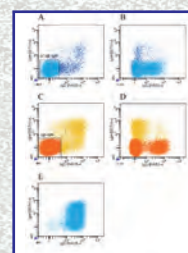


LETTERE GIC

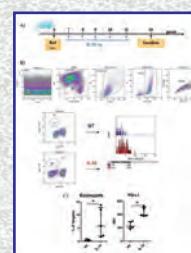
Periodico della Società Italiana di Citometria

*Malattia Residua Misurabile nella
Leucemia Acuta Mieloide*

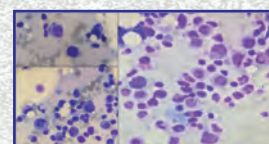
*Regolazione dell'espressione della
molecola integrinica CD49d
durante la differenziazione dei linfociti B:
uno studio basato su analisi
citofluorimetriche in tessuti tonsillari*



*Citometria a flusso multiparametrica
per la caratterizzazione degli
eosinofili murini e umani come potenziali
marcatori immunologici*



*Applicazione dell'analisi di citometria a
flusso in un caso di vexas/sindrome
mielodisplastica progredita a leucemia
acuta mieloide*



42^a CONFERENZA NAZIONALE DI CITOMETRIA
La Citometria: analisi, gestione dei dati e loro interpretazione

PROGRAMMA

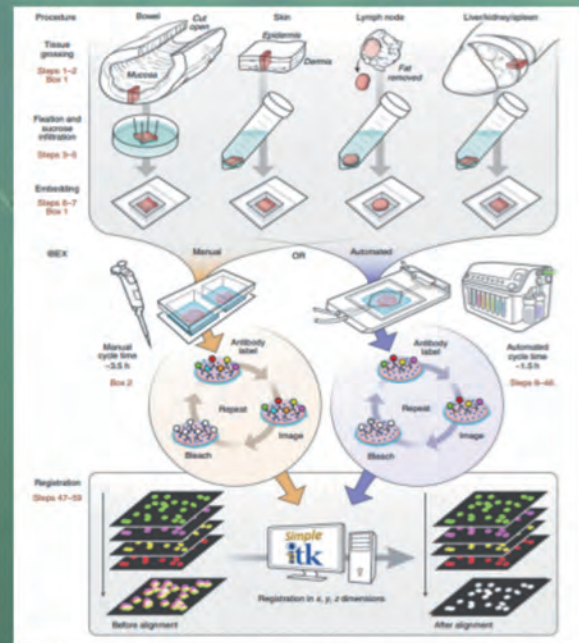
5-7 giugno 2024 Residenziale
Biotechnologie - Università degli Studi di Napoli Federico II

IBEX

Iterative Bleaching Extends multi-plexity

Multiplex Imaging

Più di **65 markers** su un **singolo campione!**



From Radtke et al., 2022, Nat Protoc

- Permette l'analisi di diversi marcatori utilizzando cicli iterativi di **marcatura anticorpale** e **inattivazione del fluoroforo**.
- Il metodo **non** richiede reagenti proprietari, attrezzature specializzate o software specifici per l'analisi.
- Può essere implementato su ogni scala ed è potenzialmente compatibile con qualsiasi metodo di lavorazione dei tessuti o campioni sia **umani** che **murini**.

IBEX è compatibile con una vasta gamma di fluorofori come Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 532, Phycoerythrin (PE), Alexa Fluor® 555, Alexa Fluor® 594, Alexa Fluor® 647 e Alexa Fluor® 700. Il segnale fluorescente del pannello precedente di anticorpi viene eliminato utilizzando il Boridruo di Litio (LiBH₄), un forte agente riducente. Il tempo di bleaching per la rimozione del segnale dipende dal tipo di fluoroforo.

Campoverde è distributore ufficiale dei prodotti BioLegend e CTSV.

Solo per i soci GIC uno **sconto esclusivo del 20%** su tutto il listino BioLegend.



SCAN ME



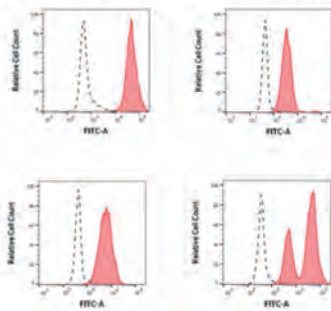
exbio

FagoFlowEx Kit

Cat.# ED7042

CE-IVD

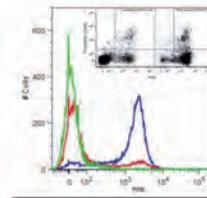
The FagoFlowEx Kit is intended for examination of phagocytic activity of neutrophil granulocytes by measuring the respiratory (oxidative) burst after their stimulation with *E. coli* bacteria in human heparinized whole blood using flow cytometry.



www.sichim.com

Annexin V Kits Flow Cytometry

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



JURKAT cells (human T cell leukemia) were treated with 200 ng/ml TRAIL/Apo2L (bacterially expressed extracellular domain of human TRAIL, corresponding to amino acids 95-281) 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



CYTOMARK

A Cellular Antigen Stabilisation Reagent

TransFix®

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

Blood Collection

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

Cerebrospinal Fluid

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

Circulating Tumour Cells

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

Sample Storage

TransFix Sample Storage Tubes

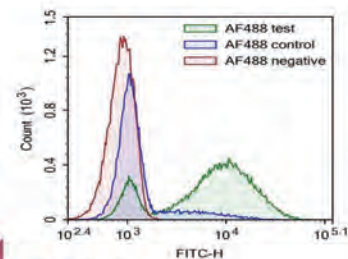
Sample storage tubes for stabilising 1 mL of sample. These tubes do not contain an anticoagulant, allowing the stabilisation of blood collected with an anticoagulant other than EDTA.

www.sichim.com

One Step TUNEL Apoptosis Kits

Flow Cytometry & Fluorescence Microscopy

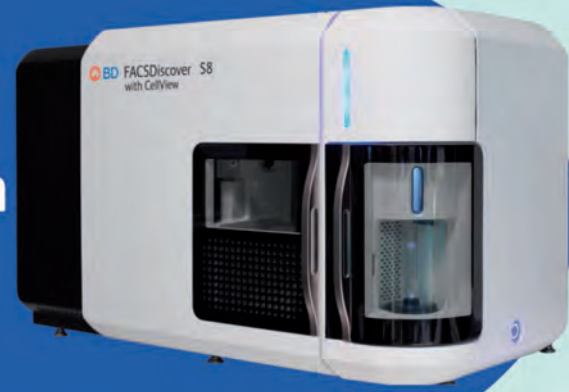
| Cat. No. | Product Name | Size |
|----------|---|-----------|
| IK-9200 | One-step TUNEL Apoptosis Kit (Green, FITC) | 50 Assays |
| IK-11128 | One-step TUNEL Apoptosis Kit (Green, AF488) | 50 Assays |
| IK-9700 | One-step TUNEL Apoptosis Kit (Red, AF555) | 50 Assays |
| IK-11129 | One-step TUNEL Apoptosis Kit (Red, AF694) | 50 Assays |
| IK-9600 | One-step TUNEL Apoptosis Kit (Red, AF647) | 50 Assays |
| IK-9500 | One-step TUNEL Apoptosis Kit (Blue, EV450) | 50 Assays |



www.immunologicalsciences.com



Empower discovery through advanced spectral resolution & image-based sorting



Put discovery in view at bdbiosciences.com

See what you sort
Sort what you see

Real-time Imaging
and Sort-compatible
Image analysis

Full spectrum Flow Cytometry
with
BD SpectralFX™ Technology
combined with
**BD CellView™ Image
Technology**

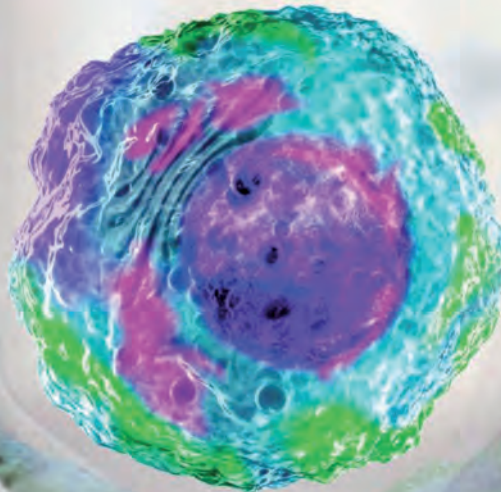
New full spectrum
system with onboard
LEDs for detector setup
and QC

Ease-of-use Guided
BD FACSCorus™
Software

Optimized detector
and default setting

Smart automation
with 3 exchangeable
Nozzles

6-way sorting with
new automated plate
sorting stage



Amplify the power of flow cytometry with innovative technology.
Cells can finally be sorted with spatial and morphological insights to study cells
that were previously impossible to identify or isolate.

**Be part of the next era of breakthroughs enabled by these advanced
technologies!**

LETTERE GIC

Vol. 32, Num. 3 - Vol. 33 Num. 1

Aprile 2024

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. 32, num. 3 - Vol. 33, num. 1 - Aprile 2024

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

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

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

Redazione:



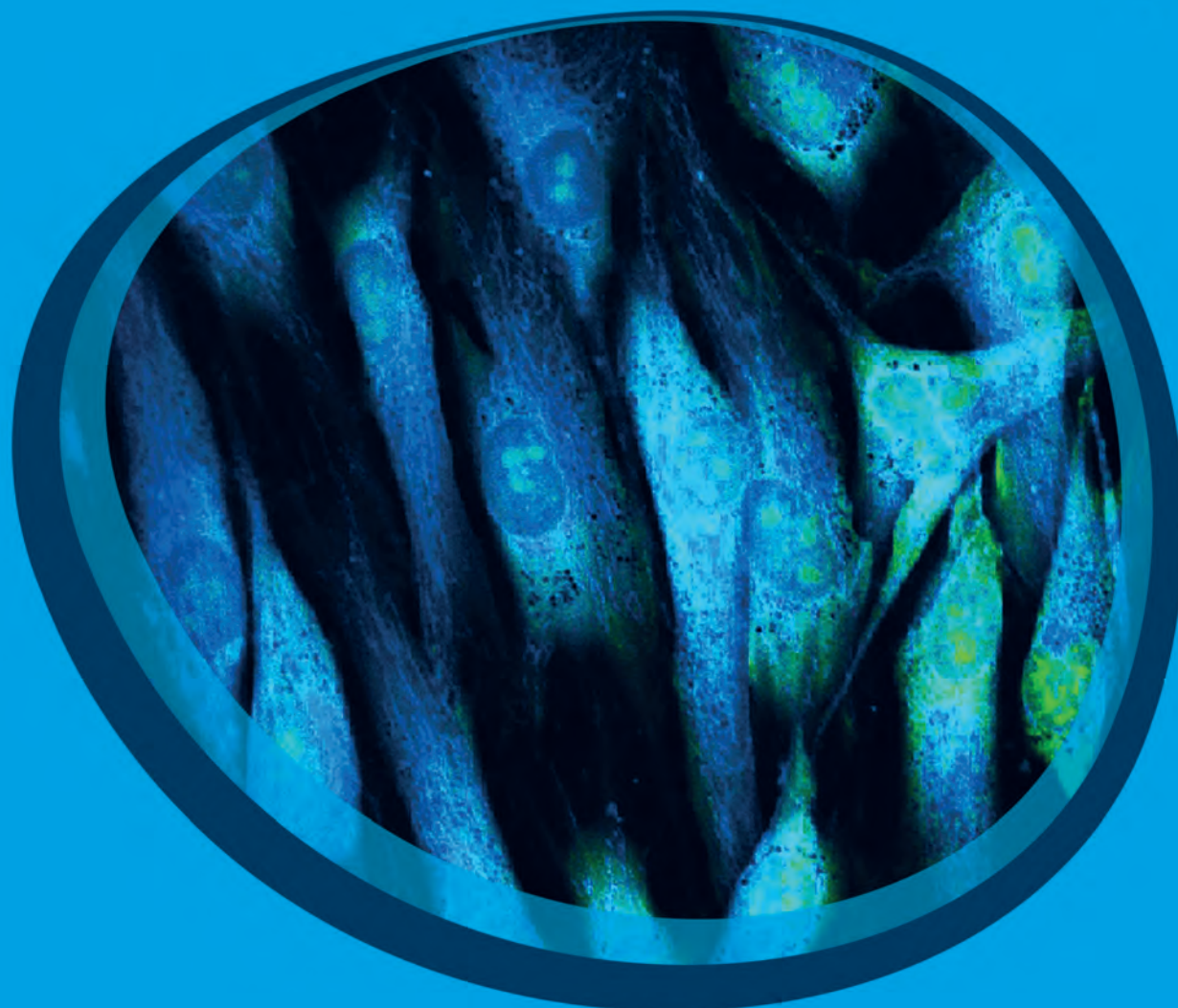
c/o Divisione Tecnologie e Metodologie per la
Salvaguardia della Salute
ENEA Centro Ricerche Casaccia, s.p. 016
Via Anguillarese, 301 - 00123 ROMA
☎ 06/30484671
e-mail: gic@enea.it
http://www.citometriagic.it



Associato alla
Unione Stampa
Periodica Italiana

SOMMARIO

- Programma**
42^a Conferenza Nazionale di Citometria
Scuola Nazionale di Citometria
Corsi teorico-pratici di formazione e aggiornamento
La Citometria: analisi, gestione dei dati e loro interpretazione 7
5-7 giugno 2024 Residenziale
Biotechnologie - Università degli Studi di Napoli Federico II
- Malattia Residua Misurabile nella
Leucemia Acuta Mieloide** 14
Giovanni Rossi
- Regolazione dell'espressione della molecola integrinica
CD49d durante la differenziazione dei linfociti B:
uno studio basato su analisi citofluorimetriche in
tessuti tonsillari** 15
**Rossella Mozzillo, Annalisa Gaglio, Erika Tissino, Andrea D'Alessandro,
Cristoforo Fabbris, Valentina Lupato, Antonella Zucchetto e Valter Gattei**
- Citometria a flusso multiparametrica per la
caratterizzazione degli eosinofili murini e umani
come potenziali marcatori immunologici** 22
**Iole Macchia, Francesca Urbani, Valentina La Sorsa, Francesco Noto,
Adriana Rosa Gambardella, Claudia Afferni, Giovanna Schiavoni**
- Ringraziamento ai Revisori dei manoscritti
inviati alla nostra Rivista** 32
- Applicazione dell'analisi di citometria a flusso
in un caso di vexas/sindrome mielodisplastica
progredita a leucemia acuta mieloide** 33
**Vincenzi Annamaria, Battipaglia Giorgia, Falconi Giulia, Fiore Alessia,
D'Agostino Francesco, Iannotta Raffaella, Grimaldi Francesco, Gurnari
Carmelo, Elena Crisà, Scalia Giulia, Izzo Barbara, Voso Maria Teresa,
Pane Fabrizio**
- Invito alla lettura** 38
a cura del Gruppo Aggiornamento e Formazione



IntraStain Helps Target Intracellular Antigens

Cells treated with IntraStain can be identified in flow cytometry by their light scatter properties and surface marker expression, while simultaneously being analyzed for intracellular antigens.

Contact us via rpsupport@agilent.com



Learn more about
Agilent's reagents
for flow cytometry



Società
Italiana di
Citometria

42^a CONFERENZA NAZIONALE DI CITOMETRIA
SCUOLA NAZIONALE DI CITOMETRIA
CORSI TEORICO-PRATICI
DI FORMAZIONE E AGGIORNAMENTO
LA CITOMETRIA:
ANALISI, GESTIONE DEI DATI E LORO INTERPRETAZIONE
Auditorium Biotecnologie
Università degli Studi di Napoli Federico II



Direttore della Scuola
Giuliano Mazzini (*Pavia*)

Comitato Scientifico e Organizzatore
Rosa Chianese (*Varese*)
Giovanni D'Arena (*Salerno*)
Raffaele De Vita (*Roma*)
Stefania Loffredo (*Napoli*)
Giulia Scalia (*Napoli*)

PROGRAMMA SCIENTIFICO

5-7 giugno 2024

Residenziale

Mercoledì 5 giugno 14:00-17:30

14:00 **Registrazione**

14:30-17:30 **SESSIONE PLENARIA (Aula Magna)**

14:30 **Apertura**

Comitato Scientifico e Organizzatore:

*Rosa Chianese (Varese), Giovanni D'Arena (Salerno), Raffaele De Vita (Roma),
Stefania Loffredo (Napoli), Giuliano Mazzini (Pavia), Giulia Scalia (Napoli)*

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

14:40 **Intelligenza artificiale in medicina: potenzialità e limiti**

Eugenio Santoro (Milano)

15:20 **La citofluorimetria spettrale applicata alla leucemia mieloide acuta: studio del metabolismo cellulare e delle vescicole extracellulari**

Dorian Forte (Bologna)

Supported by Cytosens

15:40 **Analisi predittiva della resistenza alle terapie in B-ALL mediante citometria di massa (CyTOF) a singola cellula**

Iolanda Sarno (Monza)

Supported by Standard Bio

- 16:00 **La trascrittomica a singola cellula di organoidi da tumore ovarico evidenzia firme molecolari della eterogeneità cellulare e potenziali vulnerabilità terapeutiche**
Claudio Sette (Roma)
Supported by BD
- 16:20 **Applicazione della citometria a flusso per la valutazione della disregolazione immunitaria nelle Sindromi Mielodisplastiche**
Elena Riva (Rozzano MI)
Supported by BC
- 16:40 Discussione
- Moderatori: Giuseppe Gaipa (Monza) Giuliano Mazzini (Pavia)*
- 17:00 **Artificial intelligence: application and perspective in flow cytometry**
Thomas Boyer (Amiens – France)
- 17:30 **Brindisi di Benvenuto**

Giovedì 6 giugno 8:30-17:30

Corso CB

Coordinatori: C. Pioli (Roma), G. Scalia (Napoli)

Modulo 3: Esempi in diversi campi applicativi

Ciclo cellulare e proliferazione cellulare

Giuliano Mazzini (Pavia)

To Ki or Not to Ki:

come riconsiderare uso e potenzialità del Ki-67 nella proliferazione dei linfociti

Francesca di Rosa (Roma)

10:30 Pausa caffè

La mia prima analisi multiparametrica in immunologia: controlli, controlli, controlli

Claudio Pioli (Roma)

La mia prima analisi multiparametrica in oncematologia

Giulia Scalia (Napoli)

Discussione

13:00 Pausa pranzo

14:00 **Pannelli a 10 colori per antigeni di superficie ed intracellulari: progettazione e problematiche**

Gabriele Favaretto (Roma)

Modulo 4: Didattica interattiva ed esercitazioni con Giovani Citometristi

Errori ed orrori in Citometria

Achille Anselmo (Milano)

15:30 Pausa caffè

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

Claudio Pioli (Roma), Giulia Scalia (Napoli)

Discussione

17:30 **Assemblea GIC Aperta a Tutti**

18:00 **Sapere i Sapori a km 0 “Degustazioni Campane”**

Corso C1

Coordinatori: R. Amodeo (Roma), G. D'Arena (Salerno)

Modulo 3: Approccio operativo nella diagnostica citometrica delle Emopatie Acute e Croniche

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

Leucemie Acute Mieloidi: ruolo dell'analisi citometrica e integrazione con il processo clinico: dalla richiesta al referto all'analisi citometrica della malattia residua misurabile

Rachele Amodeo (AOU Sant'Andrea, Roma), Maddalena Raia (CEINGE Università Federico II, Napoli)

Esempi pratici e dimostrazioni. Esempi di refertazione e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

Leucemie Acute e correlazione con genotipi specifici

Marisa Gorrese (Ematologia AOU, Salerno), Valentina Giudice (Ematologia AOU, Salerno)

Esempi pratici e dimostrazioni. Esempi di refertazione e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

10:30 Pausa caffè

Monitoraggio post-infusione delle cellule CAR-T mediante metodi citometrici

Giuseppe Gaipa (Ematologia IRCCS San Gerardo, Monza)

Esempi pratici e dimostrazioni. Esempi di refertazione e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

Mielodisplasie: ruolo dell'analisi citometrica e integrazione e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

Giovanni Rossi (Ematologia "Casa Sollievo della Sofferenza", San Giovanni Rotondo),
Giulia Scalia (CEINGE Biotecnologie Avanzate Franco Salvatore, Napoli)

Esempi pratici e dimostrazioni. Esempi di refertazione e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

Discussione

13:00 Pausa pranzo

Modulo 4: Ruolo della Citometria nella valutazione della malattia residua misurabile

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

LLC (-B) correlazione tra dato citometrico, genotipi specifici e interferenze da immunoterapia Giovanni D'Arena (Ematologia ASL, Salerno),

Giuseppe Coppola (Dipartimento Oncoematologico AOU, Salerno)

Esempi pratici e dimostrazioni. Esempi di refertazione e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

Aggiornamenti per l'analisi citometrica nelle malattie linfoproliferative CD5+ e malattia residua misurabile nella LLC

Daniela Graziano (Ematologia Ospedale Cardarelli, Napoli),
Maddalena Raia (CEINGE Biotecnologie Avanzate Franco Salvatore, Napoli)

Esempi pratici e dimostrazioni. Esempi di refertazione e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

15:30 Pausa caffè

Aggiornamenti per l'analisi citometrica nella diagnostica e della malattia residua misurabile nelle malattie linfoproliferative. Correlazione tra dato citometrico, citologico e istologico

Paolo Doretto (Patologia Clinica, Azienda Sanitaria Friuli Occidentale, Pordenone)
Silvia Bellesi (Ematologia Fondazione Policlinico A. Gemelli UCSC Roma)

Esempi pratici e dimostrazioni: le peculiarità della biopsia linfonodale. Esempi di refertazione e requisiti necessari nella richiesta per un'analisi citometrica ottimale

Discussione

17:30 **Assemblea GIC Aperta a Tutti**

18:00 **Sapere i Sapori a km 0 “Degustazioni Campane”**

Corso C2

Coordinatori: A. Battaglia (Roma), D. Fenoglio (Genova)

Modulo 3: Ottimizzazione di pannelli citometrici multicromatici nella caratterizzazione di popolazioni granulocitarie e linfoidi nella ricerca traslazionale e nella ricerca clinica

Immunità innata: i granulociti neutrofili

Patrizia Scapini (Verona)

La citometria a flusso nel monitoraggio dell'immunità innata e specifica nel paziente immunocompromesso

Chiara Agrati (Roma)

10:30 Pausa caffè

Immunomonitoraggio di linfociti T antigene specifici

Daniela Fenoglio (Genova)

Profilazione immunitaria nell'ageing

Sara De Biasi (Modena)

Discussione

13:00 Pausa pranzo

Modulo 4: Nuove applicazioni citometriche nello studio delle cellule immunocompetenti

Aggiornamenti sull'immunoprofilazione di leucociti circolanti

Laura Maggi (Firenze)

Immunologia della malattia di Parkinson mediante citometria di massa: applicazioni CyTOF nell'immunomonitoraggio

Antonio Cosma (Lussemburgo)

15:30 Pausa caffè

Nuove frontiere della Citometria delle cellule immunocompetenti: imaging citometrico

Marco Erreni (Milano)

Nuove frontiere della Citometria delle cellule immunocompetenti: Citometria spettrale

