



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca e dell’Innovazione in Sanità

Fondi 5 per mille ANNO 2021
Rendiconto finale di spesa

Ente della Ricerca Sanitaria

Denominazione Ente: Fondazione del Piemonte per l’Oncologia – FPO, IRCCS

Codice fiscale: 95596990010

Sede legale: Candiolo (TO) Str. Prov. 142 Km 3,95

Indirizzo di posta elettronica dell’ente:

segreteria.direzionescientifica.fpo@pec.ircc.it – direzionescientifica@ircc.it

Dati del rappresentante legale: Dott. Salvatore Nieddu nato il 24/01/1969 a Torino, CF NDDSVT69A24L219V

Titolo del progetto:

DECODIFICA SPAZIALE DELLA BIOLOGIA E DELLA PATOLOGIA PREDITTIVA NEGLI ADENOCARCINOMI POLMONARI MISTI E L’IMPATTO DEL MICROAMBIENTE VASCOLARE SULLA LORO EVOLUZIONE

Data di inizio progetto: 15/07/2023	Data di fine progetto: 14/07/2024
Fondi 5 per mille assegnati al progetto: € 54.339,05	Costo complessivo del progetto (se co-finanziato): € 60.000,00

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)		
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)		
Materiale d’uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)	60.000,00	54.339,05
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)		

Elaborazione dati		
Spese amministrative		
Altro (indicare quali)		
TOTALE	60.000,00	54.339,05

Data 31/03/2025

Il Responsabile del Progetto
Prof.ssa Anna Sapino

Il Rappresentante Legale
Dr. Salvatore Nieddu

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Rappresentante Legale
Dr. Salvatore Nieddu

Documento sottoscritto con firma digitale ai sensi dell'art. 21 del d.lgs. n. 82 del 7 marzo 2005.



Ministero della Salute – Direzione Generale della Ricerca Scientifica e Tecnologica

Rendiconto di assegnazione risorse 5 per mille ANNO 2021 Contributo percepito € 54.339,05
Enti della Ricerca Sanitaria

ENTE*: Fondazione del Piemonte per l'Oncologia IRCCS

Num. Prog.	Titolo del progetto	Fondi 5 per mille assegnati al progetto	Costo complessivo del progetto	Data indicativa di inizio progetto	Durata prevista
1	DECODIFICA SPAZIALE DELLA BIOLOGIA E DELLA PATOLOGIA PREDITTIVA NEGLI ADENOCARCINOMI POLMONARI MISTI E L'IMPATTO DEL MICROAMBIENTE VASCOLARE SULLA LORO EVOLUZIONE	€ 54.339,05	€ 60.000,00	15/07/2023	12 mesi (14/07/2024)
2					
3					
4					
5					
6					
.....					

Data 31/03/2025

Il Rappresentante Legale
Dr. Salvatore Nieddu

Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del d.lgs. 196/2003

Il Rappresentante Legale
Dr. Salvatore Nieddu

*Istituzione beneficiaria del contributo del 5 per mille.

Fondi 5 per mille ANNO 2021

Relazione descrittiva

Titolo del progetto: Decodifica spaziale della biologia e della patologia predittiva degli adenocarcinomi polmonari e l'impatto del microambiente vascolare sulla loro evoluzione.

Il tumore polmonare invasivo non mucinoso mostra una crescita solitamente a *pattern* misti. La sua semplificazione diagnostica, basata sull'indicazione del pattern prevalente e di tutti quelli con prevalenza superiore al 5%, non coglie in maniera esaustiva il significato prognostico della commistione delle componenti. In tale contesto, un primo studio pilota mirava ad incrociare l'informazione istologica eterogenea con la genetica mutazionale somatica del carcinoma polmonare, in modo da identificare determinanti comuni utili per indirizzare le decisioni cliniche.

Su una prima coorte di 47 casi sequenziati tramite un approccio di analisi a 500 geni, avevamo notato un maggior accumulo di mutazioni in geni driver (*KRAS/EGFR*) in lesioni con crescita non solida, rispetto a tumori con prevalente pattern solido. Inoltre, abbiamo notato che lesioni senza pattern di crescita solida e a prevalente architettura acinare mostravano una spiccata invasione vascolare, oltre ad una significativamente aumentata espressione del biomarcatore PD-L1, sintomo di un microambiente maggiormente immuno-stimolato.

