27/CD56) si esegue la valutazione intracitoplasmatica delle catene leggere delle immunoglobuline kappa/lambda per una conferma della clonalità delle PC patologiche. Dopo la marcatura di superficie il primo tubo viene lisato con un lisante con il fissativo e successivamente le cellule vengono lavate in PBS e sono pronte per l'acquisizione (Fig. 6). Per ogni tubo vengono acquisite almeno 5x 10<sup>6</sup> di cellule e prima dell'analisi i due tubi vengono uniti in modo da poter analizzare contemporaneamente 10 x 10<sup>6</sup> di cellule. Il software Infinicyt consente, attraverso marcatori comuni nei due tubi (CD38/ CD138/ CD45/ CD19/ CD56/ CD27), di combinare più file fcs in un unico file di dati per eseguire un'analisi globale. L'unione dei due tubi permet-

a)



b)

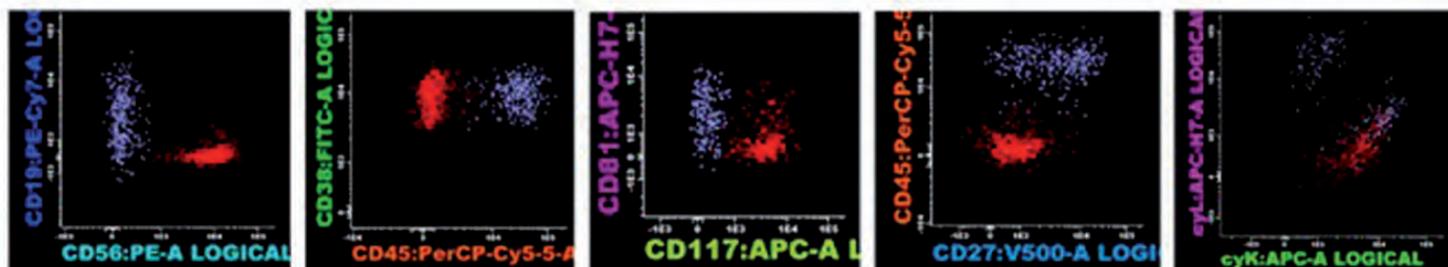


Figura 7. a) Strategia di analisi per la selezione e qualificazione delle plasmacellule totali (normali e patologiche). b) Differenti espressione degli antigeni CD19, CD45, CD56, CD117, CD81 e CD27 nelle plasmacellule normali e monoclonali patologiche, evidenziate in rosso, rappresentano lo 0,1% della popolazione cellulare totale del campione di sangue midollare (fenotipo CD45<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD27<sup>dim</sup>/CD117<sup>+/cy K</sup>).

Per ottenere una sensibilità elevata è fondamentale preparare un numero significativo di globuli bianchi da cui valutare la MMR. Infatti, per raggiungere risultati accurati, bisogna utilizzare almeno 30 milioni di globuli bianchi. Una volta prelevata la quantità di aspirato midollare, contenente 30 milioni di globuli bianchi, viene eseguita la lisi dei globuli rossi con un lisante a base di cloruro di ammonio (NH<sub>4</sub>Cl). La lisi dei globuli rossi viene eseguita in tubi Falcon da 50 mL (Bulk Lysis). In ogni tubo è possibile inserire al massimo 2mL di sangue midollare. Per quantità di sangue midollare maggiori utilizzare più provette da 50 mL. Dopo un lavaggio in tampone fosfato salino (PBS-

te di raggiungere una sensibilità elevata, fondamentale per identificare possibili cellule tumorali residue.

La seconda lisi del tubo 1 con il lisante con il fissativo è importante, poiché garantisce che le cellule abbiano caratteristiche fisiche simili a quelle del tubo 2. Questo è essenziale per poter unire ed analizzare correttamente gli eventi acquisiti da entrambi i tubi.

#### Fase post analitica

Per l'analisi è consigliato utilizzare il software di analisi Infinicyt. La possibilità di eseguire analisi automatiche (non solo manuali), aiuta a standardizzare i risultati e a

ridurre la variabilità tra diversi operatori, il che è fondamentale per garantire la riproducibilità dei dati. Per l'analisi manuale si consiglia di seguire le linee guida pubblicate dal European Myeloma Network (EMN) per la diagnosi e il monitoraggio del MM (Caers J. et al. 2018).