Mario Picozza (Roma)

Discussione

17:30 **Assemblea GIC Aperta a Tutti**

18:00 **Sapere i Sapori a km 0 “Degustazioni Campane”**

Corso C3

Coordinatori: I. D'Agnano (Milano), V. Tirino (Napoli)

Modulo 3: Le Vescicole extracellulari in Oncologia: approcci metodologici per lo sviluppo di modelli preclinici e la valutazione di biomarcatori diagnostici

La Citometria a flusso nello sviluppo di modelli preclinici di malattia basati sulle vescicole extracellulari quali biomarcatori tumorali

Igea D'Agnano (Istituto per le Tecnologie Biomediche, CNR Milano)

10:30 Pausa caffè

Esplorando i marcatori di superficie delle vescicole extracellulari: il potenziale della Citometria nella biosia liquida

Lucio Barile (Cardiocentro Ticino, Lugano)

Discussione

13:00 Pausa pranzo

Modulo 4: Approcci citometrici nello studio del cross talk cellula/cellula e valutazione di biomarcatori di risposta nei tumori solidi

14:00 **La Citometria a flusso per la profilazione immunologica del paziente oncologico: biomarcatori circolanti ed impatto delle terapie standard**

Ilaria Zizzari (Sapienza Università di Roma)

15:30 Pausa caffè

La Citometria a flusso per la valutazione dell'infiltrato immunitario nei modelli 3D in vitro

Caterina De Rosa e Virginia Tirino (Università degli Studi della Campania "L. Vanvitelli")

Discussione

17:30 **Assemblea GIC Aperta a Tutti**

18:00 **Sapere i Sapori a km 0 "Degustazioni Campane"**

Corso C4

Coordinatori: S. Amalfitano (Roma), D. Giorgi (Roma)

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

Introduzione

Tecniche citometriche per il monitoraggio microbiologico: Procedure di laboratorio

Stefano Amalfitano (Roma), Cecilia Balestra (Trieste)

10:30 Pausa caffè

Tecniche citometriche per il monitoraggio microbiologico: Esempi applicativi

Stefano Amalfitano (Roma), Cecilia Balestra (Trieste)

Discussione

13:00 Pausa pranzo

Modulo 4: Citometria ambientale dalla teoria alla pratica: Tecniche citometriche su matrici vegetali Tecniche citometriche su matrici vegetali: Procedure di laboratorio

Anna Farina (Roma) Debora Giorgi (Roma)

15:30 Pausa caffè

Tecniche citometriche su matrici vegetali: Esempi applicativi

Debora Giorgi (Roma), Anna Farina (Roma)

Discussione e conclusioni

17:30 **Assemblea GIC Aperta a Tutti**

18:00 **Sapere i Sapori a km 0 “Degustazioni Campane”**

Venerdì 7 giugno 8:30-12:30

SESSIONE PLENARIA (Aula Magna)

Moderatori: Stefania Loffredo (Napoli), Virginia Tirino (Napoli)

Il riposizionamento di farmaci come opportunità terapeutica in oncologia

Alfredo Budillon (Napoli)

Oltre il monitoraggio dell'espansione per valutare l'efficacia della terapia con cellule CAR T nei linfomi aggressivi: analisi citometrica dei monociti e loro ruolo nel modulare la risposta

Cristiana Carniti (Milano)

Discussione

Il deficit di IL-12RB1 rivela un nuovo ed essenziale ruolo di IL-12 e IL-23 nella risposta immunitaria innata e adattativa nell'uomo

Francesco Annunziato (Firenze)

Discussione

10,30 Pausa Caffè

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

Biopsia liquida: stato dell'arte e prospettive future nell'era della medicina di precisione

Antonio Russo (Palermo)

Discussione

Nuovi criteri diagnostici della Leucemia mieloide acuta secondaria: sinergia della biologia molecolare con la citometria

Francesco Lanza (Ravenna)

Discussione

12:00 Conclusioni

Rosa Chianese (Varese), Giovanni D'Arena (Salerno), Raffaele De Vita (Roma), Stefania Loffredo (Napoli), Giuliano Mazzini (Pavia), Giulia Scalia (Napoli)

*Premiazione delle Schede di Valutazione della Conferenza

13:00 Lunch di Saluto

PROGRAMMA SOCIALE

mercoledì 5 giugno

17:30 Brindisi di Benvenuto

giovedì 6 giugno

17:30 Assemblea dei Soci Aperta a Tutti

18:00 Sapere i Sapori ... a Km 0 "Degustazioni Campane"

venerdì 7 giugno

12:45 Sorteggio Premi scheda valutazione evento

13:00 Lunch di saluto*

*è indispensabile la prenotazione alla Segreteria organizzativa con un messaggio e-mail entro il 31 maggio 2024



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
Tel. 0882.242151
citometriagic@proeventi.it



SPONSOR PLATINUM



BECKMAN COULTER



BD BIOSCIENCES

SPONSOR GOLD



AGILENT



CAMPOVERDE



CYTOSENS



STANDARD BIOTOOLS ITALY

Malattia Residua Misurabile nella Leucemia Acuta Mieloide

Giovanni Rossi

U.O.C di Ematologia e Trapianto di cellule Staminali, San Giovanni Rotondo (FG)

e-mail: giovannirossi.fr@gmail.com

Editoriale

La definizione ampiamente utilizzata di Malattia Minima Residua (MMR) dovrebbe essere sostituita dalla definizione Malattia Residua Misurabile (MRM) perché la positività o la negatività di una MRM dipende dalla metodica utilizzata e dai criteri utilizzati da ciascun laboratorio. Pertanto MRM negativa non vuol dire malattia eradicata ma semplicemente non evidente (non “misurabile”) ad un determinato cut-off di una determinata metodica. Parimenti una MRM positiva per un laboratorio può risultare negativa per un altro che utilizza un cut-off differente. Ciò spiega perché è meglio utilizzare il termine “misurabile” e perché il paziente con MRM negativa può recidivare. Nella leucemia mieloide acuta (LAM) ci sono due approcci per effettuare il monitoraggio della MRM: 1) identificazione dei fenotipi associati alla leucemia (LAIP) oppure 2) identificazione dei profili di differenziazione/maturazione aberranti in quanto differenti dai profili normali (DfN). Generalmente il DfN viene utilizzato quando non ci sono informazioni relative al campione della diagnosi. Tuttavia è sempre bene utilizzare entrambi gli approcci per evitare errori su campioni in cui vi sia la scomparsa di alcuni LAIP e quindi la comparsa di nuovi. A tal proposito il gruppo ELN MRD Working Party sottolinea l'importanza dell'approccio combinato “LAIP-DfN”. Tra i temi più dibattuti nella MRM studiata nelle LAM ci sono quanti e quali anticorpi monoclonali (AcMo) utilizzare per migliorare la sensibilità della citometria a flusso. In passato è stato dimostrato come 6 AcMo piuttosto che 4 AcMo permettesse l'identificazione di più LAIP. Oggi è stato stabilito che il numero minimo di anticorpi monoclonali da utilizzare debba essere 8, sebbene non siano stati fatti studi che provino tale suggerimento. Anche su quali anticorpi utilizzare ci sono pochi studi ma il gruppo ELN MRD Working Party raccomanda la seguente combinazione: CD45, CD117, CD34, CD13, CD33, HLADR, CD7, CD56. Al fine di migliorare la specificità della combinazione suddetta, alcuni suggeriscono l'aggiunta di marker come il CD38, CD45RA, CD4, CD11b, CD64, sebbene anche il CD71 possa avere un ruolo in tal senso soprattutto nella discriminazione tra cellule leucemiche e cellule che normalmente differenziano in senso eritroide nell'ambito del compartimento cellulare CD117+/CD34+. La scelta dei marker nella combinazione descritta può essere spiegata dalla maggiore frequenza dei LAIP che includono tali marker nelle LAM: perdita o iper-espressione di CD13, CD33 e HLADR, co-espressione con il CD56 o CD7. Tuttavia, nell'identificazione della MRM, c'è sempre da considerare la specificità di ciascun LAIP e quindi la maggiore o minore capacità discriminante con le cellule normali e/o rigeneranti. La specificità è importante anche perché potrebbe influenzare direttamente il numero dei LAIP da prendere in esame nel monitoraggio. E' stato mostrato come la co-espressione tra marker immaturi (CD34 e CD117) e marker appartenenti alla linea linfoide (CD2, CD4, CD7, CD56, CD10, CD19) abbia la più alta specificità mentre la perdita di

HLADR, CD13, CD33 etc, o iper-espressione degli stessi abbia una bassa specificità. Sarebbero quindi necessari meno LAIP ad alta specificità (almeno uno) o più LAIP a bassa specificità (almeno tre) per avere una MRM in grado di identificare i pazienti a più alto rischio di recidiva con una buona sensibilità. A tale argomento si associa inevitabilmente il numero di eventi da acquisire, il quale non dovrebbe essere inferiore ai 500.000 (500.000-1000000 di eventi) CD45 positivi ed almeno 100 eventi LAIP-positivi per identificare il cluster leucemico. L'insieme degli accorgimenti descritti assicurerebbe un adeguato rapporto tra limite di identificazione (LOD) e limite di quantificazione (LOQ). LOD e LOQ sono descritti dalle seguenti formule: $LOD = N/cellule\ totali \times 100\%$ e $LOQ = N/cellule\ totali \times 100\%$, dove “N” (le cellule costituenti il cluster leucemico) è influenzato da un coefficiente di variazione (CV) che ne influenza la riproducibilità e dovrebbe mantenersi intorno al 10% (saranno richiesti pertanto 100 eventi patologici come cluster). Altro punto molto discusso e strettamente legato alla specificità dei LAIP è il cut-off da utilizzare per quantificare le cellule LAIP-positive. E' stato definito come cut-off di positività una MRM $\geq 0.1\%$ perché tale soglia garantisce una frequenza dei LAIP al di sopra di quella relativa alle cellule rigeneranti, con l'eccezione della serie monocitica che non mostra LAIP sufficientemente specifici per poter essere seguiti in follow-up. Quanto al miglior time-point per effettuare la MRM bisogna partire dal presupposto che tutti i lavori hanno sempre dimostrato un significativo valore predittivo della MRM a qualsiasi tempo di valutazione (post induzione, post consolidamento, pre- e post trapianto). Le ultime linee guida ELN hanno però definito il post induzione, post consolidamento ed il pre-trapianto i tempi ottimali in cui valutare i pazienti con LAM in follow up.

Bibliografia

1. Wood BL. Principles of minimal residual disease detection for hematopoietic neoplasms by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom.* 2016 Jan;90(1):47-53. doi: 10.1002/cyto.b.21239. Epub 2015 May 29.
2. Arroz M, et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytometry B Clin Cytom.* 2016 Jan;90(1):31-9. doi: 10.1002/cyto.b.21228. Epub 2015 Jun 2.
3. Schuurhuis GJ, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood.* 2018 Mar 22;131(12):1275-1291. doi: 10.1182/blood-2017-09-801498. Epub 2018 Jan 12.
4. Rossi G, et al. Leukemia-associated immunophenotypes subdivided in «categories of specificity» improve the sensitivity of minimal residual disease in predicting relapse in acute myeloid leukemia. *Cytometry B Clin Cytom.* 2020 May;98(3):216-225. doi: 10.1002/cyto.b.21855. Epub 2019 Nov 7.
5. Heuser M, et al. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood.* 2021 Dec 30;138(26):2753-2767. doi: 10.1182/blood.2021013626.
6. Döhner H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood.* 2022 Sep 22;140(12):1345-1377. doi: 10.1182/blood.2022016867

Regolazione dell'espressione della molecola integrinica CD49d durante la differenziazione dei linfociti B: uno studio basato su analisi citofluorimetriche in tessuti tonsillari

Rossella Mozzillo¹, Annalisa Gaglio¹, Erika Tissino¹, Andrea D'Alessandro², Cristoforo Fabbris²,
Valentina Lupato², Antonella Zucchetto¹ e Valter Gattei¹

¹Clinical and Experimental Onco-Hematology Unit, Centro di Riferimento Oncologico, I.R.C.C.S., Aviano (PN), Italy

²SOC Otorinolaringoiatria, Azienda Sanitaria Friuli Occidentale, Pordenone, Italy

e-mail:vgattei@cro.it e zucchetto.soecs@cro.it

ABSTRACT

Il CD49d è la catena alpha dell'integrina VLA-4, una molecola d'adesione chiave nello sviluppo del linfocita B, con un ruolo prognostico nell'ambito di malattie linfoproliferative (es. in leucemia linfatica cronica). Lo scopo dello studio è di verificare se la tonsilla, organo linfoepiteliale ricco di cellule B a diversi stadi maturativi, possa rappresentare un buon modello per studiare i meccanismi di regolazione dell'espressione del CD49d. Questo studio è focalizzato su 6 tonsille raccolte da 6 pazienti sottoposti a tonsillectomia di routine. In tali campioni è stata effettuata un'analisi citofluorimetrica sia su campione fresco che scongelato, utilizzando un pannello di anticorpi, necessari a distinguere le diverse sottopopolazioni di linfociti B, tra cui plasmacellule, cellule del centro germinativo (GC), e diverse sottopopolazioni di cellule B naïve e cellule B memory. Su di esse è stata poi analizzata l'espressione del CD49d, in termini di intensità di fluorescenza media (MFI). L'espressione del CD49d è risultata variabile nelle sottopopolazioni B, con il livello più alto d'espressione riscontrato nella popolazione Memory CD95+ e il più basso nelle cellule del GC. Infine, sono stati paragonati i risultati ottenuti da campioni tonsillari freschi e scongelati. Lo studio, oltre a definire i livelli variabili di espressione della molecola CD49d in tessuti tonsillari, può essere di utilità per citometristi interessati allo studio della differenziazione B cellulare normale in organi linfoidi secondari.

INTRODUZIONE

I linfociti B sono cellule del sangue che giocano un ruolo chiave nell'immunità umorale, esprimendo sulla loro superficie specifici recettori per l'antigene e occupandosi della produzione di anticorpi in seguito all'incontro con l'antigene. Il processo di maturazione dei linfociti B inizia nel midollo osseo a partire da una cellula staminale ematopoietica. Durante le prime fasi di sviluppo, avviene un processo di ricombinazione delle immunoglobuline (Ig), in cui i geni delle catene pesanti (H) e leggere (L) vengono riarrangiati per generare recettori specifici per l'antigene (BCR). Il riarrangiamento dei geni delle catene pesanti inizia durante lo stadio delle cellule pro-B, che esprimono i marcatori di superficie specifici per i linfociti B, CD19 e CD20. Successivamente, si

forma la cellula pre-B, che acquisisce pseudocatene leggere. Dalle cellule pre-B si generano i linfociti B immaturi, che esprimono il recettore di membrana IgM grazie alla formazione delle catene leggere (k o λ), che si legano alla catena pesante μ . I linfociti B lasciano il midollo osseo, esprimendo anche IgD, come cellule B mature e entrano negli organi linfatici secondari (i linfonodi, le tonsille, il tessuto linfoide associato alle mucose MALT, e le zone B dipendenti della polpa bianca della milza) come linfociti B Naïve dove vanno incontro ad una differenziazione antigene-dipendente all'interno dei cosiddetti centri germinativi (GC), microambienti specializzati di cellule B degli organi linfoidi secondari. Nel GC, a seguito del contatto con l'antigene presentato dalle cellule follicolari dendritiche (FDC), le cellule B subiscono una rapida espansione clonale e un'ipermutazione somatica (SHM), che modifica i geni codificanti per la porzione variabile delle catene pesanti delle Ig aumentando o diminuendo l'affinità per l'antigene di riferimento. Dopo questo processo, le cellule B che riconosceranno con maggiore affinità l'antigene verranno selezionate positivamente, mentre le altre, che rappresentano la maggior parte delle cellule del GC, andranno incontro ad apoptosi. Un ulteriore processo di maturazione del linfocita B selezionato nell'ambito del GC è rappresentato dal meccanismo di Class Switch Recombination (CSR), in cui le regioni costanti delle catene pesanti dei geni delle Ig subiscono una ricombinazione che determina un cambio di isotipo dando origine alle catene γ (IgG), α (IgA) o ϵ (IgE). Le cellule B successivamente matureranno in cellule della memoria o plasmacellule (1, 2).

Durante le varie fasi di differenziazione, le cellule B si affidano a meccanismi di adesione. In primo luogo, l'extravasazione, l'ingresso e la ritenzione nei tessuti sono processi vitali durante lo sviluppo e la selezione delle cellule B. In secondo luogo, le interazioni delle cellule B con altri tipi di cellule, come le cellule presentanti l'antigene (APC) FDC e/o cellule T, richiedono contatto cellula-cellula. Una delle famiglie più importanti di recettori d'adesione cellulare che mediano le interazioni cellula-cellula e matrice extracellulare è la famiglia delle integrine. Le integrine sono molecole eterodimeriche costituite da due subunità transmembrana non covalentemente associate, le catene alpha e beta. L'integrina $\alpha 4/\beta 1$

(CD49d/CD29), conosciuta come “Very Late Antigen-4” (VLA-4) è espressa principalmente sui leucociti e viene studiata soprattutto nel contesto del suo ruolo di mediatore chiave dell'homig e della ritenzione delle cellule staminali e progenitrici ematopoietiche nel midollo osseo (3). L'altra integrina contenente $\alpha 4$, $\alpha 4/\beta 7$ (LPAM-1), orchestra la migrazione delle cellule T nell'intestino legandosi al suo ligando MAdCAM-1 (4). I principali ligandi di VLA-4 sono la fibronectina, proteina della matrice extracellulare, e VCAM-1. Oltre a questi ligandi, alcune forme di osteopontina e altri ligandi non classici come l'emilina sono stati proposti come partner di VLA-4 (5, 6). Nell'ambito dei tessuti linfoidi secondari, l'integrina VLA-4 è essenziale nell'interazione tra cellula B del GC e FDC esprimente VCAM-1. Questa interazione, oltre a stabilire un contatto fisico tra le due cellule, determina l'attivazione di una via di segnalazione outside-in da parte di VLA-4 che sopprime l'apoptosi delle cellule B del GC che sono andate incontro ad un processo di SHM che ha aumentato l'affinità del BCR per l'antigene di riferimento (7).

Lo studio di CD49d e dei meccanismi che ne regolano l'espressione risulta particolarmente interessante se si considera il ruolo prognostico di questa molecola in ambito di alcune malattie linfoproliferative come la leucemia linfatica cronica (LLC) (8). Lo scopo di questo studio è quello di indagare a livello della tonsilla, utilizzata come modello di organo linfatico secondario ricco di linfociti B a diversi stadi maturativi (9), i vari livelli d'espressione dell'integrina VLA-4 nelle varie sottopopolazioni B linfocitarie a differenti stadi di differenziazione. In quanto organo nell'ambito del quale hanno origine le comuni patologie linfoproliferative inclusa la LLC, questi studi su tessuti tonsillari possono fornire interessanti informazioni relativamente alla putativa cellula d'origine (“cell-of-origin”) delle diverse patologie linfoproliferative di interesse.

La citofluorimetria a flusso è sicuramente la tecnica d'elezione per lo studio delle sottopopolazioni linfocitarie B. Le strategie di gating canoniche suddividono le cellule B in cinque popolazioni principali B: B di transizione, naïve, di memoria “non-class-switched”, di memoria “class-switched” e plasmacellule. Questa distinzione è utile per definire lo stadio di maturazione del linfocita B, ma non lo stato funzionale. In un recente studio, Glass e coautori hanno esaminato l'espressione di 351 molecole di superficie mediante citometria di massa con lo scopo di identificare le molecole che distinguono sottoinsiemi funzionalmente distinti di cellule B (10). Combinando le molecole identificate con dei readouts funzionali, viene proposto un nuovo schema di classificazione per suddividere le cellule B in dodici sottoinsiemi principali. Nel presente studio, prendendo spunto dai vari schemi di classificazione abbiamo disegnato un pannello di anticorpi originale che permettesse di stratificare meglio le varie sottopopolazioni B linfocitarie tonsil-

lari; nell'ambito di tali sottopopolazioni abbiamo indagato specificatamente l'espressione di CD49d.

MATERIALI E METODI

Processazione delle tonsille ed isolamento delle cellule tonsillari

Le tonsille, provenienti dalla S.O.C. di Otorinolaringoiatria dell'Azienda Sanitaria Friuli Occidentale come materiale di scarto nell'ambito di uno studio osservazionale (approvazione CEUR 2022-Os-85 del 10-05-2022), sono state prelevate da pazienti sottoposti ad interventi di tonsillectomia di routine e recapitate in forma anonima al laboratorio della S.O.C. di Oncologia Clinico-Sperimentale del CRO di Aviano. Ogni tonsilla è stata trasportata all'interno di un contenitore sterile contenente 40mL di terreno RPMI Medium 1640 (1X)+GlutaMAX-1 (Gibco), 10% di siero fetale bovino (FBS, Gibco), streptavidina e penicillina.

Il tessuto è stato tagliato in piccoli pezzi, che sono stati poi pressati su filtro di nylon da 40 μ m (Merck); la sospensione cellulare ottenuta è stata sottoposta ad un primo lavaggio (250 g, 10 minuti). Il pellet di cellule è stato risospeso in un lisante sterile 1X (Pharmalyse, BD Biosciences) e lasciato agire per 5 minuti a temperatura ambiente; è stato eseguito un secondo lavaggio (250 g, 10 minuti) con Phosphate Buffered Saline (PBS) 1X. Le cellule, infine, sono state risospese in una soluzione di PBS/FBS 1% e rifiltrate.

Congelamento e scongelamento cellulare

Per il congelamento delle cellule, la sospensione cellulare ottenuta a seguito della processazione delle tonsille descritta nel paragrafo precedente, è stata centrifugata a 250 g per 10 minuti e il pellet di cellule è stato risospeso in un volume variabile di terreno di congelamento (FBS e Dimetilsolfossido, DMSO, Sigma Life Science al 10%) in modo da ottenere 20-100 milioni di cellule ogni mL di terreno. La sospensione cellulare è stata rapidamente distribuita all'interno delle cryovials (1mL per ogni cryovial), che sono state poi poste a -80°C per essere trasferite in azoto nei giorni successivi.

Lo scongelamento delle cellule è stato eseguito ponendo la cryovial in acqua calda; al completo scongelamento, la sospensione cellulare è stata immediatamente trasferita in 10 mL di terreno di scongelamento (RPMI+15% FBS) e centrifugata a 130 g per 10 minuti. Il pellet cellulare è stato risospeso in un buffer di PBS/BSA (Bovine Serum Albumine) 0,5% .

Conta e vitalità cellulare

La conta e la vitalità cellulare sono state valutate al citofluorimetro a flusso BD FACSCantoII, utilizzando una provetta da citofluorimetria contenente una soluzione costituita da PBS sterile, biglie (Perfect Count Microspheres; Cytognos) a concentrazione nota, DRAQ5 (Alexis) e DAPI (Sigma), alla quale è stata aggiunta la sospensione cellulare.

