



Istituto Europeo di Oncologia S.r.l.

Bilancio d'esercizio al 31 dicembre 2022

Relazione della società di revisione indipendente
ai sensi dell'art. 14 del D. Lgs. 27 gennaio 2010, n. 39

Relazione della società di revisione indipendente ai sensi dell'art. 14 del D. Lgs. 27 gennaio 2010, n. 39

Ai Soci
dell'Istituto Europeo di Oncologia S.r.l.

Relazione sulla revisione contabile del bilancio d'esercizio

Giudizio

Abbiamo svolto la revisione contabile del bilancio d'esercizio dell'Istituto Europeo di Oncologia S.r.l. (la Società), costituito dallo stato patrimoniale al 31 dicembre 2022, dal conto economico e dal rendiconto finanziario per l'esercizio chiuso a tale data e dalla nota integrativa.

A nostro giudizio, il bilancio d'esercizio fornisce una rappresentazione veritiera e corretta della situazione patrimoniale e finanziaria della Società al 31 dicembre 2022, del risultato economico e dei flussi di cassa per l'esercizio chiuso a tale data, in conformità alle norme italiane che ne disciplinano i criteri di redazione.

Elementi alla base del giudizio

Abbiamo svolto la revisione contabile in conformità ai principi di revisione internazionali (ISA Italia). Le nostre responsabilità ai sensi di tali principi sono ulteriormente descritte nella sezione *Responsabilità della società di revisione per la revisione contabile del bilancio d'esercizio* della presente relazione. Siamo indipendenti rispetto alla Società in conformità alle norme e ai principi in materia di etica e di indipendenza applicabili nell'ordinamento italiano alla revisione contabile del bilancio. Riteniamo di aver acquisito elementi probativi sufficienti ed appropriati su cui basare il nostro giudizio.

Responsabilità degli amministratori e del collegio sindacale per il bilancio d'esercizio

Gli amministratori sono responsabili per la redazione del bilancio d'esercizio che fornisca una rappresentazione veritiera e corretta in conformità alle norme italiane che ne disciplinano i criteri di redazione e, nei termini previsti dalla legge, per quella parte del controllo interno dagli stessi ritenuta necessaria per consentire la redazione di un bilancio che non contenga errori significativi dovuti a frodi o a comportamenti o eventi non intenzionali.

Gli amministratori sono responsabili per la valutazione della capacità della Società di continuare ad operare come un'entità in funzionamento e, nella redazione del bilancio d'esercizio, per l'appropriatezza dell'utilizzo del presupposto della continuità aziendale, nonché per una adeguata informativa in materia. Gli amministratori utilizzano il presupposto della continuità aziendale nella redazione del bilancio d'esercizio a meno che abbiano valutato che sussistono le condizioni per la liquidazione della Società o per l'interruzione dell'attività o non abbiano alternative realistiche a tali scelte.

Il collegio sindacale ha la responsabilità della vigilanza, nei termini previsti dalla legge, sul processo di predisposizione dell'informativa finanziaria della Società.

Responsabilità della società di revisione per la revisione contabile del bilancio d'esercizio

I nostri obiettivi sono l'acquisizione di una ragionevole sicurezza che il bilancio d'esercizio nel suo complesso non contenga errori significativi, dovuti a frodi o a comportamenti o eventi non intenzionali, e l'emissione di una relazione di revisione che includa il nostro giudizio. Per ragionevole sicurezza si intende un livello elevato di sicurezza che tuttavia non fornisce la garanzia che una revisione contabile svolta in conformità ai principi di revisione internazionali (ISA Italia) individui sempre un errore significativo, qualora esistente. Gli errori possono derivare da frodi o da comportamenti o eventi non intenzionali e sono considerati significativi qualora ci si possa ragionevolmente attendere che essi, singolarmente o nel loro insieme, siano in grado di influenzare le decisioni economiche degli utilizzatori prese sulla base del bilancio d'esercizio.

Nell'ambito della revisione contabile svolta in conformità ai principi di revisione internazionali (ISA Italia), abbiamo esercitato il giudizio professionale e abbiamo mantenuto lo scetticismo professionale per tutta la durata della revisione contabile. Inoltre:

- abbiamo identificato e valutato i rischi di errori significativi nel bilancio d'esercizio, dovuti a frodi o a comportamenti o eventi non intenzionali; abbiamo definito e svolto procedure di revisione in risposta a tali rischi; abbiamo acquisito elementi probativi sufficienti ed appropriati su cui basare il nostro giudizio. Il rischio di non individuare un errore significativo dovuto a frodi è più elevato rispetto al rischio di non individuare un errore significativo derivante da comportamenti od eventi non intenzionali, poiché la frode può implicare l'esistenza di collusioni, falsificazioni, omissioni intenzionali, rappresentazioni fuorvianti o forzature del controllo interno;
- abbiamo acquisito una comprensione del controllo interno rilevante ai fini della revisione contabile allo scopo di definire procedure di revisione appropriate nelle circostanze, e non per esprimere un giudizio sull'efficacia del controllo interno della Società;
- abbiamo valutato l'appropriatezza dei principi contabili utilizzati nonché la ragionevolezza delle stime contabili effettuate dagli amministratori e della relativa informativa;
- siamo giunti ad una conclusione sull'appropriatezza dell'utilizzo da parte degli amministratori del presupposto della continuità aziendale e, in base agli elementi probativi acquisiti, sull'eventuale esistenza di una incertezza significativa riguardo a eventi o circostanze che possono far sorgere dubbi significativi sulla capacità della Società di continuare ad operare come un'entità in funzionamento. In presenza di un'incertezza significativa, siamo tenuti a richiamare l'attenzione nella relazione di revisione sulla relativa informativa di bilancio ovvero, qualora tale informativa sia inadeguata, a riflettere tale circostanza nella formulazione del nostro giudizio. Le nostre conclusioni sono basate sugli elementi probativi acquisiti fino alla data della presente relazione. Tuttavia, eventi o circostanze successivi possono comportare che la Società cessi di operare come un'entità in funzionamento;
- abbiamo valutato la presentazione, la struttura e il contenuto del bilancio d'esercizio nel suo complesso, inclusa l'informativa, e se il bilancio d'esercizio rappresenti le operazioni e gli eventi sottostanti in modo da fornire una corretta rappresentazione.

Abbiamo comunicato ai responsabili delle attività di governance, identificati ad un livello appropriato come richiesto dai principi di revisione internazionali (ISA Italia), tra gli altri aspetti, la portata e la tempistica pianificate per la revisione contabile e i risultati significativi emersi, incluse le eventuali carenze significative nel controllo interno identificate nel corso della revisione contabile.

Relazione su altre disposizioni di legge e regolamentari

Giudizio ai sensi dell'art. 14, comma 2, lettera e), del D. Lgs. 27 gennaio 2010, n. 39

Gli amministratori dell'Istituto Europeo di Oncologia S.r.l. sono responsabili per la predisposizione della relazione sulla gestione dell'Istituto Europeo di Oncologia S.r.l. al 31 dicembre 2022, inclusa la sua coerenza con il relativo bilancio d'esercizio e la sua conformità alle norme di legge.

Abbiamo svolto le procedure indicate nel principio di revisione (SA Italia) n. 720B al fine di esprimere un giudizio sulla coerenza della relazione sulla gestione con il bilancio d'esercizio dell'Istituto Europeo di Oncologia S.r.l. al 31 dicembre 2022 e sulla conformità della stessa alle norme di legge, nonché di rilasciare una dichiarazione su eventuali errori significativi.

A nostro giudizio, la relazione sulla gestione è coerente con il bilancio d'esercizio dell'Istituto Europeo di Oncologia S.r.l. al 31 dicembre 2022 ed è redatta in conformità alle norme di legge.

Con riferimento alla dichiarazione di cui all'art. 14, c.2, lettera e), del D. Lgs. 27 gennaio 2010, n. 39, rilasciata sulla base delle conoscenze e della comprensione dell'impresa e del relativo contesto acquisite nel corso dell'attività di revisione, non abbiamo nulla da riportare.

Milano, 11 aprile 2023

EY S.p.A.



Aldo Alberto Amorese
(Revisore Legale)

Istituto Europeo di Oncologia S.r.l.

Sede Legale in Milano – Via Filodrammatici, n. 10

Capitale Sociale Euro 80.579.007 i.v.

Registro delle Imprese di Milano n. 08691440153

Codice Fiscale e Partita IVA n. 08691440153

Relazione del Consiglio di Amministrazione sulla gestione

Signori Soci,

l'esercizio chiude con un utile pari ad € 3.591.678 (€ 2.202.502 nel 2021) considerato l'impatto negativo di imposte per tassazione corrente e differita per € 1.636.481 (€ 1.280.958 nel 2021), nonché ammortamenti e svalutazioni per complessivi € 13.198.517 (€ 12.666.084 nel 2021) e comprensivo del ripristino di valore per € 1.009.604 (€ 264.509 nel 2021) della controllata Centro Cardiologico Monzino S.p.A.

Attività societaria

Per il terzo anno consecutivo, l'Istituto Europeo di Oncologia è il primo ospedale italiano fra le eccellenze mondiali in oncologia, come determinato dalla classifica "World's Best Specialized Hospitals 2023", in terza posizione in Europa e in dodicesima posizione nel ranking mondiale dei migliori ospedali per l'area oncologica.

Si tratta di un significativo e ormai consolidato riconoscimento internazionale per il quale merita un ringraziamento anche tutto il personale, che dedica il suo impegno e la sua professionalità alla Ricerca e all'attività Clinica a favore dei pazienti. L'iniziativa di Newsweek nasce dall'esigenza di aiutare a orientare correttamente la popolazione in una sanità globale, con l'obiettivo di indicare quali ospedali offrono il più alto standard di cura a livello internazionale.

Con riferimento ai progetti di sviluppo della struttura, prosegue lo sviluppo delle attività per il progetto Protoni nei tempi previsti, dopo l'arrivo dell'attrezzatura nell'estate e l'inizio dei test tecnici. Il progetto IEO3 sta procedendo nei tempi previsti e ospiterà nuove sale operatorie e la nuova Farmacia Ospedaliera. I Trials Clinici per la sperimentazione di nuovi farmaci oncologici sta ampliandosi in volume e valore come previsto, con vantaggi per i pazienti che possono avere a disposizione le terapie più innovative

come risorsa ulteriore rispetto alle terapie correnti. Questi processi sono gestiti con il massimo rispetto sia dei principi etici di cura e tutela del paziente sia della riservatezza dei dati.

Nell'ambito del sempre più ampio processo di digitalizzazione delle attività cliniche, il progetto Biobanca, con digitalizzazione dei dati dell'Anatomia Patologica e certificazione, è l'unico disponibile in Italia e viene offerto, come servizio, anche ad altri Ospedali.

Proseguono gli investimenti in attrezzature d'avanguardia per mantenere l'altissimo livello tecnologico a supporto dell'attività di Ricerca e clinica a favore dei pazienti. Nell'anno si segnala, fra l'altro, l'arrivo di un nuovo acceleratore lineare per la radioterapia avanzata e di un ulteriore Robot di quarta generazione per la chirurgia mininvasiva assistita.

A seguito dell'attacco informatico da parte di criminali internazionali nel mese di aprile 2021, è proseguito nel 2022 l'impegno progettuale, tecnico ed economico di rafforzamento del monitoraggio IT e del contrasto alla pirateria informatica dal punto di vista infrastrutturale e di formazione degli utenti, con l'obiettivo di tutelare in modo sempre più efficace ed efficiente l'attività dell'Istituto e la privacy dei pazienti.

Dopo i positivi riscontri ricevuti sul Bilancio Sociale per gli esercizi 2019 e 2020, nel 2021 si è passati alla predisposizione del Bilancio di Sostenibilità, con obiettivo non solo di comunicare le valutazioni di impatto sociale dell'attività svolta dal Centro ma anche di porsi degli obiettivi, sempre in base ai valori etici e sociali che ne caratterizzano l'operatività. Per gli anni futuri, il Bilancio di Sostenibilità, pur con le sue specificità, sarà sviluppato in un'ottica di crescente integrazione con il Bilancio Civilistico.

L'esercizio registra un incremento dei ricavi per complessivi € 6,1 milioni, riferibile principalmente per € 4,7 milioni all'incremento dell'attività solvente, per 2,0 € milioni all'incremento dell'attività SSN di cui € 1,2 milioni concernenti l'aumento del "rimborso farmaci SSN" (ossia dei ricavi per farmaci antitumorali somministrati ambulatorialmente, che vengono rimborsati dal Servizio Sanitario ed il cui costo è incluso nei costi dei medicinali), € 1,1 milioni relativo alle prestazioni di ricovero, per € 1,8 milioni all'incremento di lasciti ed eredità, per € 1,5 milioni all'incremento dei ricavi per trials clinici, per € 0,6 milioni all'incremento dei riconoscimenti per "Funzioni non tariffabili"; decrementano i recuperi da terzi per € 3,0 milioni e le sopravvenienze attive per € 1,8 milioni.

L'incremento dei costi di produzione è stato complessivamente pari ad € 4,6 milioni.

Con riferimento ai dati relativi all'attività clinica 2022, i pazienti dimessi (ordinari e *day-hospital*) sono stati n. 16.550 (n. 16.935 nel 2021) per un totale di n. 45.822 giorni di degenza (n. 47.549 nel 2021).

L'attività chirurgica si è attestata a n. 13.639 interventi (n. 12.145 in anestesia generale e n. 1.494 in anestesia locale), con un decremento (1,09%) rispetto al 2021 (n. 13.789 interventi nel 2021).

L'attività di chirurgia robotica mini invasiva si è attestata n. 1.168 interventi (n. 1.080 nel 2021). Si segnala altresì che gli interventi in regime di *Day-Surgery* effettuati nelle strutture dello IEO *Day Centre* nel 2022 sono stati n. 4.367 (n. 4.187 nel 2021).

Nell'esercizio trascorso è continuato lo sviluppo dei *trials* clinici sponsorizzati e della ricerca clinica.

Secondo gli ultimi dati disponibili pubblicati nel PNE (Programma Nazionale Esiti) di AGENAS (Agenzia Nazionale per i Servizi Sanitari Regionali) l'Istituto sulla maggioranza delle patologie è presente con elevati volumi di attività. Nello specifico è leader a livello nazionale come volumi per mammella e cavo orale, e al secondo posto per: prostata, polmone, utero, ovaio, e al terzo posto per la laringe. In termini di qualità delle cure i dati comparativi presenti nel PNE e consistenti nel tasso di complicanze/mortalità, manifestano l'ottima qualità clinica dell'Istituto in tutte le patologie trattate e monitorate. I dati dell'ultimo PNE si riferiscono al 2021 e consentono di valutare le implicazioni della pandemia in Italia e per l'Istituto.

Nel corso dell'esercizio, l'Istituto è stato sottoposto a verifica di riaccreditamento della Terapia Intensiva da parte dell'Azienda Territoriale Sanitaria. Il processo autorizzativo ha consentito di modificare l'assetto da avere 4 posti letto in SSN e 4 posti in solvenza a 6 posti in area intensiva e 2 di semiintensiva: tutti i posti letto ora sono accreditati ed a contratto con il SSN.

Nel mese di settembre l'ATS ha svolto una verifica sia documentale che in loco in merito alle Cure domiciliari sul mantenimento dei requisiti di accreditamento che IEO ha superato.

Nel mese di marzo e nel mese di dicembre il programma di Senologia ha avuto le visite di certificazione internazionale da parte di EUSOMA (European Society of Breast Cancer Specialists): l'esito è stato la conferma dell'accREDITAMENTO all'eccellenza nel trattamento del tumore del seno.

Nel mese di novembre l'Oncoematologia è stata sottoposta ad un audit internazionale da parte di KITE Technology per verificare l'adeguatezza del nostro Istituto per la somministrazione della innovativa Terapia con Cellule Cart-T, l'esito è stato positivo e dal 2023 l'Oncoematologia IEO potrà effettuare queste terapie innovative per i pazienti ematologici.

Il 2022 è stato caratterizzato inoltre dalla stesura e condivisione dei Percorsi Diagnostici, Terapeutici ed Assistenziali (PDTA) per le varie patologie trattate in IEO secondo quanto previsto dalla normativa nazionale e regionale.

I PDTA oltre essere stati condivisi tra i vari professionisti sono stati inviati per approvazione alle rispettive Associazioni di pazienti ed un ulteriore intervento è stato promosso nei confronti dei medici di Medicina Generale con i quali si sta intraprendendo un percorso comune di condivisione.

L'IEO dal 2002 prosegue il programma di *internal audit* per la verifica degli standard nazionali ed internazionali ed il rispetto delle procedure IEO.

Il programma di audit è composto da 20 *audit* all'anno gestito da *auditor* interni certificati che verificano le aree con processi maggiormente critici quali: tenuta ed utilizzo dei farmaci, blocco operatorio, gestione delle cartelle, prevenzione delle infezioni, sicurezza della struttura e da quest'anno anche la verifica del rispetto dei PDTA.

Sono continuati gli investimenti in ambito di attrezzatura sanitaria anche con un nuovo robot Da Vinci, un acceleratore lineare, di avanzamento della costruzione del Proton Center e di varie ottimizzazioni degli spazi oltre che di adeguamento dell'infrastruttura informatica e dei *software* gestionali.

Contesto di mercato

Nel 2022 la pandemia ha sensibilmente ridotto i suoi effetti sull'operatività dell'Istituto, che ha potuto rientrare ad una quasi piena attività, mantenendo attivi, pur in misura ridotta rispetto al 2021, i presidi per limitare i rischi per pazienti (es. DPI, tamponi, analisi periodiche) e dipendenti, con costi operativi inferiori al passato ma sempre presenti.

In generale, il 2022 ha visto un aumento dell'attività clinica rispetto al 2021 ma ancora inferiore al 2019 per i pazienti extraregionali mentre l'attività in Solvenza ha continuato a progredire rispetto ai livelli del 2021 in ambito sia Ricoveri sia Ambulatoriale. L'erogazione di prestazioni ambulatoriali ai pazienti Regionali, ha superato nuovamente il tetto Regionale di rimborsi anche grazie alla grande visibilità meritata da IEO nel periodo pandemico quale Hub oncologico, al recupero di pazienti che avevano rinviato prevenzione e follow up in periodo pandemico ed all'incremento esponenziale dei controlli/follow up per una patologia sempre più cronicizzante. I ricavi relativi all'attività su pazienti extraregionali risentono ancora dei costi elevati per la mobilità infraregionale e di un trend che, pur mostrando un certo consolidamento, l'Istituto sta contrastando anche con una rinnovata offerta di servizi tramite telemedicina, diagnostica a distanza e rafforzando ulteriormente progetti quali Medici nella Tua Città, che ormai tocca un numero sempre più elevato di città italiane.

Un grande limite rispetto alla possibilità di poter adeguare l'offerta di prestazioni alla domanda crescente legata alla progressiva senescenza della popolazione ed all'aumento di cittadini affetti da patologie cronico degenerative, è rappresentato dal blocco dei budget delle strutture di diritto privato che fin dal 2012 è attestato sui valori del 2011. La Regione Lombardia, tramite ATS Milano, ha posto nel 2022 a tutte le strutture accreditate alcuni obiettivi di riduzione delle liste d'attesa e di altre performance cliniche,

tutto all'interno dei medesimi tetti di rimborso stabiliti molti anni fa. Questo ha provocato, per converso, una maggior penalizzazione degli Istituti con maggiore qualità e attrattività per i pazienti. In ogni caso, l'Istituto ha posto il massimo impegno per conseguire gli obiettivi assegnati, riducendo sensibilmente le liste d'attesa e rafforzando l'attenzione ai pazienti lombardi, pur mantenendo l'eccellenza delle prestazioni fornite.

Pur con grande attenzione ai flussi di cassa, dimostrata dall'aumento della Posizione Finanziaria Netta positiva rispetto al 31 dicembre 2021, sono stati attuati gli investimenti seguendo la crescita prevista nei piani e la produzione scientifica è proseguita superando i livelli record di Impact Factor conseguiti nel 2021.

Il costo dell'energia e del gas sul mercato, a motivo dell'incertezza geopolitica e della speculazione, ha subito nel corso del 2022 un incremento del tutto eccezionale, arrivando a circa 8 volte (oltre 500 €/Mwh in agosto 2022) i valori di inizio 2021 per l'energia. Tuttavia questo aumento, grazie alle coperture a prezzo fisso sulle forniture di energia e gas stipulate da metà 2021 fino a metà 2023 su grandissima parte dei consumi, è stato in sostanza neutralizzato sui risultati dell'Istituto nel 2022.

Questa turbolenza sul mercato energetico ha inoltre portato a problemi significativi per i fornitori, i quali da un lato hanno spesso proposto significativi incrementi nei prezzi (talvolta ingiustificati) anche a fronte di contratti a prezzo definito, da un altro hanno subito ritardi nell'ordine di mesi nella consegna soprattutto di componenti elettronici e quindi nella consegna di attrezzature all'Istituto. La discesa dei prezzi dell'energia nel 4° trimestre, grazie anche al clima mite autunnale e allo stoccaggio di gas ai limiti massimi, hanno favorito un miglioramento di questa situazione.

È proseguito nel 2022 un significativo flusso in uscita di personale, in particolare infermieri e tecnici, verso il settore pubblico, a causa della significativa richiesta di personale specializzato, che viene formato presso l'Istituto con grande attenzione e qualità. Le proposte da essi ricevute, significative sotto vari aspetti, hanno determinato la necessità di attivare specifiche campagne di "retention" con impatti organizzativi ed anche economici

Per converso, è continuato anche il flusso anche in entrata di medici ed infermieri, soprattutto con personale molto qualificato, con esperienza e con grandi prospettive, il che permette di guardare con fiducia all'ulteriore incremento nella qualità delle prestazioni fornite.

L'Istituto opera prevalentemente nel mercato della sanità pubblica, disciplinato dalle regole stabilite dal Servizio Sanitario Regionale e Nazionale, erogando prestazioni di ricovero e di assistenza specialistica ambulatoriale secondo l'assetto organizzativo per il quale risulta iscritto nel Registro delle Strutture

Accreditate. Tale normativa prevede che le Strutture Accreditate si impegnino, da un lato, a mantenere nel tempo i requisiti organizzativi e di accreditamento inerenti la dotazione organica e gli *standards* di assistenza al paziente previsti dalla normativa statale e regionale vigente e, dall'altro lato, a garantire l'erogazione delle prestazioni.

In particolare ogni anno, in ottemperanza alla Delibera Regionale (c.d. Regole di Sistema), tra la ATS e ogni struttura sanitaria accreditata viene sottoscritto un contratto annuale per l'erogazione, a favore dei cittadini residenti in Lombardia, di prestazioni di ricovero, di specialistica ambulatoriale e di diagnostica strumentale per le quali viene definito un *budget* di remunerazione.

Nel mese di giugno 2022 l'Istituto ha sottoscritto il contratto integrativo con la ATS (in base a quanto previsto dalla D.G.R. n. XI/6387 del 16 maggio 2022) nel quale è stato assegnato all'Istituto Europeo di Oncologia un *budget* per l'anno 2022 pari ad € 52.437.649 per le attività di ricovero (€ 20.835.864 a favore dei cittadini residenti in Regione Lombardia), di cui € 1.966.412 legati al raggiungimento di obiettivi specifici per migliorare l'offerta di ricovero e cura, ed un *budget* pari ad € 37.683.667 per le attività di specialistica ambulatoriale e diagnostica strumentale (€ 18.374.893 a favore dei cittadini residenti in Regione Lombardia), di cui € 2.338.260 legati al raggiungimento di obiettivi specifici per l'attività specialistica ambulatoriale. I rimborsi sono assoggettati a regressioni tariffarie crescenti a valere fino a quota 106%, oltre tale limite non viene garantita la remunerazione delle prestazioni. Nel mese di ottobre 2022, inoltre, l'Istituto ha firmato una rimodulazione contrattuale per prestazioni di ricovero con la ATS (in ottemperanza alla D.G.R. n. XI/6866 del 02/08/2022), nella quale sono state rimodulate, per € 1.580.089, le quote economiche del tetto previsto per i cittadini fuori regione verso il tetto previsto per i cittadini lombardi portando lo stesso ad € 22.415.953.

Con la sottoscrizione del contratto, l'Istituto si è impegnato a un'adeguata programmazione delle proprie attività, mediante un'omogenea allocazione mensile delle risorse assegnate, al fine di garantire la continuità del servizio nel corso dell'anno.

Andamento dell'esercizio

Il Valore della produzione ammonta ad € 264,5 milioni, con un incremento pari ad € 6,1 milioni (4,3%) rispetto al 2021.

La produzione clinica effettiva è stata pari ad € 267,8 milioni (€ 266,3 milioni nel 2021), e ha comportato la contabilizzazione di note credito per maggiore produzione non riconosciuta dalla ATS per € 3,3 milioni (€ 7,9 milioni nel 2021) relative all'eccedenza rispetto al *plafond* assegnato.

Le sopravvenienze attive, in diminuzione per € 1,8 milioni rispetto all'esercizio precedente, sono costituite da maggiori riconoscimenti di ATS Città di Milano e Regione Lombardia a valere sullo scorso esercizio (per attività ambulatoriale € 2,7 milioni, drg € 2,6 milioni, funzioni ospedaliere € 0,9 milioni, "File F" 2020 € 0,4 milioni), da note credito su costi degli esercizi precedenti (€ 0,4 milioni), da maggiori ricavi derivanti da esercizi precedenti (€ 0,3 milioni), dalla proventizzazione del fondo rischi assicurativi (€ 0,4 milioni), dalla proventizzazione di debiti per costo del personale (€ 0,4 milioni), da un rimborso dell'agenzia delle entrate (€ 0,6 milioni).

L'Istituto ha stabilito di destinare, per l'esercizio 2022, il contributo 5 per mille (a valere sui fondi destinati alla "Ricerca Sanitaria") a progetti relativi all'innovazione clinica (per € 5,1 milioni), e a progetti di ricerca (nuovi bersagli molecolari per € 0,9 milioni).

La Legge del 23 dicembre 2014, n. 190 208 (Legge di Stabilità 2015), all'art. 1 comma 154, prevede anche per l'esercizio finanziario 2022, la facoltà di destinare in base alla scelta del contribuente una quota pari al 5 per mille dell'imposta sul reddito delle persone fisiche.

L'aumento dei costi, rispetto allo scorso esercizio, pari complessivamente all'1,8% è dovuto principalmente all'incremento del costo del personale per € 4,4 milioni e degli ammortamenti per € 0,7 milioni.

Al risultato d'esercizio ha contribuito positivamente il parziale ripristino di valore, nell'ambito di precedenti svalutazioni del costo storico di acquisto, della controllata Centro Cardiologico Monzino S.p.a. per € 1,0 milioni.

Le imposte di periodo sono negative per € 1,6 milioni e considerano gli effetti di imposte anticipate nette per € 0,3 milioni.

Gli investimenti sono stati pari ad € 29,7 milioni (di cui € 0,9 milioni a valere sulla ricerca).

La posizione finanziaria netta dell'Istituto è positiva e pari ad € 43,2 milioni (€ 34,0 milioni al 31 dicembre 2021) e considera per € 12,5 milioni il debito verso la controllata Centro Cardiologico Monzino derivante dalle operazioni di *cash pooling* con la stessa.

Al fine di fornire una migliore comprensione dell'andamento dell'esercizio, di seguito si riportano il conto economico riclassificato, lo stato patrimoniale riclassificato, il prospetto fonti e impieghi e l'analisi per indici confrontati con quelli relativi al precedente esercizio.

Conto economico	2022 €/000	% ricavi totali	2021 €/000	% ricavi totali	Δ €/000	Δ % sul 2021
Ricavi clinici	216.784	82,0	207.868	80,5	8.916	4,3
Contributi di ricerca	26.857	10,2	27.124	10,5	(267)	(1,0)
Altri ricavi	20.840	7,9	23.382	9,0	(2.542)	(10,9)
Totale ricavi	264.481	100,0	258.374	100,0	6.107	2,4
Materiali	62.923	23,8	62.910	24,3	13	0,0
Prestazioni di servizi e oneri di gestione	77.089	29,1	77.195	29,9	(106)	(0,1)
Iva indetraibile	12.392	4,7	12.749	4,9	(357)	(2,8)
Costo del lavoro	95.782	36,2	91.394	35,4	4.388	4,8
MOL (EBITDA)	16.295	6,2	14.126	5,5	2.169	15,4
Ammortamenti	11.974	4,5	11.293	4,4	681	6,0
Risultato operativo (EBIT)	4.321	1,6	2.833	1,1	1.488	52,5
Proventi (oneri) finanziari netti	(97)	(0,0)	(167)	(0,1)	70	(41,9)
Ripristino valore della controllata	1.010	0,4	265	0,1	745	281,1
Effetti sulle altre partecipazioni	(6)	(0,0)	553	0,2	(559)	(101,1)
Risultato ante imposte	5.228	2,0	3.484	1,3	1.744	50,1
Imposte	(1.636)	(0,6)	(1.281)	(0,5)	(355)	27,7
Risultato d'esercizio	3.592	1,4	2.203	0,9	1.389	63,1

Stato Patrimoniale	2022	%	2021	%	Δ	Δ % sul 2021
Immobilizzazioni tecniche nette	98.755	102,0	82.674	80,6	16.081	19,5
Immobilizzazioni Immateriali	4.473	4,6	3.783	3,7	690	18,2
Immobilizzazioni finanziarie	59.756	61,7	58.753	57,3	1.003	1,7
Immobilizzazioni nette	162.984	168,3	145.210	141,6	17.774	12,2
Magazzino	8.579	8,9	8.411	8,2	168	2,0
Crediti commerciali netti	34.713	35,8	44.382	43,3	(9.669)	(21,8)
Altre attività correnti	20.871	21,6	11.078	10,8	9.793	88,4
Debiti commerciali	(60.509)	(62,5)	(49.698)	(48,5)	(10.811)	21,8
Altre passività correnti	(64.429)	(66,5)	(51.629)	(50,4)	(12.800)	24,8
Capitale circolante netto	(60.775)	(62,8)	(37.456)	(36,5)	(23.319)	62,3
Fondo T.F.R.	(5.371)	(5,5)	(5.233)	(5,1)	(138)	2,6
Capitale Investito Netto	96.838	100,0	102.521	100,0	(5.683)	(5,5)
Capitale sociale	80.579	83,2	80.579	78,6	0	0
Riserve	55.906	57,7	53.703	52,4	2.203	4,1
Risultato d'esercizio	3.592	3,7	2.203	2,1	1.389	63,1
Patrimonio netto	140.077	144,7	136.485	133,1	3.592	2,6
Titoli	0	0	0	0	0	0
Finanziamento intragruppo - cashpooling (Disponibilità)	12.501 (55.740)	12,9 (57,6)	12.501 (46.465)	12,2 (45,3)	0 (9.275)	0 20,0
Debiti/(Disponibilità) finanziarie nette	(43.239)	(44,7)	(33.964)	(33,1)	(9.275)	27,3

Prospetto Fonti Impieghi		
	2022	2021
Debiti/(disponibilità) finanziarie iniziali	(33.964)	(37.472)
Margine operativo lordo	16.295	14.126
Investimenti netti	(28.744)	(13.988)
Variazione capitale circolante netto	23.319	(2.382)
Variazione netta TFR	138	17
Flusso di cassa operativo	11.008	(2.227)
Proventi/(Oneri) finanziari netti	(97)	-
Imposte	(1.636)	(1.281)
Flusso di cassa netto	9.275	(3.508)
Debiti/(disponibilità) finanziarie finali	(43.239)	(33.964)

INDICI ECONOMICI			
	2022	2021	
	RISULTATO NETTO D'ESERCIZIO	3.592	2.203
ROE	CAPITALE NETTO MEDIO D'ESERCIZIO	138.281	135.384
		2,6%	1,6%
	REDDITO OPERATIVO (EBIT)	4.321	2.833
ROI	CAPITALE NETTO INVESTITO MEDIO DELL'ESERCIZIO	99.680	99.666
		4,3%	2,8%
	REDDITO OPERATIVO (EBIT)	4.321	2.833
ROS	RICAVI DI VENDITA	264.481	258.374
		1,6%	1,1%

INDICI STRUTTURA		2022	2021
INDICE DI STRUTTURA SECCO	PATRIMONIO NETTO	140.077	136.485
	CAPITALE FISSO	162.984	145.210
		85,9	94,0
QUOZIENTE DI DISPONIBILITA'	CAPITALE CIRCOLANTE	107.402	97.835
	PASSIVO CORRENTE	124.938	101.327
		79,1	96,6
QUOZIENTE DI TESORERIA	LIQUIDITA' IMMEDIATE+DIFFERITE	98.823	89.424
	PASSIVO CORRENTE	124.938	101.327
		86,0	88,3
ROTAZIONE DI MAGAZZINO	GIACENZA MEDIA DI MAGAZZINO	8.780	8.696
	CONSUMI	62.923	62.910
	GIORNI	51	51
ROTAZIONE DEI CREDITI	GIACENZA MEDIA DEI CREDITI	39.548	37.527
	RICAVI DI VENDITE	216.784	207.868
	GIORNI	67	66

Si forniscono di seguito alcuni dati di attività gestionali dell'anno 2022:

	2022	2021	Variaz. %
Giornate di degenza	45.822	47.549	-3,63%
Ricoveri (dimessi)	16.550	16.935	-2,27%
n. interventi	13.639	13.789	-1,09%
n. visite	191.463	192.267	-0,42%
n. esami TC	21.814	23.045	-5,34%
n. esami MRI	14.634	15.395	-4,94%
n. esami PET	5.949	5.558	7,03%
n. esami mammografici	35.112	31.893	10,09%
Radioterapie (*)	30.760	34.140	-9,90%

(*) Il numero di accessi in radioterapia dipende dagli schemi terapeutici adottati i quali prevedono frazionamenti e prescrizioni di dose, quindi di cicli in funzione alla patologia e alla clinica del paziente.