Gli antigeni CD 38, CD138, CD45, insieme ai parametri fisici, sono fondamentali per selezionare tutte le plasmacellule, sia normali che patologiche (Fig. 7a). Inoltre, la differente espressione degli antigeni CD19, CD56, CD117, CD27 e CD81, insieme alla restrizione della catena leggera delle immunoglobuline citoplasmatiche, consente una chiara discriminazione tra PC normali e monoclonali, in quasi tutti i pazienti con il MM. Nella Fig. 7b sono mostrate, in viola le plasmacellule normali (CD45<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>/CD56<sup>-</sup>/CD117<sup>-</sup>/CD27<sup>+</sup>/CD81<sup>+</sup>), e in rosso le plasmacellule patologiche (CD45<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>/CD27<sup>dim</sup>/CD81<sup>-</sup>/cyK). Le plasmacellule monoclonali rappresentano lo 0.1% della popolazione cellulare totale del campione di sangue midollare.

Naturalmente, le caratteristiche immunofenotipiche delle plasmacellule monoclonali possono variare da un paziente all'altro.

Per l'analisi automatica il software impiega un database di casi di MM e identifica automaticamente, sulla base delle caratteristiche fisiche e di espressione dei vari antigeni, non solo le popolazioni plasmacellulari (normali o patologiche), ma anche le principali popolazioni cellulari presenti nel sangue midollare.

Inoltre, una delle caratteristiche di questo software è la capacità di generare in modo automatico il referto, rappresentando un grande vantaggio nel minimizzare il rischio di errori nella trascrizione delle percentuali delle popolazioni cellulari.

#### **Fattori che possono influire sulla qualità del dato citofluorimetrico**

L'NGF è una tecnica standardizzata ad alta sensibilità ed eventuali deviazioni dalle SOP potrebbero, sia influenzare la qualità del dato citofluorimetrico, che portare a una significativa perdita di cellule con conseguente impatto sulla sensibilità con cui viene definita la MMR. Diversi fattori possono influire sul risultato finale e piccole accortezze durante la preparazione del campione possono migliorare significativamente la qualità dei dati ottenuti:

- Quando si lavora con campioni di midollo osseo ad alta cellularità è importante adattare la quantità di lisante al volume di sangue midollare che si sta processando. Un eccesso di lisante può danneggiare le cellule e ridurre la loro vitalità, portando a risultati poco affidabili nell'analisi. Quindi, mantenere le giuste proporzioni (1:25, 2 ml sangue in 50 ml di lisante) è fondamentale per garantire che le cellule rimangano intatte e pronte per l'analisi.

- E' altresì importante che durante la lisi dei globuli rossi i campioni vengano mantenuti in agitazione attraverso dispositivi che consentono una continua miscelazione della soluzione sangue- lisante. Questo consente una ottimale lisi dei globuli rossi, permettendo nelle fasi successive una migliore incubazione degli anticorpi con i globuli bianchi e una minor percentuale di detriti durante l'acquisizione del campione al citofluorimetro.

- Risospendere accuratamente le cellule con la pipetta prima dell'incubazione con gli anticorpi è un passaggio fondamentale nella preparazione del campione. Quando si lavora con un numero elevato di cellule la formazione

di aggregati è pressoché inevitabile. Se gli aggregati non vengono eliminati, gli anticorpi potrebbero non legarsi in modo ottimale alle cellule, compromettendo la qualità del dato acquisito e l'interpretazione dei risultati.

- Prima dell'acquisizione del campione è consigliabile risospendere molto bene le cellule e filtrare i campioni attraverso filtri cellulari con pori di dimensioni di 50 µm per rimuovere la presenza di possibili aggregati che potrebbero interferire con l'acquisizione del campione.

- Infine, il tipo di materiale/plastica che viene utilizzato per la preparazione del campione potrebbe avere un impatto sulla perdita di cellule. Alcune plastiche infatti legano con maggiore affinità le soluzioni in esse contenute, con possibile reclutamento di materiale cellulare che può ridurre drasticamente il numero finale di cellule che riusciamo ad analizzare, riducendo così la sensibilità nella valutazione della MMR.

#### **Analisi dei dati nei pazienti trattati con Daratumumab**

Non sempre il tipo di terapia che il paziente riceve viene comunicato nella richiesta che accompagna il campione presso il laboratorio. L'introduzione del daratumumab nella pratica clinica rende l'uso dell'anticorpo anti CD38 multiepitopo fondamentale per i laboratori di diagnostica per la valutazione delle plasmacellule durante il follow-up (Soh KT. et al. 2019).