Immunofenotipo

L'immunofenotipo è stato eseguito sia su campione fresco sia su campione scongelato. Circa $0,5-1 \times 10^6$ cellule sono state risospese in PBS/ Bovine Serum Albumine (BSA) 0,5% all'interno di una provetta da citofluorimetria in cui sono stati dispensati 50 μ L di Brilliant Stain Buffer (BD Biosciences), gli anticorpi, ognuno coniugato ad un differente fluorocromo, e un colorante di vitalità (Tabella 1). La marcatura con anticorpi di superficie è stata eseguita a temperatura ambiente al buio per circa 30 minuti. È stato poi effettuato un lavaggio (300 g, 5 minuti) con PBS/BSA 0,5%. Infine, le cellule sono state risospese in PBS/BSA 0,5% e i campioni sono stati acquisiti al citofluorimetro a flusso BD LSRFortessa X-20, precedentemente settato tramite Cytomer Set-up and Tracking beads (CS&T; BD Biosciences).

| Anticorpo | Fluorocromo | Codice | Clone | μ L/campione | Ditta |
|-----------------|-------------|-----------|---------|------------------|--------------|
| CD19 | BUV395 | 563549 | SJ25C1 | 2,5 | BD |
| CD49d | BV421 | 565277 | 9F10 | 2,5 | BD |
| CD3 | BUV496 | 612940 | UCHT1 | 2,5 | BD |
| CD27 | PE | 566944 | 0323 | 2,5 | BD |
| CD38 | BUV737 | 612824 | HB7 | 2,5 | BD |
| CD39 | BUV615 | 751258 | TU66 | 2,5 | BD |
| CD73 | PE-Cy7 | 561258 | AD2 | 2,5 | BD |
| CD95 | BB515 | 564596 | DX2 | 2,5 | BD |
| IgD | BV605 | 563313 | IA6-2 | 2,5 | BD |
| IgG | BV650 | 740596 | G18-145 | 2,5 | BD |
| IgM | BB700 | 747879 | UCH-B1 | 2,5 | BD |
| CD45RB | A647 | MA5-18144 | MEM-55 | 2,5 | ThermoFisher |
| Viability | APC-R700 | 564997 | | 2,5 | BD |
| Brilliant Stain | | 563794 | | 50 | BD |

Tabella 1. Pannello anticorpi per l'immunofenotipo. Elenco degli anticorpi con i rispettivi fluorocromi corrispondenti per $0,5 \times 10^6$ cellule in 50 μ L di Brilliant Stain Buffer.

Analisi statistica

Per determinare la significatività statistica nelle differenze di espressione di CD49d tra le diverse sottopopolazioni è stato utilizzato il test ANOVA a una via seguendo il test di confronto multiplo di Tukey.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Sospensione cellulare da tonsille

Tra febbraio e maggio 2023, presso la struttura di Oncoematologia Clinico-Sperimentale del CRO di Aviano, sono state processate 66 tonsille, 2 per ciascun paziente ($n=33$) sottoposto ad intervento di tonsillectomia di routine.

Dalla conta cellulare, effettuata dopo ogni processazione, è risultato che per tonsilla sono state ottenute in media $777,8 \times 10^6$ cellule (range $95 \times 10^6-2.868 \times 10^6$) che presentavano una vitalità cellulare media di 81,7% (range 66,1%-93%). Le tonsille destra e sinistra di cia-

scun paziente sono state processate in maniera indipendente.

Caratterizzazione immunofenotipica: identificazione delle sottopopolazioni di cellule B

L'acquisizione e l'analisi citofluorimetrica è stata eseguita in 6 diversi campioni tonsillari ottenuti da soggetti differenti (per ciascun soggetto solamente una delle due tonsille è stata utilizzata nelle analisi). Per ogni saggio citofluorimetrico sono state acquisite almeno 90.000-100.000 cellule vitali, corrispondenti ad almeno 50.000 cellule CD19+ e la strategia di gating è stata la seguente: inizialmente sono stati identificati i linfociti sulla base del forward scatter (FSC) e del side scatter (SSC), che forniscono rispettivamente informazioni sulla dimensione cellulare e granulosità citosolica (Fig. 1, A); sono stati

esclusi i doppietti cellulari (Fig. 1, B) e le cellule non vitali (Fig. 1, C). Sono stati poi identificati i linfociti B (CD19+) e i linfociti T (CD3+) (Fig. 1, D).

All'interno della popolazione dei linfociti B è stata analizzata l'espressione del CD27 e del CD38 per distinguere le seguenti sottopopolazioni: plasmacellule, caratterizzate da alta espressione di CD38 (Plasma), cellule del centro germinativo (GC), con espressione intermedia di CD38, e cellule a bassa espressione di CD38 (CD38-) (Fig. 2, A).

All'interno della popolazione identificata come CD38-, è stata analizzata l'espressione del CD27 verso CD45RB. Il CD45RB rappresenta un'isoforma del CD45 e l'anticorpo utilizzato in questo studio, il clone MEM55, permette di riconoscere una modifica post-traduzionale della proteina (una glicosilazione) associata al passaggio delle cellule B da Naïve a Memory (11). Da questa analisi sono state individuate le cellule B Naïve senza espe-

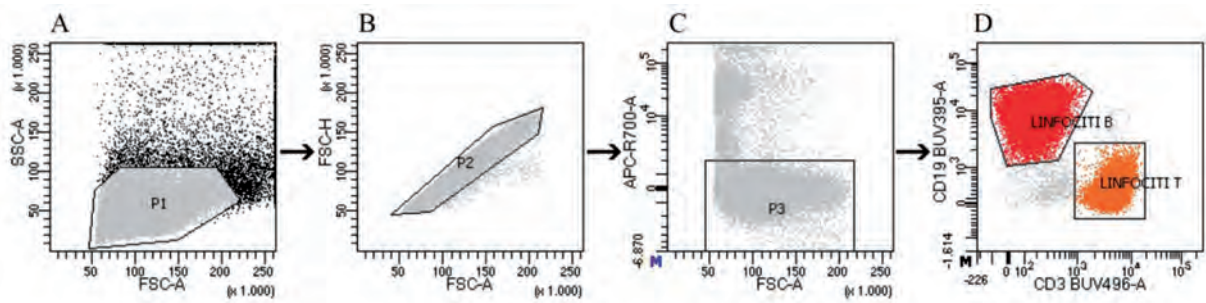


Figura 1. Analisi citofluorimetrica per identificare i linfociti B e T. Regione P1 nel plot SSC-A verso FSC-A per identificare i linfociti (A); regione P2 verso FSC-H verso FSC-A per escludere i doppietti cellulari (B); regione P3 nel plot APC-R700 verso FSC-A per escludere le cellule positive per il colorante per la vitalità (C); CD19 verso CD3 per identificare i linfociti B (CD19+) e i linfociti T (CD3+).

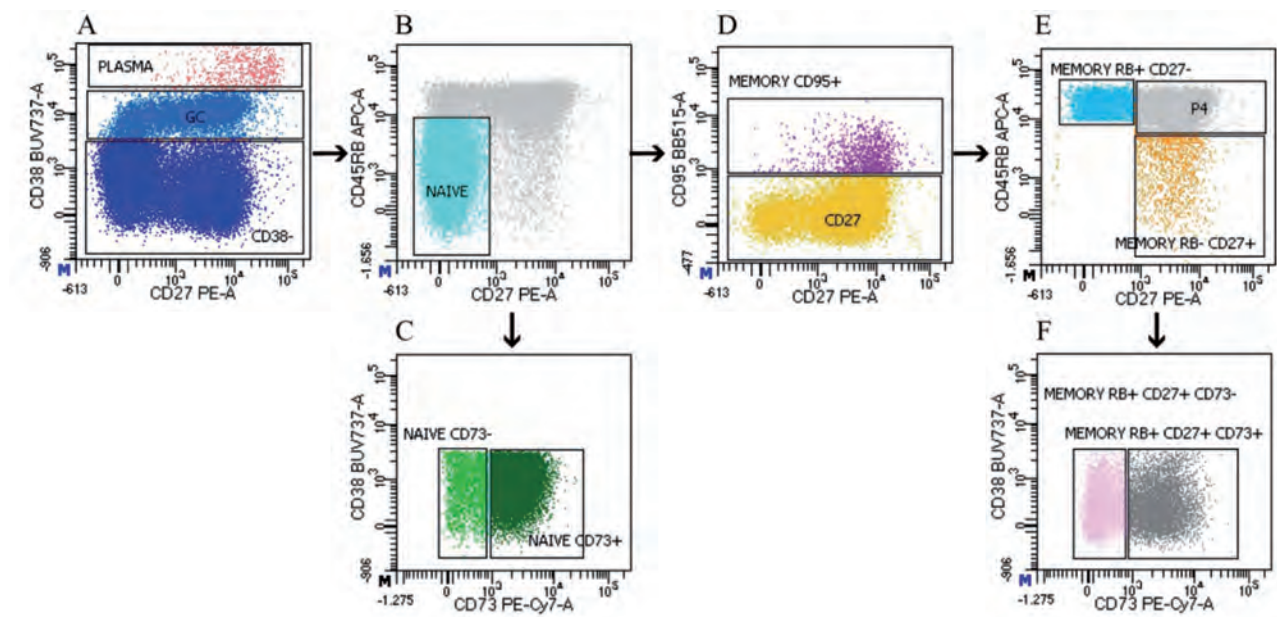


Figura 2. Strategia di gating per l'individuazione delle sottopopolazioni di linfociti B. (A) Analisi d'espressione del CD27 verso il CD38 per distinguere nei linfociti B: le plasmacellule (Plasma), le cellule del centro germinativo (GC) e le cellule a bassa espressione di CD38 (CD38⁻); (B) identificazione di popolazione B Naïve (CD27-CD45RB-) attraverso l'analisi dell'espressione del CD27 verso il CD45RB; (C) distinzione delle cellule B Naïve in CD73⁻ e CD73⁺; (D) escludendo le cellule B Naïve nella popolazione CD38- sono state individuate le cellule B Memory CD95⁺ attraverso l'analisi di CD27 e CD95; (E) all'interno delle cellule CD95⁻ sono state identificate le Memory RB+CD27⁻, Memory RB-CD27⁺ e una regione P4 corrispondente a cellule CDRB⁺CD27⁺; (F) all'interno della popolazione P4 (E) sono state individuate le Memory RB⁺CD27⁺CD73⁻ e Memory RB⁺CD27⁺CD73⁺.

rienza con l'antigene (CD27-CD45RB-) (Fig. 2, B), all'interno delle quali sono state selezionate le popolazioni B Naïve CD73⁻ e CD73⁺, attraverso l'analisi dell'espressione del CD73 (Fig. 2, C).

All'interno della popolazione B Naïve, è stata analizzata l'espressione di CD27 e CD95 individuando le cellule Memory CD95⁺ (Fig. 2, D). Nella restante popolazione cellulare (CD95⁻) è stata analizzata l'espressione di CD27 e CD45RB, identificando un'ulteriore serie di sottopopolazioni di cellule Memory: Memory RB+CD27⁻ e Memory RB-CD27⁺ (Fig. 2, E).

Nella regione corrispondente alle cellule positive sia per CD27 che CD45RB (P4) è stata infine analizzata l'espressione di CD73 e CD38, identificando le cellule Memory RB+CD27+CD73⁺ e Memory RB+CD27+CD73⁻ (Fig. 2, F). Da un'analisi delle fre-

quenze delle sottopopolazioni B nei 6 campioni presi in esame è risultato che le sottopopolazioni più rappresentate erano le cellule Naïve CD73⁺ (frequenza media +/- dev.std.=20.7+/-10.2) e le cellule del GC (frequenza media +/- dev.std.=24.2+/-7.7), e quelle meno rappresentate le cellule memory CD95⁺ (frequenza media +/- dev.std.=5.2+/-1.3) e le plasmacellule (frequenza media +/- dev.std.=1.8+/-1.2) (Figura 3).

L'analisi d'espressione dei differenti isotipi di Ig incluse nel pannello (IgD, IgM, IgG) all'interno delle sottopopolazioni B precedente identificate ha confermato l'origine Naïve, Memory o GC delle sottopopolazioni. Le cellule B Naïve (CD27-CD45RB-) infatti erano caratterizzate da espressione negativa di IgG e positiva di IgD/IgM, mentre sia le GC che le B Memory, prese nella loro totalità (cellule non Naïve) avevano al loro interno diverse com-

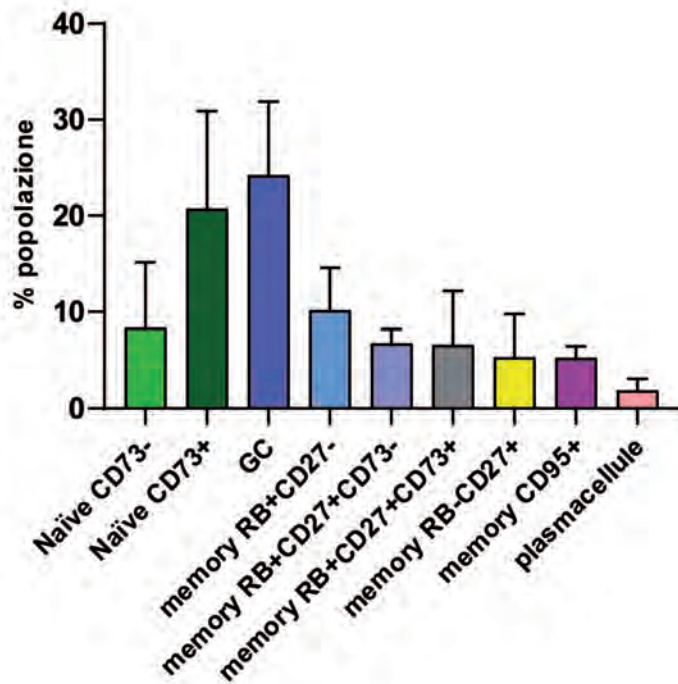


Figura 3. Frequenza delle sottopopolazioni B nei campioni tonsillari. Le barre colorate si riferiscono alla frequenza (media \pm deviazione standard) delle sottopopolazioni B identificate secondo lo schema di gating riportato in Figura 2 in 6 diversi campioni tonsillari. Le frequenze si riferiscono all'intera popolazione CD19+.

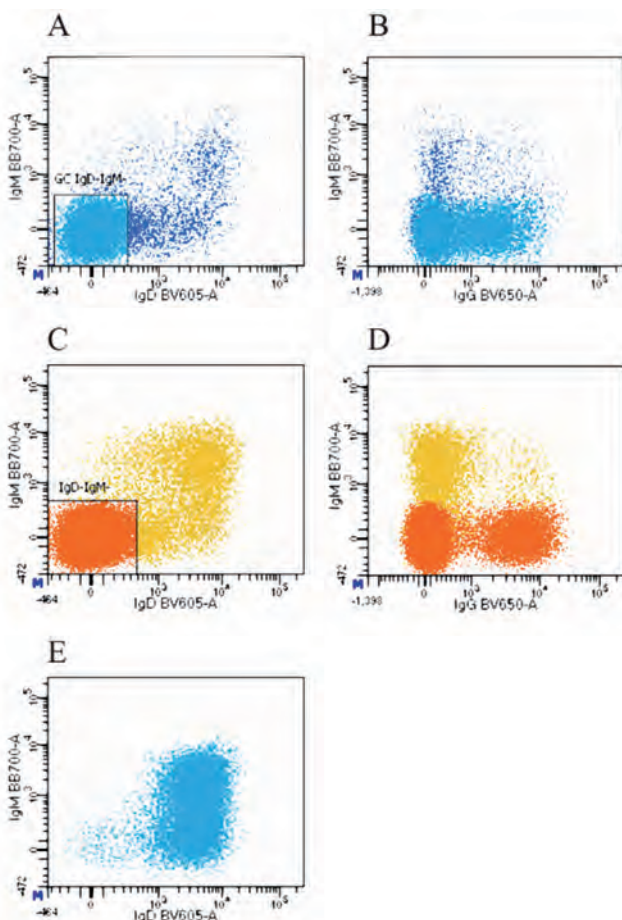


Figura 4. Analisi dell'espressione dei differenti isotipi di Ig nelle sottopopolazioni B. Analisi d'espressione di IgD verso IgM (A-C-E) e di IgG verso IgM (B-D) nelle cellule GC (A-B) nelle cellule Memory, intese come cellule non Naive (C, D) e nelle cellule Naive, intese come cellule CD27-CD45RB- (E)+.

binazioni d'espressione: IgM+IgD+, IgM-IgD- e IgG+ (Fig. 4).

Confronto tra campione fresco e campione scongelato

Per verificare se il processo di congelamento/scongelamento modificasse l'espressione delle molecole precedentemente descritte o se cambiasse le proporzioni tra le diverse sottopopolazioni, è stato utilizzato lo stesso pannello di anticorpi e lo stesso metodo di analisi descritto nel precedente paragrafo, in cellule scongelate derivanti da uno dei sei campioni analizzati a fresco. Sono stati confrontati i profili d'espressione di CD27 verso CD38, CD27 verso CD45RB e CD38 verso CD73, utili per definire le sottopopolazioni cellulari, che sono risultati sostanzialmente invariati rispetto al campione fresco (Fig. 5 A-C). Inoltre, anche le percentuali delle sottopopolazioni rispetto alla totalità dei linfociti B sono risultate molto simili tra campione fresco e campione scongelato (Fig. 5 D).

Analisi dell'espressione del CD49d nelle sottopopolazioni di cellule B

Dopo aver individuato le principali sottopopolazioni B, è stata valutata, all'interno di queste, l'espressione del CD49d. Dall'analisi dell'intensità di fluorescenza media (MFI) è risultata un'espressione del CD49d variabile nelle sottopopolazioni B, con livelli di espressione più elevati nella popolazione Memory CD95+ (media MFI \pm dev.std.=938.2 \pm 260.3) e più bassi nelle cellule GC (media MFI \pm dev.std.=269.2 \pm 39.0) (Fig. 6). Le differenze d'espressione di CD49d più significative sono risultate essere quelle tra la popolazione Naive CD73- e la popolazione memory RB+CD27+CD73- ($p < 0.0005$, Figura 6).

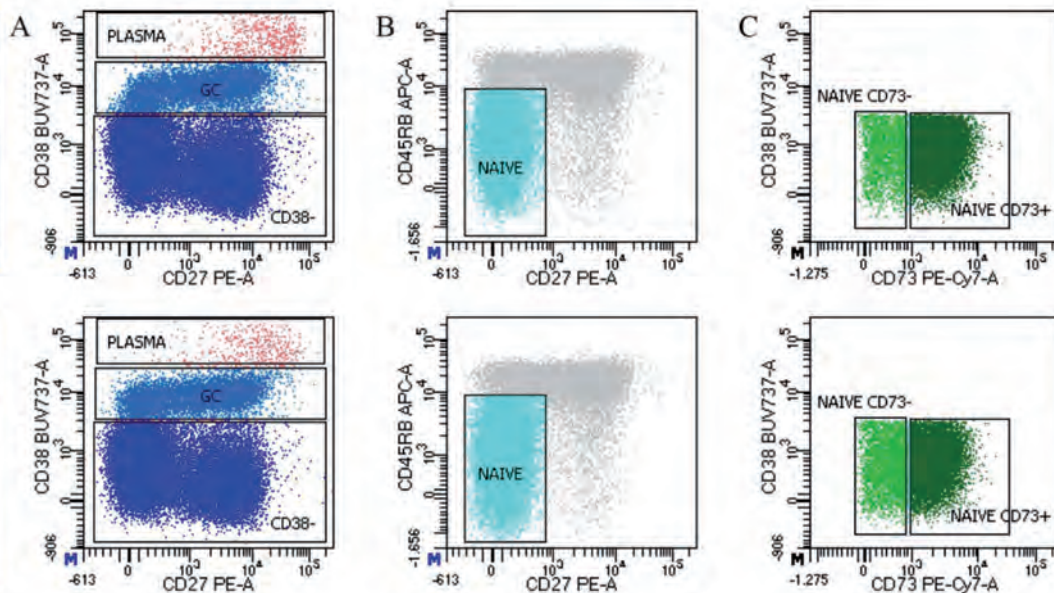
Infine, è stata analizzata e confrontata l'espressione del CD49d nelle diverse sottopopolazioni tra campione fresco e campione scongelato. Si è osservato solo un leggero calo nei valori di MFI in tutte le sottopopolazioni analizzate, ma i livelli d'espressione reciproci tra le varie popolazioni sono rimasti invariati rispetto al campione fresco (Fig. 7).

CONCLUSIONE

In conclusione, attraverso analisi citofluorimetrica di cellule derivanti da tonsilla si sono potute distinguere nove principali sottopopolazioni B caratterizzate da differenti livelli d'espressione di CD49d. La regolazione d'espressione del CD49d suggerisce un ruolo funzionale dell'integrina VLA-4 durante la maturazione del linfocita B. In particolare, la regolazione negativa d'espressione osservata nelle cellule del GC può trovare spiegazione nel destino di queste cellule. La maggior parte delle cellule del GC, che dopo SHM non avranno elevata affinità per l'antigene,

tonsilla a fresco

tonsilla scongelata



D

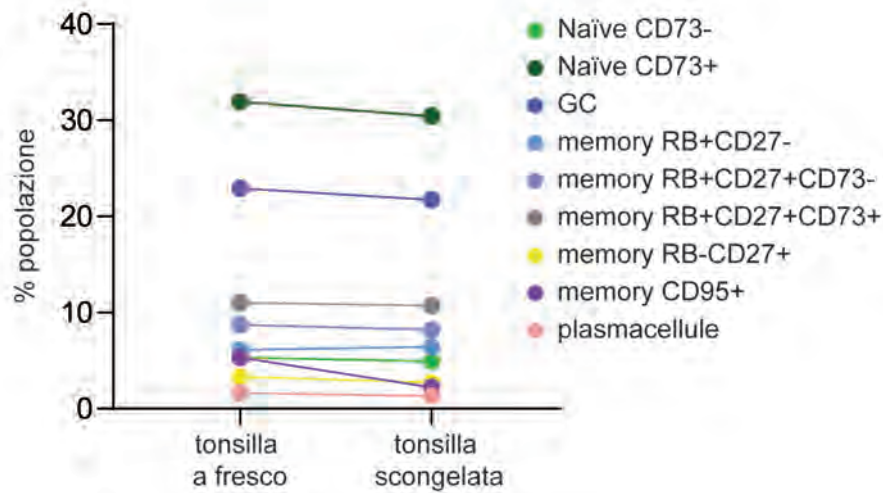
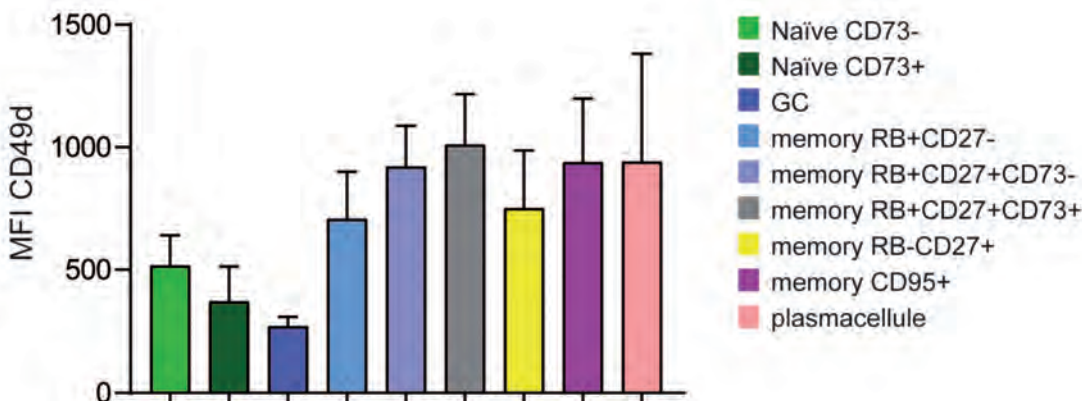


Figura 5. Confronto dei profili d'espressione tra campione fresco e scongelato. Analisi dell'espressione del CD27 verso il CD38 (A), di CD27 verso il CD45RB (B) e di CD73 verso CD38 (C) nella stessa campione tonsillare preparato a fresco (plot in alto) o dopo scongelamento (plot in basso); (D) frequenza delle 9 sottopopolazioni B identificate secondo lo schema di gating riportato in Figura 2 mettendo a confronto campione fresco e campione scongelato della stessa tonsilla.



| | | | | | | | |
|----|----|---|-----|----|----|----|----|
| ns | * | * | *** | ** | ns | * | ns |
| | ns | * | ** | ** | * | ** | ns |
| | | * | ** | ** | * | * | ns |
| | | | ** | ** | ** | ns | ns |
| | | | | ns | ns | ns | ns |
| | | | | ns | ns | ns | ns |
| | | | | | ns | ns | ns |
| | | | | | | ns | ns |
| | | | | | | | ns |

Figura 6. Espressione di CD49d nelle diverse popolazioni B di tonsilla. Le barre colorate si riferiscono all'espressione di MFI di CD49d (espressione media \pm deviazione standard) in 6 diversi campioni tonsillari nelle diverse popolazioni B analizzate. Nella tabella sottostante il grafico a barre sono riportati i valori di significatività statistica relativi ai confronti d'espressione tra le diverse popolazioni effettuati tramite test di Anova a una via seguendo il test di confronto multiplo di Tukey. Ns= test non significativo; *= $p < 0.05$; **= $p < 0.005$; ***= $p < 0.0005$.

