



Bando 2023 - Programma 5 per mille anno 2022 Bando di ricerca scientifico-sanitaria LILT 2023

Tematiche e Endpoints primari:

Sostenere le fondamentali attività di prevenzione oncologica della Lega italiana per la lotta contro i tumori (LILT) nonché' delle connesse attività di natura socio-sanitaria e riabilitativa attraverso:

- a) Prevenzione oncologica primaria: identificazione/valutazione/rimozione di fattori di rischio ambientali, professionali, psicofisici, genetici, biomolecolari ed immunologici, con particolare riferimento a stili di vita, alimentazione, alcool, tabagismo, attività fisica.
- b) Prevenzione oncologica secondaria: approcci innovativi clinico-diagnostici per la diagnosi precoce dei tumori (con particolare riferimento a carcinoma mammario, polmonare, prostatico, vescicale, coloretale, melanoma).**
- c) Prevenzione oncologica terziaria: riabilitazione fisica, sociale, psicologica, occupazionale ed estetico-rigenerativa del/la paziente oncologico/a, con particolare attenzione al coinvolgimento attivo e diretto della famiglia/caregivers.

Associazioni provinciali LILT operative, afferenti alla Rete:

(Indicare le associazioni ed i responsabili referenti, dati anagrafici, recapiti)

LILT Sassari

Bisail Marco Antonio Felice Maria
Nato a Sassari il 08/08/1959
BSLMCN59M08I452I
Via Giovanni Amendola 40, 07100 Sassari
Tel. 079/214688
Mail: segreteriailitss@tiscali.it

LILT Cagliari

Carlo Cabula
Nato a Cagliari il 24-08-1956
CBLCRL56M24B354X
Via Nicolò Machiavelli, 47, 09129 Cagliari
Tel. 070 495558
Mail: legatumori.cagliari@tiscali.it; carlocabula@me.com

LILT Nuoro

Pietrina Deiana

Nata a Orune (NU) il 28-04-1961

DNEPRN61D68G147K

Via Cagliari, 58, 08032 Desulo NU

Tel. 0784 619249

Mail: liltnuoro@tiscali.it; pietrina.deiana@gmail.com

LILT Oristano

Licheri Mercedes Eralda

Nata a Oristano il 16-02-1957

LCHMCD57B56G113T

Via Sardegna 67B, 09170 Oristano

Tel. 0783 74368

Mail: oristano@lilt.it

Strutture/ambulatori/laboratori del SSN afferenti al PRR eventualmente coinvolte specificare le strutture del SSN coinvolte, le modalità di coinvolgimento, allegare dichiarazione autorizzativa alla partecipazione al PRR redatta e firmata dalla Direzione Sanitaria dell'Ente pubblico coinvolto (*indicare i responsabili coordinatori delle attività cliniche, titolo, dati anagrafici completi, recapito*)

Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Farmacia-Università degli Studi di Sassari

Azienda Ospedaliera-Universitaria (AOU) di Sassari

Azienda Socio-Sanitaria Locale (ASL) di Nuoro

Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR)-Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB) di Cagliari

L'attuazione di questo progetto scientifico richiede una notevole integrazione di competenze di alto livello tra varie figure professionali (chirurghi, oncologi-molecolari, genetisti, biologi, tecnologi e bioinformatici). Nel team, ci sono persone che collaborano da anni con risultati eccellenti e che hanno una profonda conoscenza sia delle metodologie sia della patologia in oggetto. Questa proposta progettuale ha l'opportunità di usufruire d'infrastrutture e strumentazioni tecniche all'avanguardia, computer e reti con elevate prestazioni, ecc., e un alto livello di organizzazione tecnico-scientifica.

I Ricercatori afferenti all'AOU-Sassari saranno coinvolti nella presentazione di un emendamento al consenso informato già ottenuto dal Comitato Etico Indipendente dell'AOU-di Cagliari, si allega il verbale. Gli stessi saranno coinvolti nella selezione dei pazienti affetti da carcinoma prostatico e nella raccolta dei campioni biologici necessari per le esecuzioni delle indagini genetico-molecolari.

I Ricercatori del DMCF-Università di Sassari saranno coinvolti nell'allestimento di un database che include dati demografici, anamnesi personale e familiare e i dati clinico-patologici (dati istopatologici, tipo di trattamento eseguito, follow-up, trattamento, etc.) dei pazienti inclusi nello studio. Gli stessi saranno coinvolti nell'esecuzione degli esperimenti genetico-molecolari su campioni biologici raccolti.

I Ricercatori del CNR si occuperanno dell'esecuzione degli esperimenti genetico-molecolari su

campioni biologici raccolti e dell'analisi di bioinformatica.

I Ricercatori della ASL di Nuoro saranno coinvolti nell'esecuzione degli esperimenti genetico-molecolari su campioni biologici analizzati.

Chi presenta il PRR

Dott. Bisail Marco Antonio Felice Maria

**Esperto Coordinatore e responsabile di tutte le attività del PRR:
(Principal investigator responsabile del PRR)**

(Allegare curriculum vitae, dati anagrafici completi, recapito, titoli, qualifica e pregressa esperienza nell'area tematica oggetto di studio, pubblicazioni, affiliazione all'Associazione Provinciale LIT di)

Dr. Andrea Angius

Si allega Curriculum vitae con quanto richiesto
Affiliazione all'Associazione Provinciale LILT di Sassari

Dott. Bisail Marco Antonio Felice Maria



Sassari, 02-12-2023

Dott. Andrea Angius



Data di inizio progetto: 02/05/2024	Data di fine progetto: 30/04/2026
Fondi 5 per mille richiesti per il progetto: € 80.000	Costo complessivo del progetto (se co-finanziato): €

Elenco nominativi, contatto telefonico ed e-mail di tutti i responsabili scientifici delle Associazioni provinciali coinvolte nel progetto di rete e dei rappresentanti legali degli stessi (è previsto un singolo responsabile scientifico di progetto per ogni Associazione LILT. Il Responsabile scientifico di ogni Associazione Provinciale dovrà interfacciarsi con l'esperto coordinatore del PRR per la trasmissione e analisi dei dati. L'esperto coordinatore del PRR assume la piena responsabilità del PRR e riferisce direttamente al CSN della LILT

- 1) Referente Scientifico: Dott. Andrea Angius
Associazione Provinciale LILT Sassari
Via Giovanni Amendola 40, 07100 Sassari
Tel. 079/214688
Mail: segreteriailitss@tiscali.it
legale rappresentante: Prof.ssa Marcella Devoto