È fondamentale considerare che nei pazienti trattati con anticorpi monoclonali anti CD38, l'intensità dell'espressione del CD38 nelle plasmacellule, sia normali (evidenziate in verde) che patologiche (evidenziate in rosso), può risultare più bassa (Fig. 8). Questo aspetto è importante durante l'analisi dei dati, poiché una ridotta espressione del CD38 potrebbe influenzare la selezione e l'identificazione delle plasmacellule. I database per l'analisi automatica del software Infinicyt sono stati aggiornati con casi di pazienti con terapia monoclonali anti CD38, in modo da identificare in maniera affidabile la MMR anche in questi pazienti.

#### **Conclusioni**

Ad oggi NGF e NGS sono le tecniche raccomandate, dall'IMWG, per la valutazione della MMR nel MM. L'NGF costituisce un approccio convalidato e standardizzato per la quantificazione ad alta sensibilità (fino a  $2 \times 10^{-6}$ ) e rapida (<4h) della MMR nel MM, applicabile a quasi tutti i pazienti, e riproducibile nella maggior parte dei laboratori. Tuttavia, deve essere evidenziata la necessità di seguire i protocolli di preparazione, acquisizione e analisi dei dati per poter avere dei dati precisi ed affidabili, poiché anche piccole deviazioni dal protocollo possono avere un impatto sul risultato finale.

Lo sforzo congiunto del consorzio Euroflow e il coinvolgimento di gruppi a livello globale capaci di eseguire NGF in modo standardizzato permetteranno in futuro di migliorare la precisione del monitoraggio della MMR.

#### **Bibliografia**

- 1) Arroz M. et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. Cytometry Part B 2016 B90B: 31-39.
- 2) Caers J. et al. European Myeloma Network recommendations on tool for the diagnosis and monitoring of multiple myeloma: what to use and when. Haematologica 2018 103(11): 1772-1784.

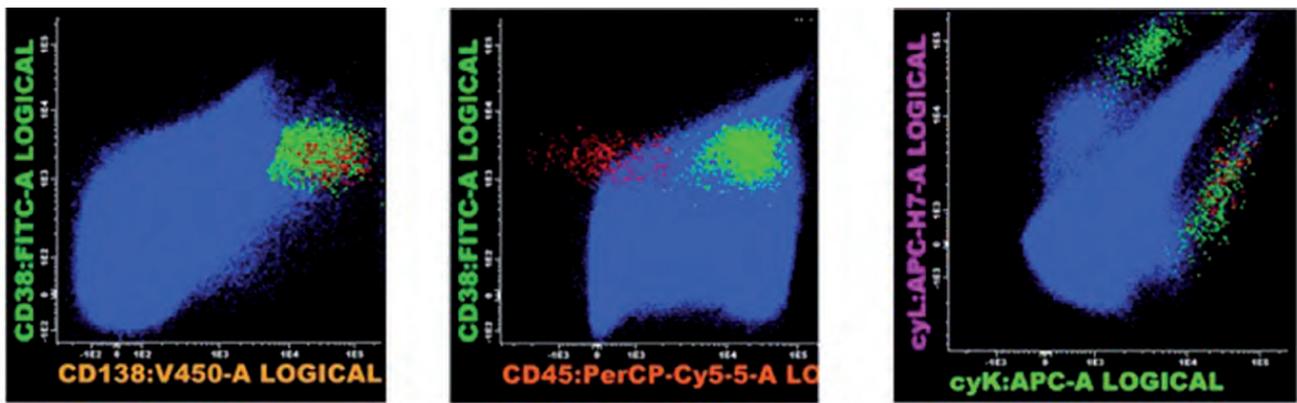


Figura 8. Livello di espressione del CD38, rilevato con l'anticipo anti CD38 multipitopo, nelle plasmacellule normali e patologiche dei pazienti con MM trattati con daratumumab.

3) Derman BA. et al. Measurable Residual Disease and Decision-Making in Multiple Myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2024 Apr;38(2):477-495.

4) Flores-Montero J. et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma. *Leukemia* (2017) 31, 2094–2103.

5) <https://euroflow.org/protocols/>

6) Kalina T. et al. EuroFlow standardization of flow cytometry protocols. *Leukemia* (2012) 26, 1986–2010.

7) Kumar S. et al. International Myeloma Working Group consensus criteria for response and minimal residual disease assessment in multiple myeloma. *Lancet Oncol* 2016 Aug;17(8): e328-e346.

