



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA

**LEGGE REGIONALE 7 AGOSTO 2007, N.7 : "PROMOZIONE DELLA RICERCA
SCIENTIFICA E DELL'INNOVAZIONE TECNOLOGICA IN SARDEGNA"**

**FORMULARIO PER
PROGETTI DI RICERCA FONDAMENTALE O DI BASE E PROGETTI DI
RICERCA FONDAMENTALE O DI BASE ORIENTATA**

Codice: CRP-26104

1. Titolo del progetto di ricerca:

Caratterizzazione molecolare del carcinoma mammario triplo-negativo (Triple Negative Breast Cancer) e screening di nuovi potenziali agenti terapeutici attivi sul sistema ubiquitina-proteasoma.

2. Tipo progetto:

A. Progetti di ricerca fondamentale o di base

2a. Area/Topic/Tender:

Scienze della vita

3. Settori scientifico - disciplinari MIUR (max 3):

MED/06. MED/08. BIO/14.

3a. Parole chiave (max 3 parole chiave):

Carcinoma mammario triplo-negativo. Bersagli molecolari. Sistema ubiquitina-proteasoma (UPS).

4. Coordinatore scientifico:

- **Cognome:**
PIGA
- **Nome:**
ANDREA
- **Qualifica:**
Direttore Struttura Complessa di Oncologia Medica
- **Data di Nascita:**
17/06/1948
- **Codice fiscale/Social security number:**
PGINDR48H17I452O
- **Struttura di riferimento:**
ASL Cagliari
- **Dipartimento:**
Dipartimento di Oncologia Medica Ospedale Oncologico Armando Businco
- **Prefisso e telefono:**
0706095405
- **Cellulare:**
3396398013
- **Indirizzo posta elettronica:**
piga_it@yahoo.it

5. Curriculum scientifico del Coordinatore:



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA**

PROF ANDREA PIGA

Nascita: 17 giugno 1948, Sassari

Stato civile: coniugato, 2 figli

Indirizzo: Struttura Complessa di Oncologia Medica,

Dipartimento di Oncologia, Ospedale Businco

Azienda ASL 8 Cagliari

Via Jenner 09100 Cagliari

Telefono 070-6095405

Fax 070-6095443

E-mail andreapiga@asl8cagliari.it

Codice fiscale: PGI NDR 48H17 I4520

FORMAZIONE:

1974 laurea in Medicina e Chirurgia, 110/110, Università di Sassari

1978 specializzazione in Ematologia, 70/70 e lode, Università di Padova

1983 specializzazione in Oncologia, 70/70 e lode, Università di Ancona

POSIZIONE PROFESSIONALE E TITOLI ACCADEMICI:

attuale Direttore S.C. Oncologia Medica, Ospedale Businco - Centro di Riferimento Oncologico Regionale, ASL 8 Cagliari

Professore Associato Confermato di Oncologia Medica, Università di Udine, attualmente in aspettativa per contratto quinquennale ASL 8 Cagliari

2002-2008 Professore Associato di Oncologia Medica, Università di Udine; Direttore Clinica di Oncologia Medica, Policlinico Universitario di Udine; Direttore della Scuola di Specializzazione in Oncologia, Università di Udine

1998-2002 Professore Associato di Oncologia Medica, Università di Ancona; Dirigente medico I livello, Clinica di Oncologia Medica, Università di Ancona.

1983-1998 Ricercatore Universitario Confermato, Università di Ancona; Dirigente medico I livello, Clinica di Oncologia Medica, Università di Ancona.

1982-1983 Ricercatore Universitario Confermato, Università di Verona; Dirigente medico I livello, Clinica di Ematologia, Università di Verona.

ALTRE QUALIFICHE fino al novembre 2008

Idoneità a Professore Ordinario di Oncologia Medica, MED/06, conseguita nel 2006

Coordinatore Scientifico del Dipartimento Sperimentale Interaziendale di Oncologia (Azienda Ospedaliera-Universitaria di Udine) fino al novembre 2008

Titolare dell'Insegnamento di Oncologia Medica nei Corsi di Laurea in Medicina e Chirurgia, in Infermieristica, in Biotecnologie dell'Università di Udine fino al novembre 2008

Coordinatore del Corso Integrato di Malattie Neoplastiche, corso di laurea in Medicina e Chirurgia dell'Università di Udine fino al novembre 2008

Coordinatore del Corso Integrato di Area Oncologica, Corso di laurea in Infermieristica dell'Università di Udine fino al novembre 2008

Coordinatore del Corso Integrato di Applicazioni Biotecnologiche alla Terapia II, Corso di laurea in Biotecnologie dell'Università di Udine fino al novembre 2008

Titolare dell'Insegnamento di Oncologia Medica nelle Scuole di Specializzazione in Oncologia, Medicina Interna, Ginecologia, Radiologia, Chirurgia Maxillo-Facciale dell'Università di Udine fino al novembre 2008

Membro del Collegio Docenti del Dottorato di Ricerca in Scienze e Tecnologie Cliniche dell'Università di Udine fino al novembre 2008

Membro del Collegio Docenti del Master in International Bioethics fino al novembre 2008

Componente del Comitato Etico Indipendente dell'Università di Udine fino al novembre 2008



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA

Membro del Comitato Tecnico-Scientifico del CRO di Aviano fino al novembre 2008
Esperto del Ministero della Salute per il programma ECM

SOCIETÀ SCIENTIFICHE

Socio AIOM, ESMO, ASCO; già socio di: Società Italiana di Ematologia, Società Italiana di Cancerologia, Società Italiana di Pedagogia Medica, European Society for the Study of Pyrimidine and Purine Metabolism in Man

BORSE E PREMI DI STUDIO

Borsa di studio della Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori nell'a.a. 1977/78.

Borsa di studio dell'Università di Padova nell'a.a. 1978/79.

Premi di studio della Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori - Sezione di Ancona negli aa.aa. 1979/80 e 1980/81.

SOGGIORNI ALL'ESTERO

Research fellow dall'ottobre 1979 al febbraio 1981, e dall'ottobre 1983 all'ottobre 1985 presso il Department of Haematology (diretto dal Prof. A. Victor Hoffbrand) del Royal Free Hospital, Università di Londra.

Honorary Lecturer presso la Royal Free Hospital Medical School, Università di Londra, dal settembre 1980 al febbraio 1981 e dall'ottobre 1983 all'ottobre 1985.

ATTIVITA' SCIENTIFICA

E' autore di oltre 250 lavori scientifici. Ha svolto ricerca scientifica principalmente nei seguenti campi:

ricerca di laboratorio e traslazionale : biochimica ed enzimologia delle cellule neoplastiche, con particolare riferimento al metabolismo purinico e pirimidinico, alla interferenza con le vie di sintesi dei nucleotidi e alla possibile utilizzazione di questi meccanismi nella terapia antitumorale; studio, in cellule normali e neoplastiche, di enzimi ad attività tirosina-chinasica e di altre chinasi cellulari e dei loro rapporti con la proliferazione e con la trasformazione neoplastica; studio dell'attività, in vitro e nell'animale da esperimento, di chelanti del ferro, noti o di nuova sintesi, come agenti antitumorali; studio dei tumori su base eredo-familiare; in questo settore la attività del prof. Piga è stata determinante nel consentire la nascita di un gruppo che, nel volgere di pochi anni, ha ottenuto concreti risultati, collaborazioni su base nazionale e finanziamenti piuttosto rilevanti;

ricerca clinica: i contributi più rilevanti riguardano alcuni campi della diagnostica in oncologia (in particolare in collaborazione con colleghi Radiologi e di altre Specialità) e i problemi terapeutici delle neoplasie mammarie, del tratto gastroenterico, urologiche e ginecologiche, polmonari, ematologiche, e delle neoplasie a sede primitiva ignota. Partecipa a sperimentazioni cooperative nazionali e internazionali nel campo della terapia dei tumori. Ha coordinato studi multicentrici nel campo della terapia dei tumori solidi.

6. Pubblicazioni scientifiche più significative del Coordinatore Scientifico:

1. Andreetta C, Puppini C, Minisini A, Valent F, Pegolo E, Damante G, Di Loreto C, Pizzolitto S, Pandolfi M, Fasola G, Piga A, Puglisi F. Thymidine phosphorylase expression and benefit from capecitabine in patients with advanced breast cancer. Ann Oncol. 2009 Feb;20(2):265-71. Epub 2008 Sep 2. PubMed PMID: 18765464

2. Puglisi F, Puppini C, Pegolo E, Andreetta C, Pascoletti G, D'Aurizio F, Pandolfi M, Fasola G, Piga A, Damante G, Di Loreto C. Expression of periostin in human breast cancer. J Clin Pathol 2008; 61:494-498.



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA**

3. Minisini AM, Menis J, Valent F, Andreetta C, Alessi B, Pascoletti G, Piga A, Fasola G, Puglisi F. Determinants of recovery from amenorrhea in premenopausal breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy in the taxane era. *Anticancer Drugs*. 2009 Jul;20(6):503-7. PubMed PMID: 19339872.
4. Minisini AM, De Faccio S, Ermacora P, Andreetta C, Fantinel R, Balestrieri M, Piga A, Puglisi F. Cognitive functions and elderly cancer patients receiving anticancer treatment: A prospective study. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008; 67:71-79.
5. Puppini C, Puglisi F, Pellizzari L, Manfioletti G, Pestrin M, Pandolfi M, Piga A, Di Loreto C, Damante G. HEX expression and localization in normal mammary gland and breast carcinoma. *BMC Cancer* 2006;6:192.
6. Puglisi F, Follador A, Minisini AM, Cardellino GC, Russo S, Andreetta C, Di Terlizzi S, Piga A. Baseline staging tests after a new diagnosis of breast cancer: further evidence of their limited indications. *Ann Oncol* 16:263-266 (2005).
7. Minisini AM, Di Loreto C, Mansutti M, Artico D, Pizzolitto S, Piga A, Puglisi F. Topoisomerase II α and APE/REF-1 are associated with pathologic response to primary anthracycline-based chemotherapy for breast cancer. *Cancer Letters* 224:133-9. Epub 2004 .(2005).
8. Puglisi F, Minisini A, Piga A. Primary systemic therapy in patients with breast cancer: rationale of use and magnitude of evidence. *Therapy* 1:91-100 (2004).
9. Puglisi F, Mansutti M, Aprile G, Minisini AM, Di Loreto C, Bazzocchi M, Londero V, Cedolini C, Gentile G, Pizzolitto S, Piga A, Sobrero A. Tumor shrinkage evaluation during and after preoperative doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel in patients with breast cancer. *Anticancer Research* 24:2487-2493 (2004).
10. Bianchi F, Rosati S, Belvederesi L, Loretelli C, Ferretti B, Bearzi I, Piga A, Cellerino R, Porfiri E. 'Secrets and Lies'. The difficulties of communicating within families with inherited cancer syndromes. *Clinical Genetics* 66:476-477 (2004).
11. Puglisi F, Minisini AM, Barbone F, Intersimone D, Aprile G, Puppini C, Damante G, Paron I, Tell G, Piga A, Di Loreto C. Galectin-3 expression in non-small cell lung carcinoma. *Cancer Letters* 212:233-239 (2004).
12. Casarsa S, Puglisi F, Baudi F, De Paola L, Venuta S, Piga A, Di Loreto C, Marchesoni D, D'Elia AV, Damante G. BRCA2 germline mutations in primary cancer of the fallopian tube. *Oncology Reports* 12:313-316 (2004).
13. Bisca A, D'Ambrosio C, Scaloni A, Puglisi F, Aprile G, Piga A, Zuiani C, Bazzocchi M, Di Loreto C, Paron I, Tell G, Damante G. Proteomic evaluation of core biopsy specimens from breast lesions. *Cancer Letters* 204:79-86 (2004).
14. Puglisi F, Zuiani C, Bazzocchi M, Valent F, Aprile G, Pertoldi B, Minisini AM, Cedolini C, Londero V, Piga A, Di Loreto C. Role of mammography, ultrasound and large-core biopsy in the diagnostic evaluation of papillary breast lesions. *Oncology* 65:311-315 (2003).



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA

15. Scartozzi M, De Nictolis M, Galizia E, Carassai P, Bianchi F, Berardi R, Gesuita R, Piga A, Cellerino R, Porfiri E. Loss of hMLH1 expression correlates with improved survival in stage III-IV ovarian cancer patients. European Journal of Cancer 39: 1144-1149 (2003).

16. Scartozzi M., Bianchi F., Rosati S., Galizia E., Antolini A., Loretelli C., Piga A., Bearzi I., Cellerino R., Porfiri E. Mutations of hMLH1 and hMSH2 in patients with suspected Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer. Correlation with microsatellite instability and abnormalities of mismatch repair protein expression. Journal of Clinical Oncology 20:1203-1208 (2002).

7. Elenco delle Unità operative

(Massimo 12 Unità- Unità I corrisponde alla sede del Coordinatore Scientifico del Progetto.