- 2) Referente Scientifico: Dott.ssa Federica Erca
Associazione Provinciale LILT Oristano
Via Sardegna 67B, 09170 Oristano
Tel. 393/5171494
Mail: federica.erca@gmail.com
legale rappresentante: Mercedes Eralda Licheri
- 3) Referente Scientifico: Dott. Carlo Cabula
Associazione Provinciale LILT Cagliari
Via Nicolò Machiavelli, 47, 09129 Cagliari
Tel. 070 495558
Mail: legatumori.cagliari@tiscali.it
Legale rappresentante: Dott. Carlo Cabula
- 4) Referente Scientifico: Dott.ssa Giovanna Piras
Associazione Provinciale LILT Nuoro
Via Cagliari, 58, 08032 Desulo NU
Tel. 0784 619249
Mail: liltnuoro@tiscali.it
legale rappresentante: Dott.ssa Grazia Cattina

elencare tutte le Associazioni LILT coinvolte nel PRR

LILT Sassari

Bisail Marco Antonio Felice Maria
Nato a Sassari il 08/08/1959
BSLMCN59M08I452I
Via Giovanni Amendola 40, 07100 Sassari
Tel. 079/214688
Mail: segreteriailtss@tiscali.it

LILT Cagliari

Carlo Cabula
Nato a Cagliari il 24-08-1956
CBLCRL56M24B354X
Via Nicolò Machiavelli, 47, 09129 Cagliari
Tel. 070 495558
Mail: legatumori.cagliari@tiscali.it; carlocabula@me.com

LILT Nuoro

Pietrina Deiana
Nata a Orune (NU) il 28-04-1961
DNEPRN61D68G147K
Via Cagliari, 58, 08032 Desulo NU
Tel. 0784 619249
Mail: liltnuoro@tiscali.it; pietrina.deiana@gmail.com

LILT Oristano

Licheri Mercedes Eralda
Nata a Oristano il 16-02-1957
LCHMCD57B56G113T

Via Sardegna 67B, 09170 Oristano
Tel. 0783 74368
Mail: oristano@lilt.it

Sassari, 02-12-2023

Il Responsabile Coordinatore del progetto

Dott. Andrea Angius



Si autorizza al trattamento dei dati ai sensi del Regolamento (UE) 2016/679
Il Legale Rappresentante
Presidente della Associazione Provinciale

Dott. Bisail Marco Antonio Felice Maria



**Piano di lavoro progettuale
Bando di ricerca scientifico-sanitaria 2023**

DOCUMENTO SINTETICO

Al CSN Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori
Via Alessandro Torlonia, 15
00161 – Roma

Piano di lavoro progettuale per PRR (progetto ricerca di rete)

Il sottoscritto Andrea Angius, (Tel.3384177680, Mail: andrea.angius@irgb.cnr.it) in qualità di Coordinatore Responsabile del Progetto di Rete, afferente alla Associazione Provinciale LILT Sassari che funge da Centro Coordinatore del PRR (sede legale Via Amendola n.40/l, C.F. 01107520908), intende richiedere alla Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori – Sede Centrale – un finanziamento nell’ambito del “programma 5 per mille anno 2017” tramite il predisposto “piano di lavoro progettuale”.

Titolo del Progetto

Studio dell'eterogeneità del carcinoma prostatico come chiave per la dissezione dei sottotipi cellulari che lo caratterizzano

Area tematica di ricerca (come individuate nel bando)

Prevenzione oncologica secondaria: approcci innovativi clinico-diagnostici per la diagnosi precoce dei tumori (con particolare riferimento a carcinoma mammario, polmonare, prostatico, vescicale, coloretale, melanoma).

Durata:

Annuale

Biennale

Costo finanziato con fondi oggetto del bando di ricerca 2023 LILT:

€ 80.000

Costo complessivo del progetto (se co-finanziato):

€

- Responsabile Coordinatore del Progetto:

Dott. Andrea Angius

Primo Ricercatore

Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR)-Istituto di Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB)

SS 554 Km 4,500, 09042 Monserrato CA

Tel.3384177680

Mail: andrea.angius@irgb.cnr.it

- Legale Rappresentante dell'Associazione Provinciale LILT di afferenza (Centro Coordinatore) con indicazione espressa dell'indirizzo di posta elettronica ed altri recapiti:

Bisail Marco Antonio Felice Maria

Via Giovanni Amendola 40, 07100 Sassari

Tel. 079/214688

Mail: segreterialiltss@tiscali.it

Sinossi del Progetto / Premesse e razionale (massimo 2 pagine)

Il carcinoma della prostata è il tumore maligno più frequente tra gli uomini (19%) [1], spesso clinicamente silente e di difficile valutazione prognostica. Nonostante le attività di diagnostica e screening non sempre è possibile differenziare esaurientemente patologie prostatiche con possibili prognosi opposte. Sebbene diversi studi abbiano evidenziato il ruolo diagnostico e prognostico dei biomarcatori circolanti [2], come l'antigene prostatico specifico (PSA), la loro misurazione non consente necessariamente di individuare la malattia, lo stadio e la gravità clinica. Richard Ablin, colui che nel 1970 scoprì il PSA, ha definito il PSA un indicatore di attività dell'organo, e non un vero e proprio marcatore tumorale [3]. Una persona che presenta valori di PSA bassi può avere un tumore aggressivo, così come un valore elevato non per forza indica una malattia dall'esito infausto [4-5]. Migliaia di uomini sono stati sottoposti a interventi di asportazione della prostata pur in presenza di tumori indolenti che mai sarebbero progrediti ne avrebbero raggiunto altre sedi.

Esistono vari studi recenti a livello cellulare e genomico su questo tumore. Lo studio delle cellule basali e del lume contenute nella prostata ha evidenziato che queste cellule formano all'interno della ghiandola prostatica un epitelio pseudo-stratificato i cui trascrittomi possono fornire informazioni importanti per perfezionare la comprensione ed il trattamento di questa patologia [6]. I ricercatori sono stati in grado di svelare le differenze molecolari e funzionali intrinseche nelle due tipologie cellulari prospettando la possibilità di ottenere potenziali ed ulteriori rivelazioni sulla eziologia del carcinoma oltre che sullo sviluppo di nuove terapie. Molto rimane da chiarire però sia in termini di eterogeneità cellulare sia di genomica.