8) Munshi NC et al. Association of Minimal Residual Disease With Superior Survival Outcomes in Patients With Multiple Myeloma: A Meta-analysis. *JAMA Oncol* 2017; 3(1): 28-35.

9) Munshi NC. et al. A large meta-analysis establishes the role of MRD negativity in long-term survival outcomes in patients with multiple myeloma. *Blood Adv.* 2020 Dec 8;4(23):5988-5999.

10) Oskarsson JP. et al. Determining hemodilution in diagnostic bone marrow aspirated samples in plasma cell disorders by next-generation flow cytometry: Proposal for a bone marrow quality index. *Blood Cancer Journal* (2023) 13:177.

11) Paiva B. et al. New criteria for response assessment: role of minimal residual disease in multiple myeloma. *Blood.* 2015;125:3059–3068.

12) Paiva B. et al. Measurable Residual Disease by Next-Generation Flow Cytometry in Multiple Myeloma. *J Clin Oncol.* 2020 38:784-792.

13) Palumbo A., Anderson K. Multiple Myeloma *N Engl J Med.* 2011;364: 1046-1060.

14) Perrot A et al. Minimal residual disease negativity using deep sequencing is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood.* 2018;132(23):2456-2464.

15) Puig N. et al. Reference Values to Assess Hemodilution and Warn of Potential False-Negative Minimal Residual Disease Results in Myeloma. *Cancers* 2021, 13, 4924.

16) Riva, G. et al. Multiparametric Flow Cytometry for MRD Monitoring in Hematologic Malignancies: Clinical Applications and New Challenges. *Cancers* 2021, 13, 4582.

17) Soh KT., Wallace PK. Evaluation of measurable residual disease in multiple myeloma by multiparametric flow cytometry: Current paradigm, guidelines, and future applications. *Int J Lab Hematol.* 2021;43(Suppl. 1):43–53.

18) Soh KT., Wallace PK. Monitoring of Measurable Residual Disease in Multiple Myeloma by Multiparametric Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom.* 2019 September; 90(1).

# Le Spatial Omics: mappare l'identità cellulare nel contesto dei tessuti

Elisabetta Ferretti and Elena Splendiani

Dipartimento di Medicina Sperimentale  
Sapienza Università di Roma

e-mail: Elisabetta.ferretti@uniroma1.it

## Abstract

### Spatial Omics: Mapping Cellular Identity Within Tissue Context

Spatial omics technologies have revolutionized biological research by enabling high-resolution mapping of gene expression, epigenetic landscapes, and protein distributions within intact tissues. Unlike conventional single-cell RNA sequencing, spatial transcriptomics preserves the spatial and cellular context essential for unraveling tissue architecture, cell-to-cell communication, and disease dynamics. This review traces the development of spatial omics, explores current technological platforms, and introduces Open-ST—an open-source tool that integrates transcriptomic and imaging data in both 2D and 3D formats. By uniting molecular detail with spatial context, spatial omics is transforming the way scientists investigate development, disease mechanisms, and therapeutic interventions.

### Abstract in italiano

Le tecnologie di spatial omics hanno rivoluzionato la ricerca biologica, permettendo la mappatura ad alta risoluzione dell'espressione genica, dei paesaggi epigenetici e della distribuzione proteica all'interno di tessuti intatti. A differenza del sequenziamento tradizionale dell'RNA a singola cellula, la trascrittomica spaziale conserva il contesto cellulare e spaziale, fondamentali per comprendere l'architettura tissutale, la comunicazione cellula-cellula e le dinamiche delle malattie. Questa review ripercorre l'evoluzione delle spatial omics, analizza le piattaforme tecnologiche attualmente disponibili e presenta Open-ST, uno strumento open-source che integra dati trascrittomici e di imaging in formati sia 2D che 3D. Unendo dettagli molecolari e contesto spaziale, le spatial omics stanno trasformando il modo in cui i ricercatori studiano lo sviluppo, i meccanismi patologici e i target terapeutici.

### Introduzione: dalla cellula alle omiche spaziali

Nel 1665, Robert Hooke osservò per la prima volta le cellule al microscopio, gettando le basi della biologia cellulare. Nei secoli successivi, l'approfondimento delle funzioni cellulari ha portato allo sviluppo delle tecnologie omiche, culminate nel 2009 con il primo sequenziamento di RNA a singola cellula (Tang *et al.*, 2009). Dal 2014, la disponibilità di piattaforme commerciali ha reso accessibile il sequenziamento trascrittomico a livello cellulare, aprendo la strada a una comprensione più fine dell'eterogeneità cellulare.