Alla lettera A di ogni elenco inserire il responsabile delle Unità Operative)

No. I	Cognome	Nome	Codice Fiscale / SSN	Email	Qualifica	Struttura di riferimento	Dipartimento	Disponibilità temporale indicativa prevista
A	PIGA	ANDREA	PGINDR48H17I452O	piga_it@yahoo.it	Direttore Struttura Complessa di Oncologia Medica	ASL Cagliari	Dipartimento di Oncologia Medica Ospedale Oncologico Armando Businco	3
B	VALLE	ENRICHETTA	VLLNCH57H69B354G	enrichettavalle@asl8cagliari.it	dirigente medico	ASL Cagliari	ONCOLOGIA MEDICA	3
C	GHIANI	MASSIMO	GHNMSM67M31B354N	massimo.ghiani@tiscali.it	Dirigente Medico	ASL Cagliari	Oncologia Medica	3

No. II	Cognome	Nome	Codice Fiscale / SSN	Email	Qualifica	Struttura di riferimento	Dipartimento	Disponibilità temporale indicativa prevista
A	URRU	SILVANA	RRUSVN80M46Z126Y	silvana.urruc@cs4.it	Ricercatrice	Enti di Ricerca	Settore di Biomedicina del CRS4 (Centro di Ricerca, Sviluppo e Studi Superiori in Sardegna, Parco Scientifico e Tecnologico della Sardegna - Polaris, Cagliari)	4

Curriculum scientifico II:

Silvana Urru ha conseguito il dottorato di ricerca in Chimica e Tecnologie del Farmaco nel 2008 a seguito della Laurea in Chimica Farmaceutica nel 2005 presso l'Università degli Studi di Cagliari. Ha svolto la sua attività da ricercatrice nel Dipartimento di Biochimica dell'Istituto Mario Negri di Milano, nel Dipartimento Farmaceutico dell'Università di Santiago de Compostela (Spagna) e presso il Dipartimento Farmaceutico dell'Università di Cagliari. Il lavoro in contesti internazionali le ha permesso di approfondire la conoscenza sia della ricerca di base che di quella clinica. In particolare, ha lavorato sulla sintesi farmaceutica e caratterizzazione di



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA

molecole con differenti attività biologiche e sperimentazioni cliniche.

La Dr.ssa Silvana Urru è attualmente ricercatrice presso il settore di Biomedicina del CRS4 (Centro di Ricerca, Sviluppo e Studi Superiori in Sardegna, Parco Polaris, Cagliari).

Pubblicazioni del responsabile dell'unità operativa II:

1.Steinbeck, C. and Hoppe, C. and Kuhn, S. and Floris, M. and Guha, R. and Willighagen, E.L., Recent Developments of the Chemistry Development Kit (CDK) - An Open-Source Java Library for Chemo- and Bioinformatics, Current Pharmaceutical Design, 2006, 12(17):2111-2120

2.Castrignanò T., de Meo P.O., Carrabino D., Floris M., Orsini M, Tramontano A., The MEPS server for identifying protein conformational epitopes, BMC Bioinformatics, 2007.

3.Floris M., Orsini M., Thanaraj TA., Splice-mediated variants of proteins (SPLIVAP) – data and characterization of changes in signatures among protein isoforms due to alternative splicing, BMC Genomics, 2008

4.Masciocchi J, Frau G, Fanton M, Sturlese M, Floris M, Pireddu L, Palla P, Cedrati F, Rodriguez-Tomé P, Moro S., MMsINC: a large-scale chemoinformatics database, Nucleic Acids Res. 2009 Jan;37 (Database issue)

5.Mentzen W., Floris M., De La Fuente A., Dissecting the dynamics of dysregulation of cellular processes in mouse mammary gland tumor. BMC Genomics, 2009.

6.Floris M, Carboni N., Mateddu A., Porcu M., Marrosu G., Solla E., Cocco E., Mura M., Marini S., Piras R., Aste R. and Marrosu MG., Aberrant splicing in LMNA gene caused by a novel mutation on the polypyrimidine tract of the intron 5, Muscle & Nerve, 2011

7.Floris M., Raimondo D., Leoni G., Orsini M., Marcatili P., Tramontano A., MAISTAS: a tool for automatic structural evaluation of alternative splicing products, Bioinformatics, 2011

8.Begala, M., Tocco, G., Meli, G., Podda, G., Urru, S.A.M. "2-Substituted benzofuran fragment ion formation in the EI spectra of 6-alkyl and 6-aryldibenzo (d,f)(1,3) dioxepine derivatives" Rapid Commun. Mass Spectrom. 2007;21: 1414-1420.

9.Michela Begala, Graziella Tocco, Gabriele Meli, Gianni Podda and Silvana A.M. Urru. "2-Substituted benzofuran fragment ion formation in the EI mass spectra of 6-alkyl and 6-aryldibenzo (d,f)(1,3) dioxepine derivatives"- A useful precursor ion for isomers differentiation. Journal of Mass Spectrometry 2009, 44, 245-251

10.S.A.M. Urru, P. Veglianese, A. de Luigi, E. Fumagalli, E. Erba, R. G. Diaza, E. Davoli, T. Borsello, G. Forloni, N. Pengo, E. Monzani, Paolo Cascio4, Simone Cenci2, R. Sitia, M. Salmona



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA

“A New Fluorogenic Peptide Determines Proteasome Activity in Single Cells” Journal of Medicinal Chemistry Oct 28;53(20):7452-60.

No. III	Cognome	Nome	Codice Fiscale / SSN	Email	Qualifica	Struttura di riferimento	Dipartimento	Disponibilità temporale indicativa prevista
A	ORRU'	SANDRA	RROSDR55T71B354J	sandraorru@asl8cagliari.it	Dirigente Medico	ASL Cagliari	Anatomia Patologica	3
B	MURGIA	ALMA	MRGLMA53A53F808V	almamurgia@asl8cagliari.it	Dirigente Biologo	ASL Cagliari	Anatomia Patologica	3
C	ASUNIS	ANNA	SNSNMR55L68B354Y	annaasunis@aob.it	Dirigente Medico	Altro	Azienda Ospedaliera Brotzu Cagliari - Anatomia Patologica	2
D	ONNIS	DANIELA	NNSDNL63B55B354H	danielaonnis@aob.it	Dirigente Medico	Altro	Azienda Ospedaliera Brotzu Cagliari - Anatomia Patologica	2

Curriculum scientifico III:

CURRICULUM VITAE DEL DR. SANDRA ORRU'

Specializzazione in Anatomia Patologica (il 10/11/2005 A.A. 2004-05),

Specializzazione in Patologia Clinica Indirizzo Gestionale e Organizzativo (il 10/11/2005 A.A. 2004-05), con votazione 70/70, tesi di specializzazione su “Il gene Her2 nel carcinoma della mammella. Importanza diagnostica Standardizzazione delle metodiche di rilevazione”.

DIRIGENTE MEDICO c/o IL SERVIZIO DI ANATOMIA PATOLOGICA DEL P.O. BUSINCO Azienda U.S.L 8 Cagliari con rapporto di lavoro a tempo pieno dal 14-11-1990

ATTRIBUZIONE DI INCARICO DI DIRIGENTE MEDICO DI STRUTTURA SEMPLICE PATOLOGIA GASTROENTERICA E DELLA MAMMELLA dal 17-02-2003

INCARICO IN CONVENZIONE PER ATTIVAZIONE SERVIZIO ANATOMIA PATOLOGICA AZIENDA POLICLINICO UNIVERSITARIO, secondo semestre del 2005 sino al luglio 2007 con la costituzione dell'Azienda Mista.

Attività Didattica Corso Professionale Infermieri A.A. 1990-1991, “Tossicologia e malattie iatrogene” Corso Professionale Infermieri A.A. 1991-1992, “ Anatomia Umana Normale” Corso di Specializzazione Assistenti Chirurgici di Sala Operatoria, A.A.1991/92 “Anatomia e Diagnostica Istologica Intraoperatoria” Scuola Speciale di Chirurgia Mammaria A.C.O.I., per gli A.A. 1998-99-2000-01-02, in qualità di docente di Anatomia Patologica.

Ho svolto attività di tutor nei confronti dei giovani biologi e medici specializzandi in Anatomia Patologica che hanno frequentato il Servizio, seguendoli quotidianamente ed insegnando loro gli aspetti teorici e pratici della professione.

Attività Scientifica RELAZIONI IN CORSI E CONVEGNI “3° Riunione Scientifica Regionale degli Anatomico-Patologi Sardi” tenutasi a Oristano, ospedale

San Martino, il 1 Dicembre 1995, in cui ho presentato due comunicazioni: “I Sarcomi a Cellule Chiare. Descrizione di un interessante caso esordito con plurime localizzazioni metastatiche”. “I Tumori Mammari Pigmentati. Diagnostica differenziale con le lesioni melanocitarie” “XVI Congresso Nazionale: Chirurgia e Qualità di vita” organizzato dall'Associazione Chirurghi Ospedalieri It. Pula 11/14-06-97, in cui ho presentato due comunicazioni: I) Rilievi statistici sui carcinomi mammari relativi agli anni 1989-1996: studio retrospettivo sull'archivio del servizio di anatomia patologica dell'Ospedale Oncologico di Cagliari; II) Carcinomi mammari linfonodo-negativi: fattori prognostici e rilievi statistici relativi agli anni 1989-1997.

“5° Riunione Scientifica Regionale degli Anatomico-Patologi Sardi” tenutasi a Cagliari, Ospedale



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA**

Brotzu il 20 Giugno 1997, in cui ho presentato una comunicazione: "I carcinomi mammari linfonodo negativi. Fattori prognostici". "Breast and Ovarian Cancer. Molecular markers of risk, progression and new therapeutic strategies" org. da Un. di Pisa, Pisa 25/27-09-97, in cui ho presentato una comunicazione "prognostic factors in node-negative breast cancer with unfavourable outcome".

"13° Riunione Scientifica Regionale degli Anatomico-Patologi Sardi" tenutasi a Oristano, Ospedale San Martino, il 15 Giugno 2001: "L'HER2-neu. Significato prognostico, valore terapeutico e standardizzazione delle metodologie di rilevazione". "Corso di Aggiornamento in Oncologia: percorso interattivo sui nuovi bersagli terapeutici nel carcinoma mammario. Informatizzazione della cartella clinica", organizzato dall'AiOM, Cagliari 5- 12-03: "Espressione del gene HER2/neu nel carcinoma della mammella. Valutazione della casistica di un anno" "Citologia dei tumori mammari: approccio diagnostico ai noduli palpabili e non della mammella" tenutosi a Ca, Osp. Oncologico, 10-09-04 organizzato dall'ASL 8, in qualità di direttore del corso. 3° Congresso Nazionale della Soc. It. Anatomia Patologica e Citopatologia Diagnostica tenutosi a Firenze 26/30 settembre 2004: "Espressione del gene HER2/neu nel carcinoma della mammella. Valutazione casistica"

Faccio parte del gruppo di lavoro dei " Consensus Workshop sull'impiego delle diverse metodiche per la determinazione dello status di HER2".

Pubblicazioni del responsabile dell'unità operativa III:

1. "Sui Tumori Mammari Epidermotropi Pigmentati (primitivi, recidivanti, metastatici). Peculiarità Istomorfologiche, Immunoistochimiche e Patogenetiche" In coll. con Ferreli A., Ardu M., Ferreli C. PATHOLOGICA vol. 88, n°5, Ottobre 1996, pag. 385.

2. "Rilievi statistici sull'incidenza del carcinoma mammario negli anni 1990-96. Studio retrospettivo sull'archivio del Servizio di Anatomia Patologica dello Ospedale Oncologico di Cagliari" In coll. Con Ferreli F., Porcu G., Amato F., Ardu M., Lai M., Maganuco C., Ferreli A. PATHOLOGICA vol. 89, n°6, Dicembre 1997, pag. 648.

3. "Rilievi istomorfologici ed immunoistochimici su un raro caso di tumore a cellule granulose della mammella maschile" In coll. Con Ferreli F., Porcu G., Pollino V., Calò P.G., Montisci S., Ferreli A. PATHOLOGICA vol. 89, n°6, Dicembre 1997 pag. 653.

4. "EBV- associated Lymphoma after allogenic BMT for beta thalassemia" In coll. con Argioli F. et al. Istituto di Clinica e Biologia dell'Età Evolutiva - Il Clinica Pediatrica, Università di Cagliari; con Ferreli A., Servizio Anatomia Patologica Ospedale Businco, Cagliari; con Pileri S., Istituto di Ematologia Policlinico Sant'Orsola, Bologna; Puxeddu P. et al, Clinica ORL Università di Cagliari -Italy; e con O'Reilly R., Memorial Sloan-Kettering Cancer Center New York - USA.

5. "Statistic relief and prognostic Consideration of Breast Cancer. A Surgical Pathology Division's study from 1989 to June 1997 Oncological Hospital of Cagliari.", pubblicato sugli Atti del XV Congresso Nazionale di Oncologia Sperimentale e Clinica, Cagliari 4-7 ottobre 1997, supplemento della rivista "TUMORI".

6. "Primary and metastatic epidermotropic pigmented breast carcinoma: Histological,



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA

immunohistochemical and ultrastructural analysis of four cases" in coll. con Ferreli C., Ferreli A., Aste N., Biggio P., pubblicato su Australasian Journal of Dermatology, Abstracts of the 19th World Congress of Dermatology 15-20 June, 1997; Vol. 38 (Suppl. 2) June 1997.

7. "Lo studio del linfonodo sentinella nel carcinoma mammario: perché, come, quando" In coll. con Di Martino L., Demontis B., Grosso L.P., Murenu G., Meleddu C., Giannoni N., Dessena M., Ferreli A., Chirurgia Italiana, Vol. 53, N° 5/2001: 609-618.