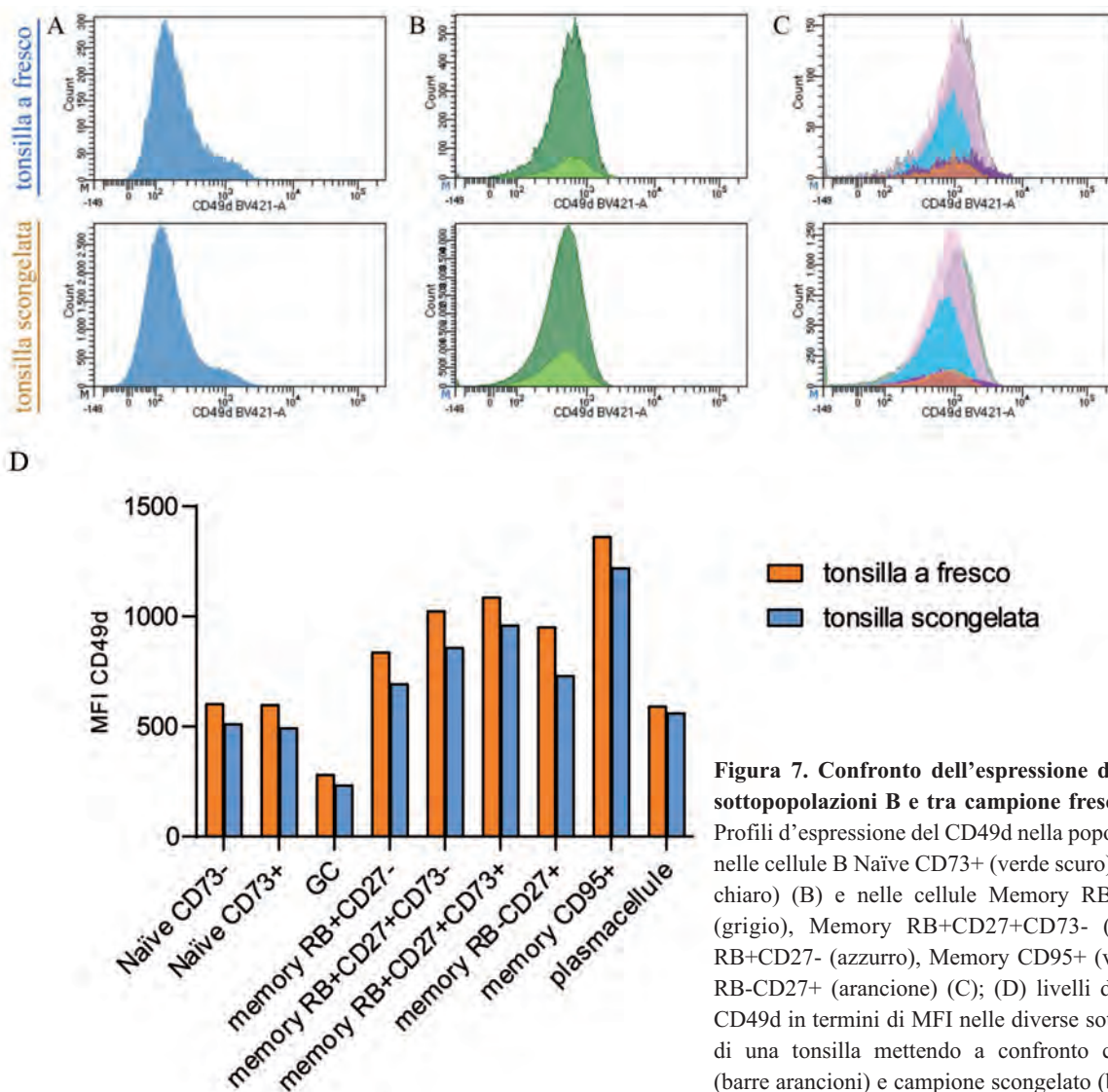


Figura 7. Confronto dell'espressione del CD49d nelle sottopopolazioni B e tra campione fresco e scongelato. Profili d'espressione del CD49d nella popolazione GC (A), nelle cellule B Naive CD73+ (verde scuro) e CD73- (verde chiaro) (B) e nelle cellule Memory RB+CD27+CD73+ (grigio), Memory RB+CD27+CD73- (rosa), Memory RB+CD27- (azzurro), Memory CD95+ (viola) e Memory RB-CD27+ (arancione) (C); (D) livelli di espressione di CD49d in termini di MFI nelle diverse sottopopolazioni B di una tonsilla mettendo a confronto campione fresco (barre arancioni) e campione scongelato (barre azzurre).

andranno incontro a morte, mentre le poche cellule con alta affinità per l'antigene, aumenteranno l'espressione di CD49d per sopravvivere grazie ai segnali di sopravvivenza rilasciati tramite legame dell'integrina VLA-4 con i suoi ligandi e diventare B Memory.

In conclusione, la tonsilla rappresenta un buon modello per lo studio dei meccanismi di regolazione di CD49d, applicabili, oltre che in campo fisiologico, anche all'ambito di malattie linfoproliferative B. La somiglianza dei risultati ottenuti da campione fresco e scongelato costituiscono il presupposto per poter utilizzare il materiale tonsillare congelato per analisi future.

REFERENZE

- LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood*. 2008;112(5):1570-80.
- Pieper K, Grimbacher B, Eibel H. B-cell biology and development. *The Journal of allergy and clinical immunology*. 2013;131(4):959-71.
- Ruoslahti E. Integrins. *The Journal of clinical investigation*. 1991;87(1):1-5.
- Gorfu G, Rivera-Nieves J, Ley K. Role of beta7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Current molecular medicine*. 2009;9(7):836-50.
- Capuano A, Fogolari F, Buccioti F, Spessotto P, Nicolosi PA,

Mucignat MT, et al. The $\alpha 4\beta 1$ /EMILIN1 interaction discloses a novel and unique integrin-ligand type of engagement. *Matrix Biology*. 2018;66:50-66.

- Hui T, Sørensen ES, Rittling SR. Osteopontin binding to the alpha 4 integrin requires highest affinity integrin conformation, but is independent of post-translational modifications of osteopontin. *Matrix Biol*. 2015;41:19-25.
- Spaargaren M, Beuling EA, Rurup ML, Meijer HP, Klok MD, Middendorp S, et al. The B cell antigen receptor controls integrin activity through Btk and PLCgamma2. *JExpMed*. 2003;198(10):1539-50.
- Bulian P, Shanafelt TD, Fegan C, Zucchetto A, Cro L, Nüchel H, et al. CD49d is the strongest flow cytometry-based predictor of overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2014;32(9):897-904.
- Pérez ME, Billordo LA, Baz P, Fainboim L, Arana E. Human memory B cells isolated from blood and tonsils are functionally distinctive. *Immunology and cell biology*. 2014;92(10):882-7.
- Glass DR, Tsai AG, Oliveria JP, Hartmann FJ, Kimmey SC, Calderon AA, et al. An Integrated Multi-omic Single-Cell Atlas of Human B Cell Identity. *Immunity*. 2020;53(1):217-32.e5.
- Koethe S, Zander L, Köster S, Annan A, Ebenfelt A, Spencer J, et al. Pivotal advance: CD45RB glycosylation is specifically regulated during human peripheral B cell differentiation. *J Leukoc Biol*. 2011;90(1):5-19.

Citometria a flusso multiparametrica per la caratterizzazione degli eosinofili murini e umani come potenziali marcatori immunologici

Iole Macchia¹, Francesca Urbani¹, Valentina La Sorsa², Francesco Noto¹,
Adriana Rosa Gambardella¹, Claudia Afferni³, Giovanna Schiavoni¹

¹Department of Oncology and Molecular Medicine, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

²Research Coordination and Support Service, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

³National Center for Drug Research and Evaluation, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

e-mail: iole.macchia@iss.it

INTRODUZIONE

Biologia generale, origine e funzioni degli eosinofili

Gli eosinofili sono un raro sottoinsieme di granulociti, pleiotropici e multifunzionali derivati dal midollo osseo, scoperti nel 1874 da Paul Ehrlich che diede loro tale nome in quanto i loro granuli si colorano fortemente con l'eosina, essendo basici. Il ruolo degli eosinofili nei processi di patogenesi è stato scoperto solo nel 1922 (Huber and Koessler 1922) e ad oggi è assodato che queste cellule svolgono molteplici ruoli sia nell'immunità innata che in quella adattativa (Long et al. 2016), così come nell'evoluzione del danno tissutale e nel rimodellamento delle vie aeree (Radonjic-Höslí and Simon 2014).

Origine, maturazione e migrazione degli eosinofili

Gli eosinofili originano dal midollo osseo attraverso una serie di progenitori e maturano fino allo stadio finale guidati da fattori di trascrizione (GATA-1, C/EBP α , PU.1 e XBP1) e dall'azione di alcune citochine (IL-3, IL-5 e GM-CSF), che ne consentono la maturazione e la migrazione nel torrente circolatorio. In particolare, l'interleuchina 5 (IL-5) è la principale citochina che supporta tutte le fasi del ciclo di vita degli eosinofili, dalla eosinofiloipoiesi alla migrazione nei tessuti e alla loro attivazione (Hogan et al. 2009). La migrazione è favorita anche dalla secrezione di IL-5 prodotta dalle cellule linfoidi innate di tipo 2 (ILC2), quando queste cellule vengono attivate da allarmine di derivazione epiteliale, come l'interleuchina 33 (IL-33) (Rodrigo-Muñoz et al. 2021).

Nel sangue periferico umano, in condizioni omeostatiche, gli eosinofili circolanti sono rilevabili in basso numero (< 450–500 eosinofili/ μ L; 1-3% dei leucociti circolanti), hanno una durata di vita limitata (circa 18 ore) (Kovalszki and Weller 2016) e migrano rapidamente nel tessuto adiposo, nel timo, nei polmoni, nell'utero, nelle ghiandole mammarie e nel tratto gastrointestinale, dove sono prevalentemente coinvolti nella fisiologia specifica di ciascun tessuto o organo (Kim and Jung 2020; J. J. Lee et al. 2010; Mishra et al. 1999; Weller and Spencer 2017).

Gli eosinofili hanno una vita relativamente breve, possono circolare 1-2 giorni prima della loro eliminazione. Tuttavia, durante l'infiammazione, guidati da citochine e allarmine come IL-33, nonché da molecole di adesione e chemochine come CCL11 (eotaxina-1), CCL24 (eotaxina-2) e CCL5 (RANTES), gli eosinofili possono

espandersi rapidamente e infiltrarsi nei tessuti infiammati o localizzarsi nei siti di infezione dove la loro sopravvivenza viene prolungata.

Diversi studi indicano che la citochina IL-33 induce una potente attivazione degli eosinofili sia umani che murini con conseguente aumento dell'espressione di CD69 e CD11b; quest'ultimo promuove l'adesione e la degranulazione contatto-dipendente di queste cellule che, a loro volta, rilasciano numerose citochine coinvolte nel mantenimento dell'omeostasi e nell'infiammazione correlata ad un fenotipo Th2 (Andreone et al. 2019; Johnston and Bryce 2017).

Per molto tempo gli eosinofili sono stati considerati come cellule effettrici allo stadio terminale che, una volta giunte nelle aree di infezione, rilasciavano il contenuto dei loro granuli, esplodendo e distruggendo l'agente infettivo. Questa visione è cambiata negli ultimi due decenni; ora sappiamo infatti che gli eosinofili hanno diversi meccanismi di rilascio del contenuto dei loro granuli nell'ambiente oltre all'"esplosione" (Fettelet et al. 2021). Inoltre, ne è stato anche dimostrato il ruolo cruciale nella regolazione di diversi processi omeostatici (Marichal, Mesnil, and Bureau 2017).

A causa della grande varietà dei loro recettori di superficie (inclusi i recettori di adesione, i recettori per le citochine e le chemochine, i recettori dei mediatori lipidici, quelli di pattern-recognition-PPR, quelli del complemento e i recettori Fc, e grazie ai mediatori immagazzinati nei loro granuli, gli eosinofili sono in grado e di interagire con altre cellule immunitarie e di influenzare molti processi immuni, in condizioni sia fisiologiche che patologiche. È importante sottolineare che i mediatori all'interno degli eosinofili sono preformati, consentendo loro di agire quasi immediatamente sull'ambiente, diversamente rispetto alle molecole effettrici e citochine prodotte da altre cellule immunitarie che devono prima essere trascritte e tradotte.

L'aumento del numero degli eosinofili circolanti (eosinofilia) è un fenomeno che può verificarsi in presenza o assenza di sintomi patologici, e può essere sia una condizione temporanea, dovuta a infezione o allergia, sia permanente, legata principalmente alla variazione genetica a livello dei geni responsabili dello sviluppo e della sopravvivenza degli eosinofili (Ramirez et al. 2018).

Funzioni degli eosinofili e loro ruolo come biomarcatori

Gli eosinofili svolgono un ruolo rilevante nelle malattie allergiche e nelle infezioni parassitarie (L. Huang and Appleton 2016; Lambrecht and Hammad 2015; Marichal, Mesnil, and Bureau 2017). Tuttavia esercitano anche altre importanti funzioni biologiche, tra cui la regolazione dell'omeostasi (Wen and Rothenberg 2016), il metabolismo del glucosio nel tessuto adiposo (E. H. Lee et al. 2018), la rigenerazione dei tessuti (Goh et al. 2013; Liu et al. 2020) e la regolazione immunitaria attraverso la modulazione dell'equilibrio Th1/Th2 (Kanda et al. 2021; Lombardi, Berti, and Cottini 2022). Inoltre, sono implicati anche nella difesa dell'ospite contro infezioni sia batteriche che virali (Arnold et al. 2018; R. Huang et al. 2021; Lamichhane and Samarasinghe 2019) e nel cancro (Ghaffari and Rezaei 2023; Simon, Utikal, and Umansky 2019; Varricchi et al. 2018).

Gli eosinofili presenti nelle vie aeree contribuiscono al mantenimento dell'omeostasi immunitaria polmonare. Durante le infezioni virali, essi possono partecipare direttamente o indirettamente alle risposte immunitarie antivirali attraverso la produzione di vari mediatori solubili, esercitando effetti benefici contro i virus respiratori, purché non inducano una risposta infiammatoria dannosa nelle vie aeree, come avviene durante l'asma allergica (Macchia et al. 2023).

Il ruolo degli eosinofili nella risposta al cancro è controverso e negli ultimi anni è diventato un argomento di crescente interesse (Ghaffari and Rezaei 2023; Simon, Utikal, and Umansky 2019). La presenza di eosinofili nel sangue o di eosinofili associati al tumore (TAE) nei pazienti affetti da cancro ha portato a speculare su come queste cellule possano effettivamente rivestire un ruolo funzionale nello sviluppo, nella progressione e nella risposta al trattamento del cancro. Dati recenti suggeriscono che gli eosinofili potrebbero rappresentare un fattore essenziale nella carcinogenesi (Fulkerson and Rothenberg 2013). Gli eosinofili possono infiltrare il microambiente tumorale (TME) dove vengono reclutati da fattori di crescita prodotti dalle cellule tumorali stesse, come l'IL-5, portando all'eosinofilia tissutale associata al tumore (TATE) (Gigon et al. 2023).

Studi sull'uomo e sul topo hanno dimostrato che gli eosinofili possono avere un ruolo pro-tumorigenico (tumori del sangue, polmone e ovaio), anti-tumorigenico (melanoma cutaneo, carcinoma del colon-retto, tumore della mammella e dello stomaco), o neutro (tumori cerebrali e della vescica) (Varricchi et al. 2018). In particolare, l'azione antitumorale nel setting del melanoma e del tumore della mammella, sembra essere esplicita principalmente attraverso meccanismi di citotossicità (Fettelet et al. 2021), con rilascio di ROS, granzimi, TNF- α , proteine cationiche eosinofile (ECP, EPX, MBP) e IL-18. L'IFN- γ prodotto dagli eosinofili favorisce inoltre la polarizzazione M1 dei macrofagi associati al tumore. Gli eosinofili possono anche esercitare attività chemotattica sulle cellule T CD8+

attraverso la produzione di CCL5, CXCL9 e CXCL10 (Ghaffari and Rezaei 2023; Poncin et al. 2021a).

I biomarcatori sono parametri fondamentali per rilevare la presenza o l'assenza di una malattia, monitorare i cambiamenti nel decorso clinico, prevedere o interpretare la risposta al trattamento o ad un intervento, identificare le popolazioni ad alto rischio di progressione della malattia, recidiva o eventi clinici, identificare la suscettibilità o il rischio e determinare la probabilità di eventi avversi.

Recenti evidenze indicano l'importanza della misurazione degli eosinofili nel sangue periferico, come potenziale biomarcatore immunologico prognostico/predittivo per la diagnosi, prognosi e predizione della gravità della malattia, in diversi contesti clinici (Balatoni et al. 2020; Onesti et al. 2020; Weide et al. 2016). Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per comprendere appieno la relazione tra livello di eosinofili e determinate condizioni cliniche.

La letteratura attuale mostra ad esempio che la conta degli eosinofili nel sangue periferico (EC) di pazienti affetti da Covid-19 potrebbe essere considerata un possibile biomarcatore predittivo e/o prognostico per l'esito clinico, data l'associazione tra eosinopenia e alterazioni respiratorie durante l'infezione da SARS-Cov-2 (R. Huang et al. 2021; Macchia et al. 2023).

Alcuni studi hanno messo in relazione la presenza di elevati livelli di eosinofilia nel sangue periferico o in altri campioni biologici con un aumentato rischio di insorgenza di enfisema o ostruzione bronchiale severa nella broncopneumopatia cronica ostruttiva (BPCO), così come ad un aumento del rischio di riacutizzazioni. Inoltre, l'EC sembra ad oggi dimostrarsi un affidabile biomarcatore per il trattamento dei pazienti BPCO (Bafadhel, Pavord, and Russell 2017; Çekmen et al. 2022).

Elevati livelli di eosinofili sono una caratteristica di alcuni tumori, tra cui quelli della mammella, del colon-retto, delle ovaie, della prostata, della cervice così come di tumori del sangue e dei linfonodi. Attualmente, l'EC è considerato un potenziale fattore prognostico/predittivo in grado di influenzare l'esito dei pazienti affetti da alcuni tipi di tumore sottoposti a immunoterapia. Infatti, la modulazione degli eosinofili da sola o in combinazione con altri trattamenti potrebbe portare a un cambiamento nella progressione della malattia. Ad esempio, l'aumento del numero di eosinofili è correlato con la risposta positiva al trattamento con gli inibitori dei checkpoint immunitari, ma anche con un aumento del rischio di effetti avversi in pazienti con melanoma (Simon, Hu, Panten, Grees, Renders, et al. 2020; Wendlinger et al. 2022), cancro al polmone (Gridelli et al. 2017) e carcinoma mammario (Holl et al. 2019). Il numero degli eosinofili è stato inoltre associato anche alla recidiva del cancro alla vescica nei pazienti che hanno ricevuto la terapia di mantenimento con bacillo di Calmette-Guérin (BCG) (Zafer et al. 2021).

Nel contesto del melanoma, in particolare nei pazienti trattati con gli inibitori dei checkpoint immunitari, la

conta degli eosinofili nel sangue periferico è stata associata a esiti clinici favorevoli ed è pertanto utilizzabile come marcatore di accompagnamento nel prevedere la risposta a tale terapia (Lucia et al. 2023; Simon, Hu, Panten, Grees, Thomas, et al. 2020). Inoltre, sempre nei pazienti con melanoma, elevati livelli sierici basali di fattori solubili quali la proteina cationica eosinofila (ECP) e la perossidasi eosinofila (EPX), sono stati associati a migliori esiti di sopravvivenza, suggerendone la potenziale utilità come marcatori prognostico/predittivi (Ammann et al. 2022).

Ad oggi, non si è ancora raggiunto un consenso sul ruolo svolto dagli eosinofili nella formazione, progressione e trattamento del cancro alla mammella (Poncin et al. 2021b). Tuttavia, all'inizio degli anni '80, Helen E. Ownby insieme ai suoi collaboratori dimostrò che le pazienti che mostravano un'elevata conta di eosinofili nel sangue avevano una migliore sopravvivenza libera da malattia rispetto alle pazienti con una bassa conta (Ownby 1983). Successivamente, questi risultati sono stati confermati in diversi articoli indipendenti, dimostrando che gli eosinofili aumentano rispettivamente la sopravvivenza cumulativa e quella libera da malattia delle pazienti con tumore della mammella (Onesti et al. 2018; Poncin et al. 2021b).

La conta degli eosinofili, che può essere ottenuta mediante l'esecuzione di un emocromo di routine, rappresenta un biomarcatore low cost e di grande utilità per orientare la scelta terapeutica più appropriata nei pazienti. Il sangue è infatti un materiale biologico che può essere raccolto rapidamente ed in modo non invasivo. Di contro, l'analisi mediante MFC consiste in una tecnologia decisamente più costosa e laboriosa, ma consente sicuramente un'analisi più accurata del fenotipo e della funzionalità cellulare, fornendo un valore aggiunto all'impiego di queste cellule come biomarcatori.