Seguono alcune informazioni relative alla composizione del personale dipendente, all'età ed altre

TABELLA DI SINTESI PERSONALE DIPENDENTE							
	N° (*)	N° (*)	Anzianità Lavorativa media (anni)	Età media (anni)	Ore medie Infortunio	Ore medie Malattia	
	2022	2021	2022	2022	2022	2022	2022
Contratti a tempo indeterminato							
Personale medico							
Donne	129	124	11,2	47,8	1,6	37,4	
Uomini	105	97	13,4	50,5	0,5	54,0	
Personale non medico							
Donne	462	441	12,7	41,1	3,7	99,3	
Uomini	188	188	12,8	42,7	6,3	56,9	
Personale non medico (Quadri e Dirigenti)							
Donne	62	60	14,8	49,5	0,7	59,5	
Uomini	20	20	10,0	47,1	-	51,3	
Amministrativi							
Donne	257	259	15,3	46,3	3,5	85,6	
Uomini	73	69	11,2	44,1	0,8	71,3	
Personale Amministrativo (Quadri e Dirigenti)							
Donne	17	22	15,8	50,5	-	36,1	
Uomini	14	16	14,0	54,4	-	75,6	
Totale personale a tempo indeterminato	1.327	1.296					
Contratti a tempo determinato							
Personale non medico							
Donne	15	16	1,4	29,5	-	17,8	
Uomini	6	3	0,4	29,5	-	-	
Personale non medico (Quadri e Dirigenti)							
Donne	6	4	0,8	30,3	-	34,4	
Uomini	2	-	0,4	43,0	-	7,4	
Amministrativi							
Donne	12	10	0,8	29,1	19,8	25,7	
Uomini	4	5	0,4	30,3	-	19,7	
Personale Amministrativo (Quadri e Dirigenti)							
Donne	-	-	-	-	-	-	
Uomini	-	-	-	-	-	-	
Personale medico							
Donne	2	1	0,5	35,6	-	3,9	
Uomini	1	-	0,2	40,0	-	-	
Totale personale a tempo determinato	48	39					
TOTALE DIPENDENTI	1.375	1.335					

(*) Non è considerato il personale interinale.

Si segnala che il 96,5 % del personale (97,1 % nel 2021) risulta impiegato con contratto a tempo indeterminato.

Attività di ricerca e sviluppo

L'attività di ricerca svolta in IEO integra ricerca clinica e ricerca traslazionale e di base svolta presso il dipartimento di oncologia sperimentale. Le principali attività di ricerca svolte nel corso del 2022 sono sintetizzate di seguito.

Meccanismi di tumorigenesi.

Abbiamo scoperto un nuovo ruolo della proteina Pcgf6 che, indipendente dalla sua nota attività di regolatore dell'espressione genica, agisce da oncosoppressore, limitando la formazione di linfomi.

La proteina Max è implicata nella modulazione dell'espressione genica, interagendo (e formando un dimero) con la proteina Myc –attivando così la trascrizione– o con la proteina Mga –reprimendo la trascrizione– e legandosi a specifiche regioni del DNA. Mga fa parte, insieme alla proteina Pcgf6, del complesso Polycomb, un complesso proteico che, legandosi al DNA, modula –nello specifico, reprime– l'espressione di specifici geni (in particolare, Mga e Pcgf6 sono parte del sottotipo PRC1.6). Mediando l'assemblaggio di Polycomb sul DNA, Mga contrasta probabilmente l'espressione di specifici geni indotta da Myc e la conseguente funzione di Myc di promuovere la formazione di tumori. Il dimero Mga/Max agisce quindi come oncosoppressore. Infatti, mutazioni che causano la perdita di funzione di Mga sono state osservate in diversi tipi di tumore. Abbiamo osservato, in modelli murini, che la simultanea sovraespressione di Myc –che è noto indurre linfomi– e delezione di Pcgf6 preveniva la morte delle cellule tumorali, accelerava la formazione di linfomi indotta da Myc e riduceva la sopravvivenza degli animali. Quindi, se l'assenza di Pcgf6 accelera la formazione di linfomi indotti da Myc, quando presente Pcgf6 agisce da oncosoppressore nei linfomi Myc-indotti. Abbiamo inoltre osservato, inaspettatamente, che la delezione di Mga non aveva effetto sulla formazione di linfomi indotta da Myc, suggerendo che Pcgf6 agisca attraverso un meccanismo diverso, indipendente dalla trascrizione. Infatti, non abbiamo notato differenze significative in termini di espressione genica tra le cellule che esprimevano Pcgf6 e quelle che non la esprimevano, sia in condizioni normali che in seguito alla sovraespressione di Myc e la delezione di Pcgf6 alterava solo i livelli di espressione di pochi geni. Inoltre, anche se la delezione di Mga preveniva il legame di Pcgf6 alle sue specifiche regioni del DNA, non alterava significativamente i livelli dell'espressione genica. Abbiamo quindi identificato un nuovo ruolo di Pcgf6 nel sopprimere la formazione di linfomi indotta da Myc, che non è dovuto alla sua nota funzione nella regolazione dell'espressione genica come parte del complesso Polycomb insieme a Mga. In futuro studi ulteriori saranno necessari al fine di caratterizzare i meccanismi coinvolti. (PMID: 35422437)

Abbiamo scoperto un nuovo meccanismo d'azione degli inibitori di LSD1 nelle cellule leucemiche, attraverso la regolazione -nello specifico, la down-regolazione- dell'espressione della proteina GSE1, proponendo quindi GSE1 come nuovo fattore pro-tumorigenico nella leucemia e un potenziale bersaglio farmacologico.

La proteina LSD1 è frequentemente sovraespressa nei tumori e la sua sovraespressione è associata con una cattiva prognosi. Diverse molecole che inibiscono l'attività di LSD1 sono state infatti sviluppate come farmaci antitumorali e studi clinici hanno mostrato i benefici di alcuni di questi farmaci nel trattamento della leucemia e di alcuni tumori solidi. Tuttavia il meccanismo alla base dell'effetto antitumorale degli inibitori di LSD1 è ancora poco noto. Noi abbiamo mostrato che l'inibizione di LSD1 riduce l'espressione di GSE1, una proteina che interagisce con LSD1. Un livello di espressione più basso di GSE1 determina una riduzione del legame della proteina a specifiche regioni del DNA coinvolte nel differenziamento cellulare. Interferendo con l'espressione di GSE1 è possibile indurre il differenziamento delle cellule leucemiche, limitando così la progressione della leucemia. Abbiamo osservato che sia l'inibizione che la rimozione genetica di LSD1 riducevano l'espressione della proteina GSE1 (nello specifico, interferendo con la traduzione, senza influenzare né i livelli di RNA messaggero né la stabilità della proteina). In vitro, la ridotta espressione della proteina GSE1 limitava la sopravvivenza delle cellule ed aumentava la morte cellulare; in vivo, i livelli più bassi di GSE1 rallentavano la progressione del tumore e prolungavano la sopravvivenza degli animali. Esplorando i meccanismi molecolari coinvolti, abbiamo scoperto che la minore espressione di GSE1 –sia indotta tramite silenziamento che sfruttando inibitori di LSD1– era la causa di una riduzione del legame di GSE1 al DNA; ciò a sua volta influenzava l'espressione di diversi geni (principalmente geni coinvolti nella risposta immune e infiammatoria, e nella proliferazione cellulare). L'alterazione dell'espressione genica che ne conseguiva rimuoveva il blocco del differenziamento che caratterizza le cellule leucemiche –come mostrato sia in linee cellulari che in cellule primarie isolate da pazienti– inducendo quindi il differenziamento. Quindi, se la ridotta espressione di GSE1 induce il differenziamento delle cellule leucemiche, quando invece è espresso, previene il differenziamento. Inoltre, abbiamo dimostrato che GSE1 favoriva l'emergere di tratti tipici delle cellule staminali tumorali, suggerendo un ruolo di GSE1 nel promuovere la progressione del tumore. Una conferma ulteriore del ruolo pro-tumorigenico di GSE1 è emerso anche dall'analisi dei dati di pazienti: i pazienti leucemici erano caratterizzati da una più elevata espressione della proteina GSE1, e questa maggiore espressione correlava con l'aumentata espressione di diversi geni (soprattutto di geni associati alla risposta infiammatoria e immune); inoltre, i pazienti che avevano un'espressione di GSE1 più elevata, avevano un più alto numero di cellule leucemiche nel sangue. È interessante sottolineare che i pazienti leucemici del sottotipo APL (leucemia promielocitica acuta) che mostravano una maggiore

espressione di GSE1 avevano una prognosi peggiore rispetto a quelli in cui i livelli di GSE1 erano più bassi. (PMID: 34862459)

Al fine di definire le alterazioni molecolari alla base della progressione del tumore ovarico -tumore altamente aggressivo e difficile da diagnosticare in stadi precoci, che dà frequentemente origine a recidiva e diventa chemioresistente- abbiamo profilato il genoma del trascrittoma di diversi modelli di tumore ovarico, che ricapitolano diversi meccanismi biologici implicati nella progressione del tumore - ovvero l'inizio, la disseminazione metastatica e la staminalità- e rappresentano diverse fasi dello sviluppo del tumore. Ciò ha rivelato le caratteristiche (ovvero, la firma molecolare) associate con la progressione del tumore ovarico. Abbiamo inoltre dimostrato che la signalling di PI3K rappresenta un punto debole delle cellule staminali del tumore ovarico potenzialmente sfruttabile per arrestare sia la progressione del tumore ovarico che la disseminazione metastatica.

Abbiamo isolato le cellule tumorali dalle asciti -ovvero il liquido addominale ricco di cellule staminali tumorali generalmente presente durante la progressione del tumore ovarico- di una paziente prima che iniziasse il trattamento. Da queste cellule abbiamo ottenuto cellule primarie e una linea cellulare immortalizzata. In parallelo, le cellule tumorali isolate di fresco dalle asciti sono state iniettate in topi immunocompromessi per generare modelli in vivo (patient-derived xenografts, PDX), e coltivate sottoforma di sferoidi tridimensionali, per aumentare il contenuto di cellule staminali tumorali. Analizzando l'espressione genica, abbiamo identificato tre diversi profili in comune tra i vari campioni: geni coinvolti nell'insorgenza del tumore ovarico, geni di staminalità, e geni coinvolti nell'interazione del tumore con il microambiente. Abbiamo successivamente correlato queste informazioni con la prognosi del paziente: i pazienti i cui i tumori mostravano una sovraespressione di tutti e tre i profili di espressione genica avevano la prognosi peggiore; al contrario, quelli che non mostravano sovraespressione di nessuno dei tre profili avevano la prognosi migliore ed erano sensibili al trattamento chemioterapico basato su platino. Infine, quelli che mostravano la sovraespressione di uno solo di questi profili di espressione genica erano generalmente chemioresistenti. In seguito, le nostre analisi hanno identificato 522 mutazioni in geni che facevano parte di pathway coinvolti in adesione cellulare, in oncogeni e in oncosoppressori e mutazioni nel gene PI3K. PI3K codifica per una proteina coinvolta in diversi processi cellulari, implicata nella disseminazione metastatica e target di diversi farmaci attualmente in studi clinici. Abbiamo quindi analizzato il ruolo della proteina PI3K nella formazione degli sferoidi tridimensionali di tumore ovarico (un modo per valutare la funzionalità delle cellule staminali tumorali): mentre la PI3K mutata sosteneva la capacità delle cellule tumorali primarie di formare sferoidi, l'inibizione della PI3K mutata abrogava completamente la loro abilità di formare sferoidi e riduceva l'espressione di marcatori tipici di staminalità, mostrando che la signalling di PI3K era coinvolta nel mantenimento della staminalità

e quindi nella formazione di sferoidi. Gli inibitori non inducevano lo stesso effetto quando PI3K non era mutata. Quindi integrando informazioni genomiche e di espressione genica in diversi modelli di tumore ovarico (ovvero cellule primarie, linee cellulari, sferoidi tridimensionali, PDX), abbiamo identificato le alterazioni molecolari associate con la progressione del tumore ovarico e con la prognosi dei pazienti. Questo approccio, che ha confermato PI3K come attore critico nello sviluppo del tumore ovarico e ha mostrato il ruolo specifico di PI3K nel funzionamento delle cellule staminali tumorali, potrebbe essere utilizzato per identificare nuove alterazioni che potrebbero essere sfruttate nell'ambito di nuovi trattamenti. Interferire con il funzionamento delle cellule staminali tumorali, agendo sulla signalling di PI3K, potrebbe consentire allo stesso tempo di limitare la crescita del tumore, prevenire la disseminazione metastatica e superare la chemioresistenza, tutti aspetti che sono stati associati con le cellule staminali tumorali. (PMID: 35218560)

Abbiamo mostrato che, nella linea cellulare di tumore testa-collo, l'infezione da HPV induce la degradazione della E-Caderina, promuovendo di conseguenza la migrazione cellulare e la formazione di metastasi.

I tumori testa-collo possono essere classificati in HPV-positivi –ovvero indotti dall'infezione da papillomavirus umano (HPV)– o HPV-negativi. Sebbene i pazienti HPV-positivi abbiano generalmente una prognosi migliore, mostrano frequentemente metastasi a livello dei linfonodi cervicali. In seguito all'infezione delle cellule umane, HPV influenza diversi processi cellulari critici, tra cui la transizione epitelio-mesenchimale (EMT). EMT è un processo cellulare che viene utilizzato fisiologicamente dalle cellule durante lo sviluppo o la guarigione delle ferite; quando attivato in maniera anomala, le cellule che vanno incontro a EMT perdono contatto con le cellule circostanti –a causa della perdita di E-Caderina, una proteina coinvolta nell'interazione cellula-cellula– ed acquisiscono proprietà invasive che portano alla formazione di metastasi. Riducendo la presenza di E-caderina a livello della membrana plasmatica, HPV induce EMT, favorendo così le metastasi. Noi abbiamo osservato delle differenze tra le cellule HPV-positive e negative: nelle cellule HPV-negative, la migrazione delle cellule tumorali era modulata dalla proteina SUMO1, che controllava indirettamente l'espressione della E-caderina attraverso una modulazione trascrizionale. Nei tumori HPV-positivi, invece, l'infezione regolava la pathway di SUMO1 (pathway attraverso cui le proteine vengono modificate chimicamente per venire correttamente localizzate all'interno della cellula) determinando un aumento prima del clivaggio e poi della degradazione della E-caderina –riducendo quindi la sua presenza a livello della membrana plasmatica–. Ciò influenzava di conseguenza EMT, migrazione cellulare e formazione di metastasi. Infatti, nei campioni di pazienti con tumori testa-collo HPV-positivi abbiamo osservato un'espressione più bassa di E-caderina a livello della membrana plasmatica, probabilmente dovuta ad un aumentato clivaggio. I nostri

dati suggeriscono anche l'esistenza di un altro meccanismo, presente solo nelle cellule HPV-positive, attraverso cui la diretta interazione della proteina UBCg (la cui espressione è più alta nei tessuti tumorali rispetto a quelli normali, e aumenta progressivamente durante lo sviluppo del tumore) con E-caderina protegge ed interferisce con la sua degradazione, modulando in qualche modo la presenza di E-caderina a livello della membrana plasmatica. Abbiamo quindi descritto un meccanismo che lega l'infezione da HPV e la più elevata probabilità di formazione di metastasi nei tumori testa-collo, attraverso la regolazione da parte di HPV della degradazione della E-caderina e quindi della sua presenza a livello della membrana plasmatica, che induce EMT e determina un aumento delle proprietà invasive delle cellule tumorali. I meccanismi descritti potrebbero essere sfruttati per controllare la formazione di metastasi nei tumori testa-collo HPV-positivi. (PMID: 36032664)

Abbiamo mostrato che nelle cellule e nei campioni tissutali dei pazienti con tumore testa-collo HPV-positivi, SMAD4 è più espresso rispetto ai tumori HPV-negativi, a causa della minore degradazione di SMAD4 nelle cellule HPV-positive. Abbiamo descritto i meccanismi responsabili della ridotta degradazione di SMAD4, che includono la ridotta ubiquitinazione (meccanismo attraverso cui una proteina viene "marcata" tramite l'aggiunta di una molecola di ubiquitina, indirizzando la proteina verso la degradazione) da parte della proteina β TRCP1. Infine, abbiamo dimostrato che l'attivazione da parte del virus HPV dei meccanismi di riparo del danno al DNA -necessari per la sua replicazione- dipende dall'espressione di SMAD4 ed influenza la sensibilità delle cellule a farmaci antitumorali che agiscono danneggiando il DNA.

Il TGFbeta è una molecola che inibisce la proliferazione cellulare ed è quindi coinvolta nella progressione del tumore. In seguito ad infezione da parte di papillomavirus (HPV), le proteine virali legano il recettore del TGFbeta, inducendone la degradazione e promuovendo così la proliferazione cellulare. SMAD4 è una proteina che gioca un ruolo chiave nei meccanismi cellulari associati al TGFbeta: quando SMAD4 si lega al suo recettore forma un complesso proteico che trasloca nel nucleo dove attiva geni chiave della proliferazione cellulare. L'assenza di SMAD4, invece, compromette la capacità delle cellule di riparare eventuali danni al DNA e determina instabilità genomica. SMAD4 risulta spesso meno espressa nei tumori e, in modelli animali, ridurre la sua espressione è sufficiente a promuovere la progressione del tumore e la disseminazione metastatica. L'infezione da HPV è la causa di un sottotipo di tumore testa-collo, soprattutto quelli dell'orofaringe. Nei tumori testa-collo causati da infezione da HPV, l'espressione di SMAD4 è più alta che in quelli non infettati. Inoltre, per replicarsi, HPV sfrutta i meccanismi cellulari di riparo del danno al DNA. Noi abbiamo mostrato che i livelli più elevati di proteina SMAD4 nei tumori testa-collo HPV-positivi rispetto ai HPV-negativi erano la conseguenza della diretta regolazione di SMAD4 da parte delle proteine del virus: infatti, la ridotta attivazione delle proteine di HPV E6 e E7

influenzava l'espressione della proteina SMAD4. In particolare, HPV interferiva -ovvero preveniva- la degradazione di SMAD4: infatti, nelle cellule dei tumori testa-collo HPV-positive, la proteina SMAD4 era più stabile. SMAD4 è normalmente degradata in seguito ad ubiquitinazione da parte di una proteina chiamata β TRCP1. Il virus HPV riduceva l'espressione di β TRCP1, la quale a sua volta determinava una minore ubiquitinazione e degradazione di SMAD4. L'espressione di β TRCP1 era infatti più bassa nelle cellule tumorali HPV-positive e nei campioni tumorali umani (spiegando quindi la più alta espressione di SMAD4). Inoltre, anche quelle poche unità di β TRCP1 presenti legavano meno SMAD4 nelle cellule HPV-positive rispetto alle cellule HPV-negative. Successivamente, abbiamo analizzato in dettaglio l'associazione tra SMAD4 e le proteine coinvolte nel riparo del danno al DNA. Abbiamo mostrato che il virus HPV modulava l'espressione di CHK1 e Rad51 -proteine coinvolte nel riparo del DNA danneggiato- agendo su SMAD4; infatti, quando SMAD4 non era espressa, il virus HPV non riusciva ad attivare i geni del riparo del danno al DNA (*rad51* and *CHK1*). Infine, abbiamo osservato che l'assenza di SMAD4, prevenendo il riparo del DNA, esacerbava il danno indotto da chemioterapia (nello specifico, con cisplatino), riducendo la vitalità cellulare e influenzando l'efficacia del trattamento. I nostri studi suggeriscono quindi che l'espressione di SMAD4 potrebbe rappresentare un marcatore utile per selezionare i pazienti che, a causa dell'effetto di SMAD4 sui meccanismi di riparo del danno al DNA, potrebbero beneficiare di trattamenti basati su farmaci che agiscono inducendo danno al DNA. (PMID: 35144669)

Abbiamo approfondito i meccanismi che modulano la distribuzione asimmetrica di Numb all'interno della cellula e controllano le proprietà staminali. Abbiamo identificato un nuovo ruolo della fosforilazione di Numb nella modulazione della divisione asimmetrica rispetto a quella simmetrica delle cellule staminali tumorali mammarie e quindi nel mantenimento delle caratteristiche staminali.

Le cellule staminali adulte normalmente si dividono in maniera asimmetrica, dando origine a due cellule figlie con un diverso "destino": una cellula rimane quiescente mentre l'altra prolifera rapidamente. Quando le cellule staminali si dividono simmetricamente, la rapida proliferazione delle cellule figlie sostiene la crescita del tumore. La divisione asimmetrica è dovuta, da un lato, a segnali derivanti dal microambiente e distribuiti in maniera asimmetrica; dall'altro, alla distribuzione asimmetrica di specifiche proteine all'interno della cellula. Nel sistema mammario, uno di questi fattori intracellulari che determinano la divisione asimmetrica o simmetrica delle cellule è Numb. I livelli di Numb correlano con le caratteristiche staminali delle cellule: l'assenza di Numb è associata con l'aggressività del tumore al seno, mentre la sua ri-espressione riduce la tumorigenesi e la disseminazione metastatica. Innanzi tutto, abbiamo osservato che la fosforilazione giocava un ruolo chiave nella localizzazione di Numb all'interno della cellula. Infatti, il silenziamento delle proteine coinvolte nella fosforilazione di Numb ne riduceva la

fosforilazione e aumentava l'associazione di Numb con la membrana plasmatica; la sovraespressione di queste proteine aveva invece effetti opposti. Inoltre, mutazioni del gene Numb che prevenivano la fosforilazione localizzavano Numb principalmente a livello della membrana plasmatica, mentre mutazioni che simulavano la fosforilazione localizzavano Numb nel citoplasma. Successivamente, abbiamo osservato che la fosforilazione di Numb rendeva la proteina non funzionale –probabilmente impedendo la sua interazione con le proteine partner– e influenzava la signaling a valle. Infatti, la fosforilazione di Numb simulava gli effetti osservati in assenza di Numb, inducendo la proliferazione –in contrapposizione con il fenotipo quiescente delle cellule staminali. Infatti, nelle cellule prive di Numb, se da un lato l'espressione di Numb mutato fosforilato (non funzionale) non influenzava la proliferazione cellulare, dall'altro, l'espressione della forma mutata non fosforilata (funzionale) di Numb riduceva il potenziale proliferativo delle cellule. Sulla base di questi risultati, abbiamo proposto un modello per descrivere il modo in cui Numb controlla la divisione asimmetrica rispetto a quella simmetrica (tumorale) delle cellule staminali mammarie: secondo questo modello, in condizioni fisiologiche, una parte di Numb è associata con la membrana plasmatica e viene distribuita in maniera asimmetrica al momento della divisione cellulare; il resto di Numb è nel citoplasma e viene distribuito equamente nelle cellule figlie; tuttavia, nel citoplasma, Numb è fosforilato e inattivo. Quindi, la sola frazione di Numb funzionale/attiva è quella nella membrana plasmatica, non fosforilata e non distribuita in maniera equa nelle cellule figlie, che determina appunto la divisione asimmetrica. Nei pazienti con tumore al seno, livelli elevati di Numb fosforilata, così come la perdita di Numb, correlavano con l'aggressività del tumore, in accordo al fenotipo osservato nelle cellule che non esprimevano Numb e nelle cellule che esprimevano la forma inattiva, fosforilata, di Numb. Interferire con la signaling a valle di Numb (cioè le signaling di p53 e di notch) con specifici inibitori influenzava la modalità di divisione (simmetrica o asimmetrica) e di conseguenza la capacità proliferativa di queste cellule, indirizzando le cellule che si dividevano in maniera simmetrica –che non esprimevano Numb o che esprimevano la forma iper-fosforilata di Numb, come frequentemente osservato nel tumore al seno– verso la divisione asimmetrica. Per quanto riguarda il meccanismo, in condizioni normali la fosforilazione di Numb era dovuta all'attività di un'isoforma della proteina PKC "atipica", capace di fosforilare Numb solo in specifiche ristrette regioni della cellula, una restrizione critica per la normale divisione asimmetrica delle cellule staminali. Nel tumore al seno, invece, l'anomala iperfosforilazione di Numb era dovuta alla diffusa (cioè non ristretta in specifiche regioni) iperattività dell'isoforma "canonica" della PKC che, prevenendo l'interazione di Numb con le proteine partner, induceva lo sviluppo del cancro. I nostri dati quindi mostrano che la perdita di attività di Numb che determina l'anomala divisione simmetrica delle cellule staminali è stata associata con lo sviluppo del cancro e con le metastasi, consentendo una rapida proliferazione delle cellule

staminali tumorali che supporta la rapida crescita del tumore. In quest'ottica, ripristinare l'attività di Numb per contrastare lo sviluppo del tumore al seno e la disseminazione metastatica apre nuove opportunità terapeutiche. (PMID: 36200956)

Abbiamo definito i meccanismi molecolari responsabili degli effetti antitumorali della metformina, identificando i metaboliti che venivano influenzati dal trattamento ed i pathway metabolici coinvolti, nelle pazienti in sovrappeso o obese sopravvissute al tumore al seno, pazienti che hanno una maggiore probabilità di manifestare recidiva. Abbiamo effettuato una caratterizzazione metabolica dei campioni, applicando in parallelo tre diversi approcci metabolomici per untargeted metabolomics, per un'analisi completa di tutti i metaboliti nel campione; targeted metabolomics, per la misurazione di specifici metaboliti; analisi degli acidi grassi.

Diversi studi epidemiologici hanno mostrato che la metformina -un farmaco comunemente usato nel trattamento del diabete di tipo 2- riduce il rischio di tumore e migliora la prognosi dei pazienti. Studi preclinici hanno dimostrato l'effetto sinergico del trattamento con metformina e del digiuno intermittente (che induce una moderata riduzione di glucosio) sulla crescita tumorale. Grazie ai suoi limitati effetti collaterali, diversi studi clinici stanno esplorando il potenziale della metformina come farmaco antitumorale, in combinazione con altri farmaci. Abbiamo analizzato i campioni di sangue, prima e alla fine del trattamento con metformina, di 373 pazienti arruolate nel contesto di due diversi studi clinici volti a valutare l'impatto della metformina e della perdita di peso su biomarcatori circolanti associati con la prognosi dei pazienti con tumore al seno (lo studio italiano "MetBreCS" condotto in IEO e lo studio americano "Reach for Health"), assegnate in maniera casuale al trattamento con metformina o al gruppo placebo. Utilizzare i dati di due diversi studi clinici ha permesso di generalizzare i risultati. Tenendo in considerazione fattori come il centro in cui sono stati effettuati gli studi, l'età delle pazienti e l'indice di massa corporea, i risultati erano coerenti sia mettendo insieme tutti i dati, sia analizzando i due studi separatamente. L'abbondanza di specifici metaboliti e di acidi grassi nel plasma dei pazienti è stata analizzata e confrontata prima e dopo il trattamento con metformina. Ciò ha permesso di identificare diversi metaboliti e acidi grassi la cui abbondanza veniva modificata in seguito al trattamento con metformina. I cambiamenti indotti dal trattamento con metformina e rilevati tramite le analisi metabolomiche indicano il coinvolgimento di specifici pathway metabolici associati al processo di tumorigenesi, approfondendo i meccanismi alla base degli effetti antitumorali della metformina, che potrebbe ridurre il rischio di recidiva in pazienti obesi o in sovrappeso. (PMID: 36581893)

Abbiamo identificato, nelle cellule di melanoma, un nuovo meccanismo, controllato dalla proteina USP7 che, regolando l'espressione della proteina RRM2, controlla la progressione del ciclo cellulare nel melanoma. Interferendo farmacologicamente con questo meccanismo tramite l'utilizzo di specifici

inibitori di USP7 è possibile indurre la senescenza delle cellule di melanoma e rendere le cellule vulnerabili a successivi trattamenti con farmaci epigenetici (inibitori di HDAC e LSD1), promuovendo la morte cellulare. I nostri risultati propongono quindi la combinazione inibitori di USP7/farmaci epigenetici come nuovo approccio terapeutico.