8. "Radiofrequency Ablation (RFA) of Breast Cancer Lumpectomy Cavities: Tissue-Based Validation of a technique Intended to Increase Negative Margins after Breast conservation Surgery." In coll. con John Eckman, Harry Kwan, Marco Rais, Maurizio Spinelli, Kathrina Christy, Cheryl Germain, Dwight Castrodale, James Coad.

9. "HLA-DQB1*0201 homozigosis predisposes to severe intestinal damage in celiac disease" In coll. con Jores RD, Frau F, Cucca F, Grazia Clemente M, De Virgilis S, Congia M. Scand J Gastroenterology 2007 Jan; 42(1):48-53

10. "A role of BRCA1 and BRCA2 germline mutations in breast cancer susceptibility within Sardinian population" in coll. con Grazia Palomba, Angela Loi, Antonella Uras, Patrizia Fancello, Giovanna Pira, Attilio Gabbas, Antonio Cossu, Mario Budroni, Antonio Contu, Francesco Tanda, Antonio Farris, Carlo Floris, Marina Pisano, Mario Lovicu, Maria Cristina Santona, Gennaro Landriscina, Laura Crisponi, Giuseppe Palmieri and Maria Monne. BMC Cancer 2009, 9:245:10.1186/1471-2407-9-245

No. IV	Cognome	Nome	Codice Fiscale / SSN	Email	Qualifica	Struttura di riferimento	Dipartimento	Disponibilità temporale indicativa prevista
A	MARRAS	VINCENZO	MRRVCN59M08I452M	marrasv@gmail.com	Dirigente Medico	Università di Sassari	Medicina clinica, sperimentale e oncologica	3
B	SAROBBA	MARIA GIUSEPPINA	SRBMGS57B53G203U	gi.sarobba@tiscali.it	Dirigente Medico	Università di Sassari	Medicina clinica, sperimentale e oncologica	3
C	PINNA	MARIA ANTONIA	PNNMNT71R51I452P	toniapinna@yahoo.it	Tecnico di Laboratorio	Università di Sassari	Medicina clinica, sperimentale e oncologica	3

Curriculum scientifico IV:

Il Dott. Vincenzo Marras ha conseguito la laurea in Medicina e Chirurgia il 7.7.1988 e la specializzazione in Anatomia Patologica nel 1992.

Il 9 Gennaio 1990 è stato assunto presso l'istituto di Anatomia e Istologia Patologica dell'Università di Sassari in qualità di Collaboratore Tecnico.

L'1 Marzo 1993, come vincitore di concorso, è stato assunto in qualità di Assistente Medico presso l'Istituto di Anatomia Patologica di Sassari.

Attualmente presta servizio come Dirigente Medico presso l'U.O. di Anatomia Patologica



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA**

dell'AOU Sassari.

Il Dott. Marras è responsabile della valutazione quantitativa dei recettori ormonali, dell'indice di proliferazione e della valutazione dell'iperespressione dell'Her-2 nei carcinomi della mammella.

Il Dott. Marras ha partecipato a numerosi corsi e congressi su varie tematiche istopatologiche anche in qualità di relatore e ha partecipato attivamente anche a studi su tematiche oncologiche ed ha partecipato alla stesura di oltre 20 pubblicazioni su riviste scientifiche nazionali ed internazionali anche di grande importanza.

CORSI E FREQUENZE PRESSO ALTRE ISTITUZIONI

1991: Frequenza Istituto di Anatomia e Istologia Patologica, Dipartimento di Biopatologia Umana, Università La Sapienza, Roma

1994: Frequenza presso sede Necton Dickinson Leiden (NL) per utilizzo strumentazioni di cimetri statica (CAS 200)

1997: Frequenza Istituto di Anatomia e Istologia Patologica, laboratorio di Citologia, Università di Trieste.

Pubblicazioni del responsabile dell'unità operativa IV:

1. Burrai GP, Mohammed SI, Miller MA, Marras V, Pirino S, Addis MF, Uzzau S, Antuofermo E. Spontaneous feline mammary intraepithelial lesions as a model for human estrogen receptor- and progesterone receptor-negative breast lesions. BMC Cancer. 2010 Apr 22;10:156.

2. Capobianco G, Spaliviero B, Dessole S, Cherchi PL, Marras V, Ambrosini G, Meloni F, Meloni GB. Paget's disease of the nipple diagnosed by MRI. Arch Gynecol Obstet. 2006 Aug;274(5):316-8.

3. Capobianco G, Dessole S, Cossu A, Marras V, Meloni GB, Mesina S, Demurtas P, Cherchi PL. Receptor modifications in vulvar dystrophies before and after treatment with topical hormones: comparison between the dextran-charcoal technique and immunohistochemical evaluation. Eur J Gynaecol Oncol. 2006;27(4):411-3.

4. Cherchi PL, Marras V, Capobianco G, Ambrosini G, Piga MD, Fadda GM, Rosas N, Dessole S. Prognostic value of p53, c-erb-B2 and MIB-1 in endometrial carcinoma. Eur J Gynaecol Oncol. 2001;22(6):451-3.

5. Cherchi PL, Marras V, Capobianco G, Ambrosini G, Piga M, Fadda GM, Dessole S. Immunohistochemical evaluation of a new epithelial antigen, Ber-EP4, in ovarian cancer: preliminary results. Eur J Gynaecol Oncol. 2001;22(6):433-5.

6. Ambrosini A, Marras V, Piga MD, Ambrosini G, Fattorini F, Canetto AM, Cherchi PL. [New serum markers in malignant epithelial tumors of the ovary]. Minerva Ginecol. 2001 Feb;53(1 Suppl 1):18-24.

7. Pisano M, Cossu A, Persico I, Palmieri G, Angius A, Casu G, Palomba G, Sarobba MG, Rocca PC, Dedola MF, Olmeo N, Pasca A, Budroni M, Marras V, Pisano A, Farris A, Massarelli G, Pirastu M, Tanda F. Identification of a founder BRCA2 mutation in Sardinia. Br J Cancer. 2000



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA

Feb;82(3):553-9.

8.Marras V, Cossu A, Onida GA, Pintus A, Bosincu L, Tanda F. [Blue nevus of the uterine cervix: description of a case and review of the literature]. Pathologica. 2000 Aug;92(4):278-83.

9.Dettori G, Madeddu G, Cottu P, Spanu A, Porcu A, Cossu Rocca P., Fancellu A, Chessa F, Marras V, Scanu Am (1999). Il ruolo del linfonodo sentinella nello staging ascellare. Archivio ed Atti della Società italiana di Chirurgia. vol. 3, p. 176-197.

10.Meloni GB, Becchere MP, Soro D, Profili S, Demelas L, Marras V. [A case of breast metastasis of esophageal squamous cell carcinoma]. Radiol Med. 1996 Jun;91(6):812-4.

No. V	Cognome	Nome	Codice Fiscale / SSN	Email	Qualifica	Struttura di riferimento	Dipartimento	Disponibilità temporale indicativa prevista
A	COSSU	SERGIO	CSSSRG64P12F979T	sergio.cossu@tiscali.it	Dirigente Medico	ASL Nuoro	Anatomia Patologica	3
B	SANTONA	MARIA CRISTINA	SNTMCR66E54I4520	maricri.san@tiscali.it	Dirigente Medico	ASL Nuoro	Oncologia Medica	2
C	FUNEDDA	LUCIA	FNDLCU54L67F979L	anatomiapatologica.hsf@aslnuoro.it	Tecnico di Laboratorio	ASL Nuoro	Anatomia Patologica	4

Curriculum scientifico V:

Il dott. Sergio Cossu è nato a Nuoro il 12/09/64.

Ha conseguito la laurea in Medicina e Chirurgia presso l' Università Cattolica del Sacro Cuore il 24/10/1989 con la votazione di 110/110.

Il 7 Luglio 1993 ha conseguito la Specializzazione in Anatomia e Istologia Patologica, presso l'Università degli studi di Sassari, con la votazione di 50/50 e lode.

Nel Gennaio 1990 è stato assunto con la qualifica di tecnico-laureato presso l'Istituto di Anatomia e Istologia Patologica dell' Università degli studi di Sassari.

Dal Gennaio 1992 al Giugno 1992 ha frequentato, in qualità di medico visitatore il Dipartimento di "Surgical Pathology" presso la Washington University di Saint Louis (USA) svolgendo un lavoro di ricerca relativo alle neoplasie maligne della tiroide.

Nel Marzo 1993, è stato assunto in qualità di Assistente medico in ruolo di Anatomia e Istologia Patologica presso l' U.S.L. n° 1 di Sassari.

Negli anni accademici 93/94, 94/95 e 95/96 gli è stata conferita l' attività didattica integrativa di Diagnostica Istologica I nella Scuola di Specializzazione in Anatomia Patologica.

Dal febbraio 1998 svolge la propria professione, con la qualifica di dirigente medico di 1° livello, presso il Servizio di Anatomia Patologica dell' Ospedale San Francesco, AUSL n°3 di Nuoro.

Dal 2003 è responsabile della struttura semplice di "Citologia Diagnostica" all' interno del suddetto servizio.

Pubblicazioni del responsabile dell'unità operativa V:

1.Primary spindle cell tumor of lymph node with "amianthoid" fibers: a histological, immunohistochemical and ultrastructural study. Tanda F, Massarelli G, Cossu A, Bosincu L, Cossu S, Ibba M. Ultrastruct Pathol. 1993 Mar-Apr;17(2):195-205.



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA

2. Rhabdoid tumours of the central nervous system. Report of three cases with immunocytochemical and ultrastructural findings. Cossu A, Massarelli G, Manetto V, Viale G, Tanda F, Bosincu L, Iuzzolino P, Cossu S, Padovani R, Eusebi V. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol. 1993;422(1):81-5.

3. Lymphangioma-like variant of Kaposi's sarcoma: clinicopathologic study of seven cases with review of the literature. Cossu S, Satta R, Cottoni F, Massarelli G. Am J Dermatopathol. 1997 Feb;19(1):16-22.

4. Kikuchi's disease and proteinaceous lymphadenopathy in 4 patients with HIV infection. Cossu A, Lissia A, Cossu S, Marras V, Tanda F, Massarelli G. Pathologica. 1998 Feb;90(1):20-6.

5. A case of carbamazepine-induced lymphadenopathy resembling Kikuchi disease. Ganga A, Corda D, Gallo Carrabba G, Cossu S, Massarelli G, Rosati G. Eur Neurol. 1998;39(4):247-8.

6. Acantholytic dyskeratotic epidermal naevus localized unilaterally in the cutaneous and genital areas. Cottoni F, Masala MV, Cossu S. Br J Dermatol. 1998 May;138(5):875-8.

7. Classical Kaposi's sarcoma and chronic lymphocytic leukaemia in the same skin biopsy. Report of two cases. Cottoni F, Masia IM, Cossu S, Montesu MA, Pardini S, Massarelli G. Br J Dermatol. 1998 Oct;139(4):753-4.

8. Histological concepts on clinico-pathological features of Kaposi sarcoma] Massarelli G, Cossu S. Pathologica. 1999 Feb;91(1):1-5.

9. Anaplastic transformation of classic Kaposi's sarcoma: clinicopathological study of five cases. Satta R, Cossu S, Massarelli G, Cottoni F. Br J Dermatol. 2001 Nov;145(5):847-9. No abstract available.

10. Kikuchi-Fujimoto disease with lateral neck localisation: a case report. Biggio A, Lai A, Demontis G, Cossu S, Canu L, Proto E. Acta Otorhinolaryngol Ital. 2003 Aug;23(4):322-5.

8. Abstract del progetto di ricerca:

Il cancro della mammella rappresenta il 29,0% di tutti i cancro incidenti tra le donne e il 16,9% di tutti i decessi per cancro. In Italia nel 2010 sono stati diagnosticati 38.286 nuovi casi di tumore della mammella femminile nella popolazione di 0-84 anni d'età. (Dati Associazione Italiana Registro Tumori - AIRTUM).

Il carcinoma mammario comprende un gruppo eterogeneo di neoplasie che differiscono per gli aspetti istopatologici, per il comportamento biologico e per le diverse risposte alla terapia. Attualmente, la scelta del trattamento del carcinoma mammario è condizionata dalla determinazione dello stato dei recettori estrogenici (ER) e progestinici (PgR), dalla valutazione dell'indice di proliferazione mediante Ki-67 (Mib-1) e dall'analisi dello stato di HER2/Neu. In



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA

base alle varie combinazioni tra questi parametri vengono definite tre categorie di carcinoma mammario con significative differenze dal punto di vista oncologico: la prima categoria è rappresentata dai tumori positivi per ER e PgR, per i quali è attuabile una terapia ormonale, associata o meno a chemioterapia; la seconda categoria è costituita da tumori caratterizzati da iperespressione/amplificazione di HER2, e può beneficiare di una terapia mirata di tipo anticorpale rivolta verso determinanti antigenici della stessa molecola; la terza categoria comprende forme neoplastiche negative sia per i recettori ormonali che per HER2/Neu, definiti triple negative, per le quali, in assenza di bersagli terapeutici specifici, l'approccio terapeutico è limitato all'utilizzo di chemioterapici convenzionali. Pertanto, avendo lo stesso livello di sensibilità verso altri farmaci, i tumori triple negative di solito sono resistenti ai farmaci a seguito di un precedente trattamento.

Emerge con chiarezza la necessità di studiare nuove possibilità di trattamento per questo gruppo di pazienti con tumore al seno.