### Perché è importante la risoluzione a singola cellula?

Ogni cellula di un organismo complesso, come un mam-

mifero, può esprimere migliaia di geni. Tuttavia, la maggior parte di questi geni è trascritta solo in poche copie per cellula. Studi recenti hanno mostrato che circa il 90% del trascrittoma cellulare è rappresentato da meno di 50 molecole per gene per cellula (Kolodziejczyk *et al.*, 2015). Questo significa che, per cogliere la complessità e la variabilità delle cellule in un tessuto, è fondamentale poter analizzare le singole cellule nella loro unicità. Le tecnologie single-cell hanno rivoluzionato questo campo, permettendo di esplorare nuovi stati cellulari, definire popolazioni rare e ricostruire le traiettorie di sviluppo o transizione patologica delle cellule. Inoltre, queste tecniche si sono rivelate essenziali per comprendere i meccanismi specifici che determinano la funzione e la disfunzione dei diversi tessuti, aprendo nuove strade per la medicina personalizzata (Svensson, Vento-Tormo and Teichmann, 2018).

### Dalle Singole cellule alle Spatial Omics

Nonostante l'enorme potenziale, le tecniche single-cell presentano un limite cruciale: la perdita dell'informazione spaziale. Le cellule, infatti, non agiscono in isolamento ma interagiscono costantemente con l'ambiente circostante e con altre cellule. Per comprendere pienamente i fenomeni biologici complessi è quindi necessario sapere non solo "cosa" esprime una cellula, ma anche "dove" si trova. Da questa esigenza nasce il campo delle spatial omics, che integra le informazioni molecolari con la posizione delle cellule all'interno del tessuto. Attraverso queste tecnologie, è possibile identificare gradienti di espressione genica, seguire traiettorie di transizione da stati sani a patologici, e scoprire microambienti funzionali specifici come le nicchie staminali o le interfacce immunitarie nei tumori. La possibilità di mantenere il contesto spaziale ha ampliato le nostre capacità di analisi in ambiti quali lo sviluppo embrionale, la rigenerazione tissutale e la progressione delle malattie.

### Tecnologie Spatial Omics

Le tecnologie spatial transcriptomics si dividono principalmente in due categorie: approcci basati sull'imaging e approcci basati sul sequenziamento. Gli approcci imaging utilizzano sonde fluorescenti o metodi di ibridazione in situ per rilevare trascritti direttamente nel tessuto, mentre quelli basati sul sequenziamento catturano RNA su array o tramite "beads" munite di barcode e li mappano nello spazio. Ogni metodo ha caratteristiche specifiche in termini di risoluzione, e tipologia di cattura.

**Tabella 1: Confronto tra tecnologie di trascrittomica single-cell e spaziale in base al metodo, numero di cellule analizzabili e approccio utilizzato.**