Metodi per lo studio degli eosinofili

Se analizzati al microscopio, gli eosinofili umani appaiono con un nucleo bilobato mentre quelli di topo presentano un nucleo a forma di ciambella. In seguito a colorazione con Giemsa o rosso Sirius, i loro granuli appaiono di un color rosso-rosa brillante. Gli eosinofili esprimono diverse proteine di superficie che ne consentono l'identificazione. È importante sottolineare che l'espressione di questi marcatori varia in funzione del loro stato di attivazione, del tipo di molecola attivante e della loro localizzazione e origine.

La plasticità funzionale degli eosinofili può riflettere l'esistenza di diversi sottogruppi di eosinofili, supportando l'ipotesi che il microambiente possa modularne l'attività (Abdala-Valencia et al. 2018). Infatti, il microambiente locale è in grado di indurre cambiamenti nel fenotipo degli eosinofili in base alle specifiche funzioni del tessuto.

In base a fenotipo, morfologia, funzioni, risposta all'IL-5 e localizzazione dell'organo, sono stati descritti due sottotipi principali di eosinofili: eosinofili residenti con fun-

zione omeostatica (rEos) ed eosinofili infiammatori (iEos) (Kanda et al. 2021). Inoltre, l'RNA sequencing a singola cellula (scRNAseq) ha consentito l'ulteriore definizione di cinque sottoinsiemi di eosinofili, il cui fenotipo dipende fortemente dall'organo dal quale vengono isolate le cellule. Un metodo di successo per la preparazione degli eosinofili per scRNAseq è stato sviluppato da Gurtner e collaboratori e si spera che consentirà un'ulteriore approfondita caratterizzazione di queste versatili cellule (Borrelli et al. 2024; Gurtner, Gonzalez-Perez, and Arnold 2021).

Studio degli eosinofili mediante citofluorimetria multiparametrica

Analogamente ad altri tipi di cellule immunitarie, appare chiaro che gli eosinofili sono costituiti da una popolazione eterogenea. L'MFC consente una fine definizione del profilo immunologico e la classificazione di sottoinsiemi di eosinofili, in base all'espressione di vari recettori di superficie, o di fattori intracellulari, rilevanti per la loro identità, maturazione, attivazione, adesione e migrazione ai tessuti.

Nel topo, i principali marcatori di superficie utilizzati per definire gli eosinofili sono: Siglec-F, CD11b e un elevato side scatter, che indica il loro contenuto altamente granuloso. Il marcatore Ly6G, non espresso dagli eosinofili, viene invece utilizzato per escludere i neutrofilo (Ly6G+). Marcatori aggiuntivi sono: il recettore per CCL11 (CD193 anche noto come CCR3), e il recettore per IL-5 (IL-5R), sebbene questi ultimi marcatori non siano necessariamente specifici degli eosinofili. È stato inequivocabilmente dimostrato che F4/80, un marcatore comunemente utilizzato per identificare i macrofagi, è espresso su diversi sottogruppi di eosinofili. L'espressione di Ly6C viene talvolta utilizzata per definire gli eosinofili ma non è strettamente necessaria in quanto esistono eosinofili Ly6C+ e Ly6C-. Infine, è stato dimostrato che l'MHCII è espresso sugli eosinofili in diverse circostanze, per cui le strategie di gating degli eosinofili che considerano l'esclusione delle cellule MHCII positive sono obsolete e dovrebbero essere riconsiderate.

Per distinguere gli eosinofili dai neutrofilo umani, le cellule vengono generalmente esaminate per la loro assenza di espressione di CD16 e per la loro presenza di espressione di CD49d. Inoltre, è noto che gli eosinofili esprimono CD61. Dopo l'attivazione, il livello di espressione dei marcatori di superficie degli eosinofili umani viene modificato. I livelli di CD62L, CD23, CD31 e PSGL-1 risultano diminuiti, mentre i livelli di CD35, CD11b, CD66, CD69, CD81 e CD44 sono aumentati.

Studio dell'attivazione degli eosinofili

Esiste un certo consenso su come identificare gli eosinofili attivati. In istologia è possibile utilizzare l'ispezione microscopica della degranolazione, che risulta però poco oggettiva e non consente una precisa quantificazione del fenomeno. I soprannatanti delle colture *ex vivo* o *in vitro* possono essere utilizzati per misurare quantitativamente

il rilascio di proteine dei granuli, nonché di citochine e mediatori lipidici. Naturalmente, la coltura di eosinofili o l'analisi di sezioni di tessuto *ex vivo* possono essere foriere di alterazioni cellulari e quindi artefatti. Pertanto, ricerche sono state volte a individuare marcatori che possano essere analizzati mediante citometria a flusso su eosinofili appena isolati. Ad esempio, gli eosinofili murini attivati aumentano la loro espressione di Siglec-F e CD11b che può essere misurata mediante la loro intensità media di fluorescenza (MFI). Anche la granularità, misurata mediante side scatter (SSC) in citometria, è comunemente utilizzata per caratterizzare lo stato di attivazione degli eosinofili.

SCOPO DEL LAVORO

Nel presente studio, abbiamo sviluppato alcuni pannelli MFC per l'analisi del fenotipo e dello stato di attivazione degli eosinofili murini e umani in condizioni stazionarie o dopo attivazione, focalizzando la nostra attenzione sul ruolo degli eosinofili nel cancro.

In particolare, abbiamo disegnato un pannello multicolor per valutare la presenza e lo stato di attivazione di eosinofili intratumorali indotti da IL-33 in un modello sperimentale di melanoma murino e l'induzione di differenziazione *in vitro* di eosinofili ottenuti da preparazioni di midollo osseo. Parallelamente, abbiamo utilizzato un pannello commerciale di anticorpi essiccati per valutare la presenza di specifiche sottopopolazioni di eosinofili umani su campioni di sangue prelevato da pazienti con carcinoma mammario, con l'intento di individuare potenziali differenze associabili ai diversi stadi di progressione della malattia (manoscritto in sottomissione). Inoltre, abbiamo integrato tale pannello essiccato con alcuni anticorpi supplementari, per studiare l'attivazione *in vitro* degli eosinofili umani da parte del SEB, in accordo con precedenti studi che ipotizzano un effetto di questa tossina direttamente sugli eosinofili, mediato dal CD48 (Minai-Fleminger et al. 2014), ma anche considerando un effetto indiretto mediato da altre sottopopolazioni circolanti che producono IL-5 a seguito di stimolazione con questo potente super-antigene (Chen et al. 2022).

Nella **Tabella 1** sono elencati i pannelli di anticorpi coniugati con fluorocromi diversi e diretti contro specifici marcatori di superficie, da noi utilizzati per l'identificazione, *in vitro* e *in vivo*, degli eosinofili di topo (A) e di uomo (B).

MATERIALI E METODI

Studi nel Topo

Modello di melanoma murino in vivo

I topi C57BL/6 (Charles River Laboratories), ospitati nella struttura per animali dell'Istituto Superiore di Sanità (Roma, Italia), sono stati manipolati in conformità con le linee guida del Comitato Etico locale. La linea cellulare di melanoma metastatico murino B16.F10 è

stata acquistata dall'American Type Culture Collection (ATCC, CRL-6475). I dettagli del modello e del protocollo sono riportati in una precedente pubblicazione (Andreone et al. 2019; V. Lucarini et al. 2017). In breve, topi C57BL/6 femmine di 7-12 settimane sono stati iniettati per via sottocutanea con $0,8 \times 10^6$ cellule di melanoma B16.F10. L'IL-33 murina ricombinante (0,4 µg per topo; Biolegend), disciolta in 200 µL di soluzione salina tamponata con fosfato (PBS), è stata iniettata nei topi per via intraperitoneale, consecutivamente per cinque giorni, a partire dal settimo giorno dopo l'inoculo di cellule tumorali quando la massa aveva raggiunto un diametro medio di 3×3 mm. I gruppi di controllo erano costituiti da topi iniettati con PBS. La sopravvivenza dei topi è stata monitorata quotidianamente e la crescita dei noduli tumorali è stata misurata due volte a settimana utilizzando un calibro (**Figura 1A**).

Caratterizzazione degli eosinofili infiltranti il tumore

Gli eosinofili infiltranti il tumore sono stati identificati come precedentemente descritto (V. Lucarini et al. 2017). In breve, 16 giorni dopo l'impianto delle cellule di melanoma B16.F10, i topi sono stati sacrificati ed i tumori espuntati. I tumori sono stati digeriti in un mezzo contenente DNasi I (325 KU/mL, Sigma) e collagenasi di tipo III (1 mg/mL, Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, NJ, USA) e fatti passare attraverso un setaccio cellulare. La sospensione cellulare risultante è stata sottoposta a lisi degli eritrociti in NH₄Cl 140 M e, Tris HCl 17 mM, pH 7,2. Le cellule sono state quindi colorate con i mAb indicati in **Tabella 1A** ed analizzati al citofluorimetro, come descritto in seguito e illustrato in **Figura 1B**.

Differenziamento degli eosinofili del midollo osseo

Gli eosinofili sono stati generati da colture di cellule di midollo osseo seguendo un protocollo modificato da quello descritto in precedenza (Andreone et al. 2019; V. Lucarini et al. 2017). Il protocollo di differenziamento degli eosinofili è illustrato nella **Figura 2A**. In breve, il midollo osseo è stato estratto dalla tibia e dal femore di topi C57BL/6 naïve e le sospensioni cellulari sono state coltivate in terreno RPMI 1640 (Euroclone) arricchito con 20% di FBS, 1% Glutamina, Hepes, NEAA e Sodio Piruvato con l'aggiunta di Flt3-L (100 ng/ml, CellGuidanceSystem) e SCF (100 ng/ml, CellGuidanceSystem) al primo giorno di cultura, indicato come giorno 0. Quattro giorni dopo (giorno 4) è stata somministrata IL-5 (10 ng/mL) così come nei successivi giorni 8, 10 e 12 (con l'aggiunta di 5 ml di terreno in questi ultimi due). Al giorno 14, le colture BM (contenenti >80% eosinofili) sono state ulteriormente coltivate in presenza di IL-5 (PeproTech) o di IL-33 (100 ng/ml, BioLegend). Il giorno 15 è stato quindi aggiunto GM-CSF per 24 ore prima della raccolta degli eosinofili.

Analisi fenotipica degli eosinofili murini mediante citometria a flusso

Per lo studio degli eosinofili nel topo, abbiamo sviluppato

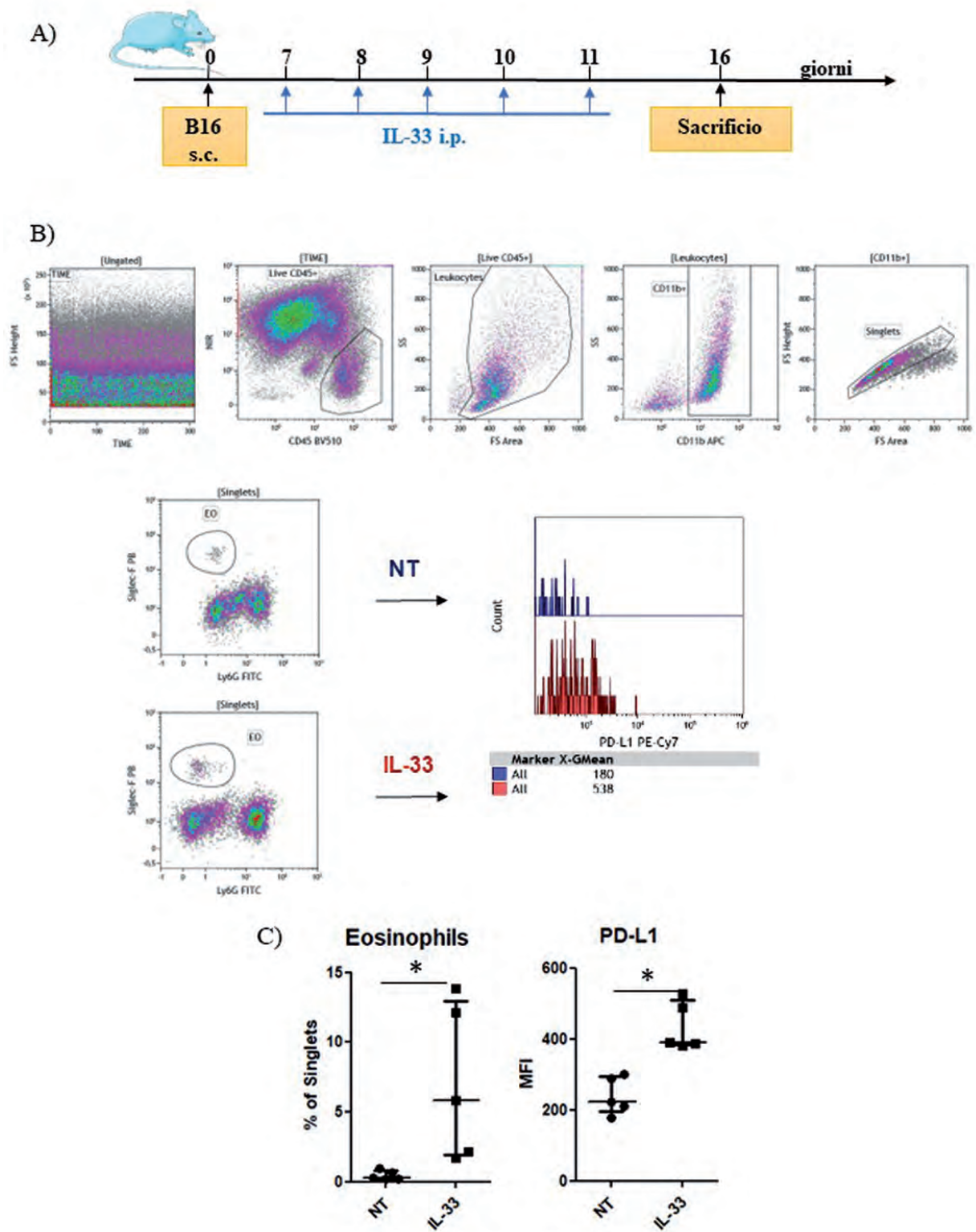


Figura 1. Studio degli eosinofili murini infiltranti il tumore in topi C57BL/6 trapiantati con cellule di melanoma B16.F10, in seguito a stimolazione *in vivo* con IL-33. A) Schema di trattamento dei topi inoculati sottocute (s.c.) con melanoma B16 e trattati con IL-33 intra-peritoneo (i.p.) a vari tempi. B) Strategia di gating e plots rappresentativi degli eosinofili nel microambiente tumorale in topi trattati (IL-33) e non trattati (NT). Il primo grafico (TIME) serve a selezionare la finestra temporale di acquisizione strumentale in cui il flusso è stabile. All'interno di questa, dapprima si selezionano le cellule leucocitarie vive (NIR-CD45+); su queste viene tracciato un plot morfologico (FS-A/SS), seguito dalla selezione delle cellule CD11b+. Si procede poi con l'esclusione degli eventi non singoli (doppietti). Dopo selezione degli eventi singoli (Singlets), viene disegnato un plot per individuare le cellule SiglecF+ Ly6G- che identificano gli eosinofili. Gli istogrammi rappresentano l'espressione del marker di exhaustion PD-L1 in un campione trattato con IL-33 rispetto a un controllo non trattato (MFI espressa come media geometrica). C) I grafici a dispersione mostrano la percentuale degli eosinofili (% delle cellule Singlet CD11b+) e la MFI del PD-L1 espresso dagli eosinofili. I dati derivano dall'analisi effettuata su 5 topi/gruppo (n=5 topi NT; n=5 topi IL-33).

| Pannello | Fluorocromo | Antigene/Ligando | Clone | Ditta | Formato |
|------------------|---------------------------|---------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|--|
| A (mouse) | FITC | Ly6G | 1A8 | Biolegend | liquido |
| | PE | CD69 | H1.2F3 | BD Pharmingen | |
| | Biotin | CD44 | IM7 | BD Pharmigen | |
| | Streptavidina PercP-Cy5.5 | - | - | eBioscience | |
| | PE-Cy7 | PDL-1 | 10F.9G2 | BioLegend | |
| | APC | CD11b | M1/70 | Biolegend | |
| | APC-Cy7 | NIR | | Molecular Probes by Lifetechnologies | |
| | BV421/eFluor450 | Siglec-F | E50-2440 | BD Pharmigen | |
| BV510 | CD45 | 30-F11 | BD Pharmigen | | |
| B (human) | FITC | CD294 (CRTH2) | BM16 | BC | Miscela essiccata (backbone) utilizzata sia per lo studio <i>ex vivo</i> che per lo studio <i>in vitro</i> |
| | ECD | CD16 | 3G8 | BC | |
| | PC5.5 | CD33 | D3HL 60.251 | BC | |
| | PC7 | CD11b | Bear1 | BC | |
| | APC | CD274 (PD-L1) | PDL1.3.1 | BC | |
| | APC A700 | Lineage (CD3, CD19, CD14, CD56) | UCHT1, RMO52, J3-119, N901 | BC | |
| | APC A750 | CD62L | DREG56 | BC | |
| | Pacific Blue | CD15 | 80H5 | BC | |
| | Krome Orange | CD45 | J.33 | BC | Liquido (drop-in), solo per lo studio <i>in vitro</i> |
| | PE | CD193/CCR3 | 5E8 | Biolegend | |
| | BUV 395 | Siglec-8 | 837535 | BD | |
| | BUV661 | CD123 | 7G3 | BD | |
| | BV650 | CD69 | FN50 | Biolegend | |
| | BV785 | CD63 | H5C6 | Biolegend | |

Tabella 1. Pannelli citofluorimetrici multicolore per il rilevamento e la caratterizzazione degli eosinofili murini (A) e umani (B), *ex vivo* e *in vitro*. A) Pannello utilizzato per la caratterizzazione degli eosinofili murini. B) Pannello impiegato per l'identificazione degli eosinofili umani. Per il monitoraggio *ex vivo* dei granulociti di pazienti con tumore alla mammella, è stato utilizzato un pannello commerciale costituito da una miscela essiccata di anticorpi. Per gli esperimenti *in vitro*, lo stesso pannello essiccato è stato utilizzato come backbone, integrandolo con diversi altri anticorpi in formato liquido (drop-in, in rosso), specifici per la discriminazione degli eosinofili (tra cui il Siglec-8) e per l'attivazione (CD69 e CD63).

un pannello MFC costituito da marcatori CD45, Ly6G, Siglec-F, CD69, CD11b, CD44 e PD-L1 (**Tabella 1A**). Tale pannello è stato utilizzato per l'analisi del fenotipo degli eosinofili infiltranti il tumore e per la caratterizzazione del fenotipo e dell'attivazione degli eosinofili derivati dal midollo osseo (BM-EO). Gli eosinofili infiltranti il tumore da topi portatori di melanoma B16 e quelli di derivazione midollare sono stati identificati come CD45+CD11b+Siglec-F+Ly6G-, come già precedentemente descritto (V. Lucarini et al. 2017). Nella **Figura 2 (B, C)** sono illustrate la strategia di gating utilizzata per l'analisi citofluorimetrica del fenotipo e dello stato di attivazione degli eosinofili BM-EO IL-5 e BM-EO IL-33, di un esperimento rappresentativo. I grafici in **Figura 2D** mostrano i risultati ottenuti su tre campioni per entrambe le condizioni sperimentali. I campioni sono stati acquisiti con un citometro a flusso Gallios e analizzati con il soft-

ware Kaluza (Beckman Coulter, Pasadena, CA, USA).

Studi nell'Uomo

Analisi *ex vivo*

L'MFC è stata utilizzata per studiare il profilo immunologico delle pazienti con tumore della mammella metastatico (n = 3) e non metastatico (n = 21). Nel caso delle pazienti con tumore non metastatico, il sangue è stato prelevato lo stesso giorno dell'espanto chirurgico del tumore primitivo, mentre i prelievi di sangue sono stati eseguiti a pazienti metastatiche con grado avanzato di malattia (presenza di ascite o versamento pleurico).

Esperimenti *in vitro*

Per gli esperimenti *in vitro*, campioni di sangue intero derivati da buffy coat di donatori sani sono stati piastrati in piastre da 96/fondo a U (100 µl/pozzetto) e diluiti 1:2 con PBS, contenente lo 0,5% di HSA (albumina da siero umano), con l'aggiunta della SEB (1 µg/ml), come indut-

tore di attivazione. I campioni sono stati incubati per 2 h a 37°C. Successivamente, sono state effettuate la marcatura e la lisi dei globuli rossi, come descritto in seguito. **Marcatore acquisizione e analisi degli eosinofili umani** Per l'analisi *ex vivo* sulle pazienti, i campioni di sangue raccolti in provette Vacutainer Sodio-EDTA (BD Biosciences), sono stati marcati dopo essere rimasti a temperatura ambiente per 24 ore, per ragioni logistiche. Per ciascun pannello sono stati colorati 200 µl di sangue inte-

ro. In breve, i campioni sono stati incubati con il corrispondente cocktail di anticorpi per 15 minuti a temperatura ambiente al buio. I globuli rossi sono stati lisati aggiungendo una soluzione di lisi (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) a temperatura ambiente per 10 minuti al buio. Dopo il lavaggio con PBS, le cellule sono state fissate in formaldeide 0,8% e conservate a 4°C al buio fino all'acquisizione entro le successive 24 ore. Prima dell'acquisizione, ai campioni è stato aggiunto un volume uguale di PBS.