In questo contesto, si inserisce lo scopo del presente studio che si propone di studiare l'eterogeneità genetica e la presenza di sottotipi cellulari nel carcinoma della prostata: nello specifico attraverso l'identificazione di biomarcatori e sottotipi cellulari sia nel sito primario che a livello circolante. La complessità molecolare e clinica di questa neoplasia rende cruciale una valutazione dettagliata per guidare approcci terapeutici più efficaci e personalizzati.

Uno degli obiettivi primari del progetto è l'identificazione di sottotipi cellulari nei tessuti tumorali utilizzando tecniche di analisi a singola cellula e immunoistochimica.

Recentemente, l'applicazione di queste tecnologie all'avanguardia ha permesso ai ricercatori di identificare cellule comuni resistenti ai farmaci e, più specificamente, ha fornito prove sulla diversa risposta ai farmaci tra cellule strettamente correlate. Possiamo elencare almeno quattro applicazioni principali in cui la singola cellula offre un vantaggio rispetto ai metodi di analisi delle popolazioni cellulari nel loro insieme: misurare la

diversità (ad esempio, l'eterogeneità del tumore); identificare sottopopolazioni rare (ad esempio, le cellule staminali del cancro o le cellule tumorali circolanti); tracciare linee cellulari durante lo sviluppo normale o la loro evoluzione anomala; scoprire nuovi tipi di cellule (analisi dell'RNA e dell'epigenomica).

L'obiettivo principale del progetto è caratterizzare sottotipi cellulari specifici nei campioni di tessuto prostatico in situ in tre gruppi di pazienti: i) iperplasia prostatica benigna (BPH), ii) lesione precancerosa (PL) e iii) carcinoma della prostata (PC). È nostra convinzione che queste analisi ci possano fornire la possibilità di identificare marcatori molecolari in grado di discernere i gruppi possibilmente al momento delle prime indagini cliniche.

Un altro obiettivo primario è la caratterizzazione genomica del carcinoma prostatico mediante l'analisi di variazioni genetiche nel sito primario attraverso metodologie d'avanguardia in grado di identificare mutazioni, amplificazioni geniche e alterazioni genomiche che contribuiscono all'eterogeneità della malattia. L'analisi e la correlazione con le cellule tumorali circolanti aiuteranno a comprendere la dinamica dell'evoluzione delle variazioni genetiche nel corso della malattia. L'analisi dei preparati tumorali dovrebbe essere combinata con il profilo cellulare della biopsia liquida e quindi utilizzata per stimare il livello di concordanza all'interno di un paziente per accertare l'applicabilità delle biopsie liquide per la caratterizzazione del tumore per ogni singolo caso.

Le prime indagini sul sito primario saranno fondamentali per identificare target specifici per permettere, tramite metodologie di arricchimento, di rilevare gli stessi target a livello circolatori in maniera affidabile e riproducibile.

Inoltre, grazie alla biobanca di campioni di tessuti prostatici (circa 300) precedentemente raccolti dal gruppo di ricerca, sarà possibile validare i biomarcatori individuati nel sito primario, con specifici metodi statistici, su un campione di ampiezza ottimale in modo da garantire una adeguata precisione delle stime per le principali variabili d'indagine a livello di intera popolazione.

Identificare potenziali biomarcatori predittivi e prognostici sia nel sito primario che possibilmente a livello circolatorio diventa essenziale per integrare competenze e prospettive nella gestione del carcinoma prostatico, garantendo un approccio completo.

Un altro aspetto altrettanto importante del nostro progetto è il ruolo delle diverse figure professionali da coinvolgere in modo sinergico. Anatomopatologi, urologi, oncologi, genetisti, bioinformatici, biochimici clinici e oncologi-molecolari saranno essenziali per integrare competenze e prospettive nella gestione del carcinoma prostatico, garantendo un approccio e una competenza scientifica completa e di livello nazionale/internazionale. La traduzione clinica, anche se in via sperimentale, sarà un momento essenziale per applicare le conoscenze acquisite per migliorare la diagnosi, la prognosi e le opzioni terapeutiche.

L'obiettivo è sviluppare strategie terapeutiche personalizzate basate sul profilo genetico e sui sottotipi cellulari identificati. L'eterogeneità intra-tumorale è comunque la sfida principale nel trattamento del PC: la definizione delle aberrazioni genomiche/trascrittomiche a livello cellulare e intra-individuale migliorerà la previsione della risposta ai farmaci nei pazienti, portando anche all'ottimizzazione dei protocolli terapeutici e alla riduzione della progressione tumorale. Sulla base di quanto detto, questo progetto propone una serie di vantaggi che derivano dalla possibilità di avere accesso a un set di dati, già esistente, con caratteristiche sia fenotipiche/cliniche sia genomiche e dalla capacità di integrare i dati RNAseq di singole cellule e dati genomici/immunoistochimici provenienti dallo stesso campione di tessuto.

Possiamo infine riassumere il rationale del nostro progetto in alcune macro voci, sia dal punto di vista prettamente scientifico e molecolare:

1. eterogeneità genetica e risposta al trattamento;
2. correlazione tra sottotipi cellulari e progressione tumorale;
3. cellule tumorali circolanti come indicatori dinamici.

Sia dal punto di vista del coinvolgimento delle figure professionali afferenti al SSN con la Collaborazione Multidisciplinare e Personalizzazione della Terapia.

Piano di lavoro progettuale - articolazione del progetto:

Ruolo svolto dall'IRGB, l'AOU-Sassari, il DMCF-Università di Sassari e la ASL di Nuoro afferenti al progetto:

Il progetto sarà organizzato in 8 attività principali (vedi Gannt)

WP # 1 Database comprendente i dati clinici, genomici e trascrittomici dei pazienti già arruolati e di quelli raccolti nella durata del progetto (1-24 mesi)

Il gruppo di ricerca possiede già un database che include l'anamnesi personale e familiare, i dati clinico-patologici, il tipo di trattamento eseguito, follow-up, etc. dei pazienti affetti da PC arruolati presso le strutture dell'AOU-Sassari e del DMCF-Università di Sassari. Ad oggi sono stati diagnosticati e trattati circa 300 campioni di tessuto prostatico che includono tutte le categorie di cui è presente il seguente materiale biologico: plasma, siero, urina, saliva e tessuto prostatico (tessuto fresco ottenuto tramite agoaspirato). L'accessibilità ai dati sarà limitata ai soli ricercatori di questo studio per analisi specifiche e integrazioni di risultati clinici e genomici. Parallelamente si procederà alla raccolta dei tessuti prostatici freschi, del sangue intero, urina e saliva per ciascun paziente diagnosticato durante il periodo del progetto. I campioni della biobanca saranno immediatamente conservati in RNeasyTM a -80°C o in RNeasyTM-ICE se precedentemente congelati per l'estrazione di RNA di alta qualità. I campioni di sangue intero prelevati dai pazienti potranno essere utilizzati per identificare biomarcatori diagnostici, prognostici e predittivi specifici e non invasivi.