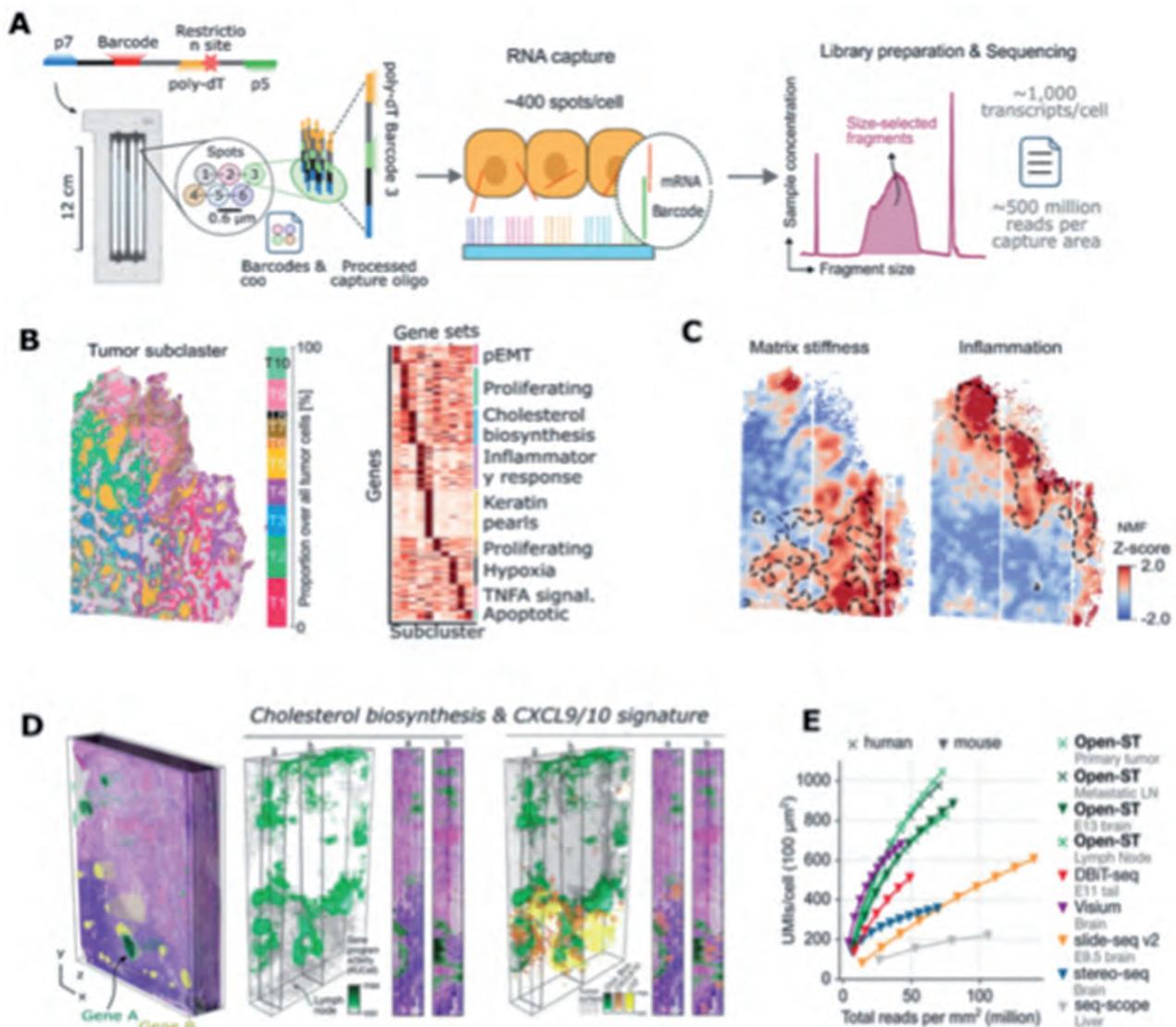
Categoria	Tecnologia	Cellule Analizzabili	Note
Single Cell	Microfluidica (Drop-seq®, 10x Genomics Chromium)	10.000 - 20.000	Alta scala, uso di goccioline per incapsulare le cellule
	Indicizzazione Combinatoria (Parse Biosciences®)	10.000 - 1.000.000	Elevatissima scala, senza bisogno di isolare singole cellule
	Ordinamento su piastra (Smart-seq2®, CEL-seq2)	100 - 300	Alta risoluzione trascrittomica, ma basso “throughput”
Analisi	Imaging - ISH (MERFISH)	>30.000	Visualizzazione diretta
Categoria	Tecnologia	Cellule Analizzabili	Note
Spaziale	CosMX®, ISS)		dell'RNA in tessuto
	Sequenziamento - Array (10x Visium®, Curio Seeker®, Stereo-seq)	>30.000	Basato su array con coordinate spaziali
	Laser Microdissection / Probe based (GeoMX®, Visium FFPE®)	>30.000	Profilazione mirata, anche su tessuti FFPE
	In situ Sequencing (10x Xenium®)	>30.000	Combina imaging e sequenziamento nello spazio

La tabella evidenzia come le diverse tecnologie siano progettate per affrontare esigenze specifiche, che vanno dalla capacità di analizzare un numero elevato di cellule, fino ad analisi ad alta risoluzione di singole cellule o trascrittomi in situ. Queste tecnologie offrono un'ampia gamma di possibilità, dalla ricerca molecolare di dettaglio alla mappatura globale, rispondendo a domande biologiche su diversi livelli di complessità (Williams *et al.*, 2022). Ogni tecnologia è progettata per rispondere a domande specifiche, adattandosi alle esigenze di risoluzione e scala. Le tecniche a singola cellula consentono un'analisi molecolare dettagliata, mentre le tecnologie di analisi spaziale, con la loro capacità di mappare l'espressione genica nel contesto spaziale, offrono nuove possibilità per comprendere come le cellule interagiscono all'interno dei tessuti e degli organi. Complessivamente, queste tecnologie stanno aprendo nuove frontiere nella biologia cellulare e nella ricerca medica.