Nel melanoma, alterazioni del ciclo cellulare determinano una proliferazione cellulare incontrollata. Diverse terapie antitumorali sono basate sull'induzione della senescenza cellulare, ovvero arrestando il ciclo cellulare in maniera permanente. Tramite uno screening genetico (basato su shRNA), abbiamo identificato geni critici nella progressione del melanoma; tra questi, USP7, una deubiquitinasi (una proteina che rimuovendo molecole di ubiquitina da proteina target, ne modula la funzione) che agiva come un oncogene nel melanoma, i cui alti livelli supportavano la crescita del melanoma. Le cellule in cui USP7 veniva silenziato, infatti, mostravano una ridotta proliferazione cellulare in vitro e una ridotta crescita del tumore in vivo, in due diversi sottotipi di melanoma (ovvero, caratterizzati da due diverse mutazioni driver: BRAF e NRAS). La riduzione della proliferazione cellulare e della crescita del tumore erano dovute all'arresto del ciclo cellulare piuttosto che alla morte cellulare. Il silenziamento di USP7 regolava diversi geni, proteine e pathway coinvolti nella senescenza, tra cui RRM2: USP7 up-regolava i livelli di RRM2 nella fase S del ciclo cellulare de-ubiquitinando RRM2 e prevenendone la degradazione. Quindi, il trattamento delle cellule di melanoma con inibitori di USP7 arrestava il ciclo cellulare e induceva la senescenza delle cellule di melanoma. Nei campioni di melanoma dei pazienti, i livelli di espressione di USP7 correlavano con la progressione del tumore: l'elevata espressione di USP7 caratterizzava i melanomi aggressivi e identificava i pazienti con minore probabilità di sopravvivenza. Infine, abbiamo valutato il potenziale di USP7 come target terapeutico nel melanoma. Dato che il trattamento con inibitori di USP7 induceva alterazioni epigenetiche –che supportavano l'arresto del ciclo cellulare–, dovute ad un'alterata attività di HDAC (deacetilasi), abbiamo testato un nuovo trattamento di combinazione con inibitori di USP7 e inibitori di HDAC/LSD1, al fine di indurre prima l'arresto del ciclo cellulare e la senescenza e successivamente la morte delle cellule senescenti, con effetti collaterali trascurabili. Abbiamo quindi, fornito solide evidenze pre-cliniche a supporto di una sperimentazione in ambito clinico di terapie basate su USP7, associate alla senescenza cellulare, per il trattamento del melanoma. (PMID: 36130505)

Al fine di definire i meccanismi alla base della recidiva nella leucemia, abbiamo effettuato una dettagliata analisi genomica e di espressione genica, a livello di singola cellula, di sei campioni isolati al momento della diagnosi e al momento della comparsa della recidiva da pazienti leucemici caratterizzati dalle alterazioni genomiche FLT3-ITD o AML1-ETO.

I pazienti con leucemia mieloide acuta hanno nel complesso una cattiva prognosi: infatti, mentre molti di loro vanno inizialmente incontro a remissione della malattia in seguito al trattamento, spesso la malattia si rimanifesta. La recidiva potrebbe essere dovuta o ad una selezione, indotta dal trattamento, delle cellule leucemiche che portano specifiche mutazioni, o alla comparsa di nuove mutazioni che conferiscono a queste cellule un vantaggio proliferativo. Anche differenze nell'espressione genica potrebbero giocare un ruolo importante. A livello genomico, la nostra analisi ha evidenziato una notevole eterogeneità, dovuta principalmente alle variazioni nel numero di copie di alcuni geni: erano presenti diverse mutazioni paziente-specifiche, alcune erano maggiormente presenti alla recidiva che alla diagnosi, altre invece erano più presenti alla diagnosi che alla recidiva. Infine, in alcuni pazienti, le alterazioni presenti alla diagnosi risultavano inalterate nei campioni corrispondenti raccolti al momento del rimanifestarsi della malattia. Al fine di identificare i meccanismi potenzialmente coinvolti nella progressione della malattia, abbiamo anche analizzato e paragonato il profilo di espressione genica dei campioni leucemici e abbiamo rilevato lo stesso elevato grado di eterogeneità: in alcuni pazienti, i campioni alla diagnosi e alla recidiva erano molto simili, mentre in altri pazienti erano molto diversi. L'analisi approfondita dei singoli pazienti separatamente ha consentito di identificare in alcuni pazienti l'up-regolazione o la down-regolazione –indipendente dalle mutazioni– di alcuni pathway intracellulari alla recidiva e non alla diagnosi –quindi verosimilmente associati con la chemioresistenza–, mentre pathway differenti erano coinvolti in altri pazienti. Abbiamo inoltre identificato delle firme molecolari –ovvero un certo numero di geni specifici i cui livelli di espressione distinguevano i pazienti FLT3-ITD e AML1-ETO. Queste firme molecolari includevano geni noti per essere associati con questi sottotipi di leucemia. Le nostre analisi hanno rilevato una maggiore presenza della firma molecolare che caratterizza e distingue le cellule staminali leucemiche (la cui presenza è normalmente associata ad un esito negativo della malattia) nei campioni isolati al momento della recidiva rispetto a quelli isolati al momento della diagnosi. Le cellule staminali leucemiche (che erano prevalentemente in fase G1 del ciclo cellulare) potrebbero sfuggire al trattamento ed essere responsabili della recidiva. Infatti, cellule staminali leucemiche con un profilo di espressione genica molto simile erano presenti nei campioni raccolti alla diagnosi e alla recidiva in due pazienti diversi. Il nostro studio offre quindi una caratterizzazione ad alta risoluzione dei campioni di leucemia, riscontrando un elevato grado di eterogeneità non solo tra i pazienti, ma anche a seconda dello stadio della malattia, che ostacola l'identificazione dei meccanismi comuni responsabili della recidiva in tutti i pazienti. Studi futuri, condotti in coorti di pazienti più grandi, potrebbero valutare se attraverso questo tipo di analisi sia possibile “raggruppare” i meccanismi alterati e coinvolti nel manifestarsi della recidiva in diversi pazienti così da trovare un “tipo” comune di meccanismo cellulare alterato e responsabile della recidiva in tutti i pazienti. (PMID: 35986270)

Nell'ambito di una collaborazione internazionale abbiamo studiato, sfruttando un modello di leucemia promielocitica acuta (APL) –ovvero un sottotipo di leucemia indotto da una traslocazione cromosomica che porta alla formazione della proteina di fusione anomala PML-RAR e al blocco del differenziamento dei blasti leucemici–, il modo in cui cambiamenti progressivi nella struttura tridimensionale del DNA durante lo sviluppo della leucemia influenzano l'espressione genica e di conseguenza la tumorigenesi. Abbiamo osservato una dinamica riorganizzazione del genoma e l'alterazione dei livelli di espressione di diversi geni durante la trasformazione maligna, inclusi geni collegati alla risposta immunitaria, al differenziamento, all'apoptosi. Queste alterazioni erano particolarmente marcate negli stadi più avanzati della malattia. Diversi geni risultavano alterati già nelle fasi precoci della malattia e rimanevano alterati nelle fasi successive, mentre altri geni erano alterati in maniera specifica nei diversi stadi: ad esempio, alcuni erano specificatamente alterati negli stadi precoci –come i geni della proliferazione e dell'adesione che risultavano upregolati e quelli della risposta immunitaria o coinvolti nel differenziamento delle cellule ematopoietiche che risultavano invece downregolati– ed altri negli stadi più avanzati, suggerendo che poche alterazioni negli stadi precoci influenzavano successivamente l'espressione genica negli stadi più avanzati della malattia. Nel complesso, nelle cellule che esprimevano PML-RAR c'erano più geni downregolati che upregolati rispetto alle cellule normali, in accordo con il noto ruolo di PML-RAR nel reprimere l'espressione genica. La modulazione dell'espressione genica in presenza di PML-RAR era dovuta a cambiamenti a livello di specifiche regioni regolatorie del DNA –gli enhancer– che infatti diventavano inattive con il progredire della leucemia. All'interno delle regioni del DNA in cui si trovavano gli enhancer che venivano inattivati con la progressione della malattia, gli autori hanno identificato il gene *klf4* –gene che codifica per un fattore di trascrizione coinvolto nel differenziamento cellulare, meno espresso in pazienti leucemici rispetto ai soggetti sani–, che risultava infatti meno espresso con il progredire della malattia. Al contrario, gli enhancer vicini al gene *Gata2* risultavano più attivi e l'espressione del gene *Gata2* aumentava. L'espressione di PML-RAR induceva una profonda riorganizzazione della struttura del DNA, aumentando o diminuendo il numero di interazioni tra regioni del DNA; ciò a sua volta influenzava l'espressione di geni coinvolti nella regolazione del differenziamento di blasti leucemici. La sovraespressione di *Klf4* in cellule leucemiche che esprimevano PML-RAR –che di solito mostrano una ridotta espressione di *Klf4*– ripristinava il differenziamento dei blasti leucemici ed eliminava completamente la loro capacità di self-renewal. Abbiamo quindi dimostrato che durante lo sviluppo della leucemia si verifica una progressiva alterazione nella struttura tridimensionale del DNA indotta dall'espressione di PML-RAR. Queste alterazioni sono lievi all'inizio e più pronunciate negli stadi più avanzati della malattia, probabilmente anche a causa di altri fattori come mutazioni aggiuntive e l'effetto del microambiente tumorale. Il gene *Klf4* ne risulta particolarmente influenzato e la sua

espressione si riduce progressivamente. Agendo come oncosoppressore, la sua ridotta espressione indotta dalla presenza di PML-RAR promuove la progressione della leucemia e la sua sovraespressione nei blasti leucemici corregge il fenotipo tumorale. Questi risultati da un lato mostrano il modo in cui, durante la progressione della leucemia, le alterazioni della struttura del DNA indotte da proteine oncogeniche influenzano l'espressione di geni chiave del processo di tumorigenesi; dall'altro, suggeriscono che sebbene gli attuali trattamenti standard siano in grado di curare un'elevata percentuale di pazienti affetti da APL, la combinazione con farmaci diretti contro Klf4 potrebbe offrire nuove opzioni terapeutiche per quei pazienti che non rispondono agli attuali trattamenti. (PMID: 35450883)

Abbiamo mostrato che le cellule del tumore del pancreas ben differenziate sono caratterizzate da uno specifico profilo di espressione genica, che è diverso da quello delle cellule tumorali poco differenziate, è controllato dai livelli di espressione della proteina IRF1, e in cui il pathway dell'IFN è attivato in maniera costitutiva. Regolando l'espressione genica, IRF1 scolpisce il metabolismo della cellula tumorale -agendo direttamente sull'attività dei mitocondri- e controlla la loro capacità di sintetizzare gli acidi grassi necessari per la formazione di nuove membrane durante la proliferazione cellulare.

Il tumore del pancreas è molto eterogeneo, costituito da un mix di cellule tumorali ben differenziate e poco differenziate, diverse sia dal punto di vista della morfologia che dell'espressione genica e con un diverso grado di aggressività. Ad esempio, il profilo di espressione genica delle cellule tumorali ben differenziate è regolato dal pathway dell'Interferone (IFN), un pathway che, in diversi tipi di tumore, è coinvolto nella progressione tumorale e nella resistenza alla terapia, sia direttamente -tramite l'attivazione di oncogeni o la modulazione del metabolismo cellulare-, sia indirettamente, agendo sul sistema immunitario. Noi abbiamo osservato che IRF1 era più espresso nelle cellule tumorali del pancreas ben differenziate rispetto a quelle poco differenziate. L'espressione di IRF1 era indipendente dalla stimolazione da parte dell'IFN prodotto dal tumore, ma era invece associata all'espressione di geni tipici del differenziamento. Il diverso livello di espressione di IRF1 contribuiva a modulare l'attivazione del pathway dell'IFN, in maniera più marcata nelle cellule tumorali ben differenziate rispetto a quelle poco differenziate. A sottolineare il ruolo centrale di IRF1, la delezione di IRF1 influenzava profondamente l'espressione genica, limitava la risposta delle cellule tumorali alla stimolazione con IFN, aumentava, in vitro, la capacità di migrazione delle cellule e, in vivo, determinava la formazione di tumori più grandi. Così come nei modelli preclinici, l'analisi dei dati dei pazienti ha evidenziato la correlazione tra l'espressione di IRF1, maggiormente espressa nelle aree del tumore ricche di cellule tumorali ben differenziate, e la risposta all'IFN. L'espressione di IRF1 controllava anche -ed era indispensabile- per il metabolismo e l'attività dei mitocondri nelle cellule tumorali. In assenza di IRF1, da un lato, si riduceva il numero di mitocondri (aumentava la mitofagia); dall'altro, per gestire lo stress dovuto al minor numero

di mitocondri, aumentava la funzionalità mitocondriale (la perdita della repressione mediata da IRF1 determinava infatti una aumentata espressione di proteine chiave del machinery di oxphos). L'elevata espressione di IRF1 nelle cellule tumorali ben differenziate, poco proliferanti, inibiva, inoltre, la sintesi degli acidi grassi, necessaria per la formazione di nuove membrane durante la proliferazione cellulare. Al contrario, la delezione di IRF1 causava un'aumentata sintesi di acidi grassi. Abbiamo quindi approfondito il ruolo chiave di IRF1 e del pathway dell'IFN nella progressione del tumore del pancreas, descrivendo in dettaglio i meccanismi molecolari coinvolti e le conseguenze funzionali, che potrebbero spiegare il ruolo antitumorale di IRF1. (PMID: 35568393)

Integrando i dati trascrittomici e proteomici di centinaia di campioni tumorali umani aneuploidi, abbiamo mostrato l'esistenza di meccanismi compensatori che consentono alla cellula di mantenere il giusto rapporto tra le componenti di uno stesso complesso proteico codificate da geni su regioni del cromosoma amplificate e quelle codificate da regioni del cromosoma non amplificate. Questa regolazione consente di evitare le condizioni di stress che minacciano la sopravvivenza della cellula aneuploide.

Errori nella segregazione dei cromosomi al momento della divisione cellulare portano all'aneuploidia, condizione in cui le cellule sono caratterizzate da un numero anomalo di cromosomi. Amplificando (o eliminando) interi cromosomi o regioni di essi, l'aneuploidia determina l'instaurarsi di una condizione di stress per la cellula; ad esempio, altera il rapporto tra le diverse subunità di un complesso proteico, riducendo di conseguenza la sopravvivenza della cellula. Tuttavia, nei tumori solidi l'aneuploidia è ampiamente diffusa, suggerendo l'esistenza di meccanismi in grado di compensare questi squilibri e consentire alle cellule di gestire lo stress associato. Noi abbiamo osservato, in diversi tipi di tumore, che alterazioni nei livelli di espressione di geni localizzati in regioni del cromosoma amplificate erano sorprendentemente accompagnate da alterazioni anche in regioni del cromosoma non amplificate. Dato che le proteine codificate da regioni non amplificate formavano dei complessi proteici con proteine codificate da regioni amplificate, abbiamo ipotizzato l'esistenza di meccanismi compensatori al fine di bilanciare l'espressione genica alterata indotta dall'aneuploidia. I meccanismi compensatori sono necessari perché le proteine in eccesso derivanti da regioni amplificate del cromosoma potrebbero aggregarsi e causare tossicità cellulare. Alcune proteine mostravano una maggiore propensione ad aggregarsi di altre. I nostri dati suggeriscono che un controllo combinato a livello trascrizionale e post-traduzionale consente di regolare l'abbondanza delle proteine: da un lato, le cellule bilanciano l'espressione da cromosomi o regioni del cromosoma amplificate/delete, a livello trascrizionale; dall'altro, a livello dei cromosomi non amplificati, il meccanismo di compensazione agisce molto probabilmente a livello post-traduzionale: le proteine in eccesso potrebbero essere "etichettate" con molecole di ubiquitina ed indirizzate verso la degradazione. In questo modo, le cellule evitavano

l'aggregazione, tossica, delle proteine in eccesso. Le cellule sfruttavano inoltre un meccanismo di compensazione di tipo "funzionale", ovvero i complessi proteici che giocano un ruolo chiave nella fisiologia cellulare erano regolati attraverso dei meccanismi che consentivano la up- o down- regolazione dell'intero complesso proteico. Nonostante tutti i meccanismi coinvolti, alcuni tumori potrebbero compensare meglio lo squilibrio indotto dall'aneuploidia e quelli maggiormente in grado di farlo avrebbero un vantaggio in termini di sopravvivenza. Per valutare la capacità dei tumori di gestire lo squilibrio, gli autori hanno calcolato un punteggio che misura il fallimento delle cellule nella gestione dello squilibrio indotto dall'aneuploidia tra le proteine dello stesso complesso proteico. Sfruttando questo punteggio, hanno osservato che i tumori con un punteggio più basso avevano una maggiore probabilità di sopravvivenza, dimostrando così che la capacità di compensare questo squilibrio fornisce un vantaggio in termini di sopravvivenza alle cellule tumorali. Il punteggio correlava con i livelli di espressione delle proteine responsabili della "marcatura" tramite ubiquitina delle proteine da degradare; ciò significa che, nei tumori meno in grado di compensare l'eccesso di proteine, c'era un'abbondanza di proteine coinvolte nella degradazione delle proteine in eccesso indotta dall'aneuploidia. Con questo studio abbiamo quindi mostrato che le cellule tumorali aneuploidi in grado di mettere in atto dei meccanismi compensatori controllano in maniera efficiente l'eccesso di proteine indotto dall'aneuploidia che altera gli equilibri tra le subunità all'interno di un complesso proteico. Questo studio spiega quindi in che modo una cellula tumorale gestisce una condizione che normalmente causerebbe stress e tossicità, consentendole di sopravvivere e proliferare. La comprensione di questi meccanismi potrebbe offrire nuovi target da sfruttare in un contesto terapeutico per arrestare la progressione tumorale. (PMID: 35575458)

Sfruttando il lievito come sistema modello, abbiamo mostrato che la dinamica dei microtubuli astrali è strettamente regolata durante il ciclo cellulare.

La corretta divisione del materiale genetico nelle cellule figlie al momento della divisione cellulare dipende dal fuso mitotico, una struttura costituita da lunghi filamenti chiamati microtubuli. Tre tipi di microtubuli costituiscono il fuso mitotico: i microtubuli del cinetocore –che afferrano i cromosomi duplicati–, i microtubuli interpolarari –che attirano i cromosomi ai lati opposti– e i microtubuli astrali –che sono critici per il corretto posizionamento del fuso. Questi meccanismi giocano un ruolo chiave in contesti fisiologici e patologici. Ad esempio, il posizionamento del fuso mitotico è critico per il mantenimento delle caratteristiche staminali. Nei tumori, le cellule che conservano le caratteristiche staminali alimentano la progressione del tumore. Abbiamo mostrato che i microtubuli astrali rimangono instabili fino alla metafase. L'instabilità dei microtubuli astrali è critica per il posizionamento del fuso, ed è regolata dall'attività della proteina Clb4 (una ciclina mitotica). Clb4, a sua volta, regola la

fosforilazione e, probabilmente, l'attività e/o la localizzazione delle proteine che regolano i microtubuli, tra cui la proteina kip2. Al contrario, i microtubuli astrali diventano più stabili all'inizio dell'anafase (la stabilizzazione dei microtubuli astrali nell'anafase è necessaria per rafforzare il legame con la corteccia cellulare) e la loro stabilizzazione è indotta dal complesso proteico APC/CCdc20 (una ligasi che degrada la proteina Clb4). Il complesso APC/CCdc20 è noto anche influenzare la dinamica dei microtubuli interpolari e del cinetocore. Questo studio, quindi, fa luce sul modo in cui questo complesso proteico regola le tempistiche degli eventi mitotici tardivi, influenzando in maniera sequenziale le tre classi di microtubuli del fuso. Abbiamo quindi identificato e caratterizzato l'asse molecolare APC/CCdc20-Clb4-Kip2 che modula la dinamica dei microtubuli astrali per assicurare un appropriato posizionamento del fuso mitotico. (PMID: 36269172)

Abbiamo analizzato la dinamica dei telomeri dei granulociti in pazienti con linfoma sottoposti a chemioterapia.

Sebbene sia noto l'effetto del trattamento chemioterapico sulla dinamica dei telomeri, i fattori che determinano la dinamica della lunghezza dei telomeri dopo la chemioterapia sono ancora poco noti. Abbiamo quindi analizzato la dinamica dei telomeri dei granulociti in pazienti con linfoma sottoposti a chemioterapia. La lunghezza dei telomeri è stata misurata tramite southern blot dopo ogni ciclo di chemioterapia ed un anno dopo la fine del trattamento. I nostri dati indicano che il sesso e la lunghezza di base dei telomeri sono i principali determinanti della dinamica della lunghezza dei telomeri in seguito a chemioterapia nei pazienti con linfoma. (PMID: 36533316)

Nell'ambito di una collaborazione italiana, abbiamo osservato che il profilo dei miRNA nelle metastasi del tumore al polmone rivela un ruolo chiave per l'asse miRNA-PD1-PDL1 nella modulazione della risposta alla chemioterapia.

Il tumore al polmone è spesso localmente avanzato al momento della diagnosi e richiede approcci di trattamento multimodali. La chemioterapia neoadiuvante seguita da chirurgia è il trattamento di elezione per i tumori in questo stadio. Tuttavia la maggioranza dei pazienti sono resistenti alla chemioterapia neoadiuvante, mostrano metastasi persistenti ai linfonodi e hanno una prognosi sfavorevole. Perciò la definizione dei meccanismi e l'identificazione di biomarcatori di resistenza al trattamento è fondamentale per migliorare la prognosi dei pazienti. Abbiamo quindi investigato il profilo dei miRNA e di espressione genica dei pazienti al terzo stadio prima del trattamento chemioterapico. Abbiamo identificato una firma molecolare di microRNA che predice in maniera accurata la risposta alla terapia neoadiuvante. Dal punto di vista meccanicistico, abbiamo identificato il ruolo regolatorio dell'asse miR-455-5p/PD-L1 nel guidare la resistenza alla chemioterapia, marcare le metastasi caratterizzate dall'attivazione del pathway di risposta all'interferone (un induttore dell'espressione di PDL1) e influenzare la sopravvivenza dei linfociti

T e la loro relativa abbondanza nel microambiente tumorale. I nostri dati quindi forniscono nuovi biomarcatori per predire la resistenza alla terapia neoadiuvante ed aggiungono informazioni molecolari rilevanti per migliorare la gestione dei pazienti con tumore al polmone localmente avanzato. (PMID: 36587234)

Abbiamo condotto una meta-analisi per valutare la presenza di specifiche alterazioni genetiche nelle metastasi cerebrali derivanti dal melanoma.

I dati disponibili sulle alterazioni molecolari nelle metastasi cerebrali derivanti da melanoma sono limitati e questo potrebbe ostacolare lo sviluppo di strategie terapeutiche efficaci. Abbiamo condotto quindi una meta-analisi di tutti gli studi che riportavano dati di sequenziamento del DNA di queste metastasi. I nostri studi hanno evidenziato la presenza di alterazioni molecolari nelle metastasi che potrebbero essere sfruttate come target terapeutici per migliorare la prognosi dei pazienti. In particolare, abbiamo identificato 27 geni mutati associati con l'attività del recettore del fattore di crescita endoteliale, del recettore tirosin chinasi, e con alterazioni nella regolazione dell'apoptosi e della proliferazione. (PMID: 36401787)

Alcuni dei segni tipici dell'invecchiamento sono molto simili ai tratti tipici associati alla tumorigenesi. Tuttavia, la reale correlazione tra i due processi non è ancora chiara e una maggior comprensione dei meccanismi di invecchiamento potrebbe aiutare a far luce sui meccanismi critici del processo di tumorigenesi. In questo contesto, abbiamo mostrato che la divisione asimmetrica delle cellule staminali mammarie, che si verifica più frequentemente durante l'invecchiamento, è responsabile della riduzione del numero e del potenziale rigenerativo delle cellule staminali mammarie –tipici segni di invecchiamento. Abbiamo evidenziato i meccanismi molecolari coinvolti, tra cui l'attivazione anomala della proteina p66Shc e la signalling intracellulare di p53/p44 che, agendo sulla proteina Inscuteable, regola la modalità di divisione simmetrica/asimmetrica delle cellule staminali.

Sfruttando un modello murino transgenico privo della proteina p66Shc –una proteina mitocondriale che, producendo specie reattive dell'ossigeno, modula l'attività di specifiche proteine intracellulari– abbiamo osservato un ritardo dell'invecchiamento –ovvero un ritardo nell'involutione della ghiandola mammaria– nei topi anziani privi di p66Shc (topi p66KO) rispetto agli animali di controllo della stessa età. Infatti, la ghiandola mammaria dei topi anziani p66KO conteneva un numero più alto di cellule staminali mammarie rispetto ai controlli anziani. Inoltre, nella ghiandola mammaria dei topi anziani p66KO, abbiamo osservato un'espressione più elevata di diversi geni che caratterizzano le cellule staminali. In vivo, le cellule staminali p66KO avevano un potenziale rigenerativo maggiore, a causa dell'aumentata capacità di autorinnovamento delle cellule staminali mammarie. Abbiamo quindi analizzato in dettaglio i meccanismi responsabili del fenotipo osservato e abbiamo notato che p66Shc

era coinvolta nel controllo della divisione simmetrica o asimmetrica delle cellule staminali. Le cellule staminali possono infatti andare incontro a divisione simmetrica –in cui una cellula staminale dà origine a due cellule figlie che mantengono entrambe le caratteristiche staminali– oppure asimmetrica –in cui una delle cellule figlie resta una cellula staminale mentre l'altra va incontro a differenziamento. Mentre negli animali di controllo anziani le cellule staminali si dividevano soprattutto asimmetricamente, negli animali anziani p66KO si dividevano soprattutto simmetricamente; la ri-espressione di p66Shc aumentava di nuovo la divisione asimmetrica e riduceva la proliferazione cellulare. p66Shc regolava l'espressione della proteina p44, la quale a sua volta regolava i livelli di p53. p53 modulava l'espressione della proteina Inscuteable, che controllava la scelta della cellula staminale tra divisione simmetrica e asimmetrica. Infatti, in topi p66KO anziani, p53 non era espressa e diversi geni coinvolti nella scelta della cellula di dividersi asimmetricamente –incluso il gene di Inscuteable– erano downregolati. La down-regolazione di Inscuteable aumentava la frequenza delle divisioni simmetriche, mentre la sua sovraespressione nelle cellule staminali dei topi p66KO anziani promuoveva nuovamente la divisione asimmetrica. Abbiamo osservato anche un numero ridotto di divisioni simmetriche delle cellule staminali, una ridotta proliferazione e un minore potenziale rigenerativo nei topi anziani normali rispetto ai topi giovani, sottolineando come la frequenza delle divisioni simmetriche/asimmetriche giocasse un ruolo anche nel normale invecchiamento. Tuttavia l'assenza di p66Shc non aveva alcun effetto nelle cellule staminali giovani, suggerendo che l'attività descritta della proteina p66Shc sia specifica del processo di invecchiamento. (PMID: 35739253)

Il sistema immunitario nel processo di tumorigenesi.

Abbiamo mostrato che la stimolazione delle cellule NK con la molecola IL15 è in grado di ripristinare la loro funzionalità metabolica e la loro attività antitumorale.

Le cellule NK sono un sottotipo di cellule immunitarie che giocano un ruolo chiave nel combattere la progressione del tumore. Altri fattori presenti nel microambiente tumorale ostacolano però in qualche modo la loro attività, “alterando” il loro metabolismo e limitando la loro capacità di fermare la crescita del tumore e la disseminazione metastatica. Identificare i meccanismi alla base di questa disfunzione metabolica delle cellule NK indotta dal microambiente è fondamentale per poter sviluppare degli strumenti in grado di interferire con questi meccanismi, ripristinare il metabolismo delle cellule NK e quindi la loro attività antitumorale, anche nelle condizioni ostili del microambiente tumorale. Sfruttando cellule NK isolate da effusioni pleuriche maligne (che rappresentano un modello eccellente e facilmente accessibile di microambiente tumorale) di pazienti con tumore al polmone, abbiamo osservato che il microambiente tumorale riduceva l'attività dei mitocondri delle cellule NK -il cui funzionamento è critico per la sopravvivenza delle cellule in un microambiente ostile e per la loro attività anti tumorale: le cellule

NK esposte al microambiente tumorale erano “esauste”, uno stato in cui le cellule immunitarie sono caratterizzate da una ridotta funzionalità. La stimolazione delle cellule NK con IL15 alterava profondamente il metabolismo cellulare, aumentando la funzionalità mitocondriale e la loro attività antitumorale. E' importante sottolineare che ciò era vero sia per le cellule “esauste” in seguito all'esposizione alle condizioni stressanti del microambiente tumorale, sia nelle cellule NK non “esauste”: IL15 era in grado di “recuperare” le cellule NK metabolicamente disfunzionali (riportandole ai livelli delle cellule di controllo), ripristinando così la loro capacità di uccidere le cellule tumorali. Inoltre, i pazienti che avevano livelli più elevati di IL15 intratumorale avevano una maggiore sopravvivenza. Abbiamo quindi identificato IL15 come un fattore chiave nel controllare l'attività anti-tumorale delle cellule NK, suggerendo che, agendo sul metabolismo cellulare, potrebbe rappresentare un efficace strumento terapeutico per potenziare l'immunoterapia basata su cellule NK, sottolineando la rilevanza clinica di queste scoperte. (PMID 36468179)

Abbiamo descritto per la prima volta il ruolo immunoregolatorio, mediato dalla molecola IL10, delle cellule iNKT intestinali nel controllare la patogenicità delle cellule T helper della mucosa e nel mantenere l'omeostasi immunitaria intestinale.

Le cellule iNKT hanno una funzione pleiotropica in diversi tessuti, secernendo un gran numero di molecole citotossiche e proinfiammatorie. Tuttavia, la presenza e la funzione delle cellule iNKT intestinali umane in grado di secernere molecole immunomodulatorie come IL10 non è mai stata riportata. In questo contesto, abbiamo descritto per la prima volta la presenza di cellule iNKT che producono IL10 (NKT10) nella lamina propria dell'intestino di individui sani e di pazienti con malattia di Crohn. Le cellule NKT10 intestinali isolate dai pazienti hanno mostrato la capacità di sopprimere l'attività dei linfociti T CD4 patogeni. L'abbondanza di cellule NKT10 della mucosa era associata ad una prognosi migliore dei pazienti con malattia di Crohn. Inoltre, il microbiota intestinale ricco di batteri che producono SCFA sosteneva la produzione di IL10 da parte delle cellule iNKT. Infine, le cellule iNKT che non producevano IL10 non erano in grado di controllare l'attività patogena dei linfociti T CD4 trapiantati in un modello sperimentale di colite. (PMID 35358301)

Abbiamo effettuato uno studio clinico per valutare l'associazione tra tumore del colon-retto, vitamina D e microbiota.