WP # 2 Estrazione DNA e RNA campioni esistenti e Protocollo RNAseq da tessuti freschi (1-18 mesi)

A partire dai campioni biologici in nostro possesso si procederà alla estrazione del DNA e del RNA mediante kit specifici (kit QIAamp DNA Blood e RNeasy) e ai controlli di qualità mediante spettrofotometro e corsa elettroforetica. Essere in possesso di un numero consistente di campioni ci consentirà di effettuare una selezione mirata sulla base dei sottotipi (BPH, PL, PC) e di raggiungere facilmente i numeri adeguati alle esigenze di validazione statistica. In particolare, l'RNA sarà quantificato utilizzando Qubit[®] RNA BR Assay e Agilent RNA 6000 Nano Kits. Il RNA Integrity Number (RIN) verrà determinato e i valori inferiori a 7 dovranno essere scartati.

WP #3 Analisi di una coorte clinica rappresentativa delle 3 classi selezionate utilizzando un approccio a cellule singole (6-12 mesi)

Ci concentreremo sull'implementazione e la validazione di un protocollo di scRNAseq da tessuti biologici freschi e crioconservati di tessuto prostatico, che potrebbe consentirci di utilizzare per questo metodo materiale precedentemente raccolto dalla biobanca esistente. Verranno testate diverse concentrazioni iniziali di cellule per verificare il numero di cellule vive dopo lo scongelamento e per verificare l'impatto della crioconservazione e del trasporto sia sulle strutture cellulari che sull'integrità delle molecole di RNA. La riproducibilità dei risultati di scRNAseq da campioni congelati ci permetterà di evitare gli effetti dei lotti e di semplificare le procedure di reclutamento e di selezione.

Questo progetto studia una piccola coorte di ~12-15 individui da integrare con risultati ottenuti da dati di total-RNA. Sulla base della letteratura recente [7,8], questi numeri sono

adeguati e permettono di identificare e caratterizzare con successo le sottopopolazioni cellulari.

Gli esperimenti saranno condotti in due fasi: "cattura di singole cellule" e generazione di dati NGS.

La preparazione della cattura di singole cellule inizierà con la diluizione della sospensione cellulare a una concentrazione adeguata in PBS e albumina di siero bovino (BSA). Verranno determinate la conta e la vitalità delle cellule. Le sospensioni cellulari saranno caricate sullo strumento Chromium Single-Cell (10x Genomics) per generare Gel Bead-in-Emulsions (GEM). Per la generazione di dati NGS, verranno preparate librerie RNA-seq monocellulari utilizzando Chromium Single-Cell 3' Library & Gel Bead Kit. La trascrizione inversa di GEM (GEM-RT) produrrà un cDNA a lunghezza intera con codice a barre da mRNA poli-adenilato. Dopo l'incubazione, il pool di miscele di reazione post-GEM-RT sarà recuperato e il cDNA purificato utilizzando microsfere magnetiche di silano. L'intero prodotto purificato dopo GEM-RT sarà amplificato mediante PCR per generare una libreria di cDNA 3'. La quantificazione delle librerie costruite sarà valutata utilizzando Qubit dsDNA HS Assay Kit, Bioanalyzer High Sensitivity Kit, seguendo le istruzioni del produttore. Le librerie possono essere sequenziate su vari strumenti Illumina (Novaseq6000, NovaseqX, etc) utilizzando un protocollo di sequenziamento paired-end 2x100 bp con almeno 30M letture ciascuna. Utilizzeremo la suite di software Cell Ranger per eseguire il "demultiplexing" dei campioni, l'identificazione del codice molecolare e la conta dei geni di una singola cellula (<http://software.10xgenomics.com>). Le procedure di "demultiplexing" delle letture si basano sull'indice Illumina i7 per la generazione di FASTQ paired-end (Read1 e Read2) e sui codici molecolari GemCode (10X e UMI). Read1, che contiene l'inserito di cDNA, sarà allineato al genoma di riferimento utilizzando il software STAR35. Il numero di letture che forniscono informazioni significative è calcolato come il prodotto di quattro parametri: (1) codici molecolari validi; (2) codice UMI valido; (3) associazione a un codice cellulare unico; (4) qualità della mappatura degli esoni. Eseguiremo l'analisi delle componenti principali (PCA) per le metriche di qualità sopra elencate per identificare gli outlier da scartare. I conteggi delle letture saranno generati per ciascun gene e campione. La normalizzazione e l'identificazione dei geni altamente variabili (HVG) associati alla varianza biologica verranno eseguite utilizzando il pacchetto sc di R. Gli HVG saranno utilizzati per identificare nuove sottopopolazioni cellulari applicando il "metodo t-stochastic neighbor embedding (t-SNE)" dai valori di espressione normalizzati degli HVG. Le cellule separate in diversi cluster, in combinazione con le proprietà biologiche degli HVG più specifici, saranno considerate come appartenenti a diverse sottopopolazioni cellulari.

I geni espressi in modo differenziale tra queste sottopopolazioni cellulari saranno identificati dal software SCDE per determinare biomarcatori specifici della sottopopolazione. Questi saranno valutati per significatività, dimensione dell'effetto, livello assoluto di espressione e localizzazione del compartimento subcellulare. I geni espressi in modo differenziale in ogni sottopopolazione saranno analizzati con l'obiettivo di identificare biomarcatori specifici da valutare per significatività funzionale, entità dell'effetto e livello di espressione assoluto. Otterremo file VCF contenenti l'intero elenco di varianti, compreso lo stato mutazionale dei geni tumorali.

Wp #4 RNASeq on Total RNAseq (6-12 mesi)

Creeremo un dataset di confronto su Total RNAseq sia sugli stessi campioni utilizzati per le single cell che su altri campioni per un numero totale di 50 soggetti suddivisi nelle tre categorie per validare tramite varie analisi bioinformatiche la possibilità di identificare geni/marcatori specifici visti nell'analisi delle single cell. Il protocollo utilizzato per la

creazione di librerie di RNA sarà l'Illumina Stranded Total RNA Prep with Ribo-Zero Plus e gli Agilent High Sensitivity DNA Assay e il kit Qubit dsDNA HS Assay saranno utilizzati per valutare le qualità e le quantità. Le librerie saranno sequenziate in modalità paired-end (2×100 bp; con almeno 30M letture ciascuna) su piattaforma Illumina NovaSeq.