Le varianti neoplastiche triple negative pur rappresentando una bassa percentuale, variabile dal 15 al 17% di tutti i carcinomi mammari, sono responsabili di un numero rilevante di morti per malattia. Questa classe di tumori mammari mostra peculiari caratteristiche clinico-patologiche e si caratterizza per una prognosi sfavorevole, alte percentuali di metastasi e recidive.

Per quanto recenti studi abbiano contribuito a meglio definire gli aspetti biologici caratterizzanti queste forme, le conoscenze dei meccanismi molecolari specifici di queste varianti neoplastiche appaiono ancora largamente incomplete, in particolare nel fornire possibili bersagli terapeutici alternativi.

Il presente progetto si propone di realizzare una banca dati di una importante variante del carcinoma mammario in Sardegna, identificando retrospettivamente le varianti triple-negative in un'ampia casistica di neoplasie diagnosticate durante il decennio 2000-2009 e di caratterizzarne gli aspetti istopatologici e i profili biologici mediante indagini di tipo immunoistochimico e genetico-molecolare.

Questa dettagliata analisi consentirà di verificare l'incidenza di queste varianti nel territorio regionale, di incrementare le conoscenze sugli aspetti biologici di queste neoplasie, di identificare possibili indicatori prognostici e di risposta a terapie mirate di tipo molecolare. Successivamente ci concentreremo sulla stratificazione di questa classe di tumori e sullo screening di molecole attive sul sistema Ubiquitina Proteasoma (UPS), nuovo target del trattamento antitumorale che svolge un ruolo centrale nella regolazione del ciclo cellulare. L'inibizione dell'attività proteasomale attraverso l'utilizzo di molecole specifiche si sta rivelando una strategia anti-tumorale estremamente promettente: il proteasoma infatti controlla la stabilità di numerose proteine che regolano la progressione attraverso il ciclo cellulare e l'apoptosi. Alterando la stabilità o l'attività di queste proteine gli inibitori del proteasoma rendono sensibili le cellule tumorali all'apoptosi.

Nell'esecuzione del progetto si prevede la partecipazione del CRS4 come Unità di Ricerca II. L'esecuzione delle attività previste da questa unità verrà svolta dal CRS4 con mezzi finanziari propri.

Per lo svolgimento del progetto le Unità Operative della Regione Sardegna si avvarranno della collaborazione di specialisti ed unità di ricerca appartenenti a qualificati centri di ricerca nazionali (Prof. Mario Salmona, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano; Prof. Paolo Cascio, Dipartimento Morfofisiologia Veterinaria Università di Torino; Prof. Stefano Moro, Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova).

9. Obiettivi generali, specifici e operativi che il progetto si propone di raggiungere. **Presentazione schematica:**

Obiettivi generali



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA**

Con questo progetto di ricerca ci proponiamo di allestire una banca dati che permetta l'analisi integrata di dati clinici, immunofenotipici e molecolari di un larga coorte di campioni tumorali della mammella della Sardegna a cui seguirà una selezione di un campione informativo ed omogeneo di tumori mammari triple negative (forme neoplastiche negative per i recettori estrogenici, progestinici e per il fattore di crescita epidermico di tipo2) (Triple Negative Breast Cancers - TNBCs). Su questo campione verranno effettuati dettagliati e sistematici studi molecolari dell'assetto genomico e trascrizionale che permetteranno di identificare marcatori molecolari specifici e di stratificare ulteriormente in sottogruppi omogenei per il profilo molecolare. Nonostante l'introduzione di nuove procedure diagnostiche e terapeutiche abbia migliorato in generale la prognosi del tumore al seno, questa patologia rimane essenzialmente incurabile per una sottoclasse importante di carcinomi mammari. E' pertanto necessario applicare e sviluppare le recenti acquisizioni dell'oncologia molecolare per la messa a punto di nuove strategie terapeutiche. Su una selezione rappresentativa delle sottopopolazioni di TNBC profilate dal punto di vista molecolare verrà eseguito uno screening, inizialmente "in-silico", di inibitori specifici del Sistema Ubiquitina-Proteasoma (UPS). Il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) costituisce un fondamentale meccanismo di controllo di qualità che elimina selettivamente proteine danneggiate o con un folding incompleto, e ha un impatto su quasi tutti i processi biologici [1]. L'inibizione dell'attività proteasomale attraverso l'utilizzo di molecole specifiche si sta rivelando una strategia anti-tumorale estremamente promettente, in particolare nei confronti di vari tipi di neoplasie che sono refrattarie a tutti i trattamenti attualmente disponibili [2] [3]. Il presente progetto si propone di selezionare varianti aggressive di carcinomi mammari e per i quali non è disponibile un protocollo terapeutico efficace; identificare e caratterizzare specifici marcatori molecolari associati alla malignità di queste varianti tumorali ed impostare uno screening di molecole attive sul sistema ubiquitina-proteasoma di questi specifici tumori. Al termine della fase di selezione in silico un numero ristretto di peptidi potenzialmente attivi verranno sintetizzati e testati sperimentalmente sia per la capacità di inibire la funzionalità del proteasoma in vitro (mediante tecniche spettrofluorimetriche che si basano sull'utilizzo di proteasoma 26S altamente purificato e di specifici peptidi fluorogenici) ed in vivo (utilizzando un innovativo peptide fluorogenico recentemente sviluppato da uno dei proponenti: TAT-EDANS-DABCYL, o TED), sia per la capacità di indurre danno sulle cellule tumorali in combinazione con i DNA-damaging agents.

Obiettivi specifici ed operativi

OR1. Realizzazione di una banca-dati del carcinoma mammario triple-negative. Si prevede di allestire un sistema informatico di banca-dati per la: i) memorizzazione delle informazioni relative ai campioni di tumori mammari e ii) di fornire gli strumenti applicativi per la gestione ed elaborazione di dati clinici, immunofenotipici e molecolari.

OR2. Selezione immunofenotipica e molecolare dei TNBC. Si prevede di fare una revisione critica della casistica da patologi delle Unità Operative di Anatomia Patologica della Sardegna, con valutazione del biofenotipo e la selezione di casi triple negative con associati i dati anagrafici, anamnestici, clinico-patologici all'esordio e nel follow-up.

OR3. Stratificazione e caratterizzazione molecolare dei TNBC. Si prevede di definire l'assetto genetico e il profilo trascrizionale di una coorte di casi TNBC selezionati in OR2 mediante l'utilizzo della piattaforma tecnologica Affymetrix e di stratificare - mediante un'analisi bioinformatica dedicata - i campioni dal punto di vista molecolare in classi omogenee.

OR4. Screening di molecole attive sul sistema ubiquitina-proteasoma nel TNBC. Si prevede di effettuare uno screening di molecole in due fasi successive i) un primo "screening virtuale" (sia "ligand based" che "structure based") per l'identificazione e la valutazione biologica di nuovi inibitori del proteasoma 26S; ii) una loro sistematica validazione biochimica e biologica su un



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA

campione rappresentativo di cellule di TBNC selezionate in accordo con la profilazione molecolare eseguita in OR3 utilizzando un innovativo peptide fluorogenico (TAT-EDANS-DABCYL, o TED) [4], che permette la determinazione diretta della efficienza del proteasoma in cellule vitali.

10. Coerenza con gli obiettivi strategici della pianificazione regionale per lo sviluppo e l'occupazione nel quadro delle raccomandazioni europee:

In conformità con quanto riportato nella Legge Regionale 7 agosto 2007 n. 7, il progetto di ricerca si propone di rafforzare il sistema della ricerca di base e scientifico-tecnologica della Sardegna, contribuendo a promuovere la ricerca e l'innovazione in settori strategici per l'economia sanitaria regionale.

Il carcinoma mammario è considerato una delle principali emergenze sanitarie e socio-economiche al mondo, con un costante incremento dell'incidenza e la crescente necessità di fornire trattamenti efficaci e quanto più individualizzati. Questa necessità appare straordinariamente rilevante per il tumore mammario, proprio in funzione dell'accertata riduzione della mortalità conseguente alla diagnosi precoce ed al miglioramento delle terapie. Il presente progetto è focalizzato sulle forme neoplastiche di carcinoma mammario (triple negative) che sono caratterizzate da scarsa responsività alle comuni terapie e da un'incompleta identificazione dei fattori biologici che ne determinano lo sviluppo e la progressione, e si pone l'obiettivo di:

- selezionare retrospettivamente le forme di carcinoma mammario triple negative nel territorio regionale, tra il 2000 ed il 2009, stimandone l'incidenza e la distribuzione geografica;
- identificare e caratterizzare mediante tecnologie e procedure avanzate specifici marcatori molecolari associati alla malignità di queste varianti tumorali;
- utilizzare la risorsa dei campioni tumorali uniformemente classificati sia dal punto di vista clinico-patologico che genetico-molecolare per impostare uno screening di molecole attive su questa specifica classe di tumori, con particolare riferimento allo sviluppo di nuovi inibitori della via degradativa Ubiquitina-Proteasoma.

Nel complesso, quindi, l'identificazione di marcatori molecolari utilizzabili a scopo stratificativo, diagnostico, prognostico e terapeutico consentirà di mettere a punto criteri diagnostici più accurati, una più precisa definizione della prognosi ed una ottimizzazione delle scelte terapeutiche, nell'ottica di un più appropriato management del paziente e di una razionalizzazione della spesa sanitaria regionale.

Inoltre, la stretta collaborazione e la condivisione delle competenze messe in gioco dagli operatori coinvolti nel progetto, provenienti dai Servizi di Anatomia Patologica della Provincia di Sassari, Nuoro, Oristano e Cagliari, va nella direzione indicata dal Piano Sanitario Regionale nella realizzazione di una Rete Oncologica Sarda.

11. Stato dell'arte:

Il carcinoma mammario rappresenta una delle neoplasie più comuni. Mentre l'incidenza di tale neoplasia appare in costante aumento, nelle ultime decadi i tassi di mortalità nei paesi industrializzati hanno evidenziato una netta riduzione, legata a molteplici fattori quali l'impatto dello screening mammografico nella diagnostica di lesioni sempre più precoci, un miglioramento nella gestione delle pazienti con forme tumorali precoci e l'applicazione di terapie mirate ed adiuvanti.

Da un punto di vista istopatologico, con il termine di carcinoma mammario si comprendono varie entità morfologiche che differiscono sia per il pattern architetturale di crescita neoplastica che per le caratteristiche citologiche.

Le strategie attualmente applicate nel trattamento del carcinoma mammario sono correlate



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA**

alla determinazione dello stato dei recettori estrogenici (ER) e progestinici (PgR), alla valutazione dell'indice di proliferazione mediante Ki-67 (Mib-1) ed all'analisi dello stato del recettore del fattore di crescita epidermico-2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 - HER2). In base alle varie combinazioni tra questi parametri vengono definite tre categorie di carcinoma mammario con significative differenze dal punto di vista oncologico:

- la prima categoria è rappresentata dai tumori positivi per i recettori ormonali, per i quali è attuabile una terapia ormonale, associata o meno a chemioterapia;
- la seconda categoria è costituita da tumori caratterizzati da iperespressione/amplificazione di HER2, e beneficia di una terapia targeted di tipo anticorpale rivolta verso determinanti antigenici della stessa molecola (Trastuzumab);
- la terza categoria comprende forme neoplastiche classificate come triplo-negativo (TNBCs) e rappresentano una classe di tumori definiti dalla contemporanea bassa espressione di recettori per gli estrogeni (ER), recettori del progesterone (PR) e recettori del fattore di crescita 2 (Her2/EGFR2/ERBB2).

I tumori TNBCs costituiscono il 10-20% di tutti i tumori al seno, e rappresentano circa il 25% delle morti per cancro al seno. Pur avendo lo stesso livello di sensibilità verso altri farmaci, TNBCs di solito sono resistenti ai farmaci a seguito di un precedente trattamento [5].

Recentemente, studi relativi ai profili di espressione genica hanno proposto una nuova classificazione molecolare sulla base delle omologie molecolari tra queste neoplasie e i due tipi cellulari epiteliali (luminali o mioepiteliali) costituenti il tessuto mammario normale. In base ai differenti profili, vengono riconosciute 5 categorie molecolari di carcinoma mammario: luminal A, luminal B, normal breast-like, HER2 overexpressing and basal-like.

Dal punto di vista prognostico il sottotipo molecolare basal-like è la forma più aggressiva e a prognosi sfavorevole. Caratteristicamente, questa variante dimostra numerosi tratti in comune con il carcinoma mammario triple negative, ivi compresi gli aspetti morfologici di neoplasia poco differenziata e - in gran parte dei casi - la negatività per recettori ormonali e HER2.

Un'altra interessante analogia è stata evidenziata tra carcinomi mammari triple negative e varianti neoplastiche correlate al BRCA1, gene responsabile di alcune forme eredo-familiari di carcinoma. In particolare, oltre il 70% delle neoplasie che insorgono in pazienti con mutazione germinale di BRCA1 mostrano profili di espressione genica e patterns immunoistochimici inquadrabili nella categoria "basal-like" e aspetti morfologici simili alle forme triple negative [6]. Inoltre, è stato verificato che nelle neoplasie sporadiche triple negative è possibile osservare un ridotta espressione di BRCA1.