Diversi studi suggeriscono un ruolo del microbiota intestinale nell'incidenza e nella progressione del tumore del colon-retto. I livelli nel sangue di vitamina D sono anche inversamente correlati con il rischio di tumore del colon-retto e con la prognosi. Tuttavia ad oggi non è nota l'effettiva relazione tra questi fattori. Abbiamo arruolato 74 pazienti con tumore del colon retto, che erano stati sottoposti a trattamento standard. A questi pazienti è stata somministrata vitamina D o placebo. Abbiamo raccolto i campioni di

microbiota fecale prima e dopo il trattamento per un successivo sequenziamento. I nostri risultati hanno mostrato che la somministrazione di vitamina D potrebbe contribuire a definire la composizione del microbiota intestinale e il microbiota intestinale potrebbe in parte mediare gli effetti della somministrazione di vitamina D. Le differenze specifiche osservate tra i sessi sottolineano la necessità di includere sesso e genere come variabile negli studi sul microbioma. (PMID 36279751)

Abbiamo investigato l'associazione tra la composizione del microbiota intestinale e la risposta al trattamento con inibitori dei checkpoint immunitari in pazienti con melanoma cutaneo in stadio avanzato. La composizione del microbioma intestinale è stata associata con la risposta clinica al trattamento con inibitori dei checkpoint immunitari (ICI), ma è ancora poco chiaro quali siano le caratteristiche specifiche del microbioma associate ai benefici clinici dei ICI. Abbiamo effettuato il sequenziamento di campioni fecali raccolti prima dell'inizio del trattamento con ICI da 5 studi osservazionali in pazienti con melanoma cutaneo in stadio avanzato. Integrando i dati con quelli derivanti da studi precedentemente pubblicati, abbiamo scoperto che il microbioma intestinale è associato in maniera significativa, ma dipendente dalla coorte analizzata, con la risposta al trattamento con ICI. Un'analisi di machine learning ha confermato l'associazione tra il microbioma e la risposta al trattamento con ICI e la sopravvivenza dei pazienti, ma ha anche rivelato la limitata riproducibilità delle signature basate sul microbioma nelle diverse coorti di pazienti. Infatti, sebbene siano state identificate diverse specie batteriche, tra cui *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Roseburia* spp. e *Akkermansia muciniphila*, associate con la risposta al trattamento, nessuna singola specie può essere considerata come un biomarcatore in tutti gli studi. Il ruolo del microbiota intestinale umano nella risposta al trattamento con ICI appare quindi più complesso di quanto precedentemente si ritenesse, che va oltre la mera presenza o assenza di specie batteriche diverse nei responder e non-responder. (PMID 35228751)

Abbiamo mostrato che la metilazione dell'istone H₃ da parte della proteina SETDB₁ riduce il legame della proteina CTCF a specifiche regioni del DNA, ovvero un tipo di sequenze ripetute chiamate SINE B₂. Quando SETDB₁ non è presente, la conseguente ridotta metilazione dell'istone H₃ (H₃K₉me₃) e l'alterata struttura del DNA determinano un aumento del numero di proteine CTCF legate alle regioni SINE B₂. Il legame di CTCF a sua volta modifica ulteriormente la struttura del DNA, influenzando la formazione di "loop" all'interno di strutture specifiche, i cosiddetti "TAD" (topologically-associating domains), alterando così l'espressione genica nei macrofagi e danneggiando la loro capacità di rispondere ed attivarsi in seguito a specifici stimoli.

Gli istoni sono proteine coinvolte nell'impacchettamento del DNA all'interno del nucleo. Così facendo, da un lato "nascondono" alcune regioni del DNA, prevenendo il legame di alcune proteine; dall'altro, espongono altre regioni, che possono essere legate da altri fattori, modulando in questo modo

l'espressione genica. L'interazione degli istoni con il DNA può essere regolata da modificazioni chimiche, come la metilazione o l'acetilazione a livello di specifici aminoacidi. La metilazione dell'istone H₃ (a livello della lisina 9 –H₃K₉me₃– che determina la repressione dell'espressione genica) è regolata da diverse proteine (SETDB₁, SETDB₂, SUV39H₁, SUV39H₂, G9a e GLP) e contribuisce alla regolazione dell'espressione genica. Spegndo l'espressione di SETDB₁ nei macrofagi, abbiamo osservato una marcata riduzione della metilazione dell'istone H₃ (H₃K₉me₃) in regioni del DNA meno compattate. La delezione di SETDB₁ non alterava la localizzazione del fattore di trascrizione PU.1 –coinvolto nella regolazione dell'identità e dell'attivazione dei macrofagi–; tuttavia, induceva il legame di PU.1 a livello di siti di legame non canonici → bassa affinità– ed influenzava l'attivazione di alcune (3%) regioni regolatorie, gli enhancer (regioni del DNA che regolano l'espressione genica e sono caratterizzati da acetilazione dell'istone H₃). Abbiamo osservato che molti degli enhancer attivati erano tipici di altri tipi cellulari e contribuivano a stabilire le caratteristiche specifiche di quel tipo cellulare (cell-lineage specific). La perdita di metilazione dell'istone H₃ e l'aumento di acetilazione indotti dalla delezione di SETDB₁ avvenivano a livello di regioni del DNA ben definite, caratterizzate da sequenze ripetute, nello specifico, le sequenze SINE B₂, che sono regioni su cui generalmente si lega la proteina CTCF. In assenza di SETDB₁, abbiamo osservato un maggior legame di CTCF a siti molto vicini agli enhancer. I nostri risultati suggeriscono che la metilazione dell'istone H₃ controlli direttamente il legame di CTCF alle sequenze SINE 2B. CTCF è una proteina che gioca un ruolo importante nella formazione di loop del DNA e quindi nell'organizzazione tridimensionale del DNA. Un aumento del legame di CTCF a livello delle sequenze SINE 2B indotto dalla delezione di SETDB₁ potrebbe quindi avere un impatto sulla struttura tridimensionale del DNA. Mentre non abbiamo osservato differenze significative in termini di struttura generale, struttura e numero di TAD tra i macrofagi in cui SETDB₁ era presente e quelli in cui era assente, abbiamo mostrato un lieve aumento nel numero di contatti tra punti diversi del DNA all'interno dei TAD, aumentando così la formazione di loop. Infine, nonostante l'impatto notevole della delezione di SETDB₁ sulla metilazione degli istoni e il legame di CTCF, l'espressione genica risultava solo marginalmente alterata. I geni up-regolati erano piuttosto vicini alle regioni su cui si legava CTCF e ai loop indotti, suggerendo la possibilità di una relazione causa-effetto tra l'aumentata formazione di loop, l'aumentata acetilazione, e l'induzione dei geni. Tmem154 era il gene maggiormente up-regolato nelle cellule in cui mancava SETDB₁ e CTCF si legava molto vicino ad esso. Abbiamo quindi dimostrato un ruolo di SETDB₁ nel modulare –influenzando i livelli di metilazione dell'istone H₃– il legame di CTCF a specifiche regioni del DNA –le regioni SINE B₂. (PMID: 35361678)

Abbiamo dimostrato che l'identificazione del sottotipo cellulare di cellule TCF1-positive funzionalmente esauste in linfoma a cellule B del sottotipo THRLBCL (T-cell/histiocyte-rich large B-cell lymphoma) potrebbe predire una migliore risposta al trattamento con inibitori dell'asse PD1/PDL1.

THRLBCL è una variante di linfoma DLBCL raro e aggressivo che generalmente colpisce i pazienti giovani e di mezza età. Il microambiente tumorale (TME) gioca un ruolo chiave nel THRLBCL a causa della sua peculiare composizione cellulare. Una percentuale significativa di pazienti THRLBCL è resistente a terapie RCHOP (ovvero, rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, e prednisone) e a terapia cellulare basata su cellule CART. E' quindi necessario lo sviluppo di approcci terapeutici specifici per questi pazienti. Al fine di comprendere le basi molecolari dell'interazione delle cellule immunitarie nel TME dei pazienti THRLBCL e identificare strategie terapeutiche nuove e promettenti, abbiamo confrontato i profili di espressione genica di 12 campioni THRLBCL e 10 campioni di DLBCL e abbiamo ulteriormente corroborato le nostre scoperte con dati in silico. Le nostre analisi hanno evidenziato il ruolo predominante del asse PD1/PDL1 nella modulazione della risposta immunitaria. Inoltre, l'attivazione di PD1/PDL1 era accompagnata dalla sovraespressione di 48 geni associati all'esaurimento funzionale dei linfociti T. A livello globale, il TME di THRLBCL era funzionalmente "esausto" e mostrava segni di infiammazione, con attivazione del pathway dell'interferone. Dal punto di vista terapeutico, abbiamo validato i nostri risultati tramite immunistochemica, identificando un sottotipo di cellule TCF1 positive abbondante in pazienti THRLBCL. Questo sottotipo cellulare correlava con una buona risposta clinica a terapie con inibitori di checkpoint immunitari e potrebbe migliorare la predizione della risposta a terapie anti-PD1 in pazienti con THRLBCL. (PMID 35767735)

Abbiamo identificato un nuovo meccanismo di evasione da parte delle cellule tumorali del controllo del sistema immunitario nel linfoma non hodgkin a cellule B.

Il ruolo e la regolazione delle cellule del sistema immunitario innato nel linfoma non hodgkin a cellule B (NHL) è poco noto. Come le cellule NK, le cellule linfoidi innate helper (ILCs) sono linfociti dotati di attività pro- o anti- tumorale e sono implicate nei processi infiammatori. Nelle nostre analisi ex vivo di cellule NK e ILCs isolate da pazienti NHL, abbiamo osservato che, rispetto ai donatori sani, la frequenza del sottotipo di cellule NK citotossico (le CD16+) si riduceva nel sangue periferico dei pazienti. In generale, le cellule Nk circolanti mostravano un fenotipo pro-tumorigenico, mentre le ILCs mostravano un fenotipo più attivato/citotossico. Al contrario, a livello della lesione tumorale, nei linfonodi dei pazienti, le ILCs mostravano un'espressione ridotta di granzima. Sfruttando colture cellulari miste di cellule derivanti da donatori sani e pazienti abbiamo mostrato che il potenziale citotossico delle ILC veniva limitato dalla presenza delle cellule tumorali; tuttavia, in assenza di cellule regolatorie, il loro potenziale citolitico era ripristinato. I nostri dati, quindi, gettano nuova luce sulla disfunzione

dell'immunità innata nel NHL, proponendo un nuovo meccanismo di evasione del controllo del sistema immunitario da parte delle cellule tumorali basato sulla riduzione della citotossicità cellulare che coinvolge le ILCs e probabilmente controllata dalle Tregs. (PMID 36228388)

Abbiamo delineato il profilo trascrizionale, alla risoluzione di singola cellula, dell'immunità intratumorale adattativa ed innata in tumori al seno triplo negativi (TNBC) durante il trattamento con chemio- ed immuno- terapia.

Il tumore al seno rappresenta la neoplasia più comune tra le donne. Le attuali opzioni terapeutiche dipendono principalmente dal tipo istologico, marcatori molecolari, aggressività clinica e stadio della malattia. L'immunoterapia (e.g. gli anticorpi anti PD1) si è dimostrata efficace in combinazione con la chemioterapia nel tumore triplo negativo (TNBC), con alcune combinazioni terapeutiche che si sono dimostrate più efficaci di altre. Tuttavia, non è mai stata effettuata una caratterizzazione precisa delle principali popolazioni cellulari implicate in questi trattamenti. Abbiamo quindi effettuato una valutazione del profilo trascrizionale delle cellule immunitarie nel microambiente tumorale (TME) in due modelli murini di TNBC tramite single cell RNAseq. Le cellule immunitarie sono state caratterizzate prima e dopo il trattamento con chemio o immunoterapia, da sole o in combinazione. Abbiamo osservato una riduzione delle cellule T (Tregs e $\gamma\delta$) con attività protumorale. Per quanto riguarda invece le cellule T CD8, abbiamo osservato, in tutte le condizioni, un generale aumento delle cellule funzionalmente esauste in seguito al trattamento che aveva avuto una scarsa efficacia, mentre un trend opposto è stato osservato per le cellule T CD8 proliferanti. Per quanto riguarda i macrofagi del tipo M2 erano maggiormente presenti in condizioni di scarsa efficacia del trattamento, mentre i macrofagi M1 mostravano un trend opposto. In entrambi i modelli abbiamo rilevato proporzioni simili di cellule B, con un aumento di cellule B proliferanti nei modelli sottoposti a trattamento combinato con cisplatino e anti-PD1. La nostra caratterizzazione, ad elevata risoluzione, del TME immunitario può fare nuova luce sulla diagnosi e il trattamento del TNBC. (PMID: 35260564)

Nell'ambito di una collaborazione internazionale, abbiamo osservato che il gene NR1H3 è associato con i macrofagi pro-infiammatori, predice la sopravvivenza dei pazienti e suggerisce il suo potenziale come target terapeutico nel diffuse large B cell lymphoma (DLBCL).

Il ruolo dei macrofagi e il loro impatto prognostico nel DLBCL rimane ad oggi controverso. Regolando il metabolismo dei lipidi, il recettore LXR controlla la polarizzazione dei macrofagi (protumorale vs antitumorale) e la risposta infiammatoria. La modulazione farmacologica della polarizzazione dei macrofagi è oggetto di studi clinici per il trattamento di alcuni tumori umani, tra cui il linfoma. Abbiamo quindi valutato il ruolo del recettore LXR come fattore prognostico nel DLBCL. Confrontando i campioni tumorali con le cellule B purificate, normali e maligne, abbiamo trovato un'associazione tra il gene NR1H3

(che codifica per il recettore LXR) e il microambiente tumorale. In particolare il trascritto del recettore era ampiamente espresso in macrofagi M1 pro-infiammatori. Abbiamo poi valutato la capacità prognostica di questo trascritto su coorti di pazienti. Indipendentemente da altri fattori prognostici, i pazienti con elevata espressione di NR1H3 mostravano una maggiore sopravvivenza rispetto a quelli che ne esprimevano poco. I nostri dati indicano quindi NR1H3 come biomarcatore associato ai macrofagi in grado di identificare i pazienti ad alto rischio e suggerisce futuri studi preclinici volti ad investigare la possibilità di modularne l'espressione a scopo terapeutico. (PMID: 35850118)

Nuovi approcci tecnologici.

Abbiamo messo a punto un nuovo approccio di proteomica basata su spettrometria di massa per l'analisi della metilazione delle arginine.

La metilazione delle arginine è una modificazione post traduzionale ampiamente diffusa e implicata nella regolazione di diversi pathway cellulari, tra cui il processamento dell'RNA, la trasduzione del segnale, la risposta al danno al DNA, la biogenesi dei miRNA, e la traduzione. Recentemente, grazie agli sviluppi biochimici ed analitici, la proteomica basata su spettrometria di massa è emersa come la strategia più efficace per caratterizzare il metil proteoma cellulare ad elevatissima risoluzione (cioè del singolo sito metilato). Tuttavia, identificare e caratterizzare in vivo la metilazione delle arginine tramite spettrometria di massa rimane una procedura difficile e soggetta ad errori, principalmente a causa della natura sub-stechiometrica di questa modificazione e della presenza di varie sostituzioni aminoacidiche e modificazioni chimiche che risultano simili alla metilazione. Per questo, è necessario lo sviluppo di metodi per aumentare l'identificazione di peptidi con arginine metilate e, in parallelo, di strategie di validazione. Abbiamo quindi disegnato un protocollo per l'identificazione di peptidi metilati a livello delle arginine e per la quantificazione da campioni cellulari, che accoppia la marcatura metabolica delle cellule con isotopi pesanti (hmSILAC) e la digestione enzimatica dell'estratto cellulare, seguito da frazionamento cromatografico ed arricchimento dei peptidi metilati usando specifici anticorpi. In seguito ad analisi di spettrometria di massa ad elevata risoluzione, i dati sono processati con un software specifico (MaxQuant) e i risultati sono analizzati tramite hnSEEKER. (PMID 35575502)

Abbiamo sviluppato il più grande database esistente –ProMetheusDB– che raccoglie i siti di metilazione delle proteine, identificati ri-analizzando gli esperimenti di hmSILAC con una versione perfezionata del nostro strumento computazionale, hmSEEKER.

La metilazione delle proteine è una modificazione chimica ampiamente diffusa, che le cellule “sfruttano” per modulare l'attività delle proteine e dei processi biologici associati, come il processamento dell'RNA, il riparo del DNA, la risposta immunitaria, la progressione del tumore. L'aggiunta simmetrica o

asimmetrica di gruppi metili alle proteine (ovvero se il gruppo metile lega lo stesso o diversi atomi, rispettivamente, nel residuo amminoacidico) influenza il comportamento delle proteine in maniera diversa: ad esempio, la metilazione simmetrica o asimmetrica cambia l'attività delle proteine istoniche, dall'attivazione alla repressione della trascrizione, modulando così i livelli di espressione di specifici geni. La metilazione delle proteine si trova quindi in una posizione perfetta per giocare un ruolo chiave nei processi biologici. Gli enzimi PRMT controllano la metilazione delle proteine e sono espressi in maniera anomala nei tumori, nelle malattie neurodegenerative e nei disordini metabolici. Infatti diversi studi clinici in corso stanno valutando l'efficacia terapeutica della modulazione farmacologica dei livelli di metilazione delle proteine tramite l'inibizione dell'attività delle proteine PRMT. Gli studi sulla metilazione delle proteine si basano sul sempre più diffuso approccio hmSILAC (che consente di identificare i peptidi metilati tramite marcatura con isotopi pesanti). hmSILAC necessita di specifici strumenti computazionali per l'analisi dei dati. La precedente versione di hmSEEKER è stata migliorata sfruttando un approccio di machine learning, in pratica un insieme complesso di funzioni matematiche che viene "costruito" (ovvero, "trained") sulla base di peptidi metilati noti e poi usato per analizzare i dati. La versione ottimizzata di hmSEEKER è risultata più sensibile e accurata, mostrando un eccellente compromesso tra specificità e sensibilità. Infatti, ad esempio, quando hmSEEKER 2.0 è stato usato per analizzare i dati di quattro diverse linee cellulari, ha identificato siti di metilazione che non era riuscito ad identificare prima del perfezionamento. ProMetheusDB è accessibile a tutti, tramite via web. Abbiamo prima di tutto caratterizzato il database: abbiamo trovato metilazioni sia a livello delle arginine che delle lisine e abbiamo notato che quasi metà delle metilazioni sulle arginine nel ProMetheusDB non erano note, mostrando che il nuovo approccio bioinformatico consentiva di identificare nuove metilazioni. Analisi funzionali hanno sottolineato che le proteine il cui stato di metilazione non era stabile, ma cambiava in seguito ad uno stimolo, erano più strettamente interconnesse dal punto di vista funzionale nelle cellule. Inoltre, abbiamo osservato che queste proteine erano principalmente coinvolte in processi cellulari come la risposta immunitaria (in aggiunta al noto ruolo nella regolazione della trascrizione mediata da PRMT1) e l'organizzazione del citoscheletro. La metilazione dell'arginina gioca un ruolo anche nella struttura delle proteine –mentre la metilazione dell'arginina era presente soprattutto in regioni "disordinate" delle proteine (ovvero a bassa complessità, in contrapposizione alle regioni "strutturate"), la metilazione della lisina veniva rilevata principalmente nelle regioni "strutturate" delle proteine– e nell'interazione proteina-proteina –come ad esempio SRSF1-SRPK1, la cui mancanza di interazione promuove lo splicing alternativo e la conseguente produzione di un'isoforma del fattore di crescita endoteliale vascolare con proprietà anti-angiogeniche. La metilazione potrebbe anche influenzare l'attività catalitica delle proteine: ad esempio, la metilazione dei residui di arginina nella proteina MAT2A

potrebbe essere coinvolta nella regolazione dei livelli cellulari di SAM (molecola che “dona” i gruppi metili per la modificazione delle proteine). La fosforilazione è un'altra comune modificazione delle proteine rilevante dal punto di vista funzionale. Studi precedenti, infatti, hanno mostrato che l'interazione tra fosforilazione e metilazione regola la localizzazione intracellulare delle proteine e le caratteristiche di staminalità delle cellule nel cancro. Le analisi hanno evidenziato che le metilazioni a livello dei residui di arginina nel ProMetheusDB si manifestavano frequentemente insieme alle fosforilazioni e correlavano invece negativamente con l'ubiquitinazione della lisina, suggerendo che la combinazione di queste modificazioni delle proteine potrebbe modulare finemente l'attività delle proteine. Infine, l'analisi dei dati ha evidenziato la presenza di metilazioni meno comuni su residui aminoacidici diversi da arginina e lisina, portando all'identificazione di nuovi siti di metilazione sulla proteina H3. ProMetheusDB rappresenta uno strumento potente per la comunità scientifica, che offre una enorme quantità di dati affidabili, utilizzabili in diversi progetti di ricerca, per investigare meccanismi cellulari associati alla tumorigenesi. (PMID: 35577067)

Abbiamo combinato approcci di proteomica e machine learning per caratterizzare le microvescicole all'interno del siero, che sono caratterizzate da uno specifico contenuto proteico che rispecchia le caratteristiche della cellula da cui sono state rilasciate. Abbiamo identificato una lista di potenziali biomarcatori, ovvero delle specifiche proteine in grado di distinguere i pazienti con tumore al polmone negli stadi precoci dai soggetti sani ad alto rischio di sviluppare la malattia.

Una diagnosi precoce è fondamentale per il successo di una terapia antitumorale. Tuttavia, solo il 15% dei pazienti con tumore al polmone viene diagnosticato negli stadi precoci, dato che i sintomi, quando presenti, sono spesso aspecifici. Sono quindi necessari nuovi test, non eccessivamente costosi e non invasivi, da poter essere utilizzati per effettuare degli screening, soprattutto per i soggetti ad alto rischio, così da effettuare una diagnosi precoce, migliorando così la prognosi dei pazienti. In questo contesto i fluidi corporei -come il sangue (plasma e siero), l'urina o l'aria espirata- rappresentano i campioni ideali, essendo facilmente accessibili, e la spettrometria di massa è sempre più spesso utilizzata per identificare nei fluidi corporei dei biomarcatori di malattia appropriati. I campioni di sangue di 46 pazienti con tumore al polmone negli stadi precoci e di 41 soggetti sani ad alto rischio sono stati raccolti nell'ambito di uno studio prospettico IEO. Le microvescicole sono state isolate dal sangue sfruttando una procedura relativamente economica (una centrifugazione ad alta velocità) e rapida, quindi potenzialmente applicabile in coorti numerose di pazienti nel contesto di un futuro screening. L'analisi delle microvescicole piuttosto che del siero intero si è dimostrata più efficiente, consentendo l'identificazione di un maggior numero di proteine. Su questi campioni, tramite analisi di spettrometria di massa e machine learning, abbiamo identificato una lista di proteine diversamente espressa nei pazienti e nei

soggetti sani, che rappresentano dei potenziali biomarcatori in grado di distinguere i pazienti con tumore al polmone negli stadi precoci dai soggetti sani. In breve, abbiamo generato “una libreria” di proteine: ovvero abbiamo identificato, tramite l'analisi del tessuto tumorale dei pazienti e delle microvescicole derivanti dal siero, diverse (2500) proteine; queste proteine rappresentavano il nostro riferimento. Abbiamo poi confrontato il profilo proteomico delle microvescicole isolate dai campioni in studio con questa libreria di proteine di riferimento per poter aumentare il numero di proteine identificate nel campione. Sfruttando questo approccio, abbiamo identificato le proteine che erano espresse in maniera diversa nei pazienti rispetto ai soggetti sani. Successivamente, abbiamo impiegato tre diversi approcci di machine learning che, sulla base delle proteine diversamente espresse nei campioni, distinguevano in maniera accurata, specifica e con elevata sensibilità, i casi di tumore dai controlli. Tra le proteine “più diverse”, le nostre analisi ne hanno evidenziate due che influenzavano maggiormente il potere predittivo dell'approccio di machine learning (ARSA e PRKCA) e due (CD59 e PDCD6IP) che erano state identificate in uno studio precedente come significativamente diverse nelle urine dei pazienti oncologici rispetto a soggetti sani e a pazienti affetti da altre malattie polmonari benigne, suggerendo che queste due proteine potrebbero essere dei marcatori tumorali specifici. Sebbene sia necessaria una validazione ulteriore attraverso altri approcci biochimici e/o in coorti di pazienti più numerose, questi biomarcatori potrebbero essere impiegati in futuro per sviluppare degli strumenti diagnostici utilizzabili in un contesto clinico-diagnostico. (PMID: 36645712)

Abbiamo sviluppato un nuovo metodo per isolare e mantenere in coltura sferoidi tridimensionali di High Grade Serous Ovarian cancer (HGSO) isolati da asciti (ovvero il liquido addominale ricco di cellule staminali tumorali generalmente presente durante la progressione del tumore ovarico e contenenti cellule tumorali). Questo metodo consente di isolare e coltivare percentuali elevate di cellule staminali tumorali, responsabili della formazione e crescita di metastasi.

Il tumore ovarico sieroso di alto grado è il tumore ginecologico più letale, a causa della precoce disseminazione metastatica e della resistenza alla terapia di una sottopopolazione di cellule tumorali -le cellule staminali tumorali-, che rendono inefficaci gli approcci terapeutici standard come la chemioterapia e la chirurgia. L'assenza di modelli tumorali adeguati, in grado di ricapitolare le caratteristiche fisiopatologiche rilevanti del tumore, ha ostacolato la messa a punto di terapie nuove ed efficienti. Gli sferoidi tridimensionali, costituiti da cellule tumorali primarie isolate dai pazienti e mantenuti in vitro sottoforma di sfere, sono modelli ampiamente utilizzati nell'ambito della ricerca sui tumori, in grado di conservare tratti critici, come ad esempio l'eterogeneità intratumorale. Gli sferoidi sono infatti stati utilizzati nella ricerca sul tumore al seno, sul tumore del colon-retto, del fegato. Noi abbiamo isolato cellule tumorali dalle asciti metastatiche dei pazienti che sono inizialmente coltivate sottoforma di colture

bidimensionali e successivamente risospese e mantenute come sferoidi tridimensionali in un mezzo supplementato con il fluido ascitico dei pazienti. Gli sferoidi sono poi propagati attraverso successive dissociazioni e riassetto. Questo metodo arricchisce notevolmente la coltura in cellule staminali tumorali. La caratterizzazione molecolare delle cellule metastatiche isolate di fresco, delle colture bidimensionali e degli sferoidi ha rivelato una maggiore variabilità delle colture bidimensionali rispetto agli sferoidi e la capacità degli sferoidi di mantenere specifiche caratteristiche del tumore di partenza attraverso passaggi successivi. Usando geni marcatori per identificare specifici tipi cellulari, abbiamo mostrato che gli sferoidi contenevano un numero elevato di cellule staminali tumorali, e che questo numero aumentava attraverso la propagazione sotto forma di sferoidi, per via dell'attivazione di specifici pathway di staminalità. E' importante sottolineare che gli sferoidi conservavano gran parte delle caratteristiche del paziente, come il profilo di espressione genica. Inoltre, gli sferoidi mostravano una variabilità nella risposta al trattamento con chemioterapici simile a quella dei pazienti da cui derivavano, e al tempo stesso evidenziando una risposta differenziale ai farmaci tra i singoli sferoidi derivati dallo stesso paziente, ponendoli in luce come strumento trasformativo per studi di medicina personalizzata. Infine, abbiamo verificato che il nostro modello di sferoidi ricapitolasse in maniera più efficiente caratteristiche specifiche delle metastasi (es. stato metabolico e signalling pathway) rispetto alle più comuni colture bidimensionali. Abbiamo quindi messo a punto un nuovo modello per la coltura di sferoidi tridimensionali di HGSOV, i quali permettono di catturare aspetti chiave delle metastasi, offrendo uno strumento potente per esplorare in vitro i meccanismi alla base della disseminazione metastatica del tumore ovarico. (PMID: 34845371)

Abbiamo messo a punto una nuova metodologia in grado di ovviare all'ostacolo principale associato al lavoro con sottopopolazioni cellulari rare come le cellule staminali normali (SC) o tumorali (CSC), a causa dell'esigua quantità iniziale di materiale.

I microRNA sono una classe di piccoli RNA non codificanti, altamente conservati dal punto di vista evolutivo, coinvolti nella regolazione di diversi processi cellulari e dello sviluppo. L'espressione dei miRNA è frequentemente alterata nei tumori umani rispetto ai tessuti normali, e potrebbe contribuire alla tumorigenesi. Generalmente, la profilazione high throughput dei livelli di espressione dei miRNA è effettuata usando campioni di tessuti normali e tumorali. I tessuti tumorali sono tuttavia piuttosto eterogenei e potrebbero contenere sottopopolazioni cellulari critiche per lo sviluppo dei tumori, ad esempio le cellule staminali tumorali, con caratteristiche simil-staminali anomale, come, ad esempio, un potenziale di replicazione illimitato. L'isolamento di queste sottopopolazioni cellulari "anomale" dai tumori solidi è un obiettivo relativamente recente, e il tumore al seno rappresenta uno dei primi tumori solidi umani in cui le CSC sono state identificate e caratterizzate dal punto di vista biologico. Sulla base

di protocolli precedentemente pubblicati, utilizzati nel nostro laboratorio e in altri gruppi di ricerca, abbiamo sfruttato un approccio basato sulla selezione via FACS per isolare cellule staminali normali e tumorali mammarie sulla base della marcatura con il marcatore fluorescente PKH26. Inoltre, a seconda del numero di SC/CSC isolate, abbiamo messo a punto due diversi protocolli per rilevare in maniera affidabile e sensibile fino a 384 miRNA usando la piattaforma Taqman Low Density Array (TLDA). (PMID: 35811104)

Abbiamo messo a punto un workflow sperimentale e analitico, basato sulla microscopia, che, rendendo la procedura semiautomatica, consente analisi rapide dei tessuti (tumorali), mantiene l'informazione spaziale derivante dall'interazione delle cellule tumorali con il microambiente tumorale circostante (in situ), un'elevata risoluzione, permette di integrare i diversi livelli di informazione e di raccogliere un gran numero di dati da un singolo esperimento (high content).

Una delle caratteristiche principali dei tumori è l'elevata eterogeneità, risultato dell'interazione tra fattori genetici, aspetti associati all'espressione genica e l'influenza del microambiente tumorale. E' quindi fondamentale, per comprendere a fondo i meccanismi molecolari alla base dello sviluppo e della progressione del tumore, sia per scopi di ricerca che clinici (diagnostici), combinare tutti questi diversi livelli di informazione ed analizzare tutti questi fattori negli stessi campioni. Gli strumenti di analisi devono essere standardizzati, per ridurre la variabilità legata all'utilizzatore ed aumentare la riproducibilità, rendendo così i risultati più solidi. Il nostro approccio permette di ovviare a problemi spesso associati con gli studi omici high content, come la perdita di informazione derivante dall'interazione della cellula tumorale con il microambiente circostante. Infatti, ad esempio, gli studi basati su next-generation sequencing sono frequentemente effettuati su sospensioni cellulari; perciò, pur consentendo analisi ad elevata risoluzione (fino a singola cellula), si perdono informazioni sulle conseguenze dell'interazione tra le cellule. Inoltre, ottimizzando (e rendendo semiautomatica) ogni fase del processo –marcatura dei tessuti, acquisizione delle immagini, analisi dei dati–, il risultato è una procedura più rapida, meno costosa, che consente di mantenere un'elevata qualità e risoluzione dei dati. (PMID: 36313693)

Abbiamo messo a punto un protocollo sperimentale e gli strumenti computazionali associati recentemente sviluppati per l'analisi di immagini di microscopia ad elevata risoluzione, per poter studiare l'attività di una proteina in determinati compartimenti subcellulari, in specifici momenti.