Per il Total RNAseq, le letture saranno tagliate per le estremità di bassa qualità con TrimGalore e l'abbondanza dei trascritti sarà analizzata con Kallisto. I dati di espressione normalizzati e i geni differenzialmente espressi (DEG) saranno identificati con DeSeq2. I trascrittomi saranno ulteriormente analizzati mediante filtraggio univariato e analisi multivariata supervisionata per la selezione di sottoinsiemi di caratteristiche dai dati di espressione.

Wp #5 Analisi bioinformatiche integrate di dati scRNAseq e trascrittoma e validazione in biopsia liquida (12-24 mesi)

L'integrazione dei dati di singole cellule con quelli dell'RNA-seq totale aiuterà e confermerà la priorità dei geni candidati causali della malattia. Ci concentreremo sui casi di espressione di trascritti specifici nei tessuti solidi e li integreremo successivamente con saggi specifici (Realtime PCR, Digital PCR, etc) su RNA totale estratti dai campioni di sangue circolante. Questo potrà aiutare a chiarire alcune questioni tra la biopsia invasiva tradizionale e l'uso della biopsia liquida. Per l'analisi della biopsia liquida, sulla base del numero di geni identificati e da validare, prenderemo anche in considerazione pannelli mirati di geni che sono di solito preferiti per la loro elevata sensibilità e il loro basso costo.

Wp #6 Analisi e confronto di banche dati pubblicamente disponibili (18-24 mesi)

Trovare o produrre dati di espressione numericamente sufficienti per il confronto tra tessuti normali e tumorali può essere impegnativo sia dal punto di vista dei tempi che dei costi. Le banche dati sono una buona risorsa per sfruttare i dati di espressione pubblici di pazienti, sia tumorali che controlli, per il confronto e l'integrazione con i nostri risultati. In particolare, i campioni di tessuto normale solido presenti nelle banche dati sono in genere in numero limitato, ma alcuni tipi di cancro possono avere un numero sufficiente per un robusto confronto statistico. Questo può aumentare la significatività dei nostri risultati. Inoltre, la loro somiglianza con i nostri dati può introdurre e confermare i segnali del microambiente tumorale nel suo profilo trascrittomico. Utilizzando database come TCGA o GTEx, sarà possibile confrontare i campioni tumorali dei nostri pazienti con campioni pubblici, utilizzando anche dati di espressione provenienti da tessuti normali di individui non affetti da cancro.

WP # 7 Analisi eQTL su dati biochimica clinica (12-24 mesi)

L'analisi dei loci quantitativi di espressione (eQTL) mira a identificare le varianti genetiche che influenzano l'espressione di uno o più geni: una coppia gene-SNP per la quale l'espressione del gene è associata alla configurazione allelica dell'SNP viene definita eQTL. L'identificazione degli eQTL si è rivelata un potente strumento per lo studio e la comprensione delle malattie nell'uomo e in altre popolazioni. Potremmo utilizzare alcuni valori prognostici e non-, analizzati tramite biochimica clinica, come tratti quantitativi da associare ai nostri dati di espressione. Per l'analisi eQTL utilizzeremo il software GEMMA (genome-wide efficient mixed-model association). Le varianti in associazione saranno dapprima filtrate per contenere solo la variante che presentasse il p Value più significativo (TopVar). L'analisi condizionale sarà effettuata a partire dai geni per cui sarà identificato un eQTL significativo (FDR <5%).

WP # 8 Integrazione e analisi dei dati genomici, clinico-patologici, follow-up e trattamento (12-24 mesi)

Sarà portata a termine la comparazione tra il profilo genomico, i dati single cell e total RNASeq e i dati clinico-patologici dei pazienti CP. I dati di trascrittoma da noi ottenuti e

quelli di altre coorti come TCGA, ecc. saranno utili a proiettare questi dati nelle caratteristiche dei sottotipi CP identificati in questo studio. I sottotipi CP saranno validati per significato prognostico, risposta alle terapie e correlazioni con informazioni clinico-patologiche e genomiche del nostro database e di altre coorti indipendenti.

Bibliografia

1. Rawla, P. Epidemiology of prostate cancer. World J. Oncol. 2019, 10, 63.
2. Boyle, H.; Alibhai, S.; et al. Updated recommendations of the International Society of Geriatric Oncology on prostate cancer management in older patients. Eur. J. Cancer 2019, 116, 116–136.
3. Ablin, R.J.; Bronson, P., Soanes, W.A., Witebsky, E. Tissue- and species-specific antigens of normal human prostatic tissue. J Immunol. 1970 Jun;104(6):1329-39.
4. Catalona, W.J.; Smith, et al. Measurement of Prostate-Specific Antigen in Serum as a Screening Test for Prostate Cancer. N.Engl. J. Med. 1991, 324, 1156–1161.
5. Catalona, W.J.; Partin, A.W.; et al. A multicenter study of [-2] pro-prostate specific antigen combined with prostate specific antigen and free prostate specific antigen for prostate cancer detection in the 2.0 to 10.0 ng/mL prostate specific antigen range. J. Urol. 2011, 185, 1650–1655.
6. Zhang, D., Park, D., et al. Stem cell and neurogenic gene-expression profiles link prostate basal cells to aggressive prostate cancer. Nature Communications. 7:10798. DOI:10.1038/ncomms10798.
7. Song, H., Weinstein, H.N.W., et al. Single-cell analysis of human primary prostate cancer reveals the heterogeneity of tumor-associated epithelial cell states. Nat Commun. 2022 Jan 10;13(1):141. doi: 10.1038/s41467-021-27322-4.
8. Vellky, J.E., Wu, Y., et al. Single-cell RNA sequencing of human prostate basal epithelial cells reveals zone-specific cellular populations and gene expression signatures. J Pathol . 2023 Nov 20. doi: 10.1002/path.6227.

Ruolo svolto dalle Associazioni Provinciali LILT afferenti al progetto:

La Sezione LILT di Sassari, promotrice del progetto, si impegna da sempre nella prevenzione delle neoplasie, considerando la cura della persona in modo olistico, con attenzione alla salute psicologica e fisica, e con un focus sugli approcci innovativi della ricerca. Il progetto attuale si allinea a questo orientamento, integrando competenze di oncologia molecolare con aspetti clinici e psicologici.