Le neoplasie triple negative, così come parte delle neoplasie basal-like, evidenziano, in circa il 60-66% dei casi, iperespressione del recettore del fattore di crescita epidermico di tipo 1 (EGFR o HER1). Poiché l'iperespressione e l'aumento di copie del gene EGFR sono comunque ritenuti indicatori di potenziale risposta ad anticorpi anti-EGFR (es. Cetuximab) o agli inibitori della tirosina-chinasi specifica (es. Gefitinib), tali terapie molecolari sono state proposte come adiuvanti in pazienti in stadi avanzati.

L'attività del sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) è essenziale per molti processi cellulari, tra cui la regolazione dei recettori, le vie di segnalazione molecolari e la degradazione tempestiva delle cicline, delle chinasi ciclina-dipendenti, e degli inibitori della chinasi durante la mitosi. Inoltre, l'attività del sistema UPS è necessaria per la processazione degli antigeni di classe I l'elaborazione dell'antigene, per l'angiogenesi, l'apoptosi e per la degradazione di proteine regolatorie, come i fattori di trascrizione. La diminuzione dei livelli e dell'attività funzionale



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA

dell'UPS [7] associata all'aumento delle necessità degradative della cellula, determina una saturazione della capacità proteolitica cellulare che si manifesta con l'accumulo di proteine poliubiquitinate, la stabilizzazione di fattori proapoptotici e di conseguenza una drammatica sensibilizzazione agli effetti pro-apoptotici dei farmaci inibitori del proteasoma [8].

L'omeostasi delle proteine è un fattore critico nella regolazione di processi biologici che sono fondamentali per la sopravvivenza delle cellule tumorali. La ricerca sul cancro si è pertanto concentrata sui processi di regolazione della sintesi e della degradazione delle proteine, come i fattori proteici che mediano la proliferazione. Si sta infatti sempre più comprendendo che la degradazione selettiva di proteine regolatorie del ciclo cellulare rappresenta un passaggio critico per il controllo dei processi cellulari associati con lo sviluppo e la progressione del cancro. La genesi dei tumori è infatti caratterizzata da risposte aberranti a segnali cellulari che normalmente regolano la crescita, la differenziazione, le funzioni e l'apoptosi delle cellule. Tutti questi processi cellulari sono a loro volta controllati tramite la trascrizione, la traduzione e la degradazione di proteine regolatorie la cui perturbazione può contribuire alla formazione del tumore. Il sistema UPS, che degrada più dell'80% delle proteine cellulari (comprese quelle coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare), è diventato quindi un bersaglio estremamente interessante per la terapia contro il cancro. La proteostasi (vale a dire il bilancio tra sintesi, secrezione e degradazione delle proteine) è, infatti, un fattore critico nella regolazione dei processi biologici che sono fondamentali per la sopravvivenza e la proliferazione delle cellule tumorali.

I TNBCs presentano più mutazioni geniche rispetto ad altri tumori della mammella, e sono pertanto più suscettibili agli agenti che danneggiano il DNA. Recentemente è stato dimostrato nel *Saccharomyces Cerevisiae* che la combinazione di mutazioni non letali dei geni codificanti per le proteine del proteasoma e per quelle coinvolte nella riparazione del DNA rende le cellule estremamente sensibili ad agenti che danneggiano il DNA, come quelli usati per il trattamento del cancro della mammella [9]: un aumento della concentrazione intracellulare di proteine danneggiate, derivante dall'azione degli agenti alchilanti, accoppiata con l'inibizione del meccanismo di turnover delle proteine danneggiate, risulta in un importante difetto di crescita cellulare.

Per questo motivo nel corso del nostro progetto valuteremo l'efficacia di nuovi inibitori proteasomali sulle cellule di tumori TNBCs. Queste cellule insieme a quelle dei controlli saranno valutate da un punto di vista biochimico e molecolare al fine di evidenziare eventuali anomalie a carico del meccanismo della degradazione proteica. L'approccio multidisciplinare di tale ricerca consentirà una comprensione ampia e approfondita di aspetti molecolari fondamentali per il trattamento di questa patologia e l'esplorazione di innovative procedure terapeutiche.

12. Articolazione del progetto e tempi di realizzazione:

Il progetto è strutturato in quattro workpackages (WPs).

WP1. Realizzazione di una banca-dati del carcinoma mammario triple-negative (0-6 mesi, Unità I - Oncologia Medica ASL8 CA; Unità II - CRS4 Cagliari) (Collaboratori: Massimiliano Cosso, Shardna, Pula) Si prevede di realizzare: i) un sistema informatico e di una banca-dati per la memorizzazione di informazioni relative ai carcinomi mammari e ii) gli strumenti applicativi per la gestione e l'elaborazione dei dati. Le informazioni da archiviare comprendono, a titolo non esaustivo: i) i dati anagrafici, dati clinici, anamnestici e familiari dei soggetti affetti e, relativamente ai corrispondenti campioni tumorali, ii) i dati istologici, immunofenotipici e molecolari. Si deve prevedere inoltre lo sviluppo di un software web-based che consenta il trattamento dei dati a distanza come supporto per ulteriori studi sui carcinomi mammari. Al



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA**

fine di gestire i dati anagrafici, anamnestici, clinici, istologici, immunofenotipici e molecolari si prevede di estendere e personalizzare un “framework” già sviluppato per la gestione di dati inerenti studi di popolazioni isolate geneticamente. Le categorie di utenti del sistema sono relative alla diversa tipologia di persone coinvolte nel progetto. Data la natura multidisciplinare del progetto si possono individuare varie figure con diversi profili: amministratori del sistema, medici, biologi, genetisti, epidemiologi. Il flusso operativo prevede che l’amministratore gestisca tutte le operazioni di configurazione del sistema, gestione delle utenze, gestione dei livelli di accesso delle utenze, configurazione sull’accessibilità dei dati. I dati memorizzati nel sistema almeno nella fase iniziale, verranno inseriti tramite una migrazione di dati già esistenti. Per ciò che riguarda i nuovi dati da memorizzare si dovrà procedere all’inserimento di cartelle elettroniche sviluppate ad hoc. Una volta completato l’inserimento dei dati, dovrà essere possibile indagare e selezionare i dati raccolti in modo da costituire “dataset” dedicati per successive analisi statistiche o la selezione di coorti di casi. Si prevede che il sistema sarà suddiviso in due parti:

- gestione amministrativa (back-end); gli utenti di questa parte del sistema sono gli amministratori, che avranno a disposizione un insieme di funzionalità: ○ gestione utenti (creazione di utenti; modifica degli utenti; cancellazione degli utenti); ○ configurazione accessibilità dei dati (definizione dei gruppi e/o dei campi che potranno essere estrapolati dal database);
- consultazione e scarico dati (front-end); gli utenti di questa parte del sistema sono i medici, biologi che avranno a disposizione le seguenti funzionalità: ○ accesso al servizio tramite password personalizzabile; ○ interrogazione della banca-dati per selezionare campioni che corrispondono a criteri preselezionati; ○ elaborazione dei dati estrapolati per la creazione di dataset; ○ salvataggio dei dataset per una successiva analisi statistica dei dati. Il database prevederà campi relativi alle seguenti tipologie di dati: dati anagrafici, misure antropometriche, dati fisiologici, anatomopatologici e clinici (terapia e follow up).

WP2. Revisione della casistica regionale e selezione immunofenotipica dei TBNC (0-18 mesi, Unità III – Anatomia Patologica ASL8, Cagliari; Unità IV – Anatomia Patologica AOU Sassari; Unità V – Anatomia Patologica ASL 3 Nuoro)

WP2.1 Revisione della casistica regionale. Contemporaneamente allo sviluppo dello strumento informatico e della banca-dati descritta in WP1 si procederà al recupero di tutti i casi di carcinoma mammario triple-negative diagnosticati presso i Servizi di Anatomia Patologica di Sassari, Nuoro, Oristano e Cagliari tra il 2000 ed il 2009, comprensivi delle casistiche provenienti dai Reparti di Chirurgia delle Province di Sassari, Olbia, Nuoro, Lanusei, Oristano, Cagliari. Tutti i casi saranno rivalutati dal punto di vista morfologico da patologi con comprovata esperienza delle rispettive Unità di appartenenza, con la definizione dei principali parametri istologici, quali l’istotipo; il grado secondo Elston and Ellis, valutando la formazione di tubuli, l’indice mitotico e il pleomorfismo nucleare; la presenza di necrosi e/o di sclerosi intratumorale; la presenza di componente infiammatoria linfocitaria e plasmacellulare intratumorale; la presenza di emboli neoplastici alla periferia del tumore; la crescita espansiva o infiltrativa della neoplasia. Tutti i dati relativi ai casi presi in esame saranno immessi nella base dati sviluppata in WP1.

WP2.2 Selezione immuno-fenotipica dei tumori mammari TNBC. La valutazione del biofenotipo triple negative prenderà in considerazione l’espressione immunoistochimica dei recettori Estrogenici (ER) e progestinici (PgR) e lo stato di HER2, valutandone l’espressione immunoistochimica. Si procederà quindi alla selezione dei casi triple negative da inserire nello studio e al recupero dei dati anagrafici, dei dati anamnestici personali e familiari, dei dati clinici - comprensivi del tipo di trattamento effettuato e del follow-up - con la collaborazione dei Servizi di Oncologia del territorio delle Province di appartenenza. Contemporaneamente alla selezione dei casi si procederà alla scelta dei preparati rappresentativi delle neoplasie in esame e all’esecuzione delle indagini immunoistochimiche per l’analisi del fenotipo basal-like



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA**

con l'utilizzo di anticorpi verso CK5/6, CK14, CK17, CK34bE12, p53, p63, P-cadherin, vimentina, topoisomerasi II-alfa, p16INK4 e verso i recettori androgenici. L'analisi immunoistochimica sarà inoltre applicata alla valutazione dell'espressione della proteina CD117 (c-kit) e dei recettori di fattori di crescita epidermico (EGFR), endoteliale vascolare (VEGFR), derivato dalle piastrine (PDGFR alfa e beta) ed insulina-simile (IGFR). L'analisi dell'aumento di copie geniche (amplificazione genica) di EGFR sarà eseguita con metodiche di ibridazione in situ a fluorescenza (FISH).

WP3. Stratificazione e caratterizzazione molecolare dei TNBC (6-24 mesi, Unità I - Oncologia Medica ASL8 Cagliari; Unità II - CRS4 Cagliari). (Collaboratori: Ignazio Piras, Shardna, Pula)

WP3.1 Analisi genomica dei TNBCs. L'obiettivo è di eseguire una sistematica analisi "genome-wide" sul DNA genomico dei campioni di TNBCs per l'identificazione delle variazioni genetiche delle sequenze codificanti e non-codificanti del genoma umano associate con il tumore [10]. L'analisi genomica comprenderà lo studio di alterazioni genetiche fini, quali le amplificazioni geniche (Copy Number Variation) e le microdelezioni sui campioni tumorali e sui relativi controlli di tessuto normale. Per l'analisi delle microdelezioni e delle Copy Number Variation (CNV) saranno analizzati chip ad alta densità di SNP (Affymetrix Human Genome-Wide SNP Array 6.0). In particolare, i dati ottenuti dalla piattaforma Affymetrix SNP 6.0, dopo normalizzazione e calcolo del rapporto campione vs riferimento, saranno impiegati per l'identificazione di regioni amplificate, delete o invariate. Tale analisi permetterà di studiare le regioni con delezioni omozigoti e le microdelezioni eterozigoti. Queste analisi verranno condotte sui tessuti patologici dei pazienti e sui relativi controlli di tessuto normale. Per identificare le microdelezioni i dati di SNP verranno normalizzati ed assemblati nell'architettura genomica utilizzando il software Chromosome Browser. Questo approccio è già stato utilizzato e validato nel rilevare microdelezioni omozigoti ed eterozigoti in campioni tumorali [11]. L'analisi statistica del genome wide scan per le CNV sarà eseguito importando i file CEL (cell intensity) all'interno pacchetto Partek Genomics Suite. WP3.2 Generazione ed analisi dei profili d'espressione genica dei TNBCs. Lo studio mediante microarray dei profili genomici e di espressione genica fornirà la possibilità di studiare in modo completo ed integrato il genoma e trascrittoma di questi tumori. Gli esperimenti verranno condotti utilizzando gli Affymetrix GeneChip arrays (Arrays 1.0 ed Exon) che permettono di eseguire contemporaneamente analisi dei livelli di espressione genica, della presenza di trascritti con splicing alternativi e di trascritti non-codificanti. I metodi di analisi includeranno Welch t-test, SAM (Significance Analysis of Microarrays) e DESeq (Differential Expression via Distance Summary) e i software Bioconductor e EDGE. Per identificare le pathway differenzialmente espresse nei diversi sottotipi tumorali verranno utilizzate procedure bioinformatiche come Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), SAM-GS (gene set extension to SAM), Iterative Group Analysis, e PLAGE. Saranno inoltre utilizzati anche database che permettono di interpretare in modo funzionale le "gene signatures" come per esempio Kegg e MSigDB. Particolare attenzione verrà anche data all'identificazione di associazioni tra le alterazioni genetiche e l'espressione genica. Mediante l'applicazione di modelli di regressione lineare sarà possibile identificare a) trascritti la cui espressione è positivamente correlata al numero di copie del relativo gene, b) siti di regolazioni all'interno di CNVs (espressione alterata in prossimità di CNV), c) hot-spots CNV (regioni che influenzano l'espressione di un elevato numero di geni). I dati ottenuti, attraverso un'approfondita analisi bioinformatica permetteranno di individuare possibili nuovi marcatori molecolari caratterizzanti specifiche sottoclassi di TNBC in relazione a categorie cliniche e prognostiche. Inoltre questi marcatori permetteranno di stratificare molecularmente i nuovi tumori TNBC che giungeranno ai centri regionali di Cagliari, Sassari e Nuoro e dal cui "tessuto fresco" verranno isolate le linee cellulari primarie da utilizzare nel WP4.