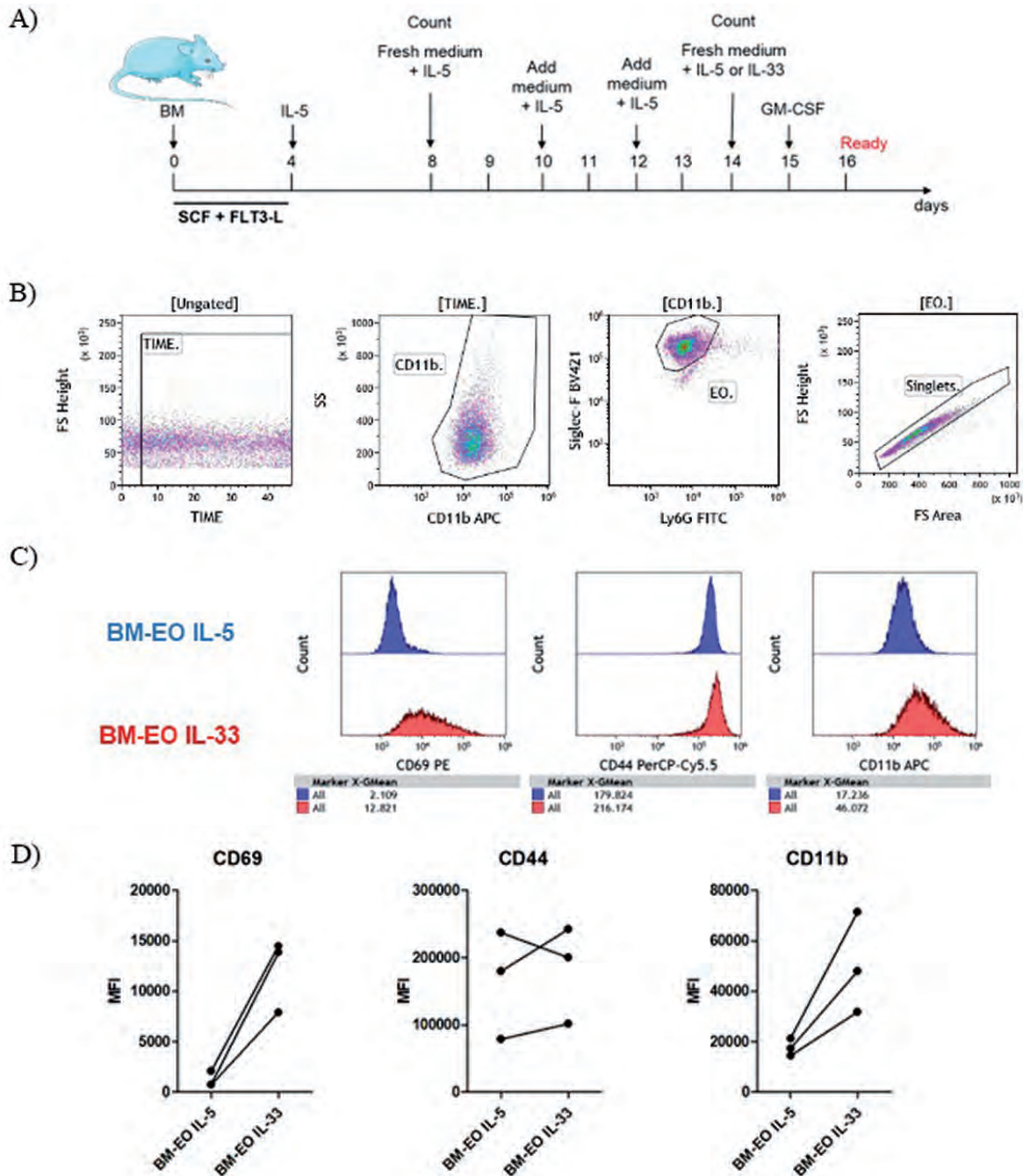


Figura 2. Differenziamento degli eosinofili di midollo osseo con IL-5 (BM-EO IL-5) o IL-33 (BM-EO IL-33). A) Schema di trattamento con IL-5 o IL-33 per la differenziazione degli eosinofili dal midollo osseo (BM-EO). B) I dotplots illustrano la strategia di gating utilizzata per rilevare i BM-EO. Dopo selezione del gate TIME, sono state sequenzialmente selezionate le cellule CD11b⁺, gli eosinofili (Ly6G⁻, Siglec-F⁺) e gli eventi singoli. C) Gli istogrammi rappresentano i marcatori di attivazione CD69, CD44 e CD11b rilevati sugli eventi singoli degli eosinofili ottenuti dopo differenziamento con IL-5 o IL-33 e le MFI relative a campioni rappresentativi. D) I grafici a linea mostrano l'espressione dei tre markers di attivazione sugli eosinofili di derivazione midollare differenziati con IL-5 (n=3) e con IL-33 (n=3).

Su questi campioni abbiamo valutato la frequenza dei granulociti totali e delle loro sottopopolazioni mediante il pannello DuraClone IM Granulocyte (Beckman Coulter, CA, US) costituito da una miscela di anticorpi essiccati anti-CD294, -CD16, -CD33, -CD11b, -CD274, -CD62L, -CD15, -CD45 e anti-CD3,-CD14,-CD19,-CD56 (questi ultimi usati come lineage neg, per escludere

re i linfociti T, B, NK e i monociti). I reagenti essiccati hanno già dimostrato di produrre un'elevata riproducibilità e una standardizzazione efficiente in progetti su larga scala come lo studio ONE (Streitz et al. 2013) e lo studio PreciseADS (Pitoiset et al. 2018).

Negli esperimenti *in vitro*, tale pannello ha costituito un backbone integrato con alcuni anticorpi in formulazione

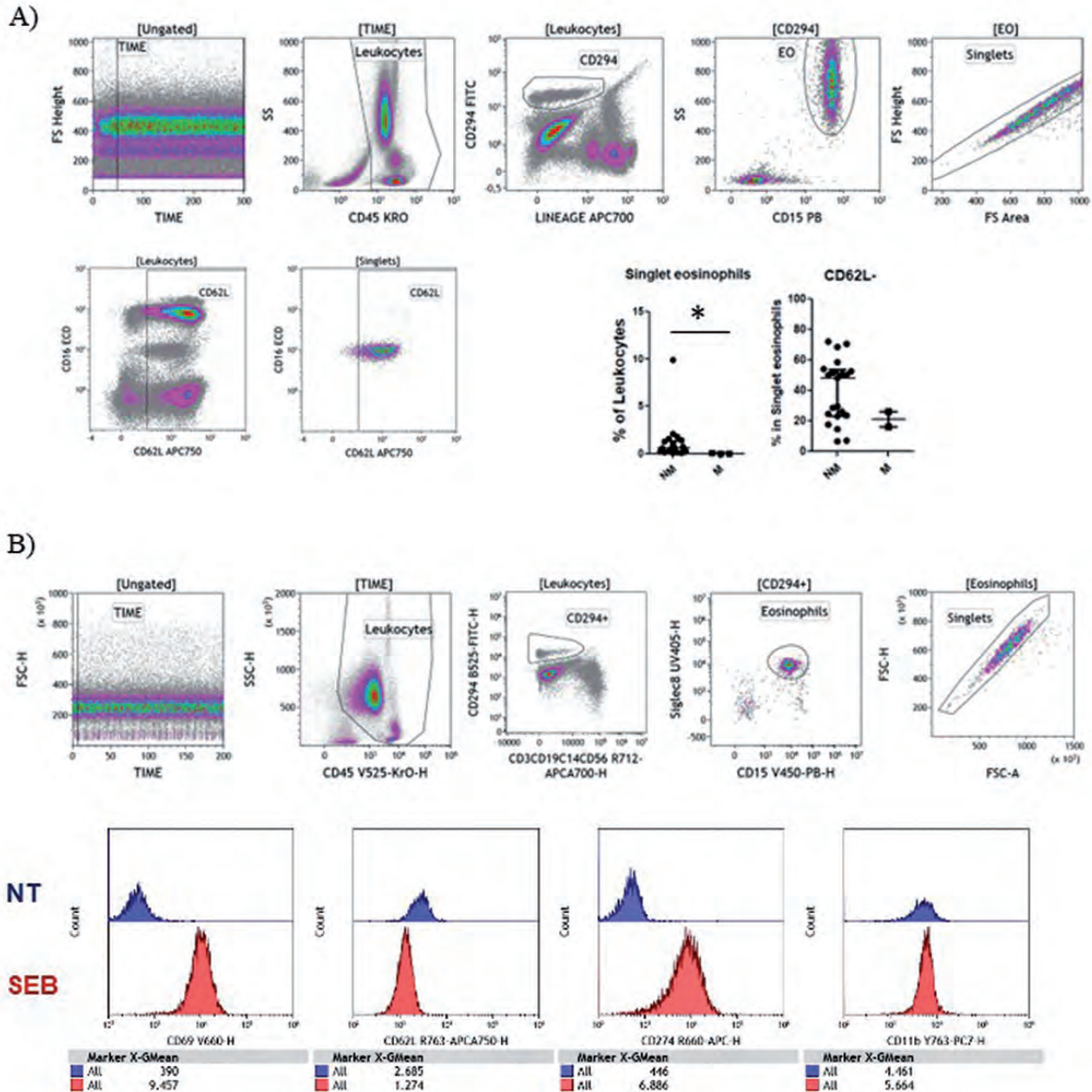


Figura 3. Analisi del fenotipo e dell'attivazione degli eosinofili circolanti umani mediante MFC. A) Caratterizzazione *ex vivo* degli eosinofili umani circolanti in pazienti affette da tumore della mammella non metastatico (NM) e metastatico (M). Strategia di gating: a partire dal gate TIME, i leucociti sono stati selezionati in base all'espressione del marker pan-leucocitario CD45. I leucociti positivi per CD294 e negativi per i marcatori di linea CD3, CD19, CD56, CD14 (Lin-) sono stati ulteriormente analizzati per l'espressione di CD15 per identificare gli eosinofili (CD294+ CD15+) che vengono ulteriormente definiti mediante la selezione degli eventi singoli. Il plot CD16/CD62L permette di identificare la popolazione CD62L- (attivata), all'interno dei leucociti totali. Lo stesso gate è applicato per definire gli eosinofili Singlets attivati. I grafici a dispersione rappresentano le percentuali di eosinofili all'interno del gate leucocitario e lo stato di attivazione degli stessi, in pazienti con tumore della mammella NM (n=21) e M (n=3). B) Valutazione dell'espressione di marcatori di attivazione e senescenza (CD69, CD62L, PD-L1/CD274 e CD11b), sulla superficie di eosinofili derivati da sangue intero di un donatore sano e coltivati *in vitro* in presenza di SEB o meno. Qui mostriamo la strategia di gating e l'analisi di un esperimento pilota.

liquida (drop-in), specifici per le molecole di superficie CD193, CD123 e Siglec-8, e per i marcatori di attivazione CD69, CD63 e CD62L. L'elenco completo delle combinazioni anticorpo-fluorocromo per la caratterizzazione degli eosinofili umani *ex vivo* e dopo stimolazione *in vitro*, sono riportati nella **Tabella 1B**.

L'acquisizione dei dati è stata eseguita utilizzando uno strumento Facs Gallios (Beckman Coulter) e l'analisi mediante il software Kaluza v.1.3 (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). La strategia di gating è illustrata nella **Figura 3**, che mostra i dot plots rappresentativi dei passaggi sequenziali per l'analisi delle sottopopolazioni di leucociti circolanti delle pazienti con tumore della mammella (**Figura 3A**) e degli eosinofili di sangue periferico stimolati *in vitro* con SEB (**Figura 3B**).

Analisi statistica

Le variabili generate dall'analisi citometrica a flusso Kaluza sono state importate in un processore statistico (IBM-SPSS V25, IBM Corporate New York, NY, USA). I valori anomali sono stati opportunamente eliminati. Il test U non parametrico di Mann-Whitney è stato utilizzato per confrontare le frequenze delle sottopopolazioni descritte nei grafici a dispersione delle Figure 1A e 3A.

RISULTATI

Esperimenti murini

Studi precedenti hanno dimostrato che in modelli murini trapiantati con cellule di melanoma B16.F10, l'esposizione alla citochina IL-33 determina una diminuzione della progressione tumorale che si accompagna ad un aumento degli eosinofili infiltranti il tumore (V. Lucarini et al. 2017). IL-33 inoltre induce un'umentata citotossicità degli eosinofili contro diverse linee cellulari tumorali (Andreone et al. 2019; Valeria Lucarini et al. 2017). In questo studio mostriamo i risultati di alcuni esperimenti di caratterizzazione degli eosinofili nel modello murino di melanoma.

La **Figura 1** illustra lo schema di trattamento dei topi C57BL/6 trapiantati con cellule di melanoma B16.F10 e trattati con IL-33 e lo studio degli eosinofili nel microambiente tumorale in topi trattati (IL-33) e non trattati (NT) (**Figura 1A**). Brevemente, il trattamento con IL-33 ha inibito significativamente la crescita dei noduli di melanoma e ha aumentato il tasso di sopravvivenza dei topi portatori di tumore. Inoltre, ha indotto un significativo reclutamento di cellule immunitarie nel tumore rispetto al controllo, in particolare a carico delle cellule T CD8⁺ e degli eosinofili (V. Lucarini et al. 2017). Gli eosinofili infiltranti il tumore vengono identificati come leucociti (CD45⁺), CD11b⁺, Siglec-F⁺, Ly6G⁻. All'interno del gate degli eosinofili è stata inoltre valutata l'espressione del PD-L1 (**Figura 1B**). I grafici a dispersione in **Figura 1C** rappresentano rispettivamente, le percentuali di eosinofili nel gate delle cellule CD11b⁺ Singlet (pannello di sinistra) e l'espressione di PD-L1 (MFI), da parte degli eosinofili (pannello di destra) di topi trattati con IL-33 (n=5), rispetto al gruppo di controllo NT (n=5). Entrambi questi para-

metri risultano significativamente aumentati nel gruppo di topi trattati con IL-33.

La **Figura 2** illustra l'effetto di IL-33 sul fenotipo di eosinofili differenziati *in vitro* dal midollo osseo murino (BM-EO). La **Figura 2A** è una rappresentazione schematica del protocollo utilizzato per generare BM-EO. Nella **Figura 2B** sono illustrati i dot plots che rappresentano la strategia di gating utilizzata per rilevare i BM-EO, definiti come CD11b⁺, Ly6G⁻ e Siglec-F⁺, mentre gli istogrammi mostrati in **Figura 2C** rappresentano i profili di fluorescenza dei marcatori di attivazione CD69, CD11b e CD44 sugli eosinofili attivati con IL-33 o coltivati con la sola IL-5, studiati all'interno del gate definito per gli eosinofili Singlet. Come si può osservare nei grafici in **Figura 2D**, i dati ottenuti da tre topi per gruppo, indicano una tendente up-regolazione di CD69, CD44 e CD11b nei BM-EO attivati con IL-33 rispetto ai BM-EO esposti alla sola IL-5. Questi dati consolidano quanto già precedentemente dimostrato (Andreone et al. 2019), introducendo inoltre una nuova evidenza per quanto riguarda l'up-regolazione, se pur lieve, del CD44.

Esperimenti nell'uomo

Nell'uomo, abbiamo effettuato un'analisi del fenotipo e dello stato di attivazione degli eosinofili circolanti umani mediante MFC, sia *ex vivo* che dopo stimolazione *in vitro*.

In **Figura 3A**, viene descritta la strategia di gating relativa a un pannello commerciale essiccato, disegnato per la caratterizzazione delle sottopopolazioni granulocitarie. Qui viene riportato il focus sul subset degli eosinofili, che sono definiti dalla sequenza: finestra temporale di flusso stabile, gate leucocitario (CD45⁺), eventi CD294⁺ lineage- (CD3, CD19, CD56, CD14), eventi CD15⁺, Singlets. La negatività al CD62L (espressione di attivazione cellulare) viene definita mediante un plot CD62L/CD16 nel gate leucocitario e quindi riportata nel gate relativo agli eosinofili singlet. I risultati preliminari ottenuti *ex vivo* su pazienti con tumore alla mammella mostrano che le pazienti con tumore metastatico presentano un tasso di eosinofili significativamente più basso e con un fenotipo tendenzialmente meno attivato rispetto alle pazienti con tumore non metastatico. Lo stato di attivazione degli eosinofili è indicato dai livelli di eosinofili negativi per CD62L, come mostrato nei grafici a dispersione in **Figura 3A** (manoscritto in sottomissione). Questi dati andranno confermati utilizzando un numero maggiore di pazienti ma suggeriscono una potenziale *signature* immunologica associata al grado di malattia.

La **Figura 3B** illustra la strategia di gating utilizzata per lo stesso pannello commerciale essiccato appena descritto, integrato con alcuni anticorpi liquidi (vedi **Tabella 1B**). In questo caso, gli eosinofili sono stati identificati nella finestra temporale di flusso stabile come gli eventi CD45⁺CD294⁺lineage-CD15⁺Siglec-8⁺ singlet. Tale pannello integrato è stato utilizzato nell'ambito di un esperimento pilota *in vitro* su un campione di sangue di un donatore sano. Abbiamo qui potuto osservare che

l'enterotossina SEB induce una attivazione degli eosinofili che si riflette nella up-regolazione di marcatori quali il CD69, il CD11b e il CD274 (PD-L1) e nella down-regolazione di CD62L (vedi gli istogrammi in **Figura 3B**), che può essere spiegata sia da un'azione diretta della enterotossina sugli eosinofili (Minai-Fleminger et al. 2014), sia da un fenomeno indiretto mediato da altri attori della risposta cellulare, come i linfociti (Rajagopalan et al. 2024).

CONCLUSIONI

Gli eosinofili sono leucociti multifunzionali che contribuiscono a vari processi fisiologici e patologici a seconda della loro localizzazione e del loro stato di attivazione. Tuttavia, il ruolo di queste cellule rimane oggetto di continue speculazioni e indagini.

In questo articolo proponiamo alcuni pannelli innovativi basati sulla citometria a flusso per la dissezione di vari sottoinsiemi di eosinofili sia nel topo che nell'uomo e mostriamo alcuni esempi di caratterizzazione e attivazione di queste cellule *ex vivo*, *in vitro* e *in vivo*. Il nostro studio fornisce un potenziale strumento per la caratterizzazione degli eosinofili come biomarcatori immunitari nel contesto sia preclinico/traslazionale che clinico. Per questo motivo, sarà importante utilizzare pannelli commerciali pre-validati oppure sottoporre i pannelli disegnati *in house* a un processo di validazione nonché a un ulteriore processo di armonizzazione nel caso in cui si voglia applicarli in un contesto di studio multicentrico.

Bibliografia

- Abdala-Valencia, Hiam et al. 2018. "Shaping Eosinophil Identity in the Tissue Contexts of Development, Homeostasis, and Disease." *Journal of Leukocyte Biology* 104(1).
- Ammann, Nadine L et al. 2022. "Activated Eosinophils Predict Longer Progression-Free Survival under Immune Checkpoint Inhibition in Melanoma." : 1–19.
- Andreone, Sara et al. 2019. "IL-33 Promotes CD11b/CD18-Mediated Adhesion of Eosinophils to Cancer Cells and Synapse-Polarized Degranulation Leading to Tumor Cell Killing." *Cancers* 11(11).
- Arnold, Isabelle C. et al. 2018. "Eosinophils Suppress Th1 Responses and Restrict Bacterially Induced Gastrointestinal Inflammation." *Journal of Experimental Medicine* 215(8): 2055–72.
- Bafadhel, Mona, Ian D. Pavord, and Richard E.K. Russell. 2017. "Eosinophils in COPD: Just Another Biomarker?" *The Lancet Respiratory Medicine* 5(9).
- Balatoni, Tímea et al. 2020. "Biomarkers Associated with Clinical Outcome of Advanced Melanoma Patients Treated with Ipilimumab." *Pathology and Oncology Research* 26(1): 317–25.
- Borrelli, Costanza, Alessandra Gurtner, Isabelle C. Arnold, and Andreas E. Moor. 2024. "Stress-Free Single-Cell Transcriptomic Profiling and Functional Genomics of Murine Eosinophils." *Nature Protocols*: 1–31.
- Çekmen, Bora et al. 2022. "Eosinophil Count Can Predict Dyspnea Level in Patients with Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Pulmonologiya* 32(1).
- Chen, Huanquan et al. 2022. Exploring the Role of *Staphylococcus Aureus* in Inflammatory Diseases.
- Fettelet, Timothée et al. 2021. "The Enigma of Eosinophil Degranulation." *International Journal of Molecular Sciences* 22(13): 1–19.
- Fulkerson, Patricia C, and Marc E Rothenberg. 2013. "Inflammation and Beyond." *Nature Reviews Drug Discovery* 12(2): 117–29. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3838>.
- Ghaffari, Sasan, and Nima Rezaei. 2023. "Eosinophils in the Tumor Microenvironment: Implications for Cancer Immunotherapy." *Journal of Translational Medicine* 21(551): 1–23. <https://doi.org/10.1186/s12967-023-04418-7>.
- Gigon, Lea et al. 2023. "Eosinophils from A to Z." (April): 1810–46.
- Goh, Y. P.Sharon et al. 2013. "Eosinophils Secrete IL-4 to Facilitate Liver Regeneration." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(24): 9914–9919.
- Gridelli, Cesare et al. 2017. "Predictive Biomarkers of Immunotherapy for Non-Small Cell Lung Cancer: Results from an Experts Panel Meeting of the Italian Association of Thoracic Oncology." *Translational Lung Cancer Research* 6(3): 373–86. <http://tldr.amegroups.com/article/view/13759/11632>.
- Gurtner, Alessandra, Ignacio Gonzalez-Perez, and Isabelle C. Arnold. 2021. "Intestinal Eosinophils, Homeostasis and Response to Bacterial Intrusion." *Seminars in Immunopathology* 43(3): 295–306.
- Hogan, Simon P. et al. 2009. "Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease." In *Allergy and Allergic Diseases, Second Edition*, , 258–94.
- Holl, Eda K. et al. 2019. "Examining Peripheral and Tumor Cellular Immunome in Patients With Cancer." *Frontiers in immunology* 10: 1767.
- Huang, Lu, and Judith A. Appleton. 2016. "Eosinophils in Helminth Infection: Defenders and Dupes." *Trends in Parasitology* 32(10): 798–807.
- Huang, Rong et al. 2021. "Association between the Peripheral Blood Eosinophil Counts and Covid-19 a Meta-Analysis." *Medicine (United States)* 100(23): e26047.
- Huber, Harry L., and Karl K. Koessler. 1922. "The Pathology of Bronchial Asthma." *Archives of Internal Medicine* 30(6): 689–760.
- Johnston, Laura K, and Paul J Bryce. 2017. "Understanding Interleukin 33 and Its Roles in Eosinophil Development." 4(May): 1–7.
- Kanda, Akira et al. 2021. "The Multiple Functions and Subpopulations of Eosinophils in Tissues under Steady-State and Pathological Conditions." *Allergology International* 70(1): 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.alit.2020.11.001>.
- Kim, Hyung Jin, and Yunjae Jung. 2020. "The Emerging Role of Eosinophils as Multifunctional Leukocytes in Health and Disease." *Immune Network* 20(3): 1–14.
- Kovalszki, Anna, and Peter F. Weller. 2016. "Eosinophilia." *Primary Care: Clinics in Office Practice* 43(4): 607–17.
- Lambrecht, Bart N., and Hamida Hammad. 2015. "The Immunology of Asthma." *Nature Immunology* 16(1): 45–56.
- Lamichhane, Prem P., and Amali E. Samarasinghe. 2019. "The Role of Innate Leukocytes during Influenza Virus Infection." *Journal of Immunology Research* 2019.
- Lee, Eun Hui et al. 2018. "Eosinophils Support Adipocyte Maturation and Promote Glucose Tolerance in Obesity." *Scientific Reports* 8(1): 1–12.
- Lee, J. J. et al. 2010. "Eosinophils in Health and Disease: The LIAR Hypothesis." *Clinical and Experimental Allergy* 40(4): 563–75.
- Liu, Jing et al. 2020. "Eosinophils Improve Cardiac Function after Myocardial Infarction." *Nature Communications* 11(1): p.6396.
- Lombardi, Carlo, Alvise Berti, and Marcello Cottini. 2022. "The Emerging Roles of Eosinophils: Implications for the Targeted Treatment of Eosinophilic-Associated Inflammatory Conditions." *Current Research in Immunology* 3: 42–53.
- Long, Hai, Wei Liao, Ling Wang, and Qianjin Lu. 2016. "A Player and Coordinator: The Versatile Roles of Eosinophils in the Immune System." *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 43(2): 96–108.
- Lucarini, V. et al. 2017. "IL-33 Restricts Tumor Growth and Inhibits Pulmonary Metastasis in Melanoma-Bearing Mice through Eosinophils." *OncoImmunology* 6(6).