1. Analisi degli aspetti epidemiologici della patologia prostatica benigna e maligna:

I ricercatori impegnati nel progetto svilupperanno un questionario dettagliato, appositamente concepito, con l'obiettivo di condurre un'analisi scrupolosa dei casi sospetti di tumore alla prostata. Questo strumento di indagine comprenderà la raccolta di informazioni demografiche, anamnestiche personali e familiari, nonché dati epidemiologici. Il questionario sarà somministrato ai pazienti che si rivolgono alle strutture LILT regionali per la prima diagnosi di sospetto carcinoma prostatico. La conduzione del questionario sarà affidata a personale qualificato appartenente alle suddette strutture associative coinvolte nel progetto. I dati risultanti dall'analisi del questionario offriranno informazioni cruciali sull'andamento epidemiologico del carcinoma prostatico. Queste informazioni saranno preziose per il Servizio Sanitario, fornendo indicazioni utili per la pianificazione di iniziative di screening e azioni finalizzate alla prevenzione e sensibilizzazione sulla malattia.

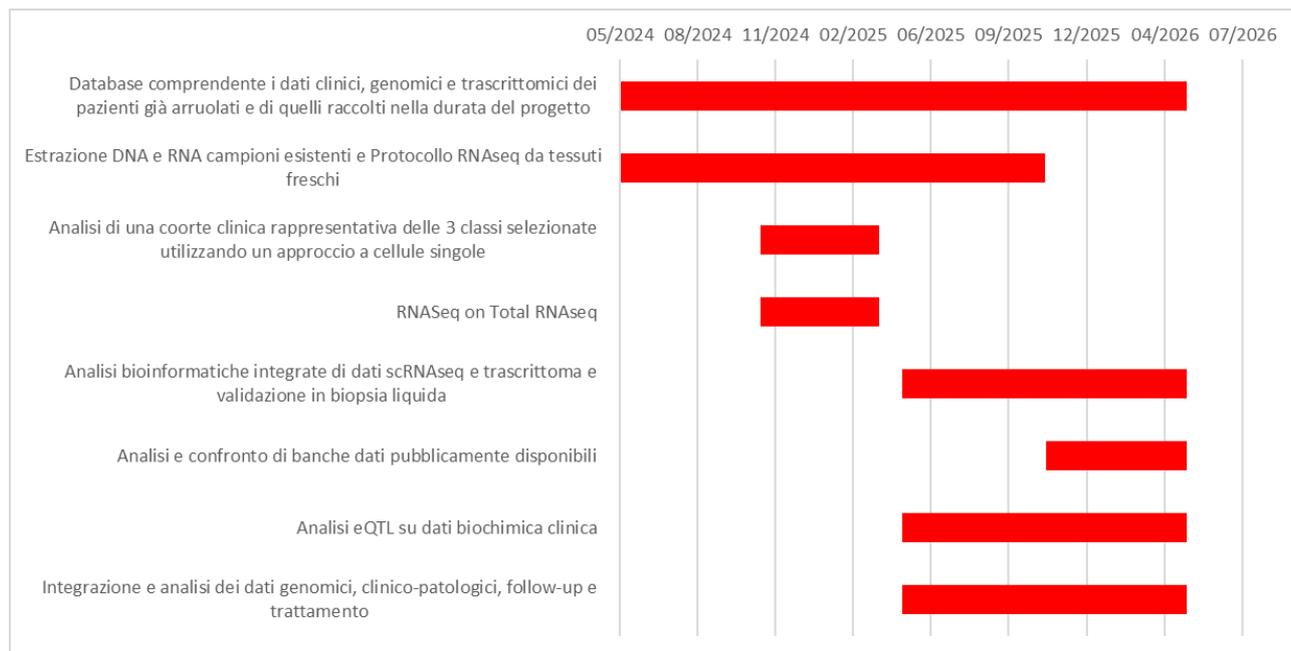
1. Analisi degli aspetti psicologici dei pazienti affetti da carcinoma prostatico:

La popolazione oncologica, in particolare i pazienti affetti da carcinoma prostatico, si trova inevitabilmente ad affrontare un elevato rischio psicopatologico, dovuto alle situazioni stressanti legate alla diagnosi, alla debilitazione fisica, alla mutilazione e alle terapie aggressive. Va considerato anche lo stato di dipendenza generato, l'allontanamento forzato dall'ambiente di vita abituale e, non da ultimo, il rischio di morte. La medicina personalizzata abbraccia l'importanza del supporto psicologico per affrontare queste sfide, mirando a contenere i fattori emozionali e le reazioni psicologiche che potrebbero

negativamente influenzare il percorso della malattia fisica. Questo approccio mira a migliorare la qualità di vita dei pazienti. Inoltre, basandosi sugli ultimi studi di ricerca e sull'esperienza clinica, si cerca di fornire un sostegno specifico ai pazienti con carcinoma prostatico che presentano un maggior rischio di sviluppare una Sindrome Ansioso-Depressiva e Post Traumatica da Stress. L'obiettivo è ridurre l'impatto sulla "qualità di vita" di tali pazienti, evitando ricorso eccessivo a terapie psicotrope che potrebbero comportare costi aggiuntivi per il servizio sanitario nazionale. Attraverso interventi di psicoterapia individuale e di gruppo, svolti presso le sezioni LILT afferenti al progetto che si avvalgono di personale qualificato allo scopo, si prevede una evoluzione del processo di autoanalisi metacognitiva, l'adattamento degli individui alla malattia e l'accettazione di essa. Questo approccio si propone di essere un supporto cruciale nelle decisioni cliniche, poiché l'identificazione precoce consente l'implementazione tempestiva di strategie di trattamento adeguate, nel rispetto del benessere complessivo del paziente.

Tempi previsti/stimati per l'ottenimento degli end-points primari

I tempi previsti o stimati per ottenere gli endpoints primari, inclusi quelli epidemiologici, psicologici e genomico-molecolari descritti nel progetto, sono di 24 mesi. Questo arco temporale rappresenta la finestra durante la quale i ricercatori si prevede raggiungeranno gli obiettivi principali e completeranno la raccolta, l'analisi e la pubblicazione dei dati pertinenti. La scelta di questo periodo di tempo riflette la pianificazione strategica del progetto e tiene conto delle sfide e delle complessità associate alla raccolta e all'elaborazione di dati in ciascuna delle aree specificate.