WP4. Screening di molecole attive sul sistema ubiquitina-proteasoma in TNBC. (12-36 mesi, Unità I- ASL 8 Cagliari; Unità III - Anatomia Patologica ASL8, Cagliari; Unità II - CRS4. Collaboratori: Prof. Mario Salmons, Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri, Milano;



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA**

Prof. Paolo Cascio, Dipartimento Morfofisiologia Veterinaria Università di Torino; Prof. Stefano Moro, Dipartimento di Scienze del Farmaco, Università degli Studi di Padova).

Questo WP prevede lo studio e la valutazione dell'efficacia - in colture cellulari di carcinomi mammari - di un trattamento con nuovi inibitori dell'attività del proteasoma, singolarmente ed in combinazione con molecole in grado di danneggiare il DNA (DNA damage-inducing agents). Ci si attende che gli inibitori del proteasoma, come il bortezomib (che funge da riferimento per i nostri studi), sensibilizzino le cellule trattate all'effetto degli agenti danneggianti il DNA. Lo studio dell'efficacia in vitro dell'utilizzo combinato di questi due approcci farmacologici per bersagliare sia il DNA che il proteasoma delle cellule neoplastiche, sarà preliminare alla progettazione razionale di strategie terapeutiche per migliorare la terapia di questi tumori.

WP4.1 Studio della funzionalità del proteasoma in colture primarie di TNBC. In una prima fase verrà monitorata la funzionalità del proteasoma di cellule di TNBC rispetto a cellule di tipo epiteliale normali di riferimento tramite l'utilizzo di un peptide fluorogenico [4] messo a punto nei nostri laboratori (TAT-EDANS-DABCYL, o TED), che permette la determinazione diretta della efficienza del proteasoma in cellule vive usando la microscopia a fluorescenza e la citometria a flusso. La realizzazione di questa fase richiederà 6 mesi.

WP4.2 Screening "in-silico" di specifici inibitori dell'attività proteasomale. Il passaggio successivo consisterà nello screening "in-silico" di nuovi potenziali inibitori del proteasoma. La progettazione razionale, guidata da strumenti computazionali di modellistica molecolare, consisterà nel selezionare le molecole più promettenti da una grande libreria virtuale di composti chimici commerciali. Verranno adottate metodiche structure-based come il docking ligando-proteina e peptide-proteina, e verranno generate ipotesi farmacoforiche per i siti attivi del proteasoma, al fine di progettare sia nuovi peptidi in grado di legare selettivamente i siti attivi, sia di identificare piccole molecole (peptidomimetici) in grado di svolgere una inibizione selettiva.

WP4.3 Sintesi e verifica biochimica dell'attività inibitoria sul proteasoma delle molecole identificate. Al termine della selezione "in-silico", la cui esecuzione richiederà 6 mesi, un numero ristretto di candidati peptidici potenzialmente attivi verranno sintetizzati e testati sperimentalmente. In particolare sintetizzeremo attraverso la metodica della sintesi in fase solida (SPPS) dei peptidomimetici che mimano il peptide naturale ma che presentano un miglior profilo farmacologico. La reale attività inibitoria di tali composti verrà testata inizialmente biochimicamente mediante tecniche spettrofluorimetriche che si basano sull'utilizzo di proteasoma 26S altamente purificato e di peptidi fluorogenici specifici per le principali attività peptidasiche proteasomali. In seguito, per visualizzare mediante tecniche di fluorescenza l'ingresso e l'attività di questi peptidi nelle cellule tumorali, costruiremo dei peptidi che sfruttano una tecnica di imaging basata sulla fluorescenza, la FRET. L'approccio utilizzato per studiare la capacità delle nostre molecole di entrare in cellule intatte è stato descritto in dettaglio in uno dei nostri lavori [4].

WP4.4 Valutazione in colture cellulari di TNBCs dell'attività inibitoria sul proteasoma delle molecole candidato. Si prevede di verificare l'attività funzionale del proteasoma in colture cellulari di TNBCs in presenza delle molecole candidato selezionate precedentemente ed in riferimento a noti inibitori del sistema UPS, quali il bortezomib, la lactacistina e l'MG132. L'attività proteasomiale sarà valutata in vitro mediante l'utilizzo di specifici peptidi fluorogenici. A tale scopo aliquote di estratto cellulare verranno incubate in presenza di peptidi fluorogenici specifici per le varie attività peptidasiche di questi enzimi. In queste condizioni gli enzimi idrolizzano il peptide fluorogenico utilizzato e liberano un gruppo fluorescente (AMC, aminometilcumarina) il cui accumulo (proporzionale all'attività dell'enzima) può essere monitorato utilizzando uno spettrofluorimetro. L'attività proteasomiale sarà inoltre valutata nelle cellule vitali attraverso l'uso di peptidi innovativi, internamente "quencherati". Entrambe le analisi, in vitro ed in vivo verranno effettuate in presenza ed in assenza di inibitori del proteosoma, sia da noi identificati che di riferimento.

WP4.5 Valutazione dell'attività



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA

pro-apoptotica dei candidati inibitori del proteasoma selezionati e in combinazione con i "DNA-damaging agents" in colture cellulari primari di TNBCs. La citossicità indotta dalle molecole sintetizzate verrà valutata attraverso il test MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma). Tra gli agenti DNA damage-inducing, si utilizzeranno tre DNA-damaging agents, ovvero doxorubicin, cyclophosphamide, e una combinazione di carboplatino ed un inibitore della poly-ADP-ribose-polymerase-1 (PARP1).

Bibliografia:

- [1] Gallastegui and Groll, Trends Biochem Sci. 2010 Nov;35(11):634-42.
- [2] Sato et al, BMC Biochemistry 2008, 9(Suppl 1).
- [3] Orłowski and Dees, Breast Cancer Res. 2003; 5(1): 1-7.
- [4] Urru et al, J Med Chem. 2010 Oct 28;53(20):7452-60.
- [5] Berrada et al, Ann Oncol. 2010 Oct;21 Suppl 7:vii30-vii35.
- [6] Shakya et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 May 13; 105(19): 7040-7045.
- [7] Cenci S. et al. The EMBO Journal, 2006, 25: 1104-13.
- [8] Cascio P. et al. European Journal of Immunology, 2008, 38: 658-667.
- [9] Burdis and Samson, Chem. Res. Toxicol., 2007, 20 (12), pp 1843-1853.
- [10] An et al, Cell Death Differ 1998 , 5:1062-1075.
- [11] Lopes et al, J Biol Chem 1997 , 272:12893-12896.

13. Ruolo di ciascuna unità operativa in funzione degli obiettivi previsti e relative modalità di integrazione e collaborazione:

Unità Operativa I (ASL8 – Cagliari)

L'U.O. I - Oncologia Medica di Cagliari avrà la responsabilità di coordinare l'intero progetto, e supervisionerà in particolare le fasi di creazione della banca dati per l'analisi integrata dei dati clinici, istopatologici e molecolari di un larga coorte di campioni di carcinoma mammario di varie aree della Sardegna (orientativamente circa il 90% dei casi visti in Regione).

Si occuperà delle funzioni di collegamento e dell'organizzazione degli incontri periodici del gruppo di studio, e di eventuali convegni scientifici.

In collaborazione con l'U.O. II e con le altre UU.OO. parteciperà alla elaborazione ed alla interpretazione dei dati.

Avrà inoltre il compito di inserire nello studio i pazienti, e, contemporaneamente, del recupero dei dati anagrafici, dei dati anamnestici personali e familiari, dei dati clinici, comprensivi del tipo di trattamento effettuato, e del follow-up, relativamente alla casistica osservata presso l'Ospedale A. Businco di Cagliari.

Specificamente all'allestimento della banca-dati per la memorizzazione di informazioni relative ai carcinomi mammari e degli strumenti applicativi per la gestione e l'elaborazione dei dati l'Unità Operativa I si avvarrà della prestazione di terzi con maturata esperienza e competenza nel settore.

L'Unità Operativa I inoltre coordinerà gli studi e le analisi relative allo studio dell'assetto genomico e trascrizionale dei TNBCs ed anche per queste attività si avvarrà, per gli aspetti tecnico-sperimentali, di competenze esterne all'unità.

Ruolo Unità II - CRS4

1) Allestimento di una banca dati per l'analisi integrata di dati clinici, immunofenotipici e molecolari di un larga coorte di campioni tumorali della mammella della Sardegna. Questo passaggio verrà portato a termine dai collaboratori di SharDNA.

2) Selezione di un campione omogeneo di tumori mammari triple-negative (forme neoplastiche negative per i recettori estrogenici, progestinici e per il fattore di crescita epidermico di tipo2) (Triple Negative Breast Cancers - TNBCs).

3) Progettazione in silico: un numero ristretto di peptidi potenzialmente attivi verranno



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA**

sintetizzati e testati sperimentalmente sia per la capacità di inibire la funzionalità del proteasoma in vitro (mediante tecniche spettrofluorimetriche che si basano sull'utilizzo di proteasoma 26S altamente purificato e di specifici peptidi fluorogenici) ed in vivo (utilizzando un innovativo peptide fluorogenico recentemente sviluppato da uno dei proponenti: TAT-EDANS-DABCYL, o TED), sia per la capacità di indurre danno sulle cellule tumorali in combinazione con i DNA-damaging agents.

4) Screening di molecole in due fasi successive i) "screening virtuale" (sia "ligand based" che "structure based") per l'identificazione e la valutazione biologica di nuovi inibitori del proteasoma 26S; ii) validazione biochimica e biologica su un campione rappresentativo di tumori TBNC selezionati in OR3 utilizzando l'innovativo peptide fluorogenico (TAT-EDANS-DABCYL, o TED) [4], che permette la determinazione diretta della efficienza del proteasoma in cellule vitali.

Gli ultimi due obiettivi verranno raggiunti con l'ausilio e il supporto di unità di ricerca nazionali altamente qualificate (Istituto Mario Negri, Università di Torino e Università di Padova).

L'Unità Operativa di Cagliari procederà al recupero di tutti i casi di carcinoma mammario Triple Negative diagnosticati presso il Servizio di Anatomia Patologica di Cagliari, comprensivi anche delle casistiche provenienti dalla Provincia di Oristano e dall'Ospedale Brotzu, per il periodo 2000-2009. Tutti i casi saranno rivalutati criticamente dal responsabile dell'Unità, con la definizione dei principali parametri istologici, quali l'istotipo; il grado secondo Elston and Ellis, la presenza di necrosi e/o di sclerosi intratumorale; la presenza di componente infiammatoria linfocitaria e plasmacellulare intratumorale; la presenza di emboli neoplastici alla periferia del tumore; la crescita espansiva o infiltrativa della neoplasia.

I casi che presenteranno particolari difficoltà diagnostiche saranno rivalutati in seduta comune con i patologi afferenti alle altre Unità Operative al microscopio a testata multipla, fino al raggiungimento di una diagnosi condivisa.

Tutti i dati relativi alla casistica oggetto dello studio saranno immessi nella base dati sviluppata in WP1.

La valutazione del biofenotipo triple negative prenderà in considerazione l'espressione immunoistochimica dei recettori estrogenici (ER) e progestinici (PgR) e lo stato di HER2, valutando l'espressione immunoistochimica (Herceptest). Si procederà quindi alla selezione dei casi triple negative da inserire nello studio e, contemporaneamente, al recupero dei dati anagrafici, dei dati anamnestici personali e familiari, dei dati clinici, comprensivi del tipo di trattamento effettuato, e del follow-up, con la collaborazione dell'Oncologia dell'ASL8 di Cagliari. Contemporaneamente alla selezione dei casi si procederà alla scelta dei preparati rappresentativi della neoplasia e alla esecuzione delle indagini immunoistochimiche per l'analisi del fenotipo basal-like con l'utilizzo di anticorpi verso CK5/6, CK14, CK17, CK34bE12, p53, p63, vimentina, e verso i recettori androgenici.

I dati ottenuti dalla valutazione immunofenotipica saranno anch'essi inseriti nell'apposito data base creato in WP1.

L'esecuzione delle indagini immunoistochimiche sarà effettuata utilizzando anticorpi monoclonali o policlonali specifici contro le molecole sopra elencate e gli antigeni verranno messi in evidenza seguendo i protocolli consigliati dai produttori dei kits. Saranno simultaneamente eseguite analisi su adeguati controlli positivi e negativi. Le immunoreazioni saranno sviluppate mediante un sistema altamente sensibile che non utilizza biotina per prevenire le possibili reazioni falso-positive legate alla presenza di biotina endogena nel tessuto. Per ogni caso saranno eseguite analisi semiquantitative con valutazione dell'intensità di colorazione, della percentuale di cellule neoplastiche immunoreattive e della localizzazione subcellulare. L'estensione dell'immunocolorazione sarà classificata come focale (<10% di cellule neoplastiche immunoreattive), moderata (da 10-50% di cellule neoplastiche immunoreattive) e diffusa (> 50% di cellule neoplastiche immunoreattive).