34. Lucarini, Valeria et al. 2017. "IL-33 Restricts Tumor Growth and Inhibits Pulmonary Metastasis in Melanoma-Bearing Mice through Eosinophils." *OncoImmunology* 6(6).
35. Lucia, Gabriella Santa et al. 2023. "Eosinophils and Melanoma: Implications for Immunotherapy." 35(2): 192–202.
36. Macchia, Iole et al. 2023. "Eosinophils as Potential Biomarkers in Respiratory Viral Infections." (July): 1–19.
37. Marichal, Thomas, Claire Mesnil, and Fabrice Bureau. 2017. "Homeostatic Eosinophils: Characteristics and Functions." *Frontiers in Medicine* 4(JUL).
38. Minai-Fleminger, Y. et al. 2014. "The CD48 Receptor Mediates Staphylococcus Aureus Human and Murine Eosinophil Activation." *Clinical & Experimental Allergy* 44(11): 1335–46.
39. Mishra, Anil et al. 1999. "Fundamental Signals That Regulate Eosinophil Homing to the Gastrointestinal Tract." *Journal of Clinical Investigation* 103(12): 1719–27.
40. Onesti, Concetta Elisa et al. 2020. "Blood Eosinophilic Relative Count Is Prognostic for Breast Cancer and Associated with the Presence of Tumor at Diagnosis and at Time of Relapse." *OncoImmunology* 9(1).
41. Onesti, Concetta Elisa, Claire Josse, Aurélie Poncin, and Pierre Frères. 2018. "Predictive and Prognostic Role of Peripheral Blood Eosinophil Count in Triple-Negative and Hormone Receptor-Negative / HER2-Positive Breast Cancer Patients Undergoing Neoadjuvant Treatment." 9(72): 33719–33.
42. OWNBY, HELEN E. 1983. "Peripheral Lymphocyte and Eosinophil Counts as Indicators of Prognosis in Primary Breast Cancer." : 126–30.
43. Pitoiset, Fabien et al. 2018. "Deep Phenotyping of Immune Cell Populations by Optimized and Standardized Flow Cytometry Analyses." *Cytometry Part A*.
44. Poncin, Aurélie et al. 2021a. "Immunity and Breast Cancer: Focus on Eosinophils." *Biomedicines* 9(9).
45. ——. 2021b. "Immunity and Breast Cancer: Focus on Eosinophils." *Biomedicines* 9(9).
46. Radonjic-Hösli, Susanne, and Hans Uwe Simon. 2014. "Eosinophils." *Chemical Immunology and Allergy* 100: 193–204.
47. Rajagopalan, Govindarajan et al. 2024. "Early Gene Expression Changes Induced by the Bacterial Superantigen Staphylococcal Enterotoxin B and Its Modulation by a Proteasome Inhibitor." : 279–93.
48. Ramirez, Giuseppe A. et al. 2018. "Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review." *BioMed Research International* 2018: Article ID 9095275, 28 pages.
49. Rodrigo-muñoz, José M., Marta Gil-martínez, Beatriz Sastre, and Victoria Del Pozo. 2021. "Emerging Evidence for Pleiotropism of Eosinophils." *International Journal of Molecular Sciences* 22(13).
50. Simon, Sonja C.S., Xiaoying Hu, Jasper Panten, Mareike Grees, Simon Renders, et al. 2020. "Eosinophil Accumulation Predicts Response to Melanoma Treatment with Immune Checkpoint Inhibitors." *OncoImmunology* 9(1). <https://doi.org/10.1080/2162402X.2020.1727116>.
51. Simon, Sonja C S, Jochen Utikal, and Viktor Umansky. 2019. "Opposing Roles of Eosinophils in Cancer." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 68(5): 823–33. <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-018-2255-4>.
52. Streitz, Mathias et al. 2013. "Standardization of Whole Blood Immune Phenotype Monitoring for Clinical Trials: Panels and Methods from the ONE Study." *Transplantation Research*.
53. Varricchi, Gilda et al. 2018. "Eosinophils: The Unsung Heroes in Cancer?" *OncoImmunology* 7(2): e1393134 (14 pages).
54. Weide, Benjamin et al. 2016. "Baseline Biomarkers for Outcome of Melanoma Patients Treated with Pembrolizumab." *Clinical Cancer Research* 22(22): 5487–96.
55. Weller, Peter F., and Lisa A. Spencer. 2017. "Functions of Tissue-Resident Eosinophils." *Nature Reviews Immunology* 17(12): 746–60.
56. Wen, Ting, and Marc E. Rothenberg. 2016. "The Regulatory Function of Eosinophils." *Microbiology Spectrum* 4(5).
57. Wendlinger, Simone et al. 2022. "Blood Eosinophils Are Associated with Efficacy of Targeted Therapy in Patients with Advanced Melanoma." *Cancers* 14(9).
58. Zafer, Mustafa et al. 2021. "Prediction of Non - Muscle - Invasive Bladder Cancer Recurrence during Intravesical BCG Immunotherapy by Use of Peripheral Blood Eosinophil Count and Percentage: A Preliminary Report." *Cancer Immunology, Immunotherapy* 70(1): 245–52. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02673-x>

Lettere GIC

Open Access

Peer Review

Un Ringraziamento ai Revisori dei manoscritti inviati alla nostra Rivista

La revisione tra pari dei manoscritti inviati ai giornali scientifici è fondamentale; anche per la nostra Rivista i Colleghi hanno messo a disposizione il loro tempo, la loro cultura e la loro esperienza professionale per la revisione dei manoscritti che sono stati inviati per la pubblicazione.

Desideriamo ringraziare anche a nome degli Autori, tutti i Colleghi sottoelencati per l'aiuto e il fondamentale contributo alla qualità degli articoli e della Rivista.

Rachele Amodeo (Roma)
Alessandra Battaglia (Roma)
Giovanni D'Arena (Salerno)
Laura Maggi (Firenze)

Claudio Pioli (Roma)
Giulia Scalia (Napoli)
Virginia Tirino (Napoli)

La Direzione e il Comitato Scientifico Editoriale

Applicazione dell'analisi di citometria a flusso in un caso di vexas/sindrome mielodisplastica progredita a leucemia acuta mieloide

Vincenzi Annamaria¹, Battipaglia Giorgia^{1,2}, Falconi Giulia³, Fiore Alessia¹, D'Agostino Francesco¹,
Iannotta Raffaella¹, Grimaldi Francesco^{1,2}, Gurnari Carmelo³, Elena Crisà⁵, Scalia Giulia⁴,
Izzo Barbara⁴, Voso Maria Teresa³, Pane Fabrizio^{1,2}

¹Federico II University of Naples, Hematology Department, Naples, Italy

²Department of Clinical Medicine and Surgery, Molecular Biology, University Federico II, Naples, Italy

³Department of Biomedicine and Prevention, University of Rome Tor Vergata, Rome, Italy

⁴Centre for Advanced Biotechnology (CEINGE), Naples, Italy

⁵Medical Oncology, Candiolo Cancer Institute, FPO-IRCCS, Candiolo (Torino), Italy

e-mail: annamariavincenzi5@gmail.com

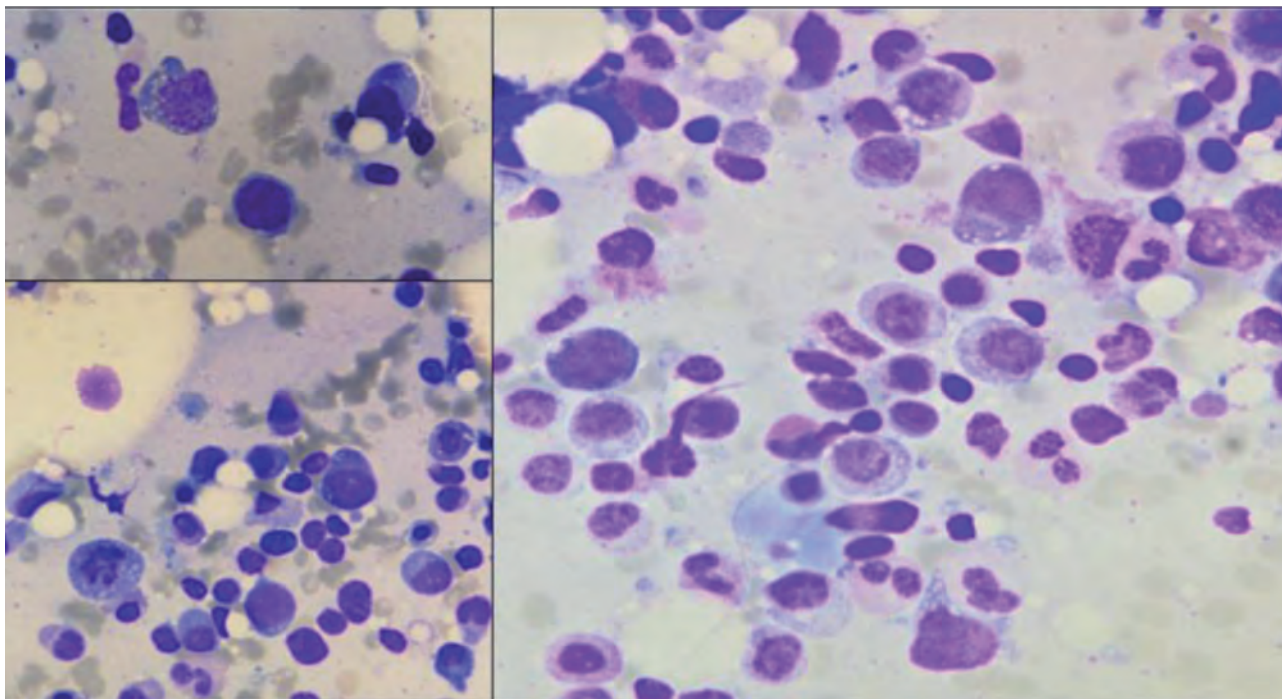
INTRODUZIONE

La sindrome VEXAS (l'acronimo sta per Vacuoles, E1 enzyme, X linked, Autinflammatory, Somatic) è una sindrome recentemente descritta causata dalla mutazione somatica *loss of function* del gene UBA1 che codifica per l'enzima attivante l'ubiquitinazione E1.

Tale sindrome si manifesta tipicamente con sintomi autoinfiammatori, talvolta inquadrati inizialmente con diagnosi di malattie reumatologiche, associati a manifestazioni ematologiche quali discrasia plasmacellulare (gammapatia monoclonale di significato incerto o mieloma multiplo) o più frequentemente anemia macrocitica e più in generale citopenie, configurando spesso una vera e propria diagnosi di sindrome mielodisplastica (MDS), nella maggior parte dei casi a basso rischio. Il quadro clinico può essere, inoltre, caratterizzato da fenomeni trombotici. Essendo una patologia legata al cromosoma X, si riscontra quasi esclusivamente in soggetti di sesso maschile seppur siano stati descritti anche in soggetti di sesso femminile. La mutazione del gene UBA1 viene rilevata nella cellu-

la staminale emopoietica e in progenitori mieloidi ed eritroidi, che sono caratterizzati all'esame morfologico da aspirato midollare da vacuoli citoplasmatici dall'aspetto particolarmente suggestivo benchè non patognomonico. Invece, nella linea linfocitaria la mutazione di UBA1 è assente, verosimilmente per selezione negativa del clone mutato per stress proteotossico e questo si traduce all'esame citofluorimetrico su sangue midollare in assenza dei precursori linfocitari B. Sono state descritte anche altre alterazioni immunofenotipiche su sangue midollare ma ad oggi non sono stati definiti markers tipici di questa patologia.

Considerata la variabilità di espressione clinica della VEXAS, al momento non sono state definite delle chiare linee guida terapeutiche per questa tipologia di pazienti e diverse categorie di farmaci sono state impiegate con variabili tassi di risposta. Numerosi report hanno dimostrato l'efficacia della terapia con azacitidina (anche associata a venetoclax) nonché il possibile ricorso a trapianto allogenico di cellule staminali in pazienti eleggibili.



Aspirato midollare in paziente con sindrome VEXAS. Si osservano i tipici vacuoli citoplasmatici.

CASO CLINICO

Un uomo di 59 anni giunse alla nostra attenzione nel luglio 2020 per comparsa di anemia macrocitica (concentrazioni sieriche di emoglobina di 10,4 g/dL e MCV pari a 110 fL) associata a trombocitopenia (conta piastrinica circa 80.000/mmc). Il paziente era già in follow-up reumatologico per febbri ricorrenti ascrivibili verosimilmente a patologia autoinfiammatoria. Concomitava, inoltre, una gammopatia monoclonale di significato incerto di tipo IgG kappa.

Con la procedura di aspirato midollare è stata posta diagnosi di sindrome mielodisplastica multilineare (MDS-MLD) a basso rischio secondo gli score prognostici attualmente in uso. All'esame morfologico dello striscio di sangue midollare si osservava il 3% di cellule patologiche e la presenza di vacuoli negli elementi della serie mieloide ed eritroide. La colorazione di Perls risultava negativa per sideroblasti ad anello. L'esame citofluorimetrico mostrava la presenza di 1,8% di cellule CD34+, CD45+ in assenza di ematogoni e di linfociti B CD19+. L'esame NGS, infine, documentava la presenza di mutazione di SF3B1 con una VAF del 34% e di ASXL1 con una VAF del 35%.

Nell'aprile 2021 la conta di cellule patologiche all'esame morfologico e citofluorimetrico dei prelievi di aspirato midollare risultava stabile, ma, considerato l'elevato burden trasfusionale, è stato avviato a screening per trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche, come indicato per la diagnosi di MDS. Tuttavia, il verificarsi di sempre più frequenti episodi infettivi necessitanti frequenti ricoveri, ivi inclusi episodi ricorrenti di pielonefrite acuta, infezione sintomatica da COVID-19 e polmonite da *Pneumocystis carinii*, il programma trapiantologico veniva accantonato.

A seguito di comparsa nel marzo 2022 di pancitopenia con conta assoluta di neutrofili inferiore a 1000/mmc, conta piastrinica inferiore a 25000/mmc e concentrazioni sieriche di emoglobina intorno a 7 g/dL e dipendenza da trasfusioni in emazie ulteriormente incrementata, ripeteva aspirato midollare. Quest'ultimo documentava

evoluzione in leucemia mieloide acuta con 24% di blasti all'esame morfologico e 16% di cellule patologiche all'esame citofluorimetrico con fenotipo CD45dim/CD34+/CD117+/HLA-DR+/CD13+/CD33+. Persisteva l'assenza di ematogoni e di linfociti B. Invariati risultavano cariotipo ed NGS.

Considerate le manifestazioni esibite dal paziente sino a quel momento e considerata la crescente letteratura in merito alla VEXAS, è stata avviata la ricerca di mutazioni di UBA1 su sangue midollare che ha mostrato la presenza di una mutazione missenso (c.121A>G, p.Met41Val) all'analisi di Sanger effettuata presso l'Università di Tor Vergata con una VAF del 68%.

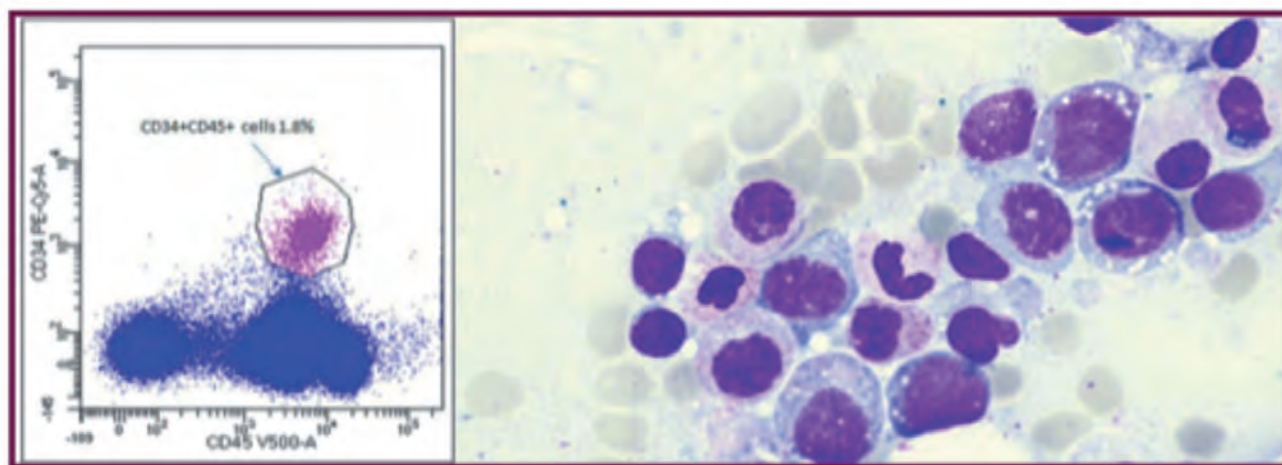
Il paziente è stato trattato, dunque, con Azacitidina combinata con Venetoclax e ha ottenuto remissione di malattia ematologica e di sintomi autoinfiammatori dopo 2 cicli di terapia. In particolare erano presenti all'aspirato midollare meno dell'1% di cellule patologiche all'esame citofluorimetrico e la mutazione di UBA1 non era più presente all'esame di Sanger e alla digital droplet PCR (ddPCR) la VAF era pari a 1.36% (giugno 2022).

Le condizioni cliniche del paziente erano, tuttavia, nettamente scadute a seguito delle numerose complicanze post-chemioterapia (numeroso complicanze infettive, diabete insulino-dipendente iatrogeno, disordini idrolettrolitici e melena) e si decideva pertanto di non proseguire con la terapia con azacitidina e venetoclax. Tuttavia, nel settembre 2022 si documentava ripresa della malattia leucemica (14% blasti midollari) e ricomparsa delle manifestazioni autoinfiammatorie, nonché un incremento di UBA1 in ddPCR al 24%.

Il paziente viene avviato a ottobre 2022 a chemioterapia intensiva presso un altro centro e successivamente indirizzato a trapianto allogenico di cellule staminali ematopoietiche da donatore non consanguineo dopo aver ottenuto una nuova remissione di malattia.

Riassumiamo dunque le valutazioni midollari a differenti time point:

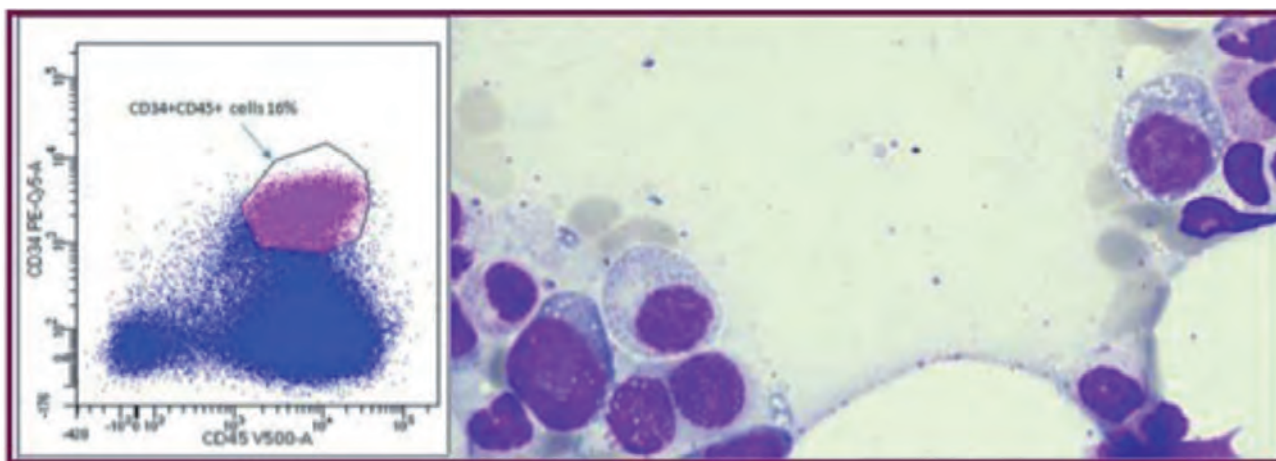
- a diagnosi (gennaio 2021) l'esame morfologico mostra-



Gennaio 2021. Aspirato midollare a diagnosi

- all'esame morfologico 3% di cellule patologiche, evidenti vacuoli citoplasmatici e nucleari in precursori eritroidi e mieloidi
- cellule CD34+ CD45+ pari al 1.8%

Diagnosi di sindrome mielodisplastica multilineare secondo WHO 2016



Marzo 2022. Aspirato midollare di rivalutazione

- all'esame morfologico 24% di blasti agranulati su fondo di mielodisplasia;
- evidenti vacuoli citoplasmatici e nucleari in precursori eritroidi e mieloidi cellule CD34+ CD45+ pari al 16%

Diagnosi di progressione a leucemia acuta mieloide

va aspetti displastici con vacuoli nei precursori eritroidi e granulopoietici; blasti pari al 3% e all'esame citofluorimetrico 1,8% di cellule CD34+CD45+. L'analisi in ddPCR condotta post hoc ha documentato una VAF della mutazione di UBA1 pari al 49%.

- progressione in leucemia mieloide acuta (marzo 2022): blasti agranulati (24%); all'esame citofluorimetrico 16% di blasti con fenotipo CD45dim/CD34+/CD117+/HLA-DR+/CD13+/CD33+ (VAF della mutazione di UBA1: 68%) e SSC ampio.

- dopo il primo ciclo di Azacitidina+Venetoclax (maggio 2022): remissione morfologica con 4% di blasti all'esame morfologico e 2% all'esame citofluorimetrico (non valutata la mutazione di UBA1)

- dopo il secondo ciclo di terapia (giugno 2022): assenza di blasti all'esame morfologico (<1% all'esame citofluo-

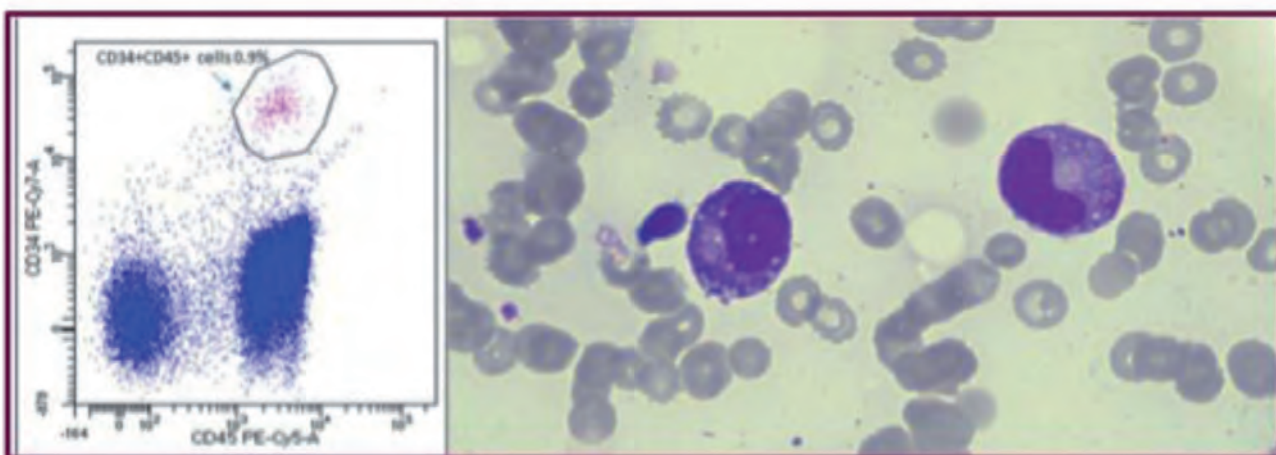
rimetrico) con VAF della mutazione di UBA1 pari a 1,38%.