Risultati attesi dalla ricerca, con specifica evidenza agli approcci con elevato livello di trasferibilità sociale, in particolare all'interno del SSN

Il progetto potrà rappresentare un passo significativo verso una gestione più mirata del carcinoma prostatico (PC), aprendo nuove prospettive per un trattamento personalizzato e avanzando la nostra comprensione delle basi molecolari della malattia.

Sulla base delle conoscenze scientifiche attuali, la caratterizzazione a livello cellulare del microambiente tumorale del PC identificherà stati cellulari eterogenei nelle cellule epiteliali della prostata, possibilmente caratterizzati da un elevato livello di segnalazione

degli androgeni o di altre molecole che si arricchiscono nel PC e consentiranno l'identificazione di popolazioni di cellule associate alla cancerogenesi della prostata.

I nostri risultati daranno sicuramente nuove informazioni sull'origine delle risposte immunologiche e/o infiammatorie comuni del microambiente tumorale. Alcuni stati cellulari associati al tumore saranno arricchiti con tipi e stati cellulari distinti da quelli dei tessuti di origine fornendo così una valutazione precisa di una possibile progressione tumorale o alternativamente mostreranno scenari più benigni a partire da stadi primari. I nostri risultati forniranno spunti diagnostici rilevanti e faranno sicuramente progredire la nostra comprensione degli stati cellulari associati alla tumorigenesi prostatica.

Una migliore comprensione dell'eterogeneità genetica fornirà una panoramica dettagliata delle variazioni genomiche nel carcinoma prostatico, identificando possibili driver molecolari da validare tramite studi funzionali e/o screening in vitro per drug discovery o drug repositioning.

La caratterizzazione dei sottotipi cellulari definirà sottotipi cellulari distintivi nei tessuti tumorali, contribuendo a identificare biomarcatori clinicamente rilevanti derivati dalle analisi delle cellule tumorali circolanti per una diagnosi e prognosi più precise.

La possibilità di avere a disposizione una grande mole di dati di biochimica clinica, proteomica e informazioni di metabolomica quantitativa arricchirà il nostro database clinico/interomico consentendoci di effettuare analisi di correlazione tra vari parametri omici praticamente a costo zero o con i soli costi di validazione finale su saggi altamente specifici.

Inoltre, influenzeremo precocemente le decisioni terapeutiche attraverso una continua interazione con i clinici e una personalizzazione terapeutica basata sul profilo genetico e sui sottotipi cellulari, con l'obiettivo di migliorare l'efficacia del trattamento.

La novità degli studi proposti rende difficile prevedere una reale valutazione del rischio e/o l'impatto specifico di ogni aspetto del progetto. Qualsiasi risultato fornirà informazioni importanti su ciascuno degli aspetti affrontati: sia i risultati "positivi" che quelli "negativi" aiuteranno a definire meglio i tratti genotipici-fenotipici associati al rischio di malignità del PC.

I fattori esterni che potrebbero influenzare le attività e gli obiettivi di questo tipo di studi di solito includono: il numero di pazienti arruolati, le caratteristiche cliniche e l'identificazione dei sottotipi cellulari. Il progetto parte però già da una raccolta in corso: di ogni individuo disponiamo già di campioni biologici e di dati genetici anche se non ancora esaustivi, e di un dataset clinico per integrare anche dati altamente eterogenei.

Tra i risultati ci auspichiamo di annoverare una visibilità scientifica e mediatica del progetto spostata nella sua parte finale o nell'immediata conclusione a causa dei tempi per un'analisi completa ed esaustiva dei dati scientifici prodotti.

Dal punto di vista dell'approccio a livello di trasferibilità sociale e all'interno del SSN, la premessa alla base del nostro studio è che l'incidenza globale del PC, nonostante i progressi del sistema sanitario e l'aumento e l'accuratezza clinica degli screening continua a rappresentare un'emergenza sanitaria.

Il progetto avrà un impatto diretto sugli ospedali e sulle organizzazioni coinvolte e consentirà l'implementazione di dati di follow-up e di outcome basati sui risultati ottenuti e sulle indicazioni cliniche. Il progetto potrà inoltre essere continuato o ampliato nella sua utilità clinica negli anni successivi grazie alla organizzazione e alle interazioni create in questi due anni.

La sostenibilità dell'intervento sarà garantita anche da altri progetti in corso e dallo sviluppo di idee progettuali basate sui risultati ottenuti che saranno seguite e sostenute con continuità dalle organizzazioni e dal personale del CNR e dell'Università di Sassari.

Un risultato tangibile sarà incoraggiare un approccio interdisciplinare che riunirà diversi istituti per aumentare il profilo scientifico del gruppo di lavoro e rafforzare l'interazione con ospedali e istituzioni.

Auspichiamo che i nostri risultati derivanti da applicazioni tecnologiche innovative possano ottenere metodologia e/o protocolli clinici da traslare in biomedicina e possibilmente da trasformare in protocolli di "medicina di precisione". Le sfide cliniche a cui i nostri risultati devono dare risposta saranno: screening per una diagnosi precoce differenziata, previsione personalizzata della risposta terapeutica e scoperta di bersagli terapeutici. I soggetti che ne beneficeranno sono i pazienti affetti da PC che necessitano di un test diagnostico precoce, di parametri prognostici e di obiettivi per una terapia personalizzata.

Gli operatori sanitari delle associazioni LILT e di qualificate strutture operanti in ambito sanitario che si occupano di oncologia, avranno a disposizione nuovi strumenti diagnostici, prognostici e terapeutici.

Auspichiamo di mettere le basi per lo sviluppo di test diagnostici altamente sensibili, specifici e non invasivi basati sui liquidi biologici circolanti che garantirà un miglioramento significativo dell'assistenza sanitaria attraverso diagnosi precise e personalizzate e contribuirà alla riduzione dei costi sanitari.

Inoltre, sicuramente i nostri dati renderanno possibile creare nuovi prototipi di dati/database clinici ospedalieri più efficienti e applicazioni in terapie basate su test statistico-matematici.

Infine, più a lungo termine si auspica che i risultati possano essere un target per le aziende farmaceutiche per lo sviluppo di kit diagnostici sperimentali e/o agenti terapeutici da immettere sul mercato.