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA**

Da blocchetti rappresentativi del tessuto neoplastico e dal tessuto mammario non neoplastico saranno inoltre allestite sezioni in paraffina dello spessore di 10-20 µm, per le indagini genetico-molecolari descritte nel WP3. Specificamente, il blocchetto neoplastico selezionato dovrà garantire la presenza di cellule neoplastiche per almeno l'80% del tessuto presente, evitando componenti necrotiche particolarmente ampie e, quando le caratteristiche morfologiche lo consentano, la presenza di marcato infiltrato linfocitario associato. Nei casi in cui siano presenti limitazioni alla quantità relativa di cellule neoplastiche per il campione da analizzare, sarà opportuno selezionare ulteriormente il tessuto neoplastico con tecniche di microdissezione manuale.

Unità Operativa IV – AOU Sassari

L'Unità Operativa di Sassari procederà al recupero di tutti i casi di carcinoma mammario Triple Negative diagnosticati presso il Servizio di Anatomia Patologica di Sassari, comprensivi anche delle casistiche provenienti dalla Provincia di Olbia-Tempio, per il periodo 2000-2009. L'Unità effettuerà le medesime indagini, seguendo le medesime procedure dell'U.O. III di Cagliari. In aggiunta l'analisi immunoistochimica sarà inoltre applicata alla valutazione dell'espressione di recettori di fattori di crescita. In particolare, si intende analizzare l'espressione del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR), del recettore del fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGFR), del recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGFR-alfa e beta), del recettore del fattore di crescita insulina-simile (IGFR), della proteina CD117 (c-kit). Tali indagini saranno eseguite presso la nostra Unità, sia dai campioni locali precedentemente selezionati, sia da sezioni in bianco allestite dai campioni neoplastici selezionati presso le Unità Operative III e V.

I dati ottenuti dalla valutazione immunofenotipica saranno anch'essi inseriti nell'apposito data base creato in WP1.

L'esecuzione delle indagini immunoistochimiche sarà effettuata utilizzando anticorpi monoclonali o policlonali specifici contro le molecole sopra elencate e gli antigeni verranno messi in evidenza seguendo i protocolli consigliati dai produttori dei kits. Saranno simultaneamente eseguite analisi su adeguati controlli positivi e negativi. Le immunoreazioni saranno sviluppate mediante un sistema altamente sensibile che non utilizza biotina per prevenire le possibili reazioni falso-positive legate alla presenza di biotina endogena nel tessuto. Per ogni caso saranno eseguite analisi semiquantitative con valutazione dell'intensità di colorazione, della percentuale di cellule neoplastiche immunoreattive e della localizzazione subcellulare. L'estensione dell'immunocolorazione sarà classificata come focale (<10% di cellule neoplastiche immunoreattive), moderata (da 10-50% di cellule neoplastiche immunoreattive) e diffusa (> 50% di cellule neoplastiche immunoreattive).

L'analisi dell'amplificazione genica di EGFR sarà eseguita con metodiche di ibridazione in situ a fluorescenza (FISH), su sezioni allestite dai campioni selezionati presso la nostra Unità e su sezioni in bianco da campioni neoplastici provenienti dalle Unità Operative I e IV.

In breve, Le sezioni in paraffina saranno sottoposte alle procedure di deparaffinizzazione e successiva digestione enzimatica utilizzando una soluzione di pepsina. Per l'ibridazione, sarà utilizzata una sonda Dual Color FISH (Vysis) costituita da una miscela di due sonde complementari a DNA marcate con sostanze fluorescenti: una che identifica l'intero gene del recettore per il fattore di crescita epidermico (Spectrum Orange®), l'altra che ibridizza il DNA satellite localizzato in corrispondenza del centromero del cromosoma 7 (Spectrum Green®). Su ogni sezione saranno applicati circa 5 µl della miscela in condizioni di ridotta illuminazione e le sezioni saranno coperte con copri-oggetto che sigillato accuratamente con del mastice. Si procederà quindi alla denaturazione ed ibridazione, ottenute mediante l'utilizzo di una camera umida termostata e temporizzata, incubando le sezioni a 75°C per 10 minuti e riportandole a 37°C overnight. A questo punto dopo rimozione del coprioggetto e sempre in condizioni di



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA**

illuminazione minima, eseguiremo diversi lavaggi post-ibridazione. Sulle sezioni, sarà successivamente applicato un substrato cromogeno fluorescente per il contrasto nucleare, il 4,5-diamino-2-fenil-indolo (DAPI), e il copri-oggetto, sigillandolo con smalto per unghie. I vetrini saranno esaminati utilizzando un microscopio a fluorescenza Olympus dotato di filtri selettivi per il DAPI e per i segnali Spectrum Green e Spectrum Orange.

Il metodo di analisi consisterà per ogni vetrino nella valutazione di almeno 60 nuclei neoplastici ad ingrandimento di 100X. Per ciascuna neoplasia saranno contati sia i segnali verdi indicanti il segnale centromerico, sia i segnali rossi della sonda locus specifica, per ciascun nucleo. Nuclei sovrapposti e nuclei con segnale incerto non saranno inclusi nella conta. Una volta effettuata la conta, sarà calcolata per ciascun tumore la media del numero dei segnali verdi e rossi e la ratio tra le due medie; la reazione sarà considerata amplificata per valori di ratio superiori a 2, come già applicato routinariamente alla valutazione dell'amplificazione di Her2 nel carcinoma della mammella.

Da blocchetti rappresentativi del tessuto neoplastico e dal tessuto mammario non neoplastico saranno inoltre allestite sezioni in paraffina dello spessore di 10-20 µm, per le indagini genetico-molecolari descritte nel WP3. Specificamente, il blocchetto neoplastico selezionato dovrà garantire la presenza di cellule neoplastiche per almeno l'80% del tessuto presente, evitando componenti necrotiche particolarmente ampie e, quando le caratteristiche morfologiche lo consentano, la presenza di marcato infiltrato linfocitario associato. Nei casi in cui siano presenti limitazioni alla quantità relativa di cellule neoplastiche per il campione da analizzare, sarà opportuno selezionare ulteriormente il tessuto neoplastico con tecniche di microdissezione manuale.

Unità Operativa V – ASL3 Nuoro

L'Unità Operativa di Nuoro, così come le altre Unità Operative di Anatomia Patologica, procederà al recupero della casistica dei carcinomi mammari Triple Negative diagnosticati presso il Servizio di Anatomia Patologica dell'Ospedale San Francesco, comprensivi anche delle casistiche provenienti dalla Provincia dell'Ogliastra, per il periodo 2000-2009. L'Unità effettuerà le medesime indagini, seguendo le medesime procedure dell'U.O. III di Cagliari. In aggiunta l'analisi immunoistochimica sarà inoltre applicata alla valutazione p16INK4.

L'esecuzione delle indagini immunoistochimiche sarà effettuata utilizzando anticorpi monoclonali o policlonali specifici contro le molecole sopra elencate e gli antigeni verranno messi in evidenza seguendo i protocolli di smascheramento consigliati dai produttori. Saranno parallelamente eseguite analisi su adeguati controlli positivi e negativi. Le immunoreazioni saranno sviluppate mediante un sistema altamente sensibile che non utilizza biotina per prevenire le possibili reazioni falso-positive legate alla presenza di biotina endogena nel tessuto.

Dai campioni selezionati per le sopradescritte indagini saranno inoltre allestite sezioni in bianco su vetrini silanizzati per le specifiche indagini immunoistochimiche ed eventualmente di FISH eseguite dall'Unità Operativa III.

Da blocchetti rappresentativi del tessuto neoplastico e dal tessuto mammario non neoplastico saranno inoltre allestite sezioni in paraffina dello spessore di 10-20 µm, per le indagini genetico-molecolari descritte nel WP3. Specificamente, il blocchetto neoplastico selezionato dovrà garantire la presenza di cellule neoplastiche per almeno l'80% del tessuto presente, evitando componenti necrotiche particolarmente ampie e, quando le caratteristiche morfologiche lo consentano, la presenza di marcato infiltrato linfocitario associato. Nei casi in cui siano presenti limitazioni alla quantità relativa di cellule neoplastiche per il campione da analizzare, sarà opportuno selezionare ulteriormente il tessuto neoplastico con tecniche di microdissezione manuale.

14. Risultati attesi dalla ricerca, il loro interesse per l'avanzamento della conoscenza



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA

e le eventuali potenzialità applicative:

Risultati attesi (suddivisi per obiettivi realizzativi)

OR1: Il progetto è focalizzato sulle forme neoplastiche di carcinoma mammario triple-negative che sono caratterizzate da scarsa responsività alle comuni terapie e da un'incompleta identificazione dei fattori biologici che ne determinano lo sviluppo e la progressione. Un passaggio importante nella piena comprensione del processo patogenetico è l'approccio integrativo di dati eterogenei, che consiste nella raccolta in uno stesso database sia di dati fenotipici che di dati biologici. La successiva applicazione di strumenti statistici permette di comprendere il ruolo dei singoli geni, eventualmente di nuovi marcatori, la scelta di sottopopolazioni, ed altre operazioni tipiche della ricerca bioinformatica ed oncologica. Il punto di partenza è pertanto la predisposizione di uno strumento informatico per la raccolta dei dati. Al fine di gestire i dati anagrafici, anamnestici, clinici, istologici, immunofenotipici e molecolari di carcinomi mammari triple-negative, si prevede di estendere e personalizzare un "framework" già sviluppato per la gestione di dati inerenti studi di popolazioni isolate geneticamente. Il risultato sarà un database affiancato da strumenti avanzati di ricerca da mettere a disposizione di diverse figure come medici, biologi, genetisti ed epidemiologi. Una volta costituita, la base di dati sarà uno strumento prezioso ed unico per le successive analisi statistiche o per la selezione di coorti di casi.

OR2 e OR3: La simultanea cernita di tutti i casi di carcinoma mammario triple-negative diagnosticati presso i Servizi di Anatomia Patologica di Sassari, Nuoro, Oristano e Cagliari, permetterà di registrare su supporto informatico tutta una serie di informazioni eterogenee quali i dati anagrafici dei pazienti, i principali parametri istologici (tra cui ad esempio il grado secondo Elston and Ellis, l'indice mitotico e il pleomorfismo nucleare), i valori di espressione dei recettori Estrogenici (ER) e progestinici (PgR) e lo stato di HER2, i risultati delle analisi immunoistochimiche ottenute tramite anticorpi come quelli p53-specifici.

Ad esempio, una analisi bioinformatica dei dati ottenuti permetterà di individuare possibili nuovi marcatori molecolari caratterizzanti specifiche sottoclassi di TNBC in relazione a categorie cliniche e prognostiche.

OR4: In ultima analisi, la valutazione dell'efficacia di un trattamento combinato che consiste nel provocare la inibizione del proteasoma in cellule di tumore triplo-negativo (TNBCs) e nell'utilizzare contestualmente molecole in grado di danneggiare il DNA (DNA damage-inducing agents), ci permetterà di verificare una nuova ipotesi terapeutica (ci si attende infatti che gli inibitori del proteasoma sensibilizzino le cellule trattate all'effetto degli agenti danneggianti il DNA) ed insieme di incrociare l'efficacia dei trattamenti proposti con il biofenotipo registrato nella base di dati.

Rilevanza e potenzialità applicativa

Riteniamo che il progetto abbia una ricaduta in primis per la Sanità Regionale - in quanto la informatizzazione di dati di rilevanza clinica sui casi di carcinoma mammario triplo-negativo e la loro integrazione con dati biologici costituiranno negli anni uno strumento utile non solo per la ricerca in oggetto ma anche per altre ricerche nel campo oncologico in cui vi sia una componente di data-mining e ci si attende anche una ricaduta generale causata dal miglioramento delle conoscenze sul tumore al seno triplo-negativo e dalla analisi di possibili nuove strategie terapeutiche.

Valorizzazione dei risultati

In conclusione, ci si attende che lo sviluppo e la realizzazione di questo progetto di ricerca possano contribuire in maniera significativa ad un importante miglioramento della conoscenza della patogenesi del tumore al seno triplo-negativo, e ad un incremento dello spettro dei bersagli molecolari.



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA

Tenendo conto di tutti questi aspetti, differenti attività specifiche possono essere condotte per massimizzare lo sfruttamento risultato dei dati, sia generando risultati o procedure brevettabili, sia rendendo pubblici i risultati attraverso la loro pubblicazione in riviste scientifiche appropriate.

15. Elementi e criteri proposti per la verifica dei risultati raggiunti:

Gli elementi principali per verificare il raggiungimento degli obiettivi proposti sono i seguenti:

1-Creazione di un database contenente i casi di tumore alla mammella triple-negative per il periodo 2000-2009.

La creazione di un database risulterà fondamentale per poter integrare i dati clinici, immunofenotipici e molecolari di un elevato numero di campioni di carcinoma mammario, derivanti dalle varie unità sanitarie della Sardegna.

Questa dettagliata analisi retrospettiva consentirà di verificare l'incidenza di queste varianti nel territorio regionale, di incrementare le conoscenze sulla biologia di queste neoplasie, di correlare gli aspetti morfologici di queste neoplasie alle alterazioni molecolari riconosciute, di identificare possibili indicatori prognostici e di risposta a terapie mirate di tipo molecolare.

La qualità del database e della sua composizione potrà essere valutata secondo parametri di fruibilità e parametri scientifici, come la facilità di esecuzione di interrogazioni da parte di utenze non esperte, la facilità di esportazione dei dati risultanti dalle interrogazioni, e la possibilità di importare i dati in comuni software statistici, come R o anche Excel.