53BP1 (inizialmente identificata come una proteina che lega p53) gioca un ruolo chiave nella fisiologia cellulare, da un lato nella scelta da parte della cellula tra i due meccanismi alternativi per riparare un danno al DNA –che rappresenta una minaccia all'integrità del genoma–, dall'altro, interagendo con p53, è coinvolta nel controllo del destino della cellula. Lo svolgimento di diverse funzioni all'interno della

cellula potrebbe essere dovuto alla sua diversa localizzazione, in momenti diversi, all'interno della cellula. Da un lato, abbiamo validato gli approcci sviluppati, fornendo alla comunità scientifica uno strumento potente per studi di microscopia ad alta risoluzione e high content dei processi intracellulari; dall'altro, sfruttando questi strumenti abbiamo ottenuto una visione dettagliata degli eventi molecolari che associano il riparo del danno al DNA e il controllo del ciclo cellulare, dimostrando che questa associazione, mediata dall'interazione tra le proteine 53BP1 e p53, che avviene in momenti specifici, in punti specifici all'interno della cellula, consente la modulazione dell'espressione genica regolata da p53 e il controllo del ciclo cellulare. Questi protocolli permettono di acquisire in maniera automatica segnali ad intensità molto bassa, su immagini acquisite su un gran numero (fino a diverse migliaia) di diverse piccole regioni della cellula (per un'accurata analisi statistica), da sette diverse molecole fluorescenti. Inoltre, le singole cellule possono essere selezionate sulla base di specifici fenotipi e riposizionate sul microscopio per l'acquisizione automatica con una diversa modalità; ad esempio, con microscopia confocale. Abbiamo applicato questi strumenti per studiare il modo in cui il danno al DNA indotto dalla radiazione influenzava il comportamento delle cellule a seconda della fase del ciclo cellulare in cui si trovavano. L'elevata risoluzione fornita da questo approccio consente di analizzare simultaneamente, ad high content, le interazioni molecolari –e la loro regolazione– alla base di processi cellulari critici in contesti fisiologici e patologici. (PMID 36077590)

Abbiamo sviluppato un workflow per identificare le variazioni somatiche tumore-specifiche in dati di sequenziamento whole exome e dati di sequenziamento di pannelli genici.

Una classificazione accurata di varianti somatiche in un campione tumorale è spesso ottenuta utilizzando un altro campione normale corrispondente derivante dallo stesso paziente, per consentire di distinguere le mutazioni germinali dalle mutazioni somatiche. Tuttavia, non sempre è disponibile un campione normale "corrispondente" rendendo difficile l'identificazione (chiamata) accurata di varianti somatiche. Screening in silico delle varianti rispetto a database pubblici o privati ed altri approcci di filtering sono spesso usati in assenza di un campione normale corrispondente. Tuttavia, difficoltà nell'identificazione accurata di varianti tumore-specifiche e l'assenza di software open-source hanno limitato l'applicazione di questo approccio in ambito clinico. Per ovviare a queste limitazioni, abbiamo sviluppato TOSCA, il primo workflow per identificare (chiamare) le varianti somatiche tumore-specifiche in dati di sequenziamento whole exome e dati di sequenziamento di pannelli genici. L'applicazione di questo workflow ai dati tumorali fornisce una stima delle varianti somatiche e germinali coerente con i risultati ottenuti con l'analisi di campioni normali appaiati. (PMID: 36699358)

Nuovi approcci terapeutici - valutazione preclinica.

Abbiamo testato in modelli preclinici un nuovo approccio terapeutico per il Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), un sottotipo di linfoma frequentemente caratterizzato dalla sovraespressione delle proteine MYC e BCL-2, che identificano una popolazione di pazienti caratterizzata da prognosi avversa. Questo nuovo approccio terapeutico combina inibitori di DDR e inibitori di BCL-2.

Gli attuali approcci terapeutici standard per il DLBCL includono l'utilizzo di un chemioterapico che agisce inducendo danno al DNA e morte cellulare. Tuttavia, un'elevata percentuale di pazienti con DLBCL sono resistenti a questa terapia. I meccanismi alla base della resistenza al trattamento nel DLBCL non sono ancora noti. Il chemioterapico comunemente impiegato agisce inducendo danno al DNA e la morte delle cellule tumorali. Le cellule di DLBCL si sono però adattate, evolvendo un meccanismo per gestire lo stress che accompagna il danno al DNA: le cellule tumorali del DLBCL iperattivano il pathway di risposta al danno al DNA (DDR) –ovvero l'insieme di fattori che rilevando la presenza di danno al DNA attivano le proteine necessarie a rispondere in maniera corretta, inducendo arresto del ciclo cellulare e riparo del danno, oppure morte cellulare–, gestiscono lo stress e diventano chemioresistenti. I nostri risultati hanno mostrato che nelle cellule di DLBCL livelli elevati di stress ossidativo e danno al DNA contribuiscono all'iperattivazione del pathway DDR. Il trattamento con inibitori del pathway di DDR (Prexasertib) inibiva la proliferazione, probabilmente a causa dell'accumulo di danno al DNA nelle cellule tumorali. Inoltre, hanno mostrato che la combinazione di diversi inibitori di DDR (incluso Prexasertib) con lo specifico inibitore di BCL-2 Venetoclax –che abbiamo precedentemente mostrato agire in combinazione con l'antibiotico tigeciclina nei linfomi double-hit– aumentava l'efficacia del trattamento, inducendo stress ossidativo, danno al DNA e morte cellulare in diverse linee cellulari di DLBCL. Abbiamo inoltre esplorato il modo in cui gli inibitori di BCL-2 sinergizzano con gli inibitori della DDR: Da un lato, la DDR previene l'accumulo di danno al DNA, determinando una aumentata proliferazione (sostenendo così la progressione tumorale). Dall'altro, BCL-2 svolge un noto ruolo protettivo contro lo stress ossidativo (che induce danno al DNA). Quindi il trattamento combinato con inibitori di BCL-2 e DDR risulta in un aumentato danno al DNA (dovuto al maggiore stress ossidativo che risulta da BCL-2 inattivo) e una ridotta abilità della cellula di gestire il danno al DNA (dovuto alla DDR inattiva), il che risulta nell'aumento della morte cellulare, fornendo un razionale per l'azione sinergica dei due inibitori. Infine, abbiamo approfondito il ruolo di MYC in questo scenario: la sovraespressione di MYC è associata con un'aumentata proliferazione cellulare –quindi maggiore stress, maggiore danno al DNA, maggiore attivazione della DDR. Di conseguenza, la sovraespressione di MYC rende le cellule più sensibili all'inibizione della DDR, con conseguente aumentata morte cellulare. Tutti questi dati supportano quindi il trattamento combinato delle cellule di DLBCL che sovraesprimono MYC/BCL-2 con inibitori di BCL-2 e della DDR. I risultati ottenuti in modelli in vitro sono stati confermati usando modelli murini di DLBCL,

in cui l'inibizione contemporanea della DDR e di BCL-2 aumenta la sopravvivenza dei topi, proponendo il trattamento combinato con inibitori di DDR e BCL-2 come nuovo ed efficace trattamento per il DLBCL. (PMID 34304248)

Abbiamo mostrato come la combinazione di due farmaci, Venetoclax e IACS, sia in grado di uccidere in maniera efficace le cellule di linfoma, in particolare del sottotipo Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL), sia in vitro che in modelli preclinici.

DLBCL è il sottotipo di linfoma non-Hodgkin più comune e aggressivo, piuttosto eterogeneo. Tra le numerose variabili che sono state descritte in DLBCL, i sottotipi di DLBCL più aggressivi sono frequentemente caratterizzati dalla sovraespressione di Myc e da una specifica "firma molecolare" mitocondriale (espressione di geni coinvolti nell'attività mitocondriale), chiamata oxphos. Inizialmente abbiamo osservato che in DLBCL l'espressione dei geni regolati da Myc era correlata con l'espressione dei geni della firma molecolare "oxphos". Usando cellule in cui Myc poteva essere attivato in maniera specifica, abbiamo osservato che Myc promuoveva l'espressione dei geni oxphos nei linfociti B; di conseguenza, anche l'attività mitocondriale era aumentata. Quando queste cellule erano trattate con IACS, un farmaco che inibisce uno dei complessi proteici della oxphos mitocondriale (il complesso I), l'attivazione di Myc rendeva le cellule significativamente più sensibili a questo farmaco. Quindi, la sovraespressione di Myc rende le cellule DLBCL maggiormente dipendenti dall'attività mitocondriale e quindi anche più sensibili alla morte cellulare indotta da IACS. Abbiamo quindi mostrato che la morte cellulare indotta da IACS avveniva attraverso un meccanismo chiamato "apoptosi intrinseca", che implica il rilascio del citocromo C nel citoplasma attraverso i pori formati da Bax e Bak (due membri della famiglia delle proteine BCL2) nella membrana mitocondriale. Indipendentemente dall'espressione di Myc, il trattamento con IACS induceva alterazioni profonde dell'espressione genica; in particolare, abbiamo sottolineato l'attivazione da parte di IACS dei geni della cosiddetta risposta integrata allo stress (integrated stress response, ISR), che a loro volta influenzano i geni coinvolti nella sopravvivenza e nella morte cellulare. D'altro canto, la sovraespressione di Myc facilitava l'apoptosi indotta da IACS, riducendo i livelli di Bcl2 e Bcl-xL, due proteine che contrastano l'attività di Bax e Bak. Abbiamo inoltre mostrato che il trattamento combinato con IACS e l'inibitore di BCL2 Venetoclax era in grado di uccidere le cellule di linfoma double-hit in vitro ed indurre la regressione parziale o completa del tumore in modelli murini di linfoma double-hit. Inoltre, in cellule di linfoma BCL2-negative, l'effetto citotossico di IACS era potenziato dall'inibizione di Mcl-1, un'altra proteina della famiglia BCL2 che contrasta la morte cellulare. Abbiamo precedentemente mostrato che la tigeciclina –un inibitore della traduzione mitocondriale- agiva in sinergia con Venetoclax nell'uccidere le cellule di linfoma double-hit. In questo lavoro abbiamo esteso questo concetto e determinato il potenziale di nuove opzioni terapeutiche basate sull'inibizione

combinata dell'attività mitocondriale (tramite IACS, colpendo i geni oxphos) e le proteine anti-apoptotiche della famiglia BCL2 (tramite Venetoclax) in DLBCL di alto grado associato a Myc. (PMID 34632715)

Abbiamo mostrato che in modelli murini di leucemia promielocitica acuta (APL), il trattamento combinato della leucemia con VPA -che agisce sulle cellule tumorali non staminali, inducendo il differenziamento-, SAHA -che elimina le cellule staminali tumorali- e ATRA -che colpisce entrambe- può sconfiggere completamente la malattia e prevenire la recidiva.

Un tumore è costituito da cellule staminali tumorali -una sottopopolazione che, analogamente alle cellule staminali normali, ha la capacità di autorinnovarsi ed è quindi responsabile della progressione del tumore- e cellule tumorali non staminali. La leucemia contiene delle cellule staminali che sono definite cellule staminali leucemiche. Le cellule staminali tumorali/leucemiche hanno anche la capacità di entrare in "quiescenza", cioè smettere temporaneamente di proliferare per far fronte a condizioni "ostili", pronte a ricominciare a proliferare rigenerando il tumore nel caso in cui le condizioni lo consentano. Per questa loro caratteristica, le cellule staminali tumorali/leucemiche sono anche responsabili della recidiva. Per via del loro ruolo nella progressione tumorale, è stato proposto che l'eliminazione delle cellule staminali tumorali potrebbe rappresentare un approccio efficace per una completa eradicazione del tumore. Tuttavia, le cellule tumorali sono caratterizzate da "plasticità", ovvero la capacità di "trasformarsi" in cellule staminali tumorali, rigenerando così il tumore e causando la recidiva. La APL è un sottotipo di leucemia caratterizzato dalla presenza di una proteina anomala (PML-RAR) che si lega al DNA e recluta il complesso proteico HDAC, alterando l'espressione di alcuni geni e determinando il blocco del differenziamento delle cellule e il conseguente accumulo di cellule immature. Interferire farmacologicamente con l'attività del complesso proteico HDAC con VPA induce il differenziamento delle cellule leucemiche, contrastando così la leucemia, ma non ha alcun impatto sulle cellule staminali tumorali/leucemiche, causando così la recidiva. Dato che la terapia prolungata con SAHA non è generalmente ben tollerata, abbiamo innanzi tutto identificato la modalità di trattamento ottimale, mostrando che due giorni di trattamento erano sufficienti, insieme ad altri farmaci, a sortire degli effetti. Inoltre, abbiamo verificato che, sebbene entrambi agiscano inibendo il complesso proteico HDAC, diversamente da VPA, SAHA influenzava la sopravvivenza delle cellule staminali tumorali. Successivamente, i topi leucemici sono stati trattati con la combinazione dei tre farmaci: SAHA (per colpire le cellule staminali tumorali), VPA (per colpire le cellule tumorali non staminali) e ATRA (per colpire sia cellule tumorali staminali che non staminali). Il risultato è stato una sopravvivenza significativamente maggiore degli animali, e in alcuni casi (nei tumori che contenevano un minor numero di cellule staminali tumorali/leucemiche) una completa remissione della malattia e nessun segno di

recidiva fino a tre mesi dopo la fine del trattamento: non c'erano cellule leucemiche nel sangue né cellule staminali tumorali. Inoltre, diversamente dal trattamento con ATRA da solo -che determina una carenza di piastrine-, il trattamento combinato non aveva alcun effetto sul numero di piastrine. Sostituendo ATRA con un'altra molecola (etretinato) che colpisce le cellule leucemiche senza toccare le cellule staminali tumorali non si riusciva ad eliminare la malattia, dimostrando ulteriormente la plasticità delle cellule leucemiche non staminali di trasformarsi in cellule leucemiche staminali e rigenerare la leucemia, causando così la recidiva. Quindi, sfruttando questo modello, abbiamo dimostrato l'efficacia di un approccio che colpisce contemporaneamente sia le cellule tumorali staminali che non staminali, suggerendo la possibilità di sfruttare queste scoperte sia per il trattamento di altri tipi di leucemia, sia in altri tipi di tumore. (PMID: 35246604)

Abbiamo identificato una nuova molecola -EMD37- che, inducendo lo stress del reticolo endoplasmatico (ER), induce la morte delle cellule tumorali, sottolineando il suo potenziale come nuova molecola antitumorale.

Colpire il reticolo endoplasmatico (ER) rappresenta una strategia antitumorale promettente. Abbiamo precedentemente riportato i nostri studi su una serie di molecole che inducono la degradazione di EGFR e c-Met e che sono implicate nella tumorigenesi. Partendo da questi risultati, abbiamo identificato EMD37, una nuova molecola (della stessa famiglia) che mostra una potente attività antitumorale. I saggi di proliferazione hanno rivelato una maggiore azione citotossica di questa molecola nei confronti delle cellule tumorali rispetto alle cellule normali. Abbiamo quindi sfruttato il profilo trascrittomico delle cellule tumorali trattate con EMD37 e le nostre analisi hanno rivelato che EMD37 promuoveva lo stress del ER la unfolded protein response (UPR). Il silenziamento di fattori di trascrizione associati allo stress del ER compromettevano almeno in parte l'attività antitumorale di EMD37. Inoltre, EMT37 induceva l'accumulo di proteine poli-ubiquitinate, inibiva la signalling di mTOR, induceva l'arresto del ciclo cellulare nella fase G2/M e l'apoptosi delle cellule tumorali umane. Inibire l'apoptosi eliminava l'efficacia antitumorale di EMD37. (PMID: 36283444)

Abbiamo effettuato un'analisi in silico esplorativa di potenziali meccanismi di resistenza a nuovi inibitori macrociclici di RET (TPX-0046).

E' stato dimostrato che TPX-0046 è in grado di vincere la resistenza agli inibitori di RET approvati da FDA Selpercatinib and Pralsetinib. Predire i meccanismi di resistenza ai farmaci in studio potrebbe facilitare il successivo design di studi clinici. L'obiettivo di questo studio era quindi quello di predire le potenziali mutazioni in grado di indurre la resistenza a TPX-0046. Abbiamo effettuato un'analisi in silico della struttura macrociclica di TPX-0046 e predetto la modalità di legame a RET. Abbiamo utilizzato come riferimento esempi presenti in letteratura di meccanismi di resistenza ad altri inibitori macrociclici

(e.g. Lorlatinib su ALK/ROS1) per simulare le mutazioni di RET responsabili della resistenza secondaria. Abbiamo effettuato simulazioni di docking per valutare l'impatto delle mutazioni sul legame di TPX-0046. I nostri risultati hanno mostrato che la modalità di legame di TPX-0046 a RET non appare influenzata dalla presenza della mutazione G810X. Al contrario, le mutazioni V804X influenzano la modalità di legame di TPX-0046. Le mutazioni L881F e S891L danneggiano il docking di TPX-0046. Le nostre scoperte suggeriscono che lo sviluppo di inibitori di RET di seconda generazione si focalizzi principalmente sulla mutazione G810X che conferisce resistenza agli inibitori selettivi di RET Selpercatinib and Pralsetinib. Queste scoperte potrebbero accelerare lo sviluppo di inibitori di RET di terza generazione, così come il design di studi clinici nel contesto dell'oncologia di precisione. (PMID 35612671)

Nuovi approcci terapeutici – valutazione clinica.

Abbiamo presentato i risultati del clinical trial ARROW di fase 1/2 che ha dimostrato l'efficacia di pralsetinib nei pazienti con tumore solido positivi per la fusione RET.

Le fusioni oncogeniche del gene RET si verificano in diversi tipi di tumore. Pralsetinib è un inibitore selettivo e potente del recettore tirosin chinasi RET. Lo studio clinico ARROW è stato disegnato per valutare l'efficacia e la sicurezza di Pralsetinib in pazienti con tumori solidi in stadio avanzato ed alterazioni del gene RET. Sono stati arruolati ventinove pazienti con dodici diversi tumori solidi (ad eccezione del tumore al polmone e tiroideo), positivi alla fusione del gene RET, che avevano precedentemente ricevuto, o non erano candidati, per terapia standard. I più comuni geni partner di fusione di RET in 23 pazienti in cui è stato possibile valutare l'efficacia di Pralsetinib erano CCDC6 (26%), KIF5B (26%) e NCOA4 (13%). La percentuale di risposta è stata del 57% tra questi pazienti. Le risposte sono state osservate indipendentemente dal tipo di tumore o dal partner di fusione del gene RET. La durata mediana della risposta, la sopravvivenza in assenza di malattia e la sopravvivenza in generale erano rispettivamente di 12, 7 e 14 mesi. Gli effetti collaterali gravi (>3) più comuni erano neutropenia e anemia. I nostri dati hanno confermato RET come target tessuto-agnostico, con la stessa sensibilità del gene RET "normale", indicando il potenziale di pralsetinib come opzione di trattamento ben tollerata, con rapida, robusta e duratura attività antitumorale in pazienti con tumore solido e diverse fusioni del gene RET. (PMID: 35962206)

Abbiamo raccolto i risultati di uno studio clinico di fase 1B volto a valutare l'efficacia di gedatolisib (PF-05212384) in combinazione con altri agenti antitumorali per il trattamento di pazienti con tumore solido e tumore al seno triplo negativo.

Gedatolisib è un inibitore di PI3K/mTOR. Abbiamo somministrato ai pazienti con diverse neoplasie gedatolisib in combinazione con docetaxel oppure cisplatino. La sicurezza e la tollerabilità della terapia

di combinazione sono state valutate in uno studio di dose escalation. I risultati del nostro studio hanno dimostrato che la terapia di combinazione con Gedatolisib mostrava un profilo di tollerabilità accettabile, con efficacia clinica, alla dose raccomandata, in pazienti con tumore al seno triplo negativo. (PMID 36335217)

Abbiamo effettuato un'analisi retrospettiva al fine di valutare l'efficacia del trattamento chemioterapico metronomico in pazienti con tumori neuroendocrini avanzati.

I tumori neuroendocrini sono generalmente a crescita lenta, quindi i pazienti spesso ricevono terapia sistemica cronica per controllare la crescita del tumore e preservare la qualità di vita. La chemioterapia metronomica (mCT) è in linea con questo approccio dato che porta alla stabilizzazione del tumore nel tempo senza una grave tossicità sistemica. Abbiamo quindi condotto un'analisi retrospettiva in pazienti con tumori neuroendocrini metastatici che hanno ricevuto trattamento chemioterapico metronomico con capecitabine (mCAP) o temozolomide (mTEM) al fine di valutarne efficacia e sicurezza, così come un'eventuale associazione tra alcune caratteristiche dei pazienti e l'esito clinico. L'analisi, condotta su 67 pazienti, suggerisce che mCAP e mTEM possono essere efficaci e ben tollerati in questi pazienti, indipendentemente dal sito primario del tumore, dal sito delle metastasi, dalla linea di trattamento e dallo stadio basale del tumore. (PMID 36306196)

Abbiamo valutato i benefici clinici della chemioterapia metronomica (regime VEX) nei pazienti con tumore al seno metastatico.

La chemioterapia metronomica è una opzione di trattamento per i tumori al seno metastatici che richiedono un controllo prolungato della malattia senza tossicità. Tuttavia, i dati disponibili sull'efficacia e la tollerabilità di un uso prolungato della terapia metronomica sono limitati. Abbiamo quindi analizzato pazienti con tumore al seno metastatico, arruolati in clinical trial in IEO, che hanno ottenuto benefici clinici prolungati per almeno 12 mesi con il regime VEX (ovvero vinorelbine, cyclophosphamide, capecitabine). Abbiamo identificato 67 pazienti. I risultati hanno mostrato che il regime di trattamento metronomica VEX può indurre benefici clinici prolungati nel tumore al seno metastatico. Inoltre, questa valutazione a lungo termine ha permesso di concludere l'assenza di evidente tossicità specifica o tardiva. (PMID 34407044)

Abbiamo effettuato uno studio clinico di fase 2, randomizzato per valutare l'efficacia di paclitaxel, somministrato settimanalmente, rispetto al trattamento combinato con cediranib-olaparib (somministrato in maniera continua o intermittente) nel tumore ovarico epiteliale di alto grado, resistente al platino.

Risultati precedenti hanno mostrato che il trattamento con cediranib-olaparib aumenta la sopravvivenza in assenza di progressione della malattia in donne con tumore ovarico recidivante sensibile al platino. Questo studio clinico -BAROCCO- ha arruolato 123 pazienti e ha dimostrato che la combinazione di

cediranib-olaparib non mostrava una maggiore efficienza rispetto alla chemioterapia in termini di sopravvivenza in assenza di progressione della malattia in pazienti con tumore ovarico pretrattati e resistenti al platino. Tuttavia, pur non avendo una efficacia maggiore, questa combinazione è attiva e potrebbe offrire un'opzione alternativa, non chemioterapica, in questa sottopopolazione di pazienti difficile da trattare. (PMID: 35063281)

Abbiamo valutato l'efficacia e la sicurezza della terapia di combinazione con Lanreotide Autogel e Temozolomide nei tumori neuroendocrini toracici progressivi nell'ambito di uno studio clinico di fase II (ATLANT).

Lanreotide autogel (LAN) e temozolomide (TMZ) sono monoterapie raccomandate per i tumori toracici neuroendocrini sulla base di linee guida; tuttavia, non sono disponibili dati prospettici né per quanto riguarda il trattamento in monoterapie né per la terapia di combinazione. Abbiamo quindi valutato l'efficacia e la sicurezza di LAN/TMZ nei tumori endocrini toracici progressivi nell'ambito dello studio clinico ATLANT. ATLANT era uno studio clinico italiano di 12 mesi, di fase II, multicentrico. Nell'ambito di questo studio abbiamo arruolato 40 pazienti maschi. Lo studio ha mostrato l'efficacia del trattamento con LAN/TMZ in questi tumori. Il trattamento si è dimostrato inoltre ben tollerato dai pazienti. Sono tuttavia necessari studi ulteriori in coorti di pazienti più grandi al fine di confermare i benefici clinici del trattamento con LAN/TMZ in questi tumori. (PMID 36044870)

Nell'ambito di uno studio multicentrico prospettico abbiamo valutato l'efficacia di Oncofid-P-B, un nuovo trattamento per il tumore della vescica in situ che non risponde alla terapia Bacillus Calmette-Guerin (BCG).

Oncofid-P-B è un nuovo composto sviluppato da Fidia farmaceutici che lega in maniera specifica il recettore Cd44 in pazienti con tumore della vescica resistenti al trattamento BCG. Abbiamo condotto uno studio clinico di fase I, nel contesto del quale abbiamo valutato sicurezza ed efficacia di questo composto in 20 pazienti. I risultati hanno mostrato che Oncofid-P-B è sicuro, ben tollerato e molto efficace se somministrato settimanalmente, fino a 12 settimane consecutive, con 40% di risposta completa fino a 15 mesi dall'inizio del trattamento. (PMID 34649772)

Abbiamo confrontato l'efficacia del trattamento multimodale rispetto alla deprivazione degli androgeni da sola, nel tumore alla prostata oligometastatico.

Abbiamo paragonato l'efficacia del trattamento multimodale (definito come prostatectomia radicale robot assistita + terapia di deprivazione degli androgeni, con o senza radioterapia neoadiuvante) rispetto all'efficacia della terapia di deprivazione degli androgeni da sola, in 74 pazienti trattati tra il 2010 e il 2018. I nostri dati hanno rivelato come il trattamento multimodale fosse associato ad una minore mortalità ed una minore incidenza del tumore alla prostata metastatico resistente alla castrazione. Con il

trattamento multimodale sono stati riscontrati meno effetti collaterali avversi associati al trattamento. (PMID: 35565441)

Abbiamo condotto uno studio retrospettivo per valutare il ruolo della chemioterapia neoadiuvante in pazienti con angiosarcoma primario localizzato.

Abbiamo selezionato tutti i pazienti (362) con angiosarcoma primario localizzato che hanno ricevuto chirurgia radicale tra il 2005 e il 2019 in 33 centri di referenza per il sarcoma, al fine di paragonare l'esito in quelli che avevano ricevuto chemioterapia neoadiuvante rispetto a quelli che non l'avevano ricevuta, in termini di sopravvivenza e presenza di metastasi distanti. Questo studio suggerisce che i pazienti con angiosarcoma localizzato primario ad alto rischio potrebbero beneficiare della terapia neoadiuvante. (PMID: 35728378)

Abbiamo effettuato uno studio al fine di valutare l'incidenza di disturbi ematologici dopo terapia di salvataggio con inibitori di PARP per il trattamento di pazienti con tumore ovarico.

Gli inibitori di PARP vengono sempre più utilizzati come terapia di salvataggio nelle pazienti con tumore ovarico, ma l'esposizione a farmaci citotossici insieme ad inibitori di PARP potrebbe favorire lo sviluppo di disturbi ematologici. Abbiamo condotto uno studio su 182 donne con tumore ovarico trattato con inibitori di PARP e valutato l'incidenza in questa popolazione di neoplasie mieloidi associate alla terapia. I nostri risultati confermano il rischio di neoplasie mieloidi secondarie in pazienti sottoposti a chemioterapia e terapia prolungata con inibitori di PARP. La gestione di questi pazienti è complessa e l'esito generalmente negativo. Procedure diagnostiche accurate sono fortemente raccomandate quando si sviluppano citopenie inusuali in pazienti che ricevono terapie con inibitori di PARP. (PMID 35695283)

Abbiamo effettuato una meta-analisi per valutare l'approccio chemioterapico più efficace per la riduzione delle dimensioni della massa tumorale nel cancro al pancreas.

Nel tumore del pancreas, la riduzione della massa tumorale può essere curativa o palliativa. FOLFIRINOX e GEM-NAB sono due terapie approvate da FDA e EMA per il trattamento della malattia in stadio avanzato. Il nostro obiettivo era quindi l'identificazione del regime terapeutico maggiormente efficace nel ridurre la massa tumorale (citoriduttivo) sulla base dei dati presenti attualmente letteratura. La meta analisi ha incluso 40 studi, con un totale di 2883 pazienti e non ha evidenziato alcuna significativa superiorità di un regime terapeutico rispetto all'altro in termini di citoriduzione, a scopo palliativo o curativo, in questa coorte di pazienti. Abbiamo però osservato un maggiore controllo della malattia con il trattamento con FOLFIRINOX rispetto a GEM-NAB che merita studi ulteriori. (PMID 35114498)

Abbiamo valutato le differenze in termini di risposta al trattamento immunoterapico in relazione al sottotipo istologico nel melanoma.

Abbiamo effettuato uno studio retrospettivo di pazienti con melanoma in stadio avanzato trattati con PD-1 e/o anti-CTLA-4 presso il nostro centro di cui erano disponibili dati riguardo al sottotipo di tumore. Abbiamo analizzato sia l'associazione tra sottotipo istologico ed esito del paziente, sia i dati di sequenziamento -per identificare geni e pathway diversamente espressi nel melanoma nodulare e rispetto al melanoma diffuso. Non abbiamo osservato alcuna differenza in termini di numero e frequenza di mutazioni in nessun gene; abbiamo però riscontrato un significativo arricchimento di geni associati a pathway coinvolti in meccanismi di presentazione dell'antigene, risposta a interferon gamma e attivazione dei neutrofili. Il nostro studio fornisce quindi evidenze che suggeriscono una significativa associazione tra sottotipo istologico e risposta a immunoterapia nel melanoma. (PMID: 34908006)

Real world clinical trial.

Abbiamo analizzato, in un contesto real world, l'efficacia di Pralsetinib nel trattamento dei tumori del polmone positivi alle fusioni del gene RET.

L'inibitore selettivo di RET Pralsetinib ha mostrato attività terapeutica in clinical trial in pazienti con tumore al polmone (non small cell lung cancer) con fusioni del gene RET. Tuttavia, ad oggi non era stata ancora investigata l'efficacia in un contesto real world. Abbiamo quindi effettuato uno studio retrospettivo per valutare efficacia e sicurezza nei pazienti arruolati nell'ambito dello studio italian expanded access program tra luglio 2019 e ottobre 2021. Nel dettaglio abbiamo arruolato 62 pazienti in 20 centri in Italia. Le alterazioni del gene RET sono state rilevate tramite analisi NGS. In questo contesto, pralsetinib ha confermato un'efficacia duratura. Il Profilo di tossicità era in accordo con report precedenti. (PMID: 36379124)

Abbiamo effettuato un'analisi in un contesto real world sull'efficacia e la progressione della malattia in pazienti con tumore al polmone trattati con pembrolizumab e chemioterapia rispetto a quelli trattati solo con chemioterapia.

Dall'introduzione dell'immunoterapia come trattamento per i pazienti con tumore al polmone caratterizzato dall'assenza di mutazioni EGFR/ALK, è risultata evidente la difficoltà di replicare i dati dei clinical trial nella pratica clinica, con conseguente elevato tasso di fallimento del trattamento. Abbiamo quindi condotto un'analisi retrospettiva su pazienti al quarto stadio, con livello di PDL1<50%, trattati con immunoterapia e chemioterapia rispetto a quelli trattati solo con chemioterapia nel nostro centro dal 2016 al 2021 ed abbiamo analizzato e confrontato la sopravvivenza nei due gruppi. Nonostante il piccolo studio di popolazione e i follow up diversi, il nostro studio dimostra che, nei pazienti con livelli di espressione di PDL1<50% l'uso sequenziale di chemioterapia seguito da immunoterapia come trattamento di prima linea non è inferiore al trattamento di prima linea combinato chemio più immunoterapia. (PMID: 36033444)

Imaging clinico.