#### Open-ST: una piattaforma open-source per l'analisi trascrittomica in 3D

L'emergere delle tecnologie spatial omics ha reso possibile lo studio dell'organizzazione spaziale dell'espressione genica nei tessuti con una risoluzione senza precedenti. Tuttavia, molte piattaforme disponibili presentano limitazioni in termini di accessibilità, scalabilità e flessibilità analitica. In questo contesto, la tecnologia di Spatial Omics più recente ed avanzata è stata sviluppata nell'ambito di una collaborazione scientifica tra Sapienza Università di Roma e Berlin Institute for Medical Systems Biology (BIMSB), ed è stata definita “Open-ST” (Schott *et al.*, 2024, 2025). Tale tecnologia ha messo

a punto una piattaforma open-source per l'analisi trascrittomica spaziale ad alta risoluzione, caratterizzata da un'integrazione tra dati di sequenziamento e immagini, applicabile sia in 2D che in 3D. Utilizzando “flowcells” della company Illumina, la tecnologia crea aree di cattura ad alta densità che sono in grado di legare RNA poliadrenilato da sezioni di tessuto con una risoluzione di circa 0,6 µm. Un processo di imaging, ottimizzato attualmente per campioni raccolti e immediatamente crioconservati a basse temperature, fornisce immagini ad alta risoluzione che vengono poi utilizzate per segmentare le cellule e integrarle con i dati trascrittomici (Figura 1 A). La combinazione tra l'imaging morfologico e la mappatura trascrittomica permette a Open-ST di studiare la composizione molecolare di tessuti complessi, come quelli tumorali, mantenendo una visione integrata delle caratteristiche cellulari e della loro interazione spaziale. Questo approccio ha permesso di identificare, per esempio, una varietà di sottotipi cellulari all'interno di un singolo campione tumorale, evidenziando l'eterogeneità molecolare non visibile con le altre tecnologie (Figura 1 B-C). La piattaforma è già stata applicata con successo in diversi tessuti e modelli sperimentali. Nel tessuto cerebrale murino, ha permesso di distinguere i tipi cellulari principali con una risoluzione subcellulare. Nei tumori testicolare, ha evidenziato l'elevata eterogeneità spaziale delle popolazioni tumorali, immunitarie e stromali. Nei linfonodi metastatici, l'approccio tridimensionale ha rivelato strutture non rilevabili con sezioni bidimensionali, portando all'identificazione di biomarcatori localizzati in regioni funzionalmente rilevanti, come il confine tra tumore e linfonodo (Figura 1 D).



**Figura 1:** "Eterogeneità Spaziale e Interazioni Molecolari nel Microambiente Tumorale del Carcinoma Squamoso della Testa e del Collo (HNSCC)" (Schott *et al.*, 2024).

A) Passaggi di preparazione dei campioni per analisi Open-ST: la tecnologia include la preparazione delle aree di cattura con "oligos" personalizzati marcati con codici a barre disposti in cluster distanti 0,6 μm utilizzando la supporti Illumina; trattamento del tessuto nell'area di cattura per rilasciare l'mRNA; seguito dalla preparazione della libreria che viene successivamente sequenziata.

B) Campione Tumorale: la tecnologia Open-ST evidenzia l'eterogeneità spaziale e trascrittomiche delle cellule tumorali che compongono il campione analizzato. Il grafico sulla sinistra mostra l'arricchimento spaziale delle popolazioni tumorali e stromali (p-value > 0,05).

C) Campione Tumorale: visualizzazione spaziale di trascritti che definiscono interazioni tra cellule diverse che corrispondono a principali coppie ligando-recettore.

D) Ricostruzione in 3D di campione di Linfonodo Tumorale: la tecnologia Open-ST evidenzia l'espressione spaziale di chemochine CXCL9/CXCL10, e di geni coinvolti nella biosintesi del colesterolo (da Reactome,

quantificata per cella segmentata con AUCCell). La componente tumorale è rappresentata in grigio. L'espressione genica è mostrata in due sezioni trasversali (a-b).

Un ulteriore vantaggio di Open-ST risiede nella sua natura open-source che favorisce la trasparenza, l'adattabilità e la condivisione nella comunità scientifica e dalla sua accessibilità economica rispetto alle altre piattaforme contribuendo a democratizzare l'accesso alla trascrittomiche spaziale tridimensionale (Figura 1 E).