2- Selezione immunofenotipica e molecolare dei tumori mammari triplo negativi (TNBC). La necessità di rivedere criticamente la casistica da parte dei patologi delle varie unità operative, rappresenta un punto cruciale per il corretto svolgimento del progetto. La mancanza di studi di coorte paragonabili a quello che ci proponiamo di intraprendere ci spinge a valutare rigorosamente il biofenotipo dei campioni in esame e la selezione dei casi triplo negativi in associazione ai dati anagrafici, anamnestici, clinico patologici sia all'esordio che al follow-up.

3- Stratificazione e caratterizzazione molecolare dei TNBC

Un altro elemento di verifica del nostro studio consiste nel definire l'assetto genetico e il profilo trascrizionale di un gruppo di campioni di triplo negativi selezionati al punto due. Per attuare questo, utilizzeremo la piattaforma tecnologica Affymetrix e stratificheremo, mediante un'analisi bioinformatica, i campioni dal punto di vista molecolare.

4- Studi in silico e validazione in vitro di molecole attive sul sistema ubiquitina-proteasoma in TNBCs.

La valutazione del sistema ubiquitina proteasoma, implicato nella regolazione di vari e fondamentale per mantenere la corretta omeostasi nella cellula. Esso rappresenta un bersaglio di nuovi farmaci utilizzati per il trattamento di vari tumori.

Effettueremo uno screening di molecole che agiscano sul proteasoma in due fasi successive, una prima fase di "screening virtuale" (sia "ligand based" che "structure based") per l'identificazione e la valutazione biologica di nuovi inibitori del proteasoma 26S grazie all'utilizzo di specifici software per la modellistica molecolare e alla potenza di calcolo del CRS4; ed una seconda fase in cui questi composti verranno validati in vitro e in vivo su cellule derivanti da pazienti affette da tumori TNBC utilizzando un innovativo peptide fluorogenico, che permette la determinazione diretta della efficienza del proteasoma.

I nostri risultati saranno valutabili in termini dell'impatto che potranno avere in ambito sanitario



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA

regionale. La possibilità di avere finalmente un registro unico su base regionale della casistica di tumore al seno (con particolare attenzione al sottotipo triplo negativo) costituirà di per sé un importante elemento di valutazione, in quanto si avrà per la prima volta una risorsa di rilievo in questo settore per la Sanità regionale, sia per gli operatori che per i ricercatori. Saranno inoltre importanti le osservazioni sperimentali che trasmetteremo alla comunità scientifica attraverso pubblicazioni su importanti riviste.

16. Mesi persona complessivi indicativi previsti per il Progetto di Ricerca e Imputazione dei costi a carico del progetto

16a. Cofinanziamento (min. 20% - max. 40% del totale del progetto ad esclusione dei Contratti per giovani ricercatori)

Unità Operativa n.I

Cofinanziamento: (min.20% - max.40% del totale del progetto ad esclusione dei Contratti per giovani ricercatori)		Numero	Disponibilità temporale Indicativa prevista (Mesi persona)	Costi a carico del progetto (importo in euro)
Componenti della sede dell'Unità Operativa		3	9	€25000
Presenza di partner di altri Dipartimenti o Enti di Ricerca		0	0	€0,00
Titolari di borse	Dottorato ¹	0	0	€0,00
	Post-dottorato ¹	0	0	€0,00
	Scuola di Specializzazione ¹	0	0	€0,00
Cofinanziamento in denaro		-	-	€0
Totale		3	9,0	€25.000,00

⁽¹⁾Rientrano in questa categoria coloro che al momento della presentazione della domanda di finanziamento risultano essere già strutturati. Non devono essere inseriti in questa sezione le borse di ricerca per giovani ricercatori per le quali si richiede finanziamento; tali figure dovranno essere inserite nella schermata successiva.

Unità Operativa n.II

Cofinanziamento: (min.20% - max.40% del totale del progetto ad esclusione dei Contratti per giovani ricercatori)		Numero	Disponibilità temporale Indicativa prevista (Mesi persona)	Costi a carico del progetto (importo in euro)
Componenti della sede dell'Unità Operativa		1	4	€0,00
Presenza di partner di altri Dipartimenti o Enti di Ricerca		3	6	€0,00
Titolari di borse	Dottorato ¹	0	0	€0,00
	Post-dottorato ¹	0	0	€0,00
	Scuola di Specializzazione ¹	0	0	€0,00
Cofinanziamento in denaro		-	-	€0



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA

Totale	4	10,0	€0,00
---------------	---	------	-------

⁽¹⁾Rientrano in questa categoria coloro che al momento della presentazione della domanda di finanziamento risultano essere già strutturati. Non devono essere inseriti in questa sezione le borse di ricerca per giovani ricercatori per le quali si richiede finanziamento; tali figure dovranno essere inserite nella schermata successiva.

Unità Operativa n.III

Cofinanziamento: (min.20% - max.40% del totale del progetto ad esclusione dei Contratti per giovani ricercatori)		Numero	Disponibilità temporale Indicativa prevista (Mesi persona)	Costi a carico del progetto (importo in euro)
Componenti della sede dell'Unità Operativa		2	6	€18000
Presenza di partner di altri Dipartimenti o Enti di Ricerca		2	4	€12000
Titolari di borse	Dottorato ¹	0	0	€0,00
	Post-dottorato ¹	0	0	€0,00
	Scuola di Specializzazione ¹	0	0	€0,00
Cofinanziamento in denaro		-	-	€0
Totale		4	10,0	€30.000,00

⁽¹⁾Rientrano in questa categoria coloro che al momento della presentazione della domanda di finanziamento risultano essere già strutturati. Non devono essere inseriti in questa sezione le borse di ricerca per giovani ricercatori per le quali si richiede finanziamento; tali figure dovranno essere inserite nella schermata successiva.

Unità Operativa n.IV

Cofinanziamento: (min.20% - max.40% del totale del progetto ad esclusione dei Contratti per giovani ricercatori)		Numero	Disponibilità temporale Indicativa prevista (Mesi persona)	Costi a carico del progetto (importo in euro)
Componenti della sede dell'Unità Operativa		3	9	€25000
Presenza di partner di altri Dipartimenti o Enti di Ricerca		0	0	€0,00
Titolari di borse	Dottorato ¹	0	0	€0,00
	Post-dottorato ¹	0	0	€0,00
	Scuola di Specializzazione ¹	0	0	€0,00
Cofinanziamento in denaro		-	-	€0
Totale		3	9,0	€25.000,00

⁽¹⁾Rientrano in questa categoria coloro che al momento della presentazione della domanda di finanziamento risultano essere già strutturati. Non devono essere inseriti in questa sezione le borse di ricerca per giovani ricercatori per le quali si richiede finanziamento; tali figure dovranno essere inserite nella schermata successiva.



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA

REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA**Unità Operativa n.V**

Cofinanziamento: (min.20% - max.40% del totale del progetto ad esclusione dei Contratti per giovani ricercatori)		Numero	Disponibilità temporale Indicativa prevista (Mesi persona)	Costi a carico del progetto (importo in euro)
Componenti della sede dell'Unità Operativa		3	9	€20000
Presenza di partner di altri Dipartimenti o Enti di Ricerca		0	0	€0,00
Titolari di borse	Dottorato ¹	0	0	€0,00
	Post-dottorato ¹	0	0	€0,00
	Scuola di Specializzazione ¹	0	0	€0,00
Cofinanziamento in denaro		-	-	€0
Totale		3	9,0	€20.000,00

⁽¹⁾Rientrano in questa categoria coloro che al momento della presentazione della domanda di finanziamento risultano essere già strutturati. Non devono essere inseriti in questa sezione le borse di ricerca per giovani ricercatori per le quali si richiede finanziamento; tali figure dovranno essere inserite nella schermata successiva.

16b. Attivazione di contratti con giovani ricercatori e/o con ricercatori che hanno beneficiato del Master & Back**Unità Operativa n.I**

Attivazione di contratti con giovani ricercatori e/o con ricercatori che hanno beneficiato del Master & Back	Numero	Disponibilità temporale Indicativa prevista (Mesi Persona)	Costi a carico del progetto (importo in euro)
Assegnisti	0	0	€0,00
Borse di Dottorato	0	0	€0,00
Altre tipologie (Altre Borse, Contratti etc.)	1	11	€22800
Totale	1	11,0	€22.800,00

Unità Operativa n.II

Attivazione di contratti con giovani ricercatori e/o con ricercatori che hanno beneficiato del Master & Back	Numero	Disponibilità temporale Indicativa prevista (Mesi Persona)	Costi a carico del progetto (importo in euro)
Assegnisti	0	0	€0,00
Borse di Dottorato	0	0	€0,00
Altre tipologie (Altre Borse, Contratti etc.)	0	0	€0,00
Totale	0	0,0	€0,00



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA

REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA**Unità Operativa n.III**

Attivazione di contratti con giovani ricercatori e/o con ricercatori che hanno beneficiato del Master & Back	Numero	Disponibilità temporale Indicativa prevista (Mesi Persona)	Costi a carico del progetto (importo in euro)
Assegnisti	0	0	€0,00
Borse di Dottorato	0	0	€0,00
Altre tipologie (Altre Borse, Contratti etc.)	1	11	€22800
Totale	1	11,0	€22.800,00

Unità Operativa n.IV

Attivazione di contratti con giovani ricercatori e/o con ricercatori che hanno beneficiato del Master & Back	Numero	Disponibilità temporale Indicativa prevista (Mesi Persona)	Costi a carico del progetto (importo in euro)
Assegnisti	0	0	€0,00
Borse di Dottorato	0	0	€0,00
Altre tipologie (Altre Borse, Contratti etc.)	1	11	€22800
Totale	1	11,0	€22.800,00

Unità Operativa n.V

Attivazione di contratti con giovani ricercatori e/o con ricercatori che hanno beneficiato del Master & Back	Numero	Disponibilità temporale Indicativa prevista (Mesi Persona)	Costi a carico del progetto (importo in euro)
Assegnisti	0	0	€0,00
Borse di Dottorato	0	0	€0,00
Altre tipologie (Altre Borse, Contratti etc.)	0	0	€0,00
Totale	0	0,0	€0,00

17. Costo complessivo del progetto articolato per voci

Voce di spesa	Unità I	Unità II	Unità III	Unità IV	Unità V
Materiale inventariabile	€ 0,00	€ 0,00	€ 0,00	€ 0,00	€ 0
Strumentazioni, Attrezzature e Prodotti Software	€ 0,00	€ 0,00	€ 0,00	€ 0,00	€ 0,00
Materiale di consumo	€ 0,00	€ 0,00	€ 105500	€ 32.000,00	€ 16000
Spese di calcolo ed elaborazione dati	€ 20000	€ 0,00	€ 0,00	€ 0,00	€ 0
Spese di personale (min.20% - max.40% del totale del progetto ad	€ 25.000,00	€ 0,00	€ 30.000,00	€ 25.000,00	€ 20.000,00



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA

esclusione dei Contratti per giovani ricercatori)					
Contratti Giovani Ricercatori/Beneficiari Master & Back	€ 22.800,00	€ 0,00	€ 22.800,00	€ 22.800,00	€ 0,00
Servizi esterni	€ 90000	€ 0,00	€ 0,00	€ 0,00	€ 0,00
Missioni	€ 0,00	€ 0,00	€ 0,00	€ 0,00	€ 0,00
Pubblicazioni	€ 0,00	€ 0,00	€ 0,00	€ 0,00	€ 0,00
Partecipazione / Organizzazione convegni	€ 2100	€ 0,00	€ 2000	€ 2000	€ 2000
Altro (voce da utilizzare solo in caso di spese non riconducibili alle voci sopraindicate)	€ 0,00	€ 0,00	€ 0,00	€ 0,00	€ 0,00
Spese Generali (60% delle spese di personale Tab.16 a)*	€ 15000	€ 0,00	€ 18000	€ 15.000,00	€ 12000
Totale	€174.900,00	€0,00	€178.300,00	€96.800,00	€50.000,00

*L'importo della voce dovrà essere calcolato forfettariamente nella misura del 60% (sessanta per cento) dell'ammontare dei costi per il personale strutturato (Tab.16 a).

18. Prospetto finanziario suddiviso per Unità Operative

Voce di spesa	Unità I	Unità II	Unità III	Unità IV	Unità V
Costo complessivo	€ 174.900,00	€ 0,00	€ 178.300,00	€ 96.800,00	€ 50.000,00

Riepilogo importi progetto

A. L'importo totale del progetto è di: € 500.000,00

B. Il totale del cofinanziamento dell'Ente è di: € 100.000,00

C. Il totale dei contratti per giovani ricercatori e/o beneficiari Master and Back è di: € 68.400,00

D. Il contributo RAS per il progetto sarà al massimo di⁽¹⁾: € 400.000,00

⁽¹⁾ "La RAS si riserva - ove necessario [...] di riconoscere un'intensità di aiuto inferiore alle intensità massime di cui all'art.7 e, comunque non inferiore al 60% al fine di consentire la realizzazione dei progetti valutati positivamente. (Art.11 del Bando)"

Allegati

Non sono presenti allegati

Luogo e data:	Firma:



UNIONE EUROPEA



REPUBBLICA ITALIANA



**REGIONE AUTONOMA
DELLA SARDEGNA**

--	--