Sulla base dei risultati del pilota, abbiamo strutturato una seconda fase analitica, che consta di 3 punti principali

1. Aumento dell'analisi su una coorte più ampia, che possa rafforzare i risultati di prevalenza morfologica e mutazionale a carico del DNA. Inoltre, su casi selezionati, effettuale analisi mutazionale per i diversi pattern di crescita tramite mesodissezione.
2. Dati i risultati preliminari legati ad un microambiente peritumorale diversificato nei diversi pattern prevalenti, abbiamo pianificato l'implementazione della analisi di espressione spaziale tramite approccio Visium 10X, su una coorte di casi significativi, rivisti dal punto di vista morfologico per la distribuzione dei pattern di crescita.
3. Sulla base della differenziale invasione vascolare nei pattern di crescita architetturale, effettuare un "proof of concept" di generazione di "vesseloidi", modelli in vitro di coltura di cellule endoteliali da tumore polmonare, potenzialmente utilizzabili in ambito pre-clinico. Il progetto verrà gestito in collaborazione con la dott.ssa Villari.

E' stata espansa la coorte in analisi ad una totalità di 157 pazienti affetti da adenocarcinoma polmonare. Tutti i pazienti sono stati rivalutati per il pattern di crescita, mentre per 129/157 è stato possibile ottenere il dato molecolare, con l'esclusione di 47 lesioni per assenza di consenso informato *ad hoc*. Tale analisi ha innanzitutto mostrato che il 91% dei casi mostravano un pattern misto (143/157), con solo il 9% (14/157) con architettura "pura". Dal punto di vista mutazionale, l'analisi su una numerosità campionaria maggiore ha permesso di valutare la prevalenza mutazioni in geni driver (*EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, *ERBB2*, *PIK3CA* e le fusioni di *ALK* e *ROS1*) separatamente nei diversi pattern prevalenti. Considerando i driver in maniera cumulativa, i pattern sono significativamente diversi per lo status mutazionale. I carcinomi acinari presentano un numero significativamente maggiore di mutazioni e mostrano anche la maggior prevalenza di mutazioni di *EGFR*, mentre il gene *KRAS* risulta essere mutato in maniera più omogenea.

Sono state sequenziate, con un approccio di *targeted sequencing* allargato, 4 diverse lesioni, con due componenti distinte di crescita, le quali regioni sono state utilizzate anche per l'implementazione della analisi spaziale dell'RNA. In due casi, le diverse aree architetture (acinare-solida e solida-lepidica) mostravano le stesse varianti driver (*KRAS* p.G12V e delezione dell'esone 19 di *EGFR*), mentre risultavano dissimili per le restanti varianti, suggerendo una simile origine ma una differenziazione molecolare successiva. In tale contesto, stiamo terminando la validazione del saggio spaziale ad RNA per selezionare ulteriori 4 casi e concludere la stesura dei risultati.

E' stato implementato il kit manuale Visum 10X FFPE spatial transcriptomic su 4 diverse aree di crescita da 2 lesioni. Il test pilota ha dimostrato un buon grado di fattibilità. L'ottimizzazione del protocollo ha mostrato come 120 milioni di *reads* per campione permetteva di rilevare l'espressione di circa 15000 geni, come atteso in pubblicazioni recenti riguardanti la tecnologia (<https://doi.org/10.1101/2023.02.15.528722>) E' stata implementata la pipeline di analisi per la generazione spaziale non supervisionata dei cluster di espressione spaziale.

Al fine di strutturare il progetto pilota del modello preclinico, è stato ottimizzato il protocollo di selezione e crescita delle cellule endoteliali, al fine di creare modelli 3D di organoidi endoteliali da paziente tumorale. Il protocollo, dopo ottimizzazione, ha permesso di generare modelli cellulari vitali.

Per verificare se il modello sperimentale rappresentasse un buon avatar preclinico per cellule endoteliali, sono stati strutturati esperimenti di valutazione dell'espressione genica dell'RNA estratto da tali modelli. I dati derivanti dall'RNA dimostrano come una doppia cattura con CD31 e CD144, aumenti la selezione per cellule con maggior espressione dei pathway endoteliali (es. pathway VEGF) significativamente più espressi nelle cellule ottenute dalla doppia selezione (Double, D vs single S, Figura 3A), in particolare adottando un passaggio di eliminazione dei fibroblasti. La coltura longitudinale per 4 settimane non inficia la stabilità del modello, ed il processo mantiene la diversità intrinseca inter-paziente attesa.

CONCLUSIONI

1. L'analisi di sequenziamento bulk su una coorte allargata (130 pazienti) conferma e raffina le differenze nella prevalenza di mutazioni a carico dei geni driver per i diversi pattern architetture. Le analisi sui casi mesodisettati mostrano però come, all'interno dello stesso paziente, le mutazioni driver siano conservate, e la differenziazione genetica tra le componenti coinvolge geni diversi.
2. L'analisi spaziale a RNA è fattibile e produttiva, e la prossima installazione di un processo automatizzato permetterà la standardizzazione del protocollo.
3. Il pilota di generazione di modelli "vesseloidi" da cellule endoteliali di pazienti affetti da tumore polmonare ha dato buoni risultati, con la validazione del modello basata sulla valutazione dell'espressione dell'RNA che conferma la sua stabilità e specificità.

Il Responsabile del Progetto
Prof.ssa Anna Sapino