Abbiamo valutato l'impatto della metodica di filtering delle immagini sulle features radiomiche.

Non ci sono evidenze a supporto della scelta di una specifica metodologia di filtering delle immagini in radiomica. Dato che il volume del tumore primario è un noto fattore prognostico, il nostro obiettivo era quello di valutare in che modo l'operazione di filtering delle immagini potrebbe influenzare la dipendenza delle features dal volume in immagini CT di tumore al polmone, e se ciò si traduce in differenze nelle performances dei modelli di sopravvivenza. Abbiamo utilizzato oltre 400 immagini CT di pazienti con tumore al polmone. Le immagini sono state sottoposte a pre processing e sono state estratte le features. I nostri risultati hanno dimostrato che le features radiomiche complementano ben noti fattori prognostici come il volume, ma la loro dipendenza dal volume è elevata e dovrebbe essere accuratamente controllata. La quantità di informazioni ottenibili dalle features radiomiche potrebbe essere minore nelle lesioni piccole, e ciò potrebbe limitare l'applicabilità della radiomica in tumori negli stadi precoci, che tendono ad essere piccoli. I nostri risultati suggeriscono un vantaggio del modello CatBoost rispetto ai modelli CoxPH. (PMID: 36636424)

Abbiamo confrontato la capacità delle features radiomiche estratte da due diverse piattaforme di predire l'esito clinico in pazienti trattati con radio-chirurgia per metastasi cerebrali da tumore al polmone.

La radiomica consente di estrarre features quantitative da immagini mediche. L'influenza del software utilizzato per l'estrazione delle features radiomiche sulla performance finale del modello è un argomento ancora ampiamente dibattuto. Abbiamo quindi sviluppato modelli che integrano features radiomiche da immagini di MRI (acquisite sfruttando due diverse piattaforme) pre-trattamento e dati clinici. L'utilizzo di due piattaforme risultava in differenze in termini di qualità e numero di features estratte, che influenzava a sua volta la performance dei modelli, sottolineando la discrepanza esistente associata all'utilizzo di due diverse piattaforme. (PMID: 36435336)

Abbiamo valutato la possibilità che i valori di composizione corporea derivanti da immagini CT e le caratteristiche cliniche siano associate al rischio di complicazioni post chirurgiche in uomini e donne che hanno subito un intervento chirurgico per tumore al polmone.

Abbiamo analizzato i dati di 107 pazienti che mostravano significative differenze in termini di indice di massa corporea. Tuttavia, abbiamo evidenziato differenze significative tra uomini (84) e donne (23) in termini di parametri come i valori di tessuto adiposo e massa muscolare. I nostri dati hanno mostrato che le misure della composizione corporea estratte da esami CT di routine potrebbero aiutare nel predire eventuali complicazioni dopo pneumonectomia, con uomini e donne molto diversi in termini di quantità

e distribuzione del grasso e massa muscolare, e gli uomini più predisposti a complicazioni con l'aumentare dell'età e la riduzione dell'area muscolare scheletrica. (PMID: 35372021)

Radioterapia.

Abbiamo effettuato una meta-analisi per valutare l'efficacia della terapia protonica ipofrazionata nel trattamento dei pazienti con tumore al polmone.

La terapia protonica ipofrazionata (PBT) sta ricevendo sempre maggior attenzione per il trattamento dei pazienti con tumore al polmone in stadio precoce. Tuttavia, è ancora necessario definire indicazioni, dosi e potenziali effetti collaterali dei protoni in questo contesto. Abbiamo quindi valutato associazioni tra programmi di frazionamento e dosi biologiche effettive, esito della malattia e tossicità. L'analisi di 8 studi, che includeva 401 pazienti con un follow up di circa 32 mesi, ha mostrato sicurezza ed efficacia del PBT ipofrazionato come opzione di trattamento per questi pazienti. (PMID: 36194908)

Abbiamo valutato gli effetti di un trattamento con radioterapia ipofrazionata del seno con electron boost intraoperatorio nelle donne in premenopausa.

Al fine di valutare l'esito del trattamento con electron boost intraoperatorio (IOERT) e irradiazione ipofrazionata (HWBI) del seno nelle giovani donne, abbiamo sottoposto al trattamento 481 pazienti con età inferiore ai 48 anni, trattate tra il 2004 e il 2014. Il nostro studio ha dimostrato che la combinazione di IOERT e HWBI determina un controllo eccellente della malattia. Abbiamo inoltre identificato la dose (<12 Gy) ideale di IOERT. (PMID: 36377094)

Abbiamo valutato la tossicità, l'efficacia (in termini di controllo a livello locale e di sopravvivenza) nelle pazienti con tumore al seno anziane trattate con radioterapia ultra-ipofrazionata adiuvante ad intensità modulata (IMRT) oppure con 3D conformal RT (3DCRT).

Abbiamo incluso nello studio 271 pazienti. Il nostro studio ha valutato la fattibilità e l'efficacia del trattamento radioterapico settimanale ultra ipofrazionato RT. La tossicità era lieve, il livello di controllo locale accettabile, e la sopravvivenza a tre anni era del 97.8%. La tossicità grave era inoltre ridotta con la tecnica IMRT. (PMID: 34989858)

La chirurgia nel trattamento dei tumori.

Abbiamo messo a punto una nuova tecnica di chirurgia oncoplastica per evitare le conseguenze negative associate ad una resezione estesa.

La tecnica si chiama "three-petal reconstruction" (3-PR). Abbiamo trattato con questo approccio 10 pazienti con tumore al seno invasivo tra settembre 2016 e maggio 2019. Non abbiamo osservato complicazioni minori o più gravi. Successivi studi di sorveglianza non hanno rivelato calcificazioni o altri sospetti nella zona ricostruita, a sostegno dell'efficacia di questa metodica. (PMID: 36261743)

Abbiamo valutato l'utilizzo di un approccio chirurgico di preservazione dell'organo in tumori della laringe in stadio avanzato.

Il tumore della laringe in stadio avanzato è una malattia che necessita di un trattamento multimodale. Strategie di preservazione degli organi sia di tipo medico che chirurgico sono in via di sviluppo per preservare gli organi e assicurare una cura. Abbiamo quindi raccolto i dati clinici di pazienti che si sono sottoposti a laringectomia orizzontale parziale (OPHL) e trattamenti adiuvanti dal 2015 al 2018. L'esito è stato confrontato con i più recenti studi che hanno riportato strategie chirurgiche e mediche di preservazione dell'organo. I nostri risultati hanno confermato che OPHL è un approccio valido di trattamento. Il controllo della malattia e la preservazione dell'organo è infatti assicurata in una significativa percentuale di pazienti, anche quando seguita da terapia adiuvante.

Abbiamo confrontato l'esito della mastectomia robotica con la tecnica classica in pazienti con tumore al seno.

Dato che l'uso della mastectomia robotica che risparmia il capezzolo continua a diffondersi, è necessaria una maggiore comprensione degli esiti in termini chirurgici, oncologici, e di qualità di vita per una appropriata selezione della paziente così come per comprendere meglio le indicazioni, i limiti, i vantaggi e i pericoli. Abbiamo quindi condotto uno studio clinico di fase III randomizzato su 80 donne con tumore al seno o mutazione del gene BRCA, e abbiamo confrontato l'esito della mastectomia robotica e quella standard. I nostri risultati hanno sottolineato che le complicazioni erano simili, evidenziando la sicurezza dell'approccio robotico. La qualità di vita era mantenuta dopo la mastectomia robotica mentre si riduceva significativamente dopo chirurgia standard. (PMID: 34597010)

Abbiamo valutato sicurezza ed efficacia del trattamento di chirurgia oncoplastica per la gestione del tumore al seno primario invasivo multicentrico e multifocale.

La chirurgia oncoplastica è un approccio che combina il trattamento di conservazione del seno e la chirurgia plastica. Sebbene questo approccio sia già stato descritto per i tumori multifocali e multicentrici, non c'è stata valutazione (follow up) a lungo termine nel confronto con pazienti che sono stati sottoposti a mastectomia. Abbiamo quindi confrontato 100 pazienti con tumore multicentrico o multifocale che hanno subito chirurgia oncoplastica con 100 che avevano un tumore multicentrico o multifocale e sono state sottoposte a mastectomia (gruppo di controllo). Abbiamo valutato la sopravvivenza in assenza di malattia, la sopravvivenza generale, incidenza di recidiva (recidiva locoregionale e recidiva distante). I nostri dati hanno mostrato che la sopravvivenza generale e la sopravvivenza in assenza di malattia erano simili nei due gruppi. L'incidenza di eventi localizzati era più alta nel gruppo sottoposto a chirurgia oncoplastica, mentre l'incidenza regionale era leggermente più elevata nel gruppo sottoposto a mastectomia. Le differenze comunque non erano statisticamente

significative. L'incidenza di eventi distanti era simile nei due gruppi. Abbiamo quindi fornito la prima evidenza disponibile che suggerisce che l'approccio oncoplastico è sicuro e affidabile per il trattamento dei tumori al seno multicentrico o multifocali. (PMID 34613536)

Abbiamo effettuato una meta-analisi al fine di valutare l'efficacia della chirurgia mininvasiva rispetto alla lobectomia in pazienti con tumore al polmone negli stadi precoci.

Abbiamo valutato le potenziali differenze in termini di esito perioperatorio, sopravvivenza in assenza di malattia e sopravvivenza generale in pazienti in stadio 1A. Le nostre analisi hanno mostrato che i due approcci avevano un esito paragonabile nel breve e lungo termine. L'incidenza di complicazioni post operatorie era simile. Sebbene l'approccio chirurgico mininvasivo sia associato alla resezione di un maggior numero di linfonodi, ciò non influenza la sopravvivenza. (PMID 36551646)

Abbiamo confrontato i pazienti con tumore al polmone in stadio I soggetti a chirurgia toracica robot-assistita, chirurgia toracica video-assistita o toracotomia per valutare eventuali differenze in termini di esito.

Abbiamo revisionato i dati di pazienti operati tra il 2011 e il 2017 e confrontato i dati tenendo in considerazione fattori come età del paziente, sesso, stadio clinico del tumore e classificazione dello stato clinico del paziente (ASA score). La nostra analisi non ha evidenziato alcuna differenza in termini di sopravvivenza tra i tre approcci, sebbene nella procedura chirurgica video-assistita abbiamo riscontrato una maggiore incidenza di recidiva locale. (PMID 35743434)

Abbiamo valutato l'eventuale effetto dell'ossigenazione Extracorporea a Membrana (ECMO) sul numero di cellule tumorali circolanti.

La diagnosi di malattia neoplastica attiva è tradizionalmente considerata una controindicazione assoluta per ECMO per via della possibilità di aumentare il numero di cellule tumorali circolanti. Abbiamo quindi effettuato uno studio prospettico non randomizzato per confrontare il numero di cellule tumorali circolanti prima e dopo chirurgia in pazienti che hanno ricevuto resezione del tumore al polmone, con e senza ECMO. I nostri risultati hanno dimostrato che nella resezione del tumore al polmone, ECMO non influenza il numero di cellule tumorali circolanti dopo la procedura. (PMID: 36291788)

Abbiamo valutato l'esito clinico a lungo termine e i fattori prognostici della chirurgia come terapia di prima linea in pazienti con tumore al polmone in cui la biopsia ha identificato la presenza di tumore ai linfonodi (N2).

Abbiamo effettuato un'analisi retrospettiva di pazienti operati tra il 2007 e il 2017 in cui il tumore era considerato completamente resecabile. Sono stati inclusi nell'analisi 285 pazienti. Le analisi hanno mostrato che i pazienti trattati chirurgicamente avevano una prognosi favorevole, simile a quella dei

pazienti trattati prima con chemioterapia e successivamente sottoposti ad intervento chirurgico. (PMID 35965495)

Abbiamo condotto uno studio al fine di valutare i benefici in termini di sopravvivenza per la linfadenectomia combinata a radioterapia nel trattamento dei pazienti con carcinoma a cellule di merkel, un tumore cutaneo altamente aggressivo con elevato rischio di recidiva e metastatizzazione.

Il nostro studio ha sottolineato l'efficacia del trattamento combinato con linfadenectomia e radioterapia. (PMID 36230698)

Abbiamo condotto un'analisi retrospettiva sulla gestione dei pazienti con tumore ovarico sieroso avanzato di basso grado con agenti chemioterapici o con chirurgia in due diversi centri oncologici.

Il tumore ovarico sieroso di basso grado rappresenta un istotipo non comune di tumore ovarico (che rappresenta circa il 5% di tutti i tumori ovarici) con un comportamento diverso rispetto al tumore di alto grado che è invece caratterizzato da una migliore prognosi e una peggiore risposta ad agenti chemioterapici. Anche in questo contesto, la chirurgia citoreduttiva è considerata cruciale per la sopravvivenza delle pazienti. Questo studio retrospettivo si poneva l'obiettivo di analizzare l'impatto di un approccio chirurgico citoreduttivo ottimale. Lo studio ha incluso un totale di 92 pazienti operate in due diversi centri tra il 1994 e il 2018. I risultati hanno sottolineato come un'ottimale chirurgia citoreduttiva migliorasse la sopravvivenza negli stadi avanzati. Quando tuttavia la resezione del tumore era incompleta, una malattia residua <10mm risultava, in questa sottopopolazione di pazienti, in una migliore sopravvivenza rispetto ad una malattia residua >10mm. (PMID 36237308)

Abbiamo effettuato un'analisi retrospettiva per valutare l'efficacia della chirurgia dopo il trattamento con immunoterapia per pazienti con tumore al polmone inizialmente non operabili.

Abbiamo analizzato i dati clinici, chirurgici, e patologici di 42 pazienti con tumore al polmone inoperabile sottoposte ad intervento chirurgico dopo una buona risposta a immunoterapia o trattamento con inibitori tirosin chinasi (TKI), diventando così operabili. I nostri dati mostrano che la resezione del tumore per sospetta malattia residua dopo immunoterapia o trattamento con TKI è fattibile. Sebbene l'intervento possa essere tecnicamente difficile per via della presenza di fibrosi, una significativa morbidità è rara. L'esito è incoraggiante, con una ragionevole sopravvivenza nel breve termine. (PMID 35681639)

Strumenti prognostici/diagnostici.

Abbiamo identificato un nuovo approccio per la stratificazione dei pazienti, da poter affiancare agli attuali biomarcatori, per aumentarne il valore prognostico. Abbiamo mostrato che i pazienti con tumore del colon-retto possono essere classificati in due gruppi sulla base dell'abbondanza all'interno della massa tumorale di neutrofili che esprimono livelli elevati della proteina CD15. Nei tumori in cui era

presente un elevato numero di questo sottotipo di neutrofili c'era anche abbondanza di un sottotipo di linfociti T (linfociti T CD8 della memoria) caratterizzati dall'elevata espressione del granzima K (GZMK). Questi pazienti avevano una prognosi peggiore.

L'efficacia della terapia nei pazienti con tumore del colon-retto dipende in gran parte dallo stadio del tumore al momento della diagnosi. Tuttavia, oltre il 40% dei pazienti va incontro a recidiva e manifesta metastasi entro cinque anni dall'intervento chirurgico, sottolineando l'esigenza di strumenti più accurati per la stratificazione dei pazienti. Nel contesto di uno studio clinico, abbiamo arruolato pazienti con tumore del colon-retto non trattati, non metastatici, operabili. All'interno della coorte di pazienti, abbiamo identificato due sottogruppi: un gruppo di pazienti in cui all'interno della massa tumorale era presente un gran numero di neutrofili caratterizzati dall'elevata espressione della proteina CD15 (HN) e un gruppo di pazienti in cui era presente un minor numero di neutrofili caratterizzati dall'elevata espressione della proteina CD15 (LN). L'accumulo di neutrofili era indotto dal rilascio nel microambiente tumorale di specifiche molecole infiammatorie solubili. La percentuale di neutrofili era inversamente correlata con l'abbondanza dei macrofagi. Nel microambiente tumorale i neutrofili interagivano direttamente con i linfociti T CD8, inducendo in questi ultimi l'espressione della proteina GZMK, che promuoveva la progressione tumorale. I linfociti T che esprimevano GZMK erano caratterizzati da uno specifico profilo di espressione genica e la loro abbondanza era associata con la manifestazione precoce di recidiva nei pazienti. Questi tumori esprimevano livelli molto bassi di E-Caderina, un tratto associato ai tumori maligni e al processo di transizione epitelio-mesenchimale -processo tipicamente legato alla disseminazione metastatica delle cellule tumorali. Pertanto, abbiamo dimostrato il valore prognostico dell'abbondanza di neutrofili nel microambiente tumorale dei pazienti con tumore del colon-retto, sottolineando in particolare la correlazione, in un sottogruppo di pazienti, tra l'accumulo della sottopopolazione di neutrofili -caratterizzata da alti livelli di proteina CD15- e l'abbondanza di linfociti T intratumorali -che esprimevano GZMK-, con la recidiva. I nostri dati indicano il ruolo di neutrofili CD15^{high} e linfociti T CD8 GZMK^{high} nella progressione del tumore, evidenziando come la loro presenza all'interno della massa tumorale possa avere un valore prognostico -affiancando gli attuali biomarcatori-

e sottolineando le implicazioni terapeutiche delle nostre scoperte. (PMID 36450724)

Abbiamo confrontato il nostro strumento prognostico precedentemente sviluppato -StemPrintER- con Oncotype Dx, un altro strumento genomico ampiamente usato per stimare il rischio di recidiva in pazienti con tumore al seno: StemPrintER distingue in maniera più accurata le pazienti ad alto rischio di sviluppare metastasi da quelle a basso rischio.

In seguito alla rimozione chirurgica del tumore primario e alla terapia post-chirurgica, le pazienti con tumore al seno possono andare incontro a recidiva. In ambito clinico c'è una gran richiesta di biomarcatori migliori, in aggiunta ai classici parametri clinico-patologici, per predire in maniera accurata il rischio individuale delle pazienti di sviluppare metastasi distanti e consentire trattamenti personalizzati, evitando così il sovra- o sotto-trattamento. Si ritiene che la recidiva sia dovuta principalmente alla presenza, all'interno della massa tumorale, di una piccola frazione di cellule staminali tumorali (CSC) che coesistono con cellule tumorali non-staminali (non-CSCs). Le CSC sono caratterizzate da una capacità illimitata di auto rinnovarsi –guidando la progressione del tumore– e dalla capacità di entrare in uno stato di quiescenza, ovvero smettere temporaneamente di proliferare, resistere alla terapia e rimanere “addormentate” anche per anni prima di “svegliarsi”, ricominciare a proliferare e dare origine a metastasi. Sulla base di diversi fattori clinico-patologici –come il grado e la dimensione del tumore, l'età del paziente, la presenza di metastasi ai linfonodi–, i medici identificano quelle pazienti che hanno un rischio più elevato di sviluppare metastasi e potrebbero beneficiare di un ulteriore trattamento anche dopo l'intervento chirurgico (terapia adiuvante). Tuttavia, la selezione delle pazienti ad alto rischio solo sulla base di questi criteri non è sempre adeguata e le pazienti potrebbero subire un sovra-trattamento anche quando non è necessario, peggiorando la loro qualità di vita. Per evitare un inutile sovra-trattamento delle pazienti, negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi strumenti per stimare il rischio di recidiva sulla base dell'espressione, nei campioni di tumore primario, di specifici geni (le cosiddette firme molecolari). Abbiamo precedentemente sviluppato uno strumento di questo tipo per stimare il rischio di recidiva precoce (entro cinque anni dalla rimozione del tumore primario) o tardiva (da cinque a dieci anni) nelle pazienti con tumore al seno (nello specifico, nelle pazienti con tumore al seno di tipo luminale). Il nome di questo strumento è StemPrintER, un acronimo che indica la possibilità di valutare il “grado di staminalità” intrinseco del tumore primario. StemPrintER funziona calcolando il rischio di recidiva misurando, all'interno della massa tumorale, i livelli di espressione di venti geni che caratterizzano le cellule staminali. Diversi studi infatti riconoscono il ruolo delle CSC nell'insorgenza delle metastasi. Abbiamo analizzato i dati di espressione genica nei campioni di tumore di 776 pazienti con cancro al seno (in particolare, lo studio è stato effettuato usando dati di pazienti in menopausa positivi per il recettore degli estrogeni, ma negativi per il recettore di tipo 2 del fattore di crescita epidermico umano). StemPrintER era in grado di stimare il rischio di sviluppo di metastasi nei dieci anni successivi alla rimozione del tumore primario, in tutte le pazienti analizzate, in accordo con i risultati precedenti che avevano dimostrato il valore prognostico di StemPrintER in 1800 pazienti. StemPrintER, inoltre, forniva ulteriori informazioni prognostiche da poter integrare con quelle ottenute sulla base di fattori clinico-patologici, supportando fortemente il suo utilizzo in un contesto clinico. Infine, abbiamo

confrontato StemPrintER con Oncotype Dx, uno degli strumenti prognostici basati sull'informazione genomica attualmente maggiormente impiegati nella pratica clinica per aiutare i clinici nel decidere se prescrivere o no la chemioterapia. Nel complesso, StemPrintER era più efficace e più informativo sia di Oncotype Dx sia dei fattori clinico-patologici, sia della combinazione dei due. Un'analisi di confronto più fine tra i due strumenti, in momenti diversi dopo l'intervento chirurgico, ha sottolineato che nei primi anni dopo la rimozione del tumore primario (entro i cinque anni) Oncotype Dx era più prognostico di StemPrintER, mentre più avanti (tra i cinque e i dieci anni), StemPrintER era molto più potente di Oncotype Dx. Analogamente, StemPrintER era in grado di predire lo sviluppo di metastasi tra le pazienti che non mostravano metastasi ai linfonodi tra le quali, invece, Oncotype Dx non riusciva. Quindi, abbiamo confermato i risultati precedenti sul potere di StemPrintER nell'interrogare la biologia delle cellule staminali nel tumore primario, misurando i livelli di espressione di venti geni specifici – associati alle caratteristiche staminali delle cellule – per predire il rischio di ogni paziente di sviluppare metastasi e abbiamo dimostrato che StemPrintER potrebbe essere usato per integrare le informazioni ottenute dall'analisi dei parametri clinico-patologici. Inoltre, StemPrintER è più potente dello strumento ad oggi maggiormente usato – Oncotype Dx – sottolineando il suo valore e il suo potenziale utilizzo per supportare gli oncologi nel processo decisionale: da solo o in combinazione con altri strumenti, StemPrintER può fornire informazioni utili per decidere se continuare una terapia aggressiva dopo la rimozione chirurgica del tumore primario nelle pazienti con tumore al seno ad alto rischio di metastasi distanti, oppure, in alternativa, evitare un trattamento chemioterapico tossico e non necessario nelle pazienti a basso rischio di recidiva. (PMID 35172273)

Abbiamo valutato la possibilità di sfruttare il profilo dei composti organici volatili (VOC) delle urine per la diagnosi di pazienti con tumore al polmone negli stadi precoci.

Ad oggi l'identificazione di potenziali biomarcatori in grado di identificare il tumore al polmone negli stadi precoci, prima che diventi sintomatico o rilevabile tramite i mezzi convenzionali, rappresenta una necessità in ambito clinico. Diverse ricerche hanno indipendentemente indicato che il profilo dei composti volatili organici (VOC) potrebbe essere considerato come una impronta utile per la diagnosi del tumore al polmone. In particolare, il 16% dei VOC si trovano nelle urine, che sono quindi un campione ideale di analisi. L'analisi dei campioni di urine attraverso tecniche non invasive, relativamente a basso costo ed immediata potrebbe avere un potenziale elevato per la diagnosi precoce del tumore. Abbiamo quindi analizzato i VOC nelle urine tramite i) gas chromatography-ion mobility spectrometer (GC-IMS) e ii) electronic nose (e-nose). Questo studio prospettico ha coinvolto in totale 127 individui: 46 pazienti (confermati da tecniche istologiche (biopsia), CT o PET) e 81 controlli. Le nostre analisi hanno identificato 8 VOC che potrebbero distinguere i pazienti dai controlli. Questo approccio identifica quindi i casi di

tumore con elevata accuratezza, sensibilità e specificità. Inoltre, 5 dei 8 VOC identificati come potenziali biomarcatori mostrano una buona sensibilità anche negli stadi precoci della malattia. (PMID 35952625) Abbiamo valutato l'impatto prognostico di diverse varianti patogeniche di BRCA1/2 sulla prognosi e sopravvivenza dei pazienti con tumore al seno.

Abbiamo analizzato l'associazione tra varianti patogeniche del gene BRCA1/2, caratteristiche clinicopatologiche, recidiva locoregionale e dati sulla sopravvivenza. In particolare abbiamo testato la differenza nell'incidenza della recidiva locale tra mutazioni missenso/di splicing e altre mutazioni. Le nostre analisi hanno mostrato che la presenza di mutazioni missenso/splicing era associata con un minore rischio di ricomparsa del tumore al seno, suggerendo che potrebbero essere utilizzate come predittori prognostici e potrebbero migliorare la gestione delle pazienti con tumore al seno. (PMID 36331686)

Abbiamo effettuato uno studio di fattibilità per confrontare l'efficacia del pannello AmoyDx HRD Focus rispetto al saggio Myriad myChoiceCDx nel testare i difetti nel meccanismo di riparo del DNA (Homologous recombination repair deficient) nel carcinoma ovarico.

Homologous recombination repair (HRR) è il meccanismo di riparo delle rotture a doppia elica del DNA. Difetti in questo meccanismo sono una caratteristica comune dei tumori ovarici. Mutazioni dei geni BRCA1/2 e/o alterazioni dei geni coinvolti in HRR sono note cause di difetti in questo meccanismo di riparo (Homologous recombination repair deficiency, HRD) e di instabilità genomica. Gli inibitori di PARP hanno rivoluzionato la gestione dei tumori ovarici caratterizzati da mutazioni nei geni BRCA e hanno mostrato una notevole efficacia in tumori con HRD. Determinare lo stato del HRD può quindi fornire informazioni sull'entità dell'efficacia della terapia basata su inibitori di PARP. Myriad MyChoice CDx è un test diagnostico in vitro basato su tecnologia NGS (next generation sequencing) in grado di generare un "punteggio di instabilità genomica" usando DNA isolato da campioni tumorali inclusi in paraffina. Questo saggio è però costoso e non rimborsabile, almeno in Italia. Abbiamo quindi condotto uno studio effettuando il test HRD Focus AmoyDx sugli stessi campioni tumorali valutati tramite il Myriad MyChoiceCDx assay. I risultati mostrano una concordanza del 87.8% tra i due saggi (ovvero 65 dei 74 tumori testati), suggerendo la fattibilità e l'affidabilità di questi test in laboratori diagnostici dotati di piattaforme NGS e personale qualificato. (PMID 36136896)

Abbiamo sviluppato un nuovo algoritmo per implementare la classificazione molecolare secondo le nuove linee guida 2020 di ESGO/ESTRO/ESP per il tumore dell'endometrio.

Al fine di confrontare l'attribuzione della classe di rischio con classificazione molecolare sconosciuta rispetto a quelli con classificazione molecolare nota, secondo le linee guida 2020, e di valutare la capacità di un nuovo algoritmo di analisi molecolare di limitare il numero di test richiesti, abbiamo

effettuato uno studio retrospettivo su 278 pazienti che hanno subito un intervento chirurgico e la caratterizzazione molecolare completa, tra il 2019 e il 2021. La classificazione molecolare del tumore dell'endometrio ha consentito la ricollocazione di un considerevole numero di pazienti in una diversa classe di rischio. Inoltre, l'applicazione del nostro algoritmo consente di ridurre il numero di test richiesti senza compromettere l'attendibilità della classificazione di rischio. (PMID 35732351)

Abbiamo valutato l'attendibilità dello score prognostico glasgow nel predire la recidiva in pazienti con tumore della vescica di alto grado, senza invasione del muscolo, sottoposti a trattamento con terapia Bacillus Calmette-Guérin (BCG).

Lo studio retrospettivo ha incluso un totale di 1382 pazienti e ha mostrato che lo score prognostico potrebbe avere il potenziale di predire la recidiva in questi pazienti, ma sono necessari studi prospettici in coorti più grandi di pazienti per valutare l'influenza di marcatori infiammatori sistemici nel predire l'esito di questi pazienti. (PMID 35328139)

Abbiamo valutato i parametri potenzialmente in grado di predire la possibilità di resezione del tumore primario e di masse a livello dei linfonodi mesenterici in pazienti con tumori neuroendocrini del piccolo intestino.

L'infiltrazione vascolare potrebbe ostacolare la resezione del tumore primario e delle metastasi mesenteriche nei tumori neuroendocrini del piccolo intestino. Alcuni fattori però potrebbero giocare un ruolo nel predire la reseccabilità del tumore. Per identificare i fattori potenzialmente in grado di influenzare la reseccabilità del tumore, abbiamo considerato, sulla base di immagini di CT, tre parametri radiologici, ovvero il grado di coinvolgimento dell'arteria mesenterica, come da precedente classificazione; il grado di coinvolgimento della vena mesenterica superiore, ovvero se assente, periferica prossimale; la presenza o assenza di fibrosi mesenterica. I parametri pre-intervento sono stati confrontati con quelli post-intervento. L'analisi è stata condotta su 49 pazienti. I nostri risultati hanno mostrato che, sulla base delle immagini CT, il coinvolgimento dell'arteria mesenterica e/o segni di fibrosi mesenterica, così come l'infiltrazione della vena mesenterica superiore prossimale alla vena del colon medio predicono un esito negativo dell'intervento. Questi fattori dovrebbero sempre essere considerati nel decidere l'approccio terapeutico in questi pazienti, soprattutto in quelli con malattia asintomatica con metastasi epatica non reseccabile. (PMID 35224681)

Nell'ambito di uno studio multicentrico abbiamo valutato l'accuratezza diagnostica della stadiazione preoperatoria dei linfonodi nel tumore della vescica, a seconda della diversa localizzazione del linfonodo. La stadiazione del linfonodo pre operatorio nel tumore della vescica indirizza le successive strategie terapeutiche e influenza la prognosi del paziente. Tuttavia, le evidenze a supporto dell'accuratezza dell'imaging convenzionale, come CT o MRI, nel rilevare in maniera accurata lo stadio del linfonodo sono

scarse. Lo scopo di questo studio era quindi quello di valutare l'accuratezza diagnostica dell'imaging convenzionale nel rilevare il coinvolgimento preoperatorio del linfonodo tra i pazienti con tumore alla vescica trattati con cistectomia radicale e dissezione del linfonodo pelvico. Abbiamo condotto un'analisi retrospettiva dei dati di 1104 pazienti operati tra il 1997 e il 2017 in tre diversi centri. I nostri dati mostrano una lieve concordanza tra lo stadio clinico e patologico del linfonodo. Le nostre sottoanalisi hanno mostrato risultati non soddisfacenti in tutti i siti dei linfonodi analizzati. Sono quindi necessarie ulteriori analisi al fine di integrare le informazioni sulla morfologia con le caratteristiche sierologiche e clinico patologiche del paziente. (PMID 35236621)

Abbiamo dimostrato che un elevato indice di massa corporea (BMI) è un fattore di rischio di prognosi sfavorevole dopo prostatectomia radicale.