- Recidiva di malattia ematologica e sintomi autinfiammatori (settembre 2022): 14% di blasti all'esame morfologico e 2% all'esame citofluorimetrico (VAF di UBA1 circa 24%)

- Dopo il primo ciclo di chemioterapia intensiva (novembre 2022): assenza di blasti all'esame morfologico (<1% all'esame citofluorimetrico) con VAF della mutazione di UBA1 pari a 0,07%.

DISCUSSIONE

La sindrome VEXAS è stata descritta per la prima volta nel 2020. È causata da una mutazione missenso somatica del gene UBA1 che si trova sul cromosoma X e che codifica per l'enzima attivante l'ubiquitinazione E1. La



Giugno 2022. Aspirato midollare di rivalutazione dopo 2 cicli di terapia

- all'esame morfologico assenza di blasti; persiste fondo displastico con elementi vacuolizzati
- cellule CD34+ CD45+ pari al 0.9%

Diagnosi di risposta ematologica con recupero ematologico incompleto (CRi)

perdita di funzione di questo gene causa uno squilibrio nel processo di ubiquitinazione con conseguente stress cellulare e iperinfiammazione.

A causa della recente descrizione della sindrome, la sua reale prevalenza non è nota ma probabilmente sottostimata. La sindrome VEXAS presenta caratteristiche morfologiche e cliniche uniche, con tipici vacuoli nei precursori mieloidi ed eritroidi osservati allo striscio di sangue midollare. Le caratteristiche infiammatorie comuni includono febbre, policondrite recidivante, vasculite, alveolite, mentre le caratteristiche ematologiche includono MDS trasfusione-dipendente, mieloma multiplo, trombosi. Le sindromi mielodisplastiche a basso rischio si verificano in quasi il 40% dei casi e prima del nostro caso non sono stati descritti casi che sono evoluti in leucemia mieloide acuta. Al momento della diagnosi si osserva frequentemente un elevato carico clonale di mutazioni, ma apparentemente non vi è una correlazione tra VAF e gravità fenotipica.

La citometria a flusso è una tecnologia utile per la diagnosi delle malattie linfematoipoietiche. Il suo utilizzo nella sindrome VEXAS non è ancora consolidato ma nel caso clinico presentato è risultato un valido strumento per il monitoraggio della malattia minima residua, combinato ad esame morfologico e ddPCR per la ricerca della mutazione di UBA1.

Da uno studio di Plesa et al. del 2022, in cui è stato analizzato l'immunofenotipo delle cellule staminali ematopoietiche (HSPC) CD34+ di 11 pazienti affetti da VEXAS, è emerso che in questi vi è iperespressione di CD90 Thy-1 markers nelle cellule staminali emopoietiche CD34+, soprattutto nella quota più immatura CD34+CD38-. Ulteriori studi condotti auspicabilmente su campioni più numerosi potrebbero confermare la specificità di questo immunofenotipo ed il suo eventuale ruolo nella fisiopatologia di questa sindrome.

In un recente lavoro di Ding et al. del 2023 è stata studiata l'applicazione della citofluorimetria a flusso per riconoscere le tipiche cellule vacuolizzate presenti nel sangue midollare dei pazienti con diagnosi di VEXAS.

Inoltre, è emerso che la presenza di vacuoli aumenta la complessità del citoplasma cellulare e dunque si traduce in SSC più ampio. Infatti, rispetto ai 106 casi di controllo, nei 27 pazienti studiati affetti da VEXAS è stata dimostrata per neutrofili, monociti e precursori eritroidi la presenza di un aumentato side scatter (SSC) ratio, che è stato calcolato dividendo la media geometrica dell'intensità del SSC della popolazione di interesse per quella dei linfociti T CD4+ provenienti dallo stesso campione.

In particolare, la differenza è risultata più lampante nei precursori neutrofili e meno nei precursori monocitari, probabilmente perché le vacuolizzazioni si osservano nei monociti in diverse ed eterogenee condizioni fisiopatologiche. Al contrario, non è emersa differenza nel SSC ratio se venivano confrontati neutrofili maturi piuttosto che i loro precursori.

In questo stesso studio è stato calcolato anche l'SSC ratio rapportando i precursori neutrofili ai neutrofili maturi e confrontato tra i pazienti VEXAS e i controlli non-VEXAS e nel primo caso il valore è risultato significativamente più alto. Tuttavia, è da considerare che i neutrofili maturi non rappresentano un controllo ideale, dal momento che gli elementi ipogranulati hanno in generale un SSC ridotto

È stato anche proposto un cutoff di SSC ratio per precursori neutrofili pari a 11 con valore predittivo di diagnosi di sindrome VEXAS del 91.7% e un valore predittivo negativo del 96.3% anche se inficiato dalla bassa prevalenza di questa malattia.

Nel caso del nostro paziente, l'intensità del CD45 e l'ampio SSC hanno consentito il monitoraggio della popolazione blastica nelle valutazioni successive alla diagnosi, pur mancando marcatori di infedeltà di linea.

CONCLUSIONE

A nostra conoscenza, questo riportato è il primo caso di progressione a leucemia acuta mieloide in contesto di sindrome VEXAS.

L'esame citofluorimetrico può essere un valido strumento, combinato con altre tecniche come la ddPCR per la mutazione di UBA1, per il monitoraggio della malattia minima residua nel setting VEXAS/LAM. Ulteriori studi sono necessari al fine di identificare eventuali pannelli che permettano di identificare e porre sospetto di VEXAS già attraverso l'esame citofluorimetrico, che resta un esame a più basso costo e con tempi tecnici inferiori rispetto al Sanger e alla ddPCR.

Bibliografia

1. Ferrada MA, Sikora KA, Luo Y, et al. Somatic Mutations in UBA1 Define a Distinct Subset of Relapsing Polychondritis Patients With VEXAS. *Arthritis Rheumatol.* 2021;73(10):1886-1895. doi:10.1002/art.41743
2. Gurnari C, Mannion P, Pandit I, et al. UBA1 Screening in Sweet Syndrome With Hematological Neoplasms Reveals a Novel Association Between VEXAS and Chronic Myelomonocytic Leukemia. *HemaSphere.* 2022;6(10):e775. doi:10.1097/HS9.0000000000000775
3. Gelsi-Boyer V, Brecqueville M, Devillier R, Murati A, Mozziconacci MJ, Birnbaum D. Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases. *J Hematol Oncol.* 2012;5(1):1-6. doi:10.1186/1756-8722-5-12/TABLES/1
4. Heiblig M, Ferrada MA, Koster MJ, et al. Ruxolitinib is more effective than other JAK inhibitors to treat VEXAS syndrome: a retrospective multicenter study. *Blood.* 2022;140(8):927-931. doi:10.1182/blood.2022016642
5. Georjin-Lavialle S, Terrier B, Guedon AF, et al. Further characterization of clinical and laboratory features in VEXAS syndrome: large-scale analysis of a multicentre case series of 116 French patients. *Br J Dermatol.* 2022;186(3):564-574. doi:10.1111/bjd.20805
6. Loschi M, Roux C, Sudaka I, et al. Allogeneic stem cell transplantation as a curative therapeutic approach for VEXAS syndrome: a case report. *Bone Marrow Transplant.* 2022;57(2):315-318. doi:10.1038/s41409-021-01544-y
7. Gurnari C, McLornan DP. Update on VEXAS and role of allogeneic bone marrow transplant: Considerations on behalf of the Chronic Malignancies Working Party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant.* Published online August 2022. doi:10.1038/s41409-022-01774-8
8. Ganan-Gomez I, Yang H, Ma F, et al. Stem Cell Architecture Drives Myelodysplastic Syndrome Progression and Predicts Response to Venetoclax-Based Therapy. Vol 28. Springer US; 2022. doi:10.1038/s41591-022-01696-4
9. Martignoles JA, Delhommeau F, Hirsch P. Genetic Hierarchy of Acute Myeloid Leukemia: From Clonal Hematopoiesis to Molecular Residual Disease. *Int J Mol Sci* 2018, Vol 19, Page 3850. 2018;19(12):3850. doi:10.3390/IJMS19123850
10. Yanna Ding, Alina E. Dulau-Florea, Emma M. Groarke, Bhavisha A. Patel, David B. Beck, Peter C. Grayson, Marcela A. Ferrada, Neal S. Young, Katherine R. Calvo, Raul C. Braylan; Use of flow cytometric light scattering to recognize the characteristic vacuolated marrow cells in VEXAS syndrome. *Blood Adv* 2023; 7 (20): 6151-6155. doi: https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2023010456
11. Adriana Plesa, et al. Correlation of Clonal Hematopoiesis in Vexas Syndrome with Immunophenotype Alterations in CD34+ HSPCs (Hematopoietic Stem Progenitor Cells): Multiparametric Flow Cytometry Heterogeneity in CD34+CD38- Stem Cells Fraction and Upregulation of CD90 Thy-1 By Unsupervised Strategy Using PCA, Tsnee and Flowsom. *Blood* 2022; 140 (Supplement 1): 4086-4087. doi: https://doi.org/10.1182/blood-2022-169959.

LONG LIFE CARE

POWERED BY CYTOFLOWSERVICE



Cytoflowservice è una realtà innovativa che offre servizi integrati di manutenzione hardware e software sui principali tipi di citometri

CYTOFLOWSERVICE si afferma attraverso un **Programma di Assistenza ("Long Life Care")** dedicato e flessibile, che soddisfa le necessità dei clienti con un'offerta economica competitiva in termini di numero di interventi garantiti, manutenzioni programmate e ricambi originali.

Nel programma Long Life non esiste il termine "**Obsolescenza Programmata**" in quanto, oltre ai servizi di manutenzione e **Pronto Intervento**, l'Azienda offre un servizio di Upgrade Tecnologico in hardware e software per i citometri analogici.

Con questo programma efficace e certificato, sarà possibile estendere la vita della strumentazione per molti anni.

Grazie alla partnership con **Kineti River Corp.**, Cytoflowservice, propone prodotti e servizi per applicazioni di nicchia, risolvendo le **limitazioni della citofluorimetria "commerciale"** perchè "*progetti speciali richiedono sempre soluzioni innovative*".

- ✓ **ASSISTENZA TECNICA DEDICATA E FLESSIBILE**
- ✓ **PRONTO INTERVENTO LASER**
- ✓ **UPGRADE TECNOLOGICO HARDWARE E SOFTWARE**
- ✓ **OFFERTA ECONOMICA COMPETITIVA**
- ✓ **CONTRO L' OBSOLESCENZA PROGRAMMATA**

distributore ufficiale in Europa e Medio Oriente di



CYTOFLOW
SERVICE

Sede Legale: Viale Tito Labiengo, 12 - 00174 Roma
Sede Operativa: Via Monte Albino, 18 - 00178 Roma
Tel.: (+39) 06.83980640
Email: info@cytoflowservice.com
Sito web: www.cytoflowservice.com
Seguici su:

[cytoflowservice](https://www.instagram.com/cytoflowservice) [Cytoflowservice](https://www.facebook.com/Cytoflowservice)



Invito alla lettura

a cura del Gruppo Aggiornamento e Formazione

When does a PNH clone have clinical significance?

Daria V Babushok¹

Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2021 Dec 10;2021(1):143-152.

doi: 10.1182/hematology.2021000245.

L'emoglobinuria parossistica notturna (PNH) è un raro disordine ematologico acquisito della cellula staminale emopoietica. Insorge come conseguenza dell'espansione clonale non maligna di una o più cellule staminali che hanno acquisito una mutazione a carico del gene PIG-A, localizzato sul cromosoma X. Tali mutazioni sul gene PIG-A hanno come conseguenza la mancata formazione dell'ancora GPI e l'impossibilità a molte proteine di legarsi alla membrana. La PNH è considerata come una delle sindromi da insufficienza midollare come l'anemia aplastica (AA) e le sindromi mielodisplastiche che hanno in comune un midollo ipoplastico ed eritropoiesi clonale. La diagnosi di PNH rimane una diagnosi clinica. Necessita, tuttavia, della documentata assenza parziale o totale di molecole GPI linked sulla membrana plasmatica di almeno due linee cellulari. La metodica "gold standard" per l'individuazione del clone PNH è la citometria a flusso che grazie all'approccio multiparametrico e all'ampia disponibilità di marcatori, consente di valutare su più linee cellulari più proteine "GPI-linked" contemporaneamente. La valutazione del significato clinico di un clone PNH rimane più sfumata poiché l'interpretazione dei risultati richiede una comprensione della patogenesi della PNH e della sua relazione con l'insufficienza midollare. Solo circa un terzo dei pazienti con cloni PNH presenta una malattia "PNH classica" ossia con emolisi conclamata e con sintomi correlati. I pazienti con "PNH classica" traggono il massimo beneficio dagli inibitori del complemento. Al contrario, due terzi dei cloni PNH individuati, si osservano in pazienti la cui manifestazione clinica è quella di un'insufficienza midollare con pochi o nessun sintomo correlato ma associabile alla dimensione del clone. Sebbene si verificano delle eccezioni, i pazienti con insufficienza midollare di solito, hanno cloni PNH subclinici più piccoli. Questa revisione affronta gli scenari comuni che si presentano nella valutazione del significato clinico dei cloni PNH individuati e fornisce linee guida pratiche per avvicinarsi a un paziente con un risultato positivo per PNH.

Rachele Amodeo

rachele.amodeo@ospedalesantandrea.it

A new score including CD43 and CD180: Increased diagnostic value for atypical chronic lymphocytic leukemia

Yi Li[†], Xiwen Tong[†], Lifang Huang[†], Li Li[†], Chunyan Wang[†], Cheng He[†], Songya Liu[†], Zhiqiong Wang[†], Min Xiao[†], Xia Mao[†], Donghua Zhang[†]

Cancer Medicine 2021 Jul;10(13):4387-4396. doi: 10.1002/cam4.3983. Epub 2021 Jun 1.

La leucemia linfatica cronica (LLC) è una delle più comuni patologie linfoproliferative coinvolgente i linfociti di tipo B ed è il disordine linfoproliferativo che maggiormente si avvale dello studio immunofenotipico mediante citometria a flusso per la sua diagnosi. Nel 1994 Matutes et al. proposero uno score citometrico basato sull'espressione di cinque marcatori (CD5, CD23, CD22, FMC7 ed immunoglobuline di superficie) sensibile e potenzialmente capace di discriminare la leucemia linfatica cronica da altri disordini linfoproliferativi. Nel 1997 Moreau EJ et al. hanno migliorato la sensibilità di questo score introducendo l'anticorpo monoclonale CD22 al posto del CD79b. Recentemente un nuovo punteggio diagnostico "CLL flow Score" ha introdotto ulteriori accorgimenti al fine di migliorarne l'accuratezza. Questi score, con i limiti che caratterizzano tutti i punteggi diagnostici, sono importanti nella diagnostica immunofenotipica della LLC.

Lo scopo di questo lavoro è di introdurre un nuovo score maggiormente rispondente alle esigenze diagnostiche soprattutto della popolazione asiatica. Gli anticorpi monoclonali utilizzati da Yi Li e collaboratori in questo nuovo score LLC sono il CD43, CD200, FMC7, CD79b e CD180. La peculiarità che ha attirato la mia attenzione è la sostituzione del CD5 e del CD23 (anticorpi cardine della nostra indagine fenotipica) con il CD43 ed il CD180. Questo score proposto da Yi Li ha una sensibilità del 91,8% ed una specificità dell'83,1%. Il nuovo score LLC ha mostrato una migliore sensibilità rispetto al punteggio di Moreau e al punteggio CLL flow, rispettivamente del 41,2% e del 47,1%. La sensibilità risulta del 61,4% e del 64,9% se si applica questo score al gruppo di pazienti con LLC atipica. Gli autori concludono che tale score da loro proposto ha contribuito, insieme a tecniche morfologiche e molecolari, alla diagnostica differenziale tra LLC e sindromi linfoproliferative diverse, soprattutto in pazienti cinesi con immunofenotipo atipico.

Punto di riflessione: Il fatto che in Cina la sostituzione di due monoclonali cardine dell'immunofenotipo routinariamente utilizzato in Europa dia un eccellente risultato diagnostico può essere determinato da un'eterogeneità della LLC frutto dell'interazione di un corredo genetico diverso con differenti fattori ambientali?

Buona lettura.

Giuseppe Coppola
giuseppe.coppola@sangiiovannieruggi.it

“Le leucemie acute con cariotipo complesso”

Acute leukemias with complex karyotype show a similarly poor outcome independent of mixed, myeloid or lymphoblastic immunophenotype: A study from the Bone Marrow Pathology Group

Timothy Kirtek et al.

Leuk Res. 2023 Jul;130:107309. doi: 10.1016/j.leukres.2023.107309.

La leucemia acuta a fenotipo misto (MPAL) è un gruppo eterogeneo di leucemie acute caratterizzate da blasti leucemici che esprimono marcatori di più linee. Sono stati raccolti in questo studio casi negli adulti di MPAL, LMA e LLA B e T de novo con cariotipo complesso e messi a confronto. Il cariotipo complesso è stato definito come avente 3 o più anomalie non correlate. Per l'immunofenotipizzazione sono stati utilizzati pannelli anticorpali adeguati per valutare le diverse linee di blasti leucemici secondo le linee guida MPAL riviste nella quarta edizione della WHO. L'obiettivo di questo lavoro è rispondere alla controversia su come classificare al meglio i casi di leucemia acuta con cariotipo complesso a discendenza blastica ambigua.

“La malattia residua misurabile mediante citometria a flusso nella leucemia mieloide acuta”

Measurable residual disease by flow cytometry in acute myeloid leukemia is prognostic, independent of genomic profiling

Chezi Ganzel et al.

Leuk Res 2022 Dec;123:106971 doi: 10.1016/j.leukres.2022.106971.

La valutazione della malattia residua misurabile (MRD) fornisce un potente indicatore dell'efficacia della terapia anti-leucemica. Non è noto, tuttavia, se l'integrazione della MRD con il profilo molecolare identifichi meglio i pazienti a rischio di recidiva. Per studiare la rilevanza clinica della MRD in relazione a uno schema prognostico su base molecolare, è stata valutata la MRD mediante Citometria a flusso in 189 pazienti con leucemia mieloide acuta in remissione morfologica completa (CR). Questo lavoro suggerisce che l'integrazione della MRD con il profilo genetico e l'espressione di CD25 pre-trattamento può migliorare la prognosi nella leucemia mieloide acuta.

“Citometria a flusso multiparametrica nella valutazione della mielodisplasia: problemi analitici”

Multiparameter flow cytometry in the evaluation of myelodysplasia: Analytical issues: Recommendations from the European LeukemiaNet/International Myelodysplastic Syndrome Flow Cytometry Working Group

Anna Porwit et al.

Cytometry B Clin Cytom. 2023 Jan;104(1):27-50. doi: 10.1002/cyto.b.22108.

La Citometria a flusso multiparametrica (MFC) è uno dei metodi ausiliari essenziali nello studio del midollo osseo (BM) di pazienti con citopenia e sospetta sindrome mielodisplastica (MDS). La MFC può essere applicata anche nel follow-up dei pazienti con MDS sottoposti a trattamento. Questo documento riassume le raccomandazioni del gruppo di lavoro internazionale/europeo Leukemia Net per la Citometria a flusso nelle sindromi mielodisplastiche sulle questioni analitiche in MFC per l'iter diagnostico delle MDS. Vengono fornite raccomandazioni per l'analisi di diversi sottoinsiemi di cellule del midollo osseo come precursori mieloidi, componenti granulocitici e monocitici in maturazione ed eritropoiesi. Un set principale di 17 marcatori identificati come correlati in modo indipendente a una diagnosi citomorfologica di mielodisplasia è suggerito come obbligatorio per la valutazione MFC del BM in un paziente con citopenia.

“CD123”

CD123 Is Consistently Expressed on *NPM1*-Mutated AML Cells

Vincenzo Maria Perriello et al.

Cancers (Basel). 2021 Jan 28;13(3):496. doi: 10.3390/cancers13030496.

La leucemia mieloide acuta con mutazione *NPM1* comprende circa il 30% delle LMA di nuova diagnosi negli adulti. Nonostante i notevoli progressi nel trattamento di questo frequente sottotipo di leucemia mieloide acuta, circa il 50% dei pazienti con leucemia mieloide acuta con *mutazione NPM1* trattati con il trattamento convenzionale va in progressione di malattia. Il CD123 è stato identificato come potenziale bersaglio per l'immunoterapia nella leucemia mieloide acuta e sono stati sviluppati diversi approcci terapeutici anti-CD123 per la leucemia mieloide acuta resistente alle terapie convenzionali. I risultati di questo studio identificano la LMA con mutazione *NPM1* e in particolare la LMA con doppia mutazione *NPM1/FLT3* come sottogruppi di malattie che possono trarre beneficio dalle terapie mirate anti-CD123.

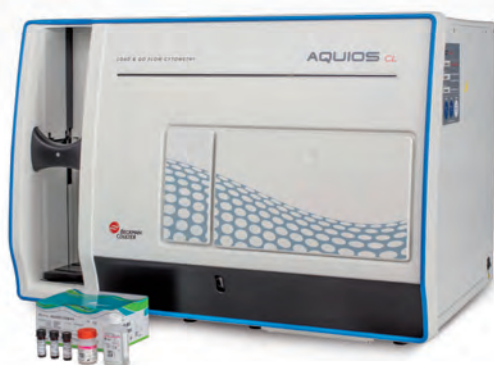
Rachele Amodeo
rachele.amodeo@ospedalesantandrea.it



POTETE CONTRIBUIRE
A SALVARE VITE UMANE



VI AIUTEREMO A TROVARE CELLULE STAMINALI VIVE.



Il nostro nuovo sistema **AQUIOS STEM** è un'evoluzione del **Gold Standard**. Le cellule staminali possono salvare la vita. Ma solo se un numero sufficiente di cellule vitali vengono trapiantate. Ora, il nostro nuovo Sistema **AQUIOS STEM** rende più facile l'identificazione di queste cellule vitali - ogni giorno, tutti i giorni. Utilizzato con il citometro a flusso **AQUIOS CL**, completamente automatizzato "load and go", il nostro sistema mantiene l'accuratezza, riduce i ritardi e semplifica la conformità e la tracciabilità dei dati: supportandovi come voi supportate i medici.

<https://www.beckman.it/reagents/coulter-flow-cytometry/antibodies-and-kits/aquios/stem>



© 2022 Beckman Coulter, Inc. Tutti i diritti riservati. Beckman Coulter, il logo stilizzato e i nomi di prodotti e servizi Beckman Coulter citati nel presente documento sono marchi o marchi registrati di Beckman Coulter, Inc. negli Stati Uniti e in altri Paesi.

Per conoscere le sedi e i numeri di telefono degli uffici Beckman Coulter in tutto il mondo, visitate il sito Contact Us su [beckman.com](https://www.beckman.com).

Materiale dedicato al personale sanitario