Infine, i dati generati tramite Open-ST potrebbero avere un impatto significativo nel campo delle terapie geniche. La possibilità di analizzare in dettaglio la distribuzione spaziale e molecolare degli RNA fornisce informazioni cruciali per lo sviluppo e l'ottimizzazione delle terapie geniche. In questo contesto, Open-ST rappresenta un potente strumento per migliorare la comprensione delle interazioni tra le molecole di RNA all'interno delle cellule, contribuendo allo sviluppo di trattamenti farmacologici più mirati e personalizzati, fondamentali per la medicina di precisione.

### Prospettive future

Le tecnologie spatial stanno rapidamente evolvendo verso l'integrazione con altre analisi omiche e pertanto avremo la possibilità di analizzare uno stesso campione mediante multi-omica. In dettaglio, sarà possibile combinare in un'unica analisi informazioni di tipo trascrittomico, epigenetico, proteico e metabolico ad altissima risoluzione. Questa convergenza porterà a una comprensione più accurata dei meccanismi molecolari e delle loro variazioni nel tempo e nello spazio.

Tuttavia, restano delle sfide da affrontare: la gestione di enormi volumi di dati, la standardizzazione dei protocolli e la riduzione dei costi per renderle accessibili anche in contesti clinici. In questo scenario, piattaforme open-source come Open-ST giocano un ruolo chiave nel democratizzare l'accesso alla tecnologia e nell'accelerare la ricerca traslazionale.

### Conclusioni

Le spatial omics rappresentano una delle innovazioni tecnologiche più promettenti della biologia e della medicina moderna. Unendo informazioni molecolari e spaziali, permettono di esplorare l'organizzazione tissutale con un livello di dettaglio prima inimmaginabile. Piattaforme

come Open-ST aprono nuove possibilità per lo studio di patologie complesse, dalla cancerogenesi alla neurodegenerazione, contribuendo alla medicina sempre più di precisione.

### Bibliografia

- 1) Kolodziejczyk, A.A. *et al.* (2015) 'The Technology and Biology of Single-Cell RNA Sequencing', *Molecular Cell*, 58(4), pp. 610–620. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.04.005>.
- 2) Schott, M. *et al.* (2024) 'Open-ST: High-resolution spatial transcriptomics in 3D', *Cell*, 187(15), pp. 3953–3972.e26. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.05.055>.
- 3) Schott, M. *et al.* (2025) 'Protocol for high-resolution 3D spatial transcriptomics using Open-ST', *STAR Protocols*, 6(1), p. 103521. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2024.103521>.
- 4) Svensson, V., Vento-Tormo, R. and Teichmann, S.A. (2018) 'Exponential scaling of single-cell RNA-seq in the past decade', *Nature Protocols*, 13(4), pp. 599–604. Available at: <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.149>.
- 5) Tang, F. *et al.* (2009) 'mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell', *Nature Methods*, 6(5), pp. 377–382. Available at: <https://doi.org/10.1038/nmeth.1315>.
- 6) Williams, C.G. *et al.* (2022) 'An introduction to spatial transcriptomics for biomedical research', *Genome Medicine*, 14(1), p. 68. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13073-022-01075-1>.



# 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>

Società Italiana di Citometria  
Scuola Nazionale di Citometria

# QUADERNI GIC

## I FONDAMENTI DELLA CITOMETRIA

a cura di Raffaele De Vita e Giuliano Mazzini



Società Italiana di Citometria  
Scuola Nazionale di Citometria

QUADERNI DI CITOMETRIA

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

GIOVANNI D'ARENA  
LORIS ZAMAI  
RENATO ZAMBELLO

a cura di Raffaele De Vita e Giuliano Mazzini



Società Italiana di Citometria  
Scuola Nazionale di Citometria

QUADERNI DI CITOMETRIA

## LA CITOMETRIA A FLUSSO PER LO STUDIO DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE

a cura di Raffaele De Vita e Giuliano Mazzini



Società Italiana di Citometria  
Scuola Nazionale di Citometria

QUADERNI DI CITOMETRIA

## VALUTAZIONE CITOFUORIMETRICA DELLA MALATTIA MINIMA RESIDUA

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

a cura di Raffaele De Vita e Giuliano Mazzini

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



# Spectral Flow Cytometry Meets Modularity

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

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

### The Best CytoFLEX You Can Get



#### CytoFLEX mosaic 88 Detection Module for CytoFLEX LX Flow Cytometer

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



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

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



A flexible approach to  
spectral flow cytometry



Data you can trust



Makes the complex easy



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

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

For Beckman Coulter's worldwide office locations and phone numbers, please visit Contact Us at [beckman.com](https://beckman.com)  
2025-GBL-EN-107398-v1