L'associazione tra obesità e tumore alla prostata è ancora controversa. Abbiamo quindi condotto uno studio per valutare l'effetto del BMI sulla prognosi, sull'invasività e sulla recidiva. Abbiamo arruolato 427 pazienti classificati come stadio 1 che avevano subito prostatectomia e che erano stati sottoposti a valutazione del BMI. I nostri dati mostrano che un BMI elevato è un fattore in grado di predire una prognosi sfavorevole in pazienti con malattia classificata con rischio basso/moderato prima dell'intervento, suggerendo che la valutazione del BMI potrebbe essere utile in ambito clinico per identificare i pazienti con caratteristiche favorevoli tra i pazienti ad alto rischio. (PMID 34167120)

Nell'ambito di uno studio multicentrico abbiamo valutato l'impatto dell'età alla diagnosi sull'esito dei pazienti con carcinoma in situ della vescica.

Lo studio è stato condotto su 172 pazienti trattati tra il 2002 e il 2012 in 8 diversi centri oncologici. I risultati hanno mostrato che l'età alla diagnosi appare associata con un aumentato rischio di recidiva e progressione del tumore. Inoltre lo studio ha evidenziato che i pazienti in età avanzata potrebbero non rispondere alla terapia Bacillus Calmette-Guérin (BCG). (PMID 35033480)

Abbiamo effettuato uno studio clinico al fine di valutare la correlazione tra caratteristiche biologiche e radiologiche con l'esito clinico in pazienti con tumore alla prostata in stadio precoce.

La delezione di PTEN e l'espressione di Ki67 sono due dei biomarcatori più promettenti nel tumore alla prostata. Analogamente, la biopsia guidata da MRI multiparametrico (mpMRI) è uno strumento potente per la rilevazione e la stadiazione del tumore alla prostata. L'obiettivo di questo studio era quindi quello di valutare la possibile correlazione tra lo stadio patologico, definito da biopsia guidata da mpMRI, con l'espressione di ki67 e la delezione di PTEN. Questa correlazione potrebbe essere utile per la stadiazione e il trattamento personalizzato. L'analisi è stata effettuata nel contesto di uno studio clinico di fase II su 19 pazienti. Non abbiamo osservato alcuna correlazione tra la stadiazione del tumore, delezione di PTEN ed espressione di ki67 in questa coorte di pazienti. Ulteriori studi sono necessari per l'identificazione di

una eventuale associazione con l'aggressività e la risposta al trattamento con radioterapia ultra ipofrazionata. (PMID 35014537)

Abbiamo effettuato uno studio retrospettivo su pazienti maschi con diagnosi di carcinoma al seno tra gennaio 1999 e dicembre 2018.

Nel periodo in studio, 20 pazienti sono stati trattati per questa patologia presso il nostro centro oncologico. Abbiamo raccolto i dati riguardo alla presentazione clinica, età di manifestazione, caratteristiche radiologiche, stato dei recettori, tipo istologico, e follow up. Questa malattia è negli uomini estremamente rara. I nostri dati mostrano che una diagnosi e una gestione appropriata consentono una prognosi eccellente. (PMID 36114939)

Abbiamo valutato il ruolo dell'angiogenesi in pazienti con tumori neuroendocrini trattati con everolimus. Il successo della terapia molecolare nel trattamento dei tumori neuroendocrini ha sottolineato il potenziale di un approccio terapeutico che interferisce con l'angiogenesi e con il pathway PI3K/AKT/mTOR. Tuttavia, la principale sfida nell'era delle terapie molecolari rimane l'identificazione precoce di tumori resistenti, soprattutto quando l'efficacia è raramente associata ad una evidente riduzione del volume del tumore. Abbiamo quindi condotto uno studio prospettico per investigare il ruolo prognostico dei biomarcatori solubili del turnover di angiogenesi, cellule endoteliali circolanti, e progenitori, in 43 pazienti con tumore neuroendocrino metastatico sottoposti a trattamento con everolimus. Tra i marcatori analizzati, abbiamo identificato una specifica sottopopolazione di cellule circolanti associata ad una progressione tumorale significativamente aumentata. I nostri studi suggeriscono che le cellule circolanti potrebbero rappresentare un biomarcatore surrogato di attività angiogenica in pazienti trattati con everolimus e i livelli basali possono essere correlati con la sopravvivenza. Tuttavia, studi ulteriori sono ora necessari per validare il ruolo di queste cellule come marcatore surrogato per la selezione di pazienti candidati per trattamenti antiangiogenici. (PMID 36139632)

Meta-analisi.

Abbiamo effettuato la prima meta-analisi mai fatta sui benefici, in termini di sopravvivenza, che smettere di fumare potrebbe avere sulla prognosi dei pazienti con tumore testa-collo, analizzando i dati di sedici articoli pubblicati sull'argomento, includendo oltre 3.000 pazienti con tumore testa-collo (da Nord America, Europa e Asia).

Il fumo di sigaretta è uno dei principali fattori di rischio –insieme all'abuso di alcol e all'infezione da papillomavirus– per il tumore testa-collo. Se da un lato è stato proposto che smettere di fumare possa aumentare la sopravvivenza dei pazienti, gli attuali dati sono contraddittori e non ci sono reali evidenze scientifiche a supporto di tale affermazione. Averne la certezza sarebbe però estremamente utile perché

rappresenterebbe un fattore piuttosto semplice da manipolare per aumentare la sopravvivenza dei pazienti. I nostri risultati hanno mostrato che smettere di fumare è associato con un aumento del 20% nella sopravvivenza dei pazienti. Inoltre, sebbene non statisticamente significativo, è stato osservato un aumento paragonabile, in termini di sopravvivenza, anche per gli altri endpoint considerati (e.g. sopravvivenza in assenza di malattia, progressione, metastasi). Uno degli articoli inclusi nella meta-analisi

riportava i dati divisi per sesso, mostrando che queste differenze potrebbero essere dovute ad un diverso stile di vita o ad altri fattori di rischio non ancora noti (diversi in uomini e donne) che potrebbero interagire con il fumo. Pertanto, sebbene siano necessarie conferme definitive tramite la pianificazione di studi ad hoc, i risultati mostrano un'aumentata sopravvivenza dei pazienti che smettono di fumare dopo la diagnosi di tumore testa-collo. (PMID: 35999273)

Al fine di comprendere meglio l'associazione tra Covid-19 e vitamina D, abbiamo effettuato una meta-analisi degli articoli di ricerca e degli studi clinici osservazionali e interventistici che hanno esplorato il link tra Covid-19 e vitamina D (sia livelli sierici basali sia integrazione di vitamina D), considerando sia la gravità della malattia –ovvero ricovero o terapia intensiva– sia la mortalità.

La vitamina D può essere prodotta nella pelle, in seguito ad esposizione alla luce del sole, o assunta attraverso la dieta. A causa di insufficiente consumo o esposizione al sole, la carenza di vitamina D è abbastanza diffusa nella popolazione. La vitamina D è generalmente associata alla salute delle ossa, eppure, è stato riportato che livelli adeguati di vitamina D hanno effetti positivi nei casi di influenza o infezioni del tratto respiratorio, dato che i livelli bassi di vitamina D correlano con una aumentata suscettibilità a queste infezioni. Più recentemente, alcuni studi hanno suggerito un'associazione tra carenza di vitamina D e malattia grave e aumentato rischio di ospedalizzazione nella Covid-19. La nostra meta-analisi, che è parte di un progetto finanziato dalla Regione Lombardia, ha consentito di analizzare quasi 2.000 pazienti Covid-19 gravi, rafforzando così l'attendibilità dei risultati. Sebbene i dati sugli eventuali effetti della vitamina D nel ridurre il rischio di infezione da SARS-CoV2 richiedano ulteriori studi, i risultati hanno mostrato che livelli sufficienti di vitamina D e l'integrazione di vitamina D era associata ad un migliore decorso della malattia, riducendo significativamente il rischio di malattia grave e mortalità; al contrario, livelli bassi di vitamina D correlavano con un rischio più elevato di malattia grave e morte, considerando anche la variabilità dovuta all'età del paziente, al sesso o altre condizioni preesistenti che sono state associate con una cattiva prognosi. L'associazione era particolarmente evidente nella popolazione anziana, che generalmente ha livelli molto bassi di vitamina D, in cui quindi gli effetti dell'integrazione erano più marcati. Gli effetti della somministrazione di dosi più basse di vitamina D avevano effetti simili alle dosi più basse. Inoltre, la nostra analisi ha mostrato che in inverno,

a causa del minor numero di ore di sole, la carenza di vitamina D è di solito più diffusa e la supplementazione aveva effetti più evidenti che in estate, quando la produzione di vitamina D indotta dal sole potrebbe essere sufficiente. Inoltre, è importante sottolineare che l'integrazione di vitamina D migliorava la prognosi in particolare nei pazienti Covid-19 non gravi. Quindi, sebbene siano necessari studi clinici disegnati ad hoc al fine di provare definitivamente gli effetti protettivi della supplementazione di vitamina D nel limitare la gravità della malattia da Covid-19, questa meta-analisi suggerisce fortemente un'associazione che merita studi ulteriori. (PMID: 35793346)

Abbiamo effettuato una meta-analisi del microbioma di individui –sia donatori che riceventi– prima e dopo trapianto di microbiota fecale. La nostra analisi ha rivelato i fattori principali –protocollo di somministrazione e pre-trattamento antibiotico– che influenzano il successo del trapianto. Abbiamo inoltre sviluppato un modello basato su machine learning per predire la composizione del microbiota intestinale dopo il trapianto, che potrebbe consentire di identificare il donatore migliore per ogni ricevente.

Il microbiota intestinale è l'insieme di batteri ed altri microorganismi che popolano il tratto gastrointestinale e svolgono un ruolo attivo nella fisiologia umana. Il trapianto di microbiota fecale da donatori sani è un approccio che si è rivelato estremamente efficace in alcuni contesti clinici, ma ha dato risultati peggiori in altre condizioni, a causa del fatto che il microbiota trapiantato non sempre sopravvive, si riproduce e colonizza l'ospite in maniera altrettanto efficace. Una migliore comprensione delle ragioni della diversa efficacia del trapianto di microbiota fecale potrebbe rivelarsi estremamente utile per predire gli effetti del trattamento e per aumentarne l'efficacia. Abbiamo quindi incluso nella nostra analisi gli studi per cui erano disponibili informazioni sulla composizione del microbioma di donatori e riceventi, prima e dopo trapianto di microbiota fecale, in diverse condizioni patologiche. Il trapianto induceva un rimodellamento della composizione del microbioma: il ricevente “perdeva” parte del suo microbioma e acquisiva gran parte microbioma del donatore. Il modo in cui il trapianto di microbiota era effettuato influenzava significativamente la colonizzazione da parte del microbiota del donatore e, in particolare, la doppia somministrazione (nel tratto gastrointestinale superiore e inferiore) risultava più efficace. Il pre-trattamento con antibiotici –così come la somministrazione da donatori multipli– aumentava significativamente l'abbondanza del microbiota del donatore rispetto a quello del ricevente. Inoltre, sia la maggiore colonizzazione da parte del microbiota del donatore che la somiglianza preesistente (cioè prima del trapianto) nella composizione del microbiota tra donatore e ricevente sembrava migliorare gli effetti a livello clinico. Alcuni dei ceppi batterici che costituivano il microbiota avevano una maggiore capacità di colonizzare il ricevente rispetto ad altre, probabilmente per via di caratteristiche intrinseche (ad oggi sconosciute) dei microrganismi, come ad esempio la capacità di

sopravvivere in ambienti diversi (es. nell'intestino infiammato). Predire la composizione del microbiota dopo trapianto di microbiota fecale potrebbe essere estremamente utile per identificare i donatori migliori per ogni ricevente (a seconda delle caratteristiche sia del donatore che del ricevente), così da consentire una migliore colonizzazione del ricevente ed indurre gli effetti più marcati dal punto di vista clinico. A questo scopo, abbiamo sviluppato un approccio di machine learning che, tenendo in considerazione diversi fattori e nonostante l'eterogeneità non trascurabile, predice in maniera efficiente la composizione del microbiota dopo trapianto di microbiota fecale. I due fattori critici da tenere in considerazione sono risultati essere l'abbondanza di specifiche specie nel donatore e nel ricevente prima del trapianto e la prevalenza di una data specie. (PMID 36109637)

Tramite una meta-analisi abbiamo dimostrato che il tumore al seno triplo-negativo e il tumore al seno metaplastico hanno sopravvivenza in assenza di malattia paragonabile, sebbene quest'ultimo presenti una prognosi significativamente peggiore in termini di sopravvivenza.

Il tumore al seno metaplastico e il triplo negativo vengono spesso confusi in termini di sopravvivenza e prognosi. Abbiamo quindi valutato la prognosi di queste diverse diagnosi. Abbiamo selezionato per la nostra meta-analisi sei studi, che includevano circa 60.000 pazienti. La nostra analisi ha dimostrato che il tumore al seno metaplastico era associato con una peggiore sopravvivenza -con un'incidenza di morte più alta del 40%-. Non abbiamo inoltre riscontrato alcuna eterogeneità tra gli studi. (PMID 35088973)

Abbiamo effettuato una meta-analisi per valutare l'associazione tra trattamento con inibitori dei checkpoint immunitari e qualità della vita.

Sulla base di 34 clinical trial, che includevano oltre 18.000 pazienti, i nostri dati mostrano che il trattamento con inibitori dei checkpoint immunitari in monoterapia è associato in maniera favorevole con la qualità di vita del paziente e può essere quindi combinato con altre classi di farmaci antitumorali. (PMID: 35972744)

Ruolo di sesso/genere nel trattamento dei pazienti oncologici.

Abbiamo condotto uno studio clinico osservazionale per valutare il ruolo del sesso e dei livelli di emoglobina nei pazienti con carcinoma squamocellulare orale.

Le differenze tra donne e uomini potrebbero avere un impatto sul potere dei fattori prognostici nel predire la sopravvivenza al carcinoma squamocellulare orale. I livelli di emoglobina e l'attivazione del sistema immunitario giocano un ruolo critico in questo scenario che potrebbe essere fondamentale nel determinare, in parte, la prognosi diversa a seconda del sesso e del genere. Abbiamo quindi condotto uno studio osservazionale retrospettivo. Abbiamo raccolto campioni tumorali, i dati clinici dei pazienti, inclusi i livelli di emoglobina e il rapporto neutrofili/linfociti (NLR). Abbiamo paragonato la sopravvivenza tra uomini e donne. L'analisi ha incluso 576 pazienti. La nostra analisi ha mostrato che nella nostra

coorte di pazienti, gli uomini avevano una migliore sopravvivenza e sopravvivenza in assenza di malattia rispetto alle donne negli stadi precoci della malattia. Livelli bassi di emoglobina erano un fattore prognostico indipendente per le donne, soprattutto nei tumori in stadi precoci. Tuttavia, negli stadi più avanzati (III e V), il sesso non era un fattore significativamente associato alla prognosi dei pazienti. Abbiamo valutato l'impatto del sesso sulla prognosi dei pazienti con tumore neuroendocrino ben differenziato in un contesto real world.

A questo scopo abbiamo sfruttato il database contenente dati epidemiologici, di sorveglianza, e di risultati della ricerca e abbiamo revisionato i dati di pazienti con diagnosi di carcinoma polmonare tipico e atipico. I nostri dati sottolineano come le pazienti femmine con tumori polmonari abbiano una maggiore probabilità di sopravvivenza rispetto ai pazienti maschi, soprattutto tra i pazienti con carcinoidi tipici. (PMID: 35388711)

Ricerca Covid-19.

Usando colture di cellule epiteliali del tratto respiratorio superiore e inferiore –quelle maggiormente attaccate dal virus– e cellule immunitarie –quelle principalmente coinvolte nella reazione del corpo contro l'infezione–, nell'ambito di una collaborazione italiana abbiamo testato gli effetti degli inibitori di HDAC -farmaci epigenetici che si sono dimostrati efficaci come farmaci antitumorali e che sono stati precedentemente implicati nella risposta infiammatoria- contro la covid-19. I nostri risultati suggeriscono l'utilizzo di inibitori di HDAC per attenuare la sintomatologia grave della malattia covid-19, che è dovuta ad un'attivazione eccessiva, deregolata del sistema immunitario, agendo sulla risposta immunitaria.

Abbiamo simulato l'infezione virale stimolando le cellule con molecole specifiche (Poly I:C, un analogo sintetico del dsRNA, che lega e attiva il recettore TLR₃ –Toll-like receptor–, così come con specifici agonisti di TLR) e abbiamo analizzato gli effetti sulle cellule epiteliali e sulle cellule del sistema immunitario: i monociti circolanti, i macrofagi e i linfociti T. Il trattamento con gli inibitori di HDAC riduceva i livelli di molecole infiammatorie e down-regolava l'espressione di geni pro-infiammatori coinvolti nell'attivazione del sistema immunitario nei pazienti covid-19 (tra cui la pathway dell'interferone –una pathway importante nella risposta del sistema immunitario alle infezioni– e geni coinvolti nel danno tissutale nei pazienti gravemente malati). Gli inibitori di HDAC riducevano anche significativamente l'espressione del recettore ACE2 –proteina necessaria per l'infezione delle cellule umane da parte del virus SARS-CoV2– che aumentava quando le cellule epiteliali venivano stimulate per simulare l'infezione virale. Infine, gli inibitori di HDAC erano in grado di prevenire l'esaurimento dei linfociti T –una condizione, frequentemente osservata nei pazienti covid-19, in cui i linfociti T sono poco funzionali–, mostrando il loro potenziale nel sostenere la risposta immunitaria all'infezione. HDAC è un enzima che rimuove l'acetilazione, una modificazione chimica che regola l'espressione genica. Inibendo l'attività di

HDAC, gli inibitori accendono e spengono i geni e i processi cellulari che sono regolati dall'acetilazione mediata da HDAC e coinvolti nella risposta delle cellule all'infezione da covid-19. Il fatto che funzionino a concentrazioni clinicamente rilevanti suggerisce l'importanza di studi ulteriori ed un futuro impiego in ambito clinico, per il trattamento dei pazienti covid-19 negli stadi avanzati della malattia, quando l'infiammazione eccessiva determina il decorso della malattia. Il desametasone è attualmente usato per il trattamento dei pazienti gravi, per via della sua azione anti-infiammatoria; l'azione degli inibitori di HDAC down-regola anche il pathway dell'interferone i cui livelli elevati, sebbene benefici nelle fasi precoci della malattia, risultano dannosi negli stadi avanzati, sostenendo un'infiammazione già eccessiva. (PMID 35592335)

Al fine di comprendere la durata e il grado di protezione dall'infezione da SARS-CoV-2 in persone vaccinate o in coloro che sono guariti -argomento ancora ampiamente dibattuto-, abbiamo effettuato uno studio di sorveglianza sul personale IEO, su un periodo di diciassette mesi a partire da Aprile 2020. Nell'ambito di questo studio, il personale IEO (1.493 lavoratori) è stato testato per la presenza di infezione -tramite test molecolare su tampone orofaringeo o saliva- prima e dopo la vaccinazione. In parallelo, tramite un test sierologico sviluppato in istituto, è stata misurata ogni quattro settimane la presenza di anticorpi contro il virus SARS-CoV-2. Prima della vaccinazione, abbiamo osservato una percentuale molto bassa di re-infezioni (3%) nelle persone che erano guarite da COVID-19. Dopo la vaccinazione (con vaccino Pfizer o Astrazeneca), la misurazione degli anticorpi contro SARS-CoV-2 ha mostrato l'elevata efficacia del vaccino: su 2.029 persone vaccinate, solo il 2% presentava livelli molto bassi di anticorpi. I livelli anticorpali si riducevano nel tempo in tutti dopo la vaccinazione, eppure la maggioranza delle persone aveva ancora anticorpi fino a quattro mesi dopo la somministrazione del vaccino. Solo trenta persone si sono infettate nonostante la vaccinazione; tuttavia, tra loro, l'infezione ha avuto una durata più breve (mediana di solo due giorni) e tutti hanno riportato pochi o nessun sintomo. È interessante sottolineare che le persone vaccinate avevano sette volte meno probabilità di infettarsi rispetto a coloro che guarivano da una precedente infezione. Inoltre, livelli anticorpali elevati nel sangue correlavano con una minore frequenza e rilevamento del virus, suggerendo che un'elevata concentrazione di anticorpi era in grado di fermare l'infezione in maniera rapida ed efficace. Pertanto, sebbene i dati siano stati raccolti prima della diffusione delle varianti delta e omicron, lo studio IEO SOS-COV2 ha mostrato che nonostante dopo la vaccinazione sia possibile infettarsi, questo rimane comunque un evento piuttosto raro -ancora più raro che in seguito alla guarigione da una precedente infezione-, più breve e con sintomi generalmente più lievi. (PMID 35100309)

Abbiamo effettuato una meta-analisi che suggerisce che le limitazioni in termini di attività sportiva imposte durante la pandemia abbiano avuto un notevole impatto negativo sulla salute dei giovani atleti, senza tuttavia contribuire a ridurre la diffusione della covid-19.

Abbiamo effettuato uno studio nazionale retrospettivo su 1764 atleti sotto i 25 anni per analizzare il rapporto rischio-benefici della chiusura delle attività sportive durante la pandemia. Abbiamo analizzato l'associazione tra la pratica sportiva durante il periodo di studio e il rischio di infezione da covid-19 negli atleti e nelle loro famiglie oppure con i cambiamenti nell'indice massa corporea e l'aderenza alle linee guida dell'organizzazione mondiale della sanità per l'attività fisica. La percentuale di soggetti con un test positivo per SAR-CoV2 era simile tra coloro che prendevano parte ad attività sportive e coloro che non partecipavano. Restringendo l'analisi ai soggetti che praticavano sport all'interno di un centro sportivo organizzato, il rischio di positività era considerevolmente ridotto per gli atleti che non hanno mai arrestato il loro training. D'altro canto, coloro che avevano interrotto l'attività sportiva mostravano un aumento del 1% dell'indice di massa corporea. L'aderenza alle linee guida dell'organizzazione mondiale della sanità per l'attività fisica era inoltre significativamente più alta per gli atleti che hanno continuato le loro attività sportive. (PMID 35805566)

Abbiamo effettuato una meta-analisi per valutare la trasmissione del virus SARS-CoV2 nelle scuole.

Il contributo delle scuole nella diffusione del virus è ancora ampiamente discusso. Abbiamo quindi effettuato un'analisi sui dati derivanti da 1.088 pubblicazioni, che includevano oltre 120.000 soggetti. Gli studi di contact tracing hanno mostrato che i giovani risultavano significativamente meno associati alla diffusione del virus rispetto agli adulti. Infine, da studi di sieroprevalenza, su un totale di quasi 18.000 soggetti coinvolti, abbiamo stimato una probabilità notevolmente inferiore che i bambini risultassero positivi agli anticorpi contro il virus.

Nell'esercizio 2022, nell'ambito della Ricerca Clinica, sono stati approvati n. 60 studi osservazionali, n. 86 *trials* relativi a studi di fase I, II, III e IV (n. 90 nel 2021). I *trials* in corso risultano n. 721 (n. 699 nel 2021). I pazienti reclutati in *trial* sono stati n. 64.888 (n. 58.274 nel 2021).

Sono stati inoltre pubblicati n. 877 lavori scientifici (n. 962 nel 2021). I punti di *Impact Factor* sono risultati n. 9.362 (n. 8.044 nel 2021).

Attività di formazione

L'Istituto Europeo di Oncologia lavora per realizzare un modello innovativo di sanità e di ricerca avanzata nel campo dell'oncologia. Prevenzione e diagnosi, educazione sanitaria e formazione, ricerca e cura sono integrati in un modello interdisciplinare che mette al centro la persona malata. Per sostenere l'operato dei nostri professionisti, l'Istituto anche nel 2022 ha realizzato progetti di formazione continua attraverso un articolato programma di gestione e sviluppo delle competenze.

L'intensificarsi dei bisogni di cure efficaci e sostenibili e la complessità dello scenario in cui operiamo hanno determinato la necessità di investire sulle persone, attraverso una formazione continua che fornisca gli strumenti per decidere ed agire rapidamente e con efficacia. In tempi di risorse scarse, è stato fondamentale scegliere accuratamente cosa fare e come fare, per questo abbiamo riscontrato molto valida la metodologia del *problem based learning*, lavorare sulla comprensione e la soluzione dei problemi che quotidianamente impattano sulla vita professionale. Il Piano Formativo diviene quindi lo strumento di programmazione per la gestione e la valorizzazione delle risorse umane ed è rivolto a tutte le categorie professionali. Promuove lo sviluppo di ogni persona e si orienta sulle competenze indispensabili per il buon funzionamento dell'Istituto, investe sulle nuove tecnologie e sulle opportunità di scambi clinici, scientifici e assistenziali. Questo al fine di facilitare percorsi di apprendimento interdisciplinari e interprofessionali fortemente sensibili e connessi alla complessità organizzativa e all'umanizzazione delle cure.

In particolare nel 2022, abbiamo continuato a riprogettare la nostra offerta formativa, sfruttando le potenzialità delle tecnologie digitali, per non interrompere i corsi e continuare a essere vicini alle nostre persone.

Abbiamo garantito:

- a) i corsi di formazione sulle soft skills: tra cui *problem solving* strategico, *teamworking*, *decision making*, *time management*, *agile project management*, comunicazione assertiva, intelligenza emotiva, *conflict management*, *people management*, *leadership*, comunicare con il paziente oncologico e i suoi familiari e la gestione dello stress in collaborazione con il nostro team di psicologi e docenti esperti;
- b) percorsi di *coaching* mirati a sviluppare le capacità manageriali per responsabili gestionali di nuova nomina, potenziando le risorse individuali e del team;
- c) attività di Educazione Continua in Medicina, con l'accreditamento delle riunioni multidisciplinari, i journal club, le discussioni di casi clinici, la condivisione dei percorsi assistenziali, tra cui linee guida e percorsi diagnostico-terapeutici in endoscopia digestiva, journal club della divisione nuovi farmaci, staff multidisciplinare di senologia, aggiornamenti per auditor.

d) la formazione sull'area emergenza-urgenza per i professionisti sanitari a contatto con i pazienti, che ha posto particolare attenzione alle manovre da adottare in caso di paziente Covid19, al fine di ridurre il rischio di esposizione al virus, il conseguente contagio e l'ulteriore diffusione;

e) IEO Language Academy in un mondo sempre più internazionale e globalizzato abbiamo deciso di raccogliere la sfida della formazione linguistica e di fornire a tutte le nostre persone uno strumento innovativo per promuovere la conoscenza delle lingue, in coerenza con uno dei valori che guidano il nostro Istituto: lo Spirito Europeo. Con IEO Language Academy, non solo abbiamo la possibilità di migliorare la conoscenza della lingua inglese, ma anche quella di altre otto lingue (spagnolo, tedesco, francese, cinese, russo, olandese, portoghese e italiano per stranieri);

f) abbiamo potenziato la nostra offerta formativa e-learning con lo sviluppo di nuovi corsi clinici e gestionali: ad es. l'identificazione e la gestione dei pazienti a rischio suicidario e autolesionismo, la sedazione procedurale, laser chirurgici, disturbi elettrolitici e cenni di trattamento, gas medicali, telemetria e gestione allarmi, l'utilizzo del nuovo glucometro, il *primary nursing*, ecc.

g) il Training Portal lo strumento digitale che abbiamo realizzato per la rilevazione dei fabbisogni formativi e la generazione dell'offerta formativa;

h) la formazione sulla Cybersecurity e Data Protection un percorso innovativo che risponde all'esigenza di rendere consapevole il personale sui rischi emergenti e sempre più pervasivi in materia di trattamento dei dati e sui comportamenti da adottare per prevenire gli attacchi informatici e dotarsi di processi operativi in linea con gli obblighi normativi, il modello organizzativo e le principali procedure e regolamenti;

i) la formazione su UpToDate l'Istituto si è dotato di questo strumento informatico a supporto delle decisioni cliniche con l'obiettivo di migliorare la qualità della vita ai malati, snellire le tempistiche, ridurre i margini di errore e accelerare la pianificazione dei trattamenti.

Anche nel 2022 l'offerta formativa rivolta al personale si è articolata in 8 aree tematiche: manageriale e comportamentale, clinica, linguistica, informatica, istituzionale, normativa radioprotezione, normativa sicurezza sul lavoro e emergenza-urgenza.

Abbiamo organizzato 89 corsi, in modalità training on the job, e-learning e aula, di cui 62 accreditati ECM.

In particolare, si evidenziano i 25 percorsi di formazione manageriale e comportamentale.

Per promuovere la cultura della sicurezza e della salute nei luoghi di lavoro e adempiere agli obblighi normativi, abbiamo realizzato 61 azioni formative, tra cui la formazione aggiuntiva preposti, la corretta

movimentazione dei pazienti e rischi correlati alla professione e corsi online riferiti all'Accordo Stato-Regioni D.lgs. 81/08 e alle emergenze, ai gas medicali e ai laser chirurgici.

Il portale per la formazione e-Learning dell'Istituto completa l'offerta formativa con una serie di corsi online, riunendo qualità dei contenuti e metodologia didattica innovativa. Un ambiente virtuale di qualità e di facile navigazione che caratterizza la nuova proposta formativa FAD dell'Istituto e permette al personale di aggiornare le conoscenze ottimizzando il proprio tempo. Il catalogo dei corsi online spazia dall'area chirurgica, all'area clinica, a quella gestionale ed è costantemente arricchito con nuove tematiche, aprendosi al settore infermieristico e al mondo della chirurgia. I corsi e-learning IEO sono realizzati con i contenuti che i professionisti dell'Istituto hanno sviluppato negli anni, denotando una propensione continua verso l'innovazione e la sperimentazione, frutto di un costante confronto con le migliori pratiche dei più prestigiosi contesti scientifici nazionali e internazionali.

Nel 2022 l'Istituto ha continuato a sostenere le partecipazioni del personale ad iniziative scientifiche nazionali e internazionali per un totale di 792 richieste gestite, come relatori e partecipanti a congressi, advisory board, seminari e corsi fuori sede. Quest'attività è ritenuta fondamentale per stabilire scambi di esperienze e promuovere nuove collaborazioni in modo da offrire ai pazienti soluzioni diagnostiche e terapeutiche all'avanguardia.

L'obiettivo del 2022 è stato quello di realizzare programmi di formazione continua che ponessero al centro la persona con tutti i suoi bisogni, utilizzando metodologie innovative di apprendimento al fine di rafforzare e sviluppare le competenze. In tale ottica, abbiamo accompagnato il cambiamento che la pandemia ha imposto, con queste azioni:

- orientare maggiormente la formazione su competenze relazionali e comportamentali, per aiutare i nostri collaboratori ad avere capacità di assorbimento, adattamento e trasformazione della crisi
- motivare le nostre persone disorientate dalla durata e dall'ampiezza dello shock a trovare nuove risorse interiori e a riorganizzare le attività, identificando migliori processi e priorità
- potenziare lo scambio e il confronto quotidiano tra i diversi ruoli professionali per contribuire a un cambio di mentalità e creare team resilienti e capaci di gestire la crisi.