Risultati attesi dalla ricerca, con specifica evidenza riguardo lo sviluppo di reti collaborative fra le Associazioni LILT e qualificate strutture operanti in ambito sanitario e di ricerca

La LILT, con la sua presenza diffusa su tutto il territorio nazionale, assume un ruolo fondamentale nella diffusione delle conoscenze relative al controllo dei fattori di rischio di malattia modificabili, come dieta, fumo, alcol e altri. Inoltre, agisce come un veicolo essenziale per la divulgazione delle informazioni riguardanti i risultati genomico-molecolari ottenuti dallo studio proposto sul carcinoma prostatico. La diffusione di queste informazioni rappresenta un elemento cruciale per massimizzare l'impatto positivo del progetto proposto dalla LILT. Nello specifico, per quanto riguarda i dati epidemiologici, la LILT può contribuire in modo significativo alla progettazione di programmi di screening mirati nella Regione Sardegna. Fornendo al Servizio Sanitario Regionale dettagliate informazioni sull'andamento della malattia, si potrà ottimizzare la progettazione di interventi preventivi mirati, migliorando l'efficacia delle strategie di salute pubblica e l'utilizzo efficiente delle risorse disponibili. Per quanto concerne gli aspetti psicologici, la LILT ha l'opportunità di sensibilizzare il pubblico e gli operatori sanitari sull'importanza del supporto psicologico per i pazienti affetti da carcinoma prostatico. La divulgazione di informazioni sui rischi psicologici associati alla malattia può contribuire a de-stigmatizzare la sfera emotiva legata al cancro e a promuovere un approccio integrato e umanizzato alla cura del paziente. Infine, la diffusione dei risultati genomico-molecolari rappresenterà un passo fondamentale per avanzare nella comprensione della malattia e orientare la ricerca futura. La pubblicazione dei risultati su riviste scientifiche indicizzate garantirà la visibilità e la condivisione delle scoperte con la comunità scientifica, facilitando la collaborazione e l'approfondimento delle conoscenze nel campo della medicina personalizzata.

In sintesi, la LILT, sfruttando la sua vasta rete e reputazione, si configura come attore chiave

<p>nella promozione della consapevolezza, nell'implementazione di pratiche preventive e nell'avanzamento della ricerca scientifica nel contesto del carcinoma prostatico. La diffusione mirata di dati epidemiologici, psicologici e genomico-molecolari contribuirà in modo significativo a informare la comunità e a fornire basi solide per future ricerche e interventi sanitari.</p>	
<p>Associazione Provinciale LILT Sassari Associazione Provinciale LILT Cagliari Associazione Provinciale LILT Nuoro Associazione Provinciale LILT Oristano</p>	<p>Altre Strutture afferenti del SSN partecipanti (indicare a quale titolo /regime)</p> <p>Citate nel riquadro sottostante relativamente agli Enti partner</p>

<p>AMPLIARE LA TABELLA SOPRA RIPORTATA PER LA DEFINIZIONE DELLA RETE E DEI PARTECIPANTI AL PRR (Elenco delle Associazioni Provinciali coinvolte con indicazione dei rispettivi responsabili; altri Enti/partner coinvolti nel progetto (specificando ruolo ente e relativo responsabile - esempio Mario Bianchi, Consiglio Nazionale delle Ricerche, unità operativa, personale coinvolto):</p> <p>Associazione Provinciale LILT Sassari-Responsabile: Dott. Bisail Marco Antonio Felice Maria</p> <p>Associazione Provinciale LILT Cagliari-Responsabile: Dott. Carlo Cabula</p> <p>Associazione Provinciale LILT Nuoro-Responsabile: Dott.ssa Pietrina Deiana</p> <p>Associazione Provinciale LILT Oristano-Responsabile: Dott.ssa Licheri Mercedes Eralda</p> <p>ENTI PARTNER:</p> <p>Dott. Andrea Angius, Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR), Unità Operativa Ricerca Genetica e Biomedica (IRGB) Personale coinvolto:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Dott. Andrea Maschio- Ricercatore - Dott. Vincenzo Rallo- Ricercatore Tempo Determinato - Dott.ssa Manila Deiana- Collaboratore Tecnico Enti di Ricerca TI (CTER) V° livello <p>Prof.ssa Maria Rosaria De Miglio, Dipartimento di Medicina, Chirurgia e Farmacia-Università degli Studi di Sassari, Unità Operativa Patologia Molecolare Personale coinvolto:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Prof. Paolo Cossu Rocca-Docente di Anatomia Patologica - Dott.ssa Donatella Coradduzza-Specializzanda in patologia Clinica e Biochimica Clinica - Dott. Matteo Massidda-Assegnista di Ricerca <p>Prof. Ciriaco Carru, Azienda Ospedaliera-Universitaria (AOU) di Sassari, Unità Operativa di Coordinamento Centro Prelievi AOU-Sassari Personale coinvolto:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Prof. Massimo Madonia-Docente di Urologia <p>Dott.ssa Giovanna Piras, Azienda Socio-Sanitaria Locale (ASL) di Nuoro, Unità Operativa Ematologia</p>

Indicazione delle modalità di coinvolgimento dei borsisti, del loro numero e della loro retribuzione.
Tempi di ricerca mesi/uomo

Non si richiede finanziamento per borsisti

Estremi per ricevere il finanziamento

**BANCO DI SARDEGNA
FILIALE 1 SASSARI
P.ZZA CADUTI DEL LAVORO
IT17U010151720100000014353**

Costo complessivo del Progetto articolato per voci di spesa

VOCI DI SPESA	COSTO COMPLESSIVO	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE
Personale di ricerca (borsista)	0	0
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)	0	0
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)	36.000	0
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)	5.000	0
Elaborazione dati	27.000	0
Spese amministrative MAX 5%	4.000	0
Altro: Pubblicazione articoli scientifici	8.000	0
TOTALE	80.000	0

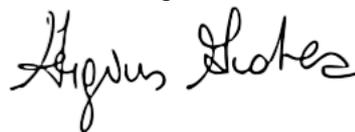
Alla presente proposta deve essere allegato:

- il curriculum vitae del Responsabile Coordinatore del progetto di Rete e dei Referenti scientifici delle varie Associazioni Provinciali afferenti

- Le lettere di accettazione a collaborare al progetto di Rete sottoscritte dai responsabili delle strutture Sanitarie pubbliche / convenzionate del SSN, unitamente al nulla osta specifico delle rispettive Direzioni sanitarie
- la complessiva documentazione di progetto
- Riferimenti autorizzativi del Comitato etico di competenza, se previsto

In fede,

Il Responsabile Coordinatore del PRR
Dott. Andrea Angius



Il legale rappresentante dell'Associazione
LILT di afferenza (centro coordinatore)
Dott. Bisail Marco Antonio Felice Maria



Sassari, 02-12-2023