Lo sforzo richiesto è quello di offrire una proposta formativa nel segno dell'affidabilità, dell'innovazione e della sostenibilità a tutti i nostri collaboratori, chiamati a far fronte al lavoro, con rinnovato impegno e motivazione.

IEO Education, con la supervisione della Direzione Scientifica, ha progettato e realizzato tra gli altri:

1. 7° Corso intensivo trattamento fisico dell'edema linfovenoso, marzo e maggio 2022
2. Simposi di Chirurgia Generale, 11 aprile, 23 maggio e 13 giugno 2022
3. IV Corso Mugo, 27 e 28 maggio 2022
4. Breast Cancer: Oncologic and Reconstructive Surgery, 27 e 28 ottobre 2022
5. Esagon Course on Ovarian Cancer Surgery and More, marzo e ottobre 2022

Nel 2022 ha realizzato: n. 22 eventi di cui 8 accreditati ECM. Il totale delle ore di formazione erogate è stato n. 350 e il numero complessivo dei medici di medicina generale, specialisti e altri operatori sanitari che hanno partecipato agli eventi è stato n. 849, di cui n. 208 con crediti con un indice medio di soddisfazione degli eventi del 92,1 %.

Il totale complessivo dei crediti ECM erogati ai partecipanti è stato di n. 2.630,9. Sono stati assegnati crediti a tutor e docenti per un totale complessivo di 95 crediti.

Relazione su ambiente e sicurezza

L'Istituto Europeo di Oncologia non produce danni ambientali per effetto della sua attività sulla base delle seguenti evidenze:

- non vengono rilasciati direttamente o indirettamente nell'ambiente rifiuti solidi o liquidi di alcun genere, sia che si tratti di rifiuti pericolosi che di rifiuti non pericolosi. I rifiuti vengono raccolti in modo differenziato nei reparti e nei servizi ove vengono prodotti e sono prelevati da aziende specializzate e autorizzate per la loro gestione (recupero o smaltimento a seconda delle tipologie di rifiuto), in conformità alle vigenti leggi. Per la complessità del processo, dal 2011 la Direzione Sanitaria ha implementato un Sistema di Gestione della Qualità (dal 2018 certificato in accordo con la Norma ISO 9001:2015) che fornisca garanzia che il processo di gestione dei rifiuti sanitari sia conforme ai requisiti di sicurezza e sorveglianza guidati da un comportamento etico;
- non vengono rilasciati nell'ambiente rifiuti solidi o liquidi radioattivi. I rifiuti radioattivi a breve tempo di dimezzamento vengono raccolti in apposite aree controllate e smaltiti soltanto una volta accertata l'assenza di radioattività al di sopra dei limiti stabiliti dalla legge. I rifiuti radioattivi a più lungo tempo di decadimento sono smaltiti tramite azienda autorizzata. Il processo avviene sotto il controllo della Fisica Sanitaria e dell'Esperto di Radioprotezione;

- nei laboratori dell'Istituto i reflui potenzialmente pericolosi vengono raccolti separatamente in appositi contenitori e smaltiti come rifiuti speciali, in accordo con le prescrizioni interne e le vigenti normative in materia;
- dalle attività cliniche, di ricerca e di produzione farmaci chemioterapici non vengono emesse in atmosfera sostanze pericolose per l'ambiente o per la salute e sicurezza degli esseri viventi;
- sui fumi della centrale termica vengono praticati, con la dovuta periodicità, i controlli previsti dalle leggi in vigore.

Nel corso del 2022 non sono state segnalate all'Istituto non-conformità o infrazioni alle leggi da parte degli organi delegati alla sorveglianza ambientale.

Con riferimento alla bonifica avviata nel 2020 sui terreni acquisiti in Via Ripamonti 406-426, sono proseguite le attività concordate con gli Enti competenti. In particolare:

AREA EX RATTI:

Nel corso dell'esercizio sono stati mantenuti attivi in modo continuativo sia l'impianto di Soil Vapor Extraction (SVE) predisposto nel 2021 sia quello di P&T, in funzione dall'agosto 2020.

I due impianti costituiscono il sistema di Messa in Sicurezza d'Emergenza (Mise) dell'area.

Per quanto concerne l'iter amministrativo:

- nel mese di agosto 2022 IEO ha trasmesso agli Enti Competenti apposito documento contenente i "Risultati della Caratterizzazione";
- nel mese di dicembre 2022 Arpa ha trasmesso l'esito (nota tecnica e referti analitici) delle attività di caratterizzazione effettuate in contraddittorio a settembre 2021, sia sulla matrice suolo insaturo, sia sulla matrice acque sotterranee;
- per i primi mesi del 2023 sono attese, sempre da Arpa, la ricostruzione dell'assetto idrochimico a monte del sito "ex Ratti", nonché la conclusione del procedimento di indagine da parte di Città Metropolitana ai sensi degli artt. 244 e 245 c. 2 del d.lgs 152/06.

Sempre in conformità all'iter di procedura ordinaria di bonifica ai sensi del D.Lgs. 152/2006, a valle dell'autorizzazione del Piano di Caratterizzazione (luglio 2021) nel corso del primo semestre del 2023 saranno presentati l'Analisi di Rischio e infine il Progetto di Bonifica.

AREE EX MASCHERPA e EX GOBBI (Park 4)

Con riferimento alla potenziale contaminazione dei terreni di riporto, è stato redatto il progetto di bonifica mediante procedura semplificata ai sensi dell'art. 242-bis del D.Lgs. 152/2006. Tale progetto potrà essere formalizzato solo a valle del conseguimento dei necessari Titoli autorizzativi (Autorizzazione Paesaggistica da parte del Parco Agricolo Sud Milano e SCIA di demolizione) ai fini della demolizione delle preesistenze (tettoie e alberature), demolizioni necessarie per poter intervenire sui terreni.

La richiesta di Autorizzazione Paesaggistica sopra menzionata è stata protocollata c/o Parco Agricolo Sud nel mese di dicembre 2022. È pertanto ipotizzabile che il Progetto di Bonifica possa essere formalizzato entro il primo semestre 2023.

Tutte le fasi degli interventi previsti, nei procedimenti sopra descritti, saranno eseguite in accordo con gli Enti Competenti e nel rispetto delle procedure previste dall'art. 242 (Titolo V della parte IV) del D.Lgs. 152/06.

Protezione dei dati personali

L'Istituto in ottemperanza alla normativa vigente in materia di protezione dati personali (regolamento UE 2016/679 e D.lgs. 196/03 integrato dal D.lgs. 101/2018) si è dotato di uno specifico modello organizzativo che prevede la presenza di un "Comitato Data Protection", un "Data Protection Officer" e un Responsabile Sicurezza dei Sistemi Informativi

Di seguito le principali attività svolte nell'ultimo esercizio:

- ✓ Potenziamento della sicurezza dell'infrastruttura tecnologica IT per far fronte alle nuove minacce sulla cyber security;
- ✓ Potenziamento delle attività di formazione con focus specifico anche sulla cyber security;
- ✓ Miglioramento sinergie con ufficio acquisti per monitoraggio contratti con fornitori di servizi al fine di eventuali nomine quali Responsabili trattamento dati personali se la loro attività prevede utilizzo di dati personali di pazienti o di professionisti;
- ✓ Miglioramento della valutazione dei progetti di ricerca retrospettivi anche sotto il profilo dei rischi in ambito data protection nell'ambito dell'iter standardizzato per i progetti di ricerca dell'Istituto, che consente di bilanciare le esigenze dello sviluppo delle conoscenze in ambito scientifico con la tutela dei diritti dei cittadini. Il sistema di garanzie predisposto da IEO prevede

un Patto di Partecipazione alla Ricerca Scientifica, un Regolamento che disciplina l'utilizzo di dati e campioni per la ricerca, un Registro Trattamenti con annessa Valutazione dei Rischi per ogni progetto retrospettivo. E' previsto il potenziamento del sistema con la creazione di una board di direzione specificatamente dedicato alla valutazione dei progetti con particolare attenzione ai rischi data protection ed ai suoi risvolti morali, nonché la creazione di una sezione del sito dedicata alla trasparenza per informare e rendicontare gli interessati sull'utilizzo dei dati e dei campioni biologici.

Tutte le attività svolte sono tracciabili e documentabili.

Sedi secondarie

L'Istituto, che ha sede legale in Via Filodrammatici n. 10 a Milano, opera nelle sedi di Milano di Via Ripamonti n. 435 dove si trova la struttura ospedaliera, di Via San Luca n. 10 dove è ubicato il poliambulatorio IEO Centro, di Via Serio (sede del Campus IFOM-IEO), di via Ripamonti, 426 sede di IEOOffice, di Via Lampedusa 13 sede del corso di laurea in infermieristica, di Opera sede del corso di laurea dei Tecnici di radiologia.

Rischi ed incertezze

Per il particolare settore in cui opera, a maggior ragione nell'attuale momento di crisi economica e finanziaria, la Vostra Società è soggetta ai seguenti rischi:

Rischi connessi alla normativa di riferimento ed alla dipendenza dal settore pubblico

La Società opera in un settore ampiamente regolato da norme impositive in termini di volumi di ricavi assoggettati a rimborsi da parte del SSN, che comportano conseguenti rischi in termini di redditività operativa. Ciò comporta che le possibilità di mantenimento e crescita delle attività e della redditività delle stesse sono fortemente condizionate dagli impianti normativi imposti dagli enti regolatori. Va sottolineato, in ultimo, che i cambiamenti delle regole di attività e finanziamento degli erogatori, di possibile introduzione da parte di Regione Lombardia nell'imminenza dei nuovi esercizi, possono comportare rettifiche anche in difetto delle tariffe prestazionali riconosciute, con effetti di scostamento del fatturato di produzione verso il *budget* assegnato.

Rischi connessi alla dipendenza dal settore pubblico

Tale settore rappresenta oltre il 59,5% del fatturato clinico dell'Istituto. Un'eventuale riduzione della capacità di spesa da parte della Pubblica Amministrazione potrebbe quindi incidere negativamente sulle possibilità di crescita e sui risultati economico finanziari dell'Istituto.

A ciò si aggiunga che il momento di grave crisi economica e finanziaria rende possibile un ulteriore allungamento dei termini di pagamento da parte degli enti pubblici.

Rischio credito

Il rischio di concentrazione di crediti con caratteristiche di criticità è moderato e monitorato, con riferimento alla categoria di beni/servizi, per cliente/importo. Sulla base di quanto avvenuto in passato, il rischio è per altro più sull'allungamento dei tempi di pagamento in particolare da parte degli istituti assicurativi che non sul rischio di insolvenza, che pare mantenersi ancora limitato.

Rischio liquidità

La Società presenta attualmente una struttura finanziaria che non evidenzia rischi di crisi di liquidità, avendo una posizione attiva di liquidità nei confronti del sistema creditizio, oltre ad affidamenti non utilizzati. La liquidità viene investita con caratteristiche di rischio e di oscillazioni molto contenute, facilmente smobilizzabili e con controparti istituzionali primarie.

Rischio di cambio e rischio di tasso di interesse

La Società non è soggetta al rischio di mercato derivante dalla fluttuazione dei cambi delle valute perché opera in un contesto nazionale in cui le transazioni sono condotte in euro.

Rischio connesso alla fornitura di beni

I rischi di prezzo e di fornitura connessi ai materiali di consumo ed alle attrezzature varie e specifiche vengono monitorati per il tramite di adeguate *policies* interne che ne regolano gli acquisti.

Rischi legali

Nonostante il rispetto della normativa di riferimento, l'Istituto potrebbe essere esposto al rischio di richieste risarcitorie a seguito di danni causati su propri pazienti. Per far fronte a tali responsabilità l'Istituto ha in essere coperture assicurative il cui massimale è ritenuto adeguato e costantemente monitorato.

Rischi di *compliance*

Con riferimento in particolare al D.L. 219/2006 ed al D.L. 231/2001, la Società si è dotata di un Codice Etico, di un Modello Organizzativo e di un insieme di *policies* e procedure, su cui è erogata continua formazione mirata a garantire l'aggiornamento sulla tematica in oggetto di tutti i collaboratori interessati e di cui è verificata costantemente la corretta applicazione.

Posizione Fiscale

Alla data di redazione del presente documento non sono stati notificati accertamenti di natura fiscale.

Al 31.12.2021 risultano prescritti, ai fini dell'azione accertatrice degli uffici finanziari, gli esercizi fino al 2015 per le imposte dirette e per l'IVA, fatte salve le disposizioni di cui all'art. 43, comma 3, del D.P.R. n. 600 del 1973 e all'art. 57, comma 3, del D.P.R. n. 633 del 1972. Segnaliamo che il termine di decadenza per gli atti di accertamento relativi al periodo di imposta 2016, naturalmente in scadenza per il 31.12.2022, deve intendersi differito di 85 giorni in conseguenza della sospensione dettata dall'art. 67, D.L. n. 18/2000. Il nuovo termine di decadenza risulta essere, pertanto, il 26 marzo 2023.

Nel febbraio del 2013 l'Istituto ha presentato istanza di interpello all'Agenzia delle Entrate per la richiesta di dimezzamento dell'aliquota IRES; nel giugno dello stesso anno l'Agenzia ha previsto la possibilità di usufruire della riduzione IRES limitatamente all'imponibile fiscale generato dalle prestazioni di ricovero e ambulatoriali rese in regime di convenzionamento e dall'attività di ricerca scientifica traslazionale. Nel giugno del 2014 è stata presentata una nuova istanza di interpello, con la quale l'Istituto ha proposto all'Agenzia un criterio oggettivo per la determinazione di tali imponibili; nell'ottobre 2014 l'Agenzia ha confermato il metodo di ripartizione forfettaria dell'imponibile basato sulla composizione percentuale del fatturato riferibile all'attività agevolata (attività sanitaria convenzionata e ricerca scientifica traslazionale) rispetto al totale dello stesso.

Quote proprie

Al 31.12.2022 la Società non possedeva quote proprie, né ha proceduto ad acquisti o ad alienazioni nel corso dell'esercizio.

Rapporti con le società del Gruppo

Al 31.12.2022 i rapporti con la controllata Centro Cardiologico Monzino S.p.A. (società per la quale l'Istituto Europeo di Oncologia esercita attività di direzione e coordinamento), sono relativi prevalentemente a prestazioni di servizi amministrativi e clinici, come illustrato in Nota Integrativa e sono regolati a condizioni di mercato.

Di seguito si forniscono le informazioni relative alle poste infragruppo, in migliaia di Euro:

	Verso controllate
Debiti per operazioni di Cash Pooling	12.501
Debiti per servizi infragruppo	136
Crediti per servizi intragruppo	142
Costi per prestazioni cliniche	79
Costi per servizi intragruppo	146
Costi per interessi passivi sul Cash Pooling	50
Ricavi per prestazioni cliniche	154
Ricavi per prestazioni di servizi	1.440

Fatti di rilievo intervenuti dopo la chiusura dell'esercizio

L'attività clinica è ripresa in modo significativo da inizio anno, in ambito sia regionale sia extraregionale, con tutte le premesse per positivi risultati durante il 2023.

Il costo di energia e gas, dopo il rilevantisimo incremento fino all'estate 2022, ha continuato una lenta discesa nel 1° trimestre 2023 e vari operatori forniscono previsioni di una certa stabilità delle quotazioni nei prossimi trimestri del 2023. Molti produttori di energia ad oggi preferiscono non prendere rischi sulle quotazioni e offrono soprattutto prezzi variabili a 1-2 anni

L'Istituto ha un contratto per la fornitura di energia e gas a prezzi fissati nel 2021 per tutto il 2022 e parte del 2023 e sta svolgendo una gara su tale forniture per il periodo dopo la scadenza delle coperture, raccogliendo proposte da vari operatori. Sono comunque state progettate ed in parte già attivate misure di contenimento dei consumi.

Evoluzione prevedibile della gestione

Continuerà l'impegno dell'Istituto nel perseguimento dell'eccellenza nell'area Clinica, della Ricerca, della Formazione, nell'attenzione verso la centralità del paziente e tutto ciò in un contesto economico incerto e normativo imprevedibile.

Sarà mantenuta la massima attenzione all'avanzamento dei significativi progetti immobiliari ed operativi in corso, compatibilmente con i tempi delle necessarie autorizzazioni.

L'Istituto metterà in atto ogni azione al fine di raggiungere una maggiore efficienza del sistema e ciò sia con una continua attenzione al controllo dei costi ed alla generazione di liquidità, sia con nuovi investimenti in professionisti e mezzi tecnici capaci di ampliare in senso qualitativo e quantitativo, l'offerta complessiva dell'Istituto.



Il Bilancio è stato redatto sulla base del presupposto della continuità dell'attività sociale.



Signori, nel raccomandarVi l'approvazione del seguente bilancio, che presenta un utile di esercizio pari ad € 3.591.678 Vi proponiamo di destinare l'utile, come previsto dall'art. 26 dello statuto, alla riserva legale per € 359.168 ed al Fondo ricerca e sviluppo per € 3.232.510.

In conclusione, desideriamo altresì manifestare a tutto il personale dell'Istituto il nostro più vivo ringraziamento per l'impegno e la competenza ancora una volta dimostrati nell'espletamento dei propri incarichi e per l'attenzione e l'umanità rivolte nei confronti dei nostri pazienti.

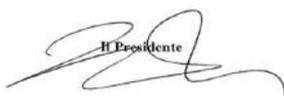
p. il Consiglio di Amministrazione

Il Presidente

Stato patrimoniale

Pag. 1/5

	31.12.2022	31.12.2021
	€	€
A) Crediti verso soci per versamenti ancora dovuti	0	0
B) Immobilizzazioni		
<i>I Immateriali</i>		
3 Diritti brevetto industriale e diritti utilizzazione delle opere dell'ingegno	0	0
4 Concessioni, licenze, marchi e diritti simili	3.430.359	2.512.257
6 Immobilizzazioni in corso e acconti	659.926	658.842
7 Altre	382.553	611.490
<i>Totale immobilizzazioni immateriali</i>	4.472.838	3.782.589
<i>II Materiali</i>		
1 Terreni e fabbricati	23.550.420	24.259.898
2 Impianti e macchinario	10.088.227	9.312.984
3 Attrezzature industriali e commerciali	24.378.807	24.513.247
4 Altri beni	4.244.270	3.855.761
5 Immobilizzazioni in corso e acconti	36.493.500	20.732.460
<i>Totale immobilizzazioni materiali</i>	98.755.224	82.674.350
<i>III Finanziarie</i>		
1 Partecipazioni in:		
a) Imprese controllate	59.077.671	58.068.067
b) Imprese collegate	0	0
c) Imprese controllanti	0	0
d-bis) Altre imprese	678.762	684.728
Totale partecipazioni	59.756.433	58.752.795
2 Crediti		
d-bis) Verso Altri	1.064.182	1.016.913
Totale crediti	1.064.182	1.016.913
3 Altri titoli		
Totale altri titoli	0	0
<i>Totale immobilizzazioni finanziarie</i>	60.820.615	59.769.708
Totale immobilizzazioni	164.048.677	146.226.647



Il Presidente

Stato patrimoniale

Pag. 2/5

ATTIVO (seguito)		31.12.2022	31.12.2021
		€	€
C) Attivo circolante			
<i>I Rimanenze</i>			
1	Materie prime, sussidiarie e di consumo	8.579.120	8.410.815
<i>Totale rimanenze</i>		8.579.120	8.410.815
<i>I bis</i>	Beni destinati alla vendita	779.700	60.000
<i>II Crediti</i>			
1	Verso clienti	38.140.668	48.051.989
2	Verso imprese controllate	142.106	167.250
3	Verso imprese collegate	0	0
4	Verso controllanti	0	0
5-bis	Crediti tributari	2.045.956	1.492.737
5-ter	Imposte anticipate	2.478.515	2.794.441
5-quater	Verso altri	979.299	1.542.177
5-quater	Verso altri (oltre l'esercizio)	9.164.181	
<i>Totale crediti</i>		52.950.725	54.048.594
<i>III Attività finanziarie che non costituiscono immobilizzazioni</i>			
6	Altri titoli	0	0
<i>Totale attività finanziarie che non costituiscono immobilizzazioni</i>		0	0
<i>IV Disponibilità liquide</i>			
1	Depositi bancari e postali	55.632.349	46.314.110
3	Denaro e valori di cassa	108.111	151.215
<i>Totale disponibilità liquide</i>		55.740.460	46.465.325
Totale attivo circolante		118.050.005	108.984.734
D) Ratei e risconti			
	Ratei attivi	2.774.216	2.493.178
	Risconti attivi	1.584.027	1.678.572
Totale Ratei e risconti		4.358.243	4.171.750
TOTALE ATTIVO		286.456.925	259.383.131



Il Presidente

Stato patrimoniale

Pag. 3/5

PASSIVO		31.12.2022	31.12.2021
		€	€
A) Patrimonio netto			
I	Capitale	80.579.007	80.579.007
IV	Riserva legale	7.709.624	7.489.374
V	Riserve statutarie: Fondo ricerca e sviluppo	48.196.102	46.213.850
IX	Utile (perdita) dell'esercizio	3.591.678	2.202.502
Totale patrimonio netto		140.076.411	136.484.733
B) Fondi per rischi e oneri			
2	Per imposte differite	524.586	529.989
4	Altri	9.279.170	9.115.914
Totale fondi per rischi e oneri		9.803.756	9.645.903
C) Trattamento fine rapporto di lavoro subordinato		5.370.939	5.232.975
D) Debiti			
7	Debiti verso fornitori	60.372.506	49.587.060
9	Debiti verso imprese controllate	12.637.220	12.611.489
10	Debiti verso imprese collegate	0	0
11	Debiti verso controllanti	0	0
12	Debiti tributari	3.929.381	4.037.351
13	Debiti verso istituti di previdenza e di sicurezza sociale	5.001.725	4.435.657
14	Altri debiti	19.229.502	16.376.681
Totale debiti		101.170.334	87.048.238
E) Ratei e risconti			
	Ratei passivi	45.792	60.000
	Risconti passivi	29.989.693	20.911.282
Totale ratei e risconti		30.035.485	20.971.282
TOTALE PASSIVO		286.456.925	259.383.131



Il Presidente

Conto economico

Pag. 4/5

	31.12.2022	31.12.2021
	€	€
A) Valore della produzione		
1 Ricavi delle vendite e delle prestazioni	216.783.979	207.867.986
5 Altri ricavi e proventi:		
- Contributi per programmi di ricerca	26.857.487	27.123.570
- Proventi diversi	20.840.426	23.382.284
	47.697.913	50.505.854
Totale valore della produzione	264.481.892	258.373.840
B) Costi della produzione		
6 Per materie prime, sussidiarie, di consumo e merci	63.091.327	62.340.716
7 Per servizi	58.881.287	59.498.507
8 Per godimento di beni di terzi	6.750.189	6.741.309
9 Per il personale		
a) salari e stipendi	75.439.096	71.815.966
b) oneri sociali	15.969.688	15.725.293
c) trattamento di fine rapporto	4.226.055	3.810.992
e) altri costi	147.394	41.746
	95.782.233	91.393.997
10 Ammortamenti e svalutazioni		
a) ammortamento delle immobilizzazioni immateriali	1.736.567	1.506.699
b) ammortamento delle immobilizzazioni materiali	10.237.221	9.786.182
d) svalutazione dei crediti compresi nell'attivo circolante e delle disponibilità liquide	1.224.729	1.373.203
	13.198.517	12.666.084
11 Variazioni delle rimanenze di materie prime, sussidiarie, di consumo e merci + (-)	(168.305)	569.491
12 Accantonamenti per rischi	4.977.890	4.877.866
13 Altri accantonamenti	0	0
14 Oneri diversi di gestione	17.647.565	17.453.314
Totale costi della produzione	260.160.703	255.541.284
Differenza tra valore e costi della produzione (A-B)	4.321.189	2.832.556



Il Presidente

Conto economico	Pag. 5/5	
	31.12.2022	31.12.2021
	€	€
C) Proventi e oneri finanziari		
15 Proventi da partecipazioni		
- dividendi ed altri da imprese controllate	0	0
- dividendi ed altri da altre imprese	0	167.007
	0	167.007
16 Altri proventi finanziari		
b) da titoli iscritti nelle immobilizzazioni che non costituiscono partecipazioni	0	0
c) da titoli iscritti nell'attivo circolante che non costituiscono partecipazioni	0	0
d) proventi diversi dai precedenti		
- interessi e commissioni da altri e proventi vari	33.138	28.220
	33.138	28.220
17 Interessi ed altri oneri finanziari		
- imprese controllate	50.045	52.727
- altri	114.313	124.745
	164.358	177.472
17bis) Utili e (perdite) sui cambi	34.552	(17.798)
Totale proventi e oneri finanziari + (-)	(96.668)	(43)
D) Rettifiche di valore di attività e passività finanziarie		
18 Rivalutazioni		
a) di partecipazioni	1.009.604	650.947
	1.009.604	650.947
19 Svalutazioni		
a) di partecipazioni	5.966	0
c) di titoli iscritti nell'attivo circolante che non costituiscono partecipazioni	0	0
	5.966	0
Totale delle rettifiche + (-)	1.003.638	650.947
Risultato prima delle imposte + (-)	5.228.159	3.483.460
20 Imposte sul reddito dell'esercizio, correnti, differite e anticipate		
- Imposte correnti	1.325.958	966.590
- Imposte differite, anticipate	310.523	314.368
Totale imposte sul reddito es., correnti, differite, anticipate	1.636.481	1.280.958
21 Utile (perdita) dell'esercizio	3.591.678	2.202.502


Il Presidente

Rendiconto Finanziario	2022	2021
FLUSSI FINANZIARI DERIVANTI DALLA GESTIONE		
A. REDDITUALE		
(metodo indiretto)		
Utile (perdita) dell'esercizio	3.591.678	2.202.502
Imposte sul reddito	1.636.481	1.280.958
Interessi passivi/(interessi attivi)	96.668	43
(Dividendi)	0	0
Insussistenze derivanti dalla cessione di attività	0	0
1. Utile (perdita) dell'esercizio prima d'imposte sul reddito, interessi, dividendi e plus/minusvalenze da cessione	5.324.827	3.483.503
Rettifiche per elementi non monetari che non hanno avuto contropartita nel capitale circolante netto		
Accantonamenti ai fondi	10.428.674	10.062.061
(Ripristini)/perdite di valore delle immobilizzazioni	(1.009.604)	(650.947)
Ammortamenti delle immobilizzazioni	11.973.788	11.292.881
Svalutazioni per perdite durevoli di valore	5.966	0
2. Flusso finanziario prima delle variazioni del ccn	21.398.824	20.703.995
Variazioni del capitale circolante netto		
Decremento/(incremento) delle rimanenze	(168.305)	569.491
Decremento/(incremento) dei crediti verso clienti	9.936.465	(15.119.153)
Incremento/(decremento) dei debiti verso fornitori	10.811.231	7.702.919
Decremento/(incremento) ratei e risconti attivi	(186.493)	(153.702)
Incremento/(decremento) ratei e risconti passivi	9.064.203	(545.504)
Altre variazioni del capitale circolante netto	(7.931.126)	2.546.193
3. Flusso finanziario dopo le variazioni del ccn	21.525.975	(4.999.756)
Altre rettifiche		
Interessi incassati/(pagati)	(96.668)	(43)
(Imposte sul reddito pagate)	0	0
Dividendi incassati	0	0
Utilizzo dei fondi	(10.132.857)	(8.707.887)
4. Flusso finanziario dopo le altre rettifiche	(10.229.525)	(8.707.930)
Flusso finanziario della gestione reddituale (A)	38.020.101	10.479.812

Rendiconto Finanziario	2021	2020
FLUSSI FINANZIARI DERIVANTI DALL'ATTIVITÀ		
B. D'INVESTIMENTO		
Immobilizzazioni materiali	(26.318.095)	(12.426.118)
(Investimenti)	(26.318.095)	(12.426.118)
Prezzo di realizzo disinvestimenti	0	0
Immobilizzazioni immateriali	(2.426.817)	(1.561.294)
(Investimenti)	(2.426.817)	(1.561.294)
Prezzo di realizzo disinvestimenti	0	0
Immobilizzazioni finanziarie	0	0
(Investimenti)	0	0
Prezzo di realizzo disinvestimenti	0	0
Attività finanziarie non immobilizzate	0	0
(Investimenti)	0	0
Disinvestimenti	0	0
Flusso finanziario dell'attività di investimento (B)	(28.744.912)	(13.987.412)
FLUSSI FINANZIARI DERIVANTI DALL'ATTIVITÀ DI		
C. FINANZIAMENTO		
Mezzi propri	0	0
Cash pooling – controllata	(54)	(1.319.824)
Dividendi (e acconti su dividendi) pagati		
Flusso finanziario dell'attività di finanziamento (C)	(54)	(1.319.824)
Incremento (decremento) delle disponibilità liquide (a ± b ± c)	9.275.135	(2.430.710)
Disponibilità liquide al 1 gennaio	46.465.325	51.292.749
Depositi bancari e postali	46.314.110	51.208.262
Denaro e valori di cassa	151.215	84.487
Disponibilità liquide al 31 dicembre	55.740.460	46.465.325
Depositi bancari e postali	55.632.349	46.314.110
Denaro e valori di cassa	108.111	151.215



Il Presidente

Istituto Europeo di Oncologia S.r.l.

Sede Legale in Milano – Via Filodrammatici, n. 10

Capitale Sociale Euro 80.579.007 i.v.

Registro delle Imprese di Milano n. 08691440153

Codice Fiscale e Partita IVA n. 08691440153

NOTA INTEGRATIVA

Il bilancio di esercizio al 31 dicembre 2022 è stato redatto in conformità alla normativa del Codice Civile, interpretata ed integrata dai principi e criteri contabili elaborati dall'Organismo Italiano di Contabilità (O.I.C.) ed infine, ove mancanti e in quanto non in contrasto con le norme e i principi contabili italiani, da quelli emanati dall'*International Accounting Standard Board* (I.A.S.B.).

Il bilancio è stato predisposto nel presupposto della continuità aziendale, non sussistendo incertezze significative a riguardo.

Il bilancio d'esercizio è costituito dallo Stato Patrimoniale, dal Conto Economico, dal Rendiconto Finanziario (redatti in conformità agli schemi rispettivamente di cui agli artt. 2424, 2424 bis c.c., agli artt. 2425 e 2425 bis c.c. e all'art. 2425 ter del Codice Civile) e dalla presente Nota Integrativa.

La Nota Integrativa ha la funzione di fornire l'illustrazione, l'analisi ed in taluni casi un'integrazione dei dati di bilancio e contiene le informazioni richieste dagli artt. 2427 e 2427 bis del Codice Civile, da altre disposizioni del Codice Civile in materia di bilancio e da altre leggi precedenti. Inoltre, in essa sono fornite tutte le informazioni complementari ritenute necessarie a dare la rappresentazione più trasparente e completa, anche se non richieste da specifiche disposizioni di legge.

Gli importi sono espressi in unità di Euro, salvo diversa indicazione.

Fatti di rilievo intervenuti dopo la chiusura dell'esercizio

L'attività clinica è ripresa in modo significativo da inizio anno, in ambito sia regionale sia extraregionale, con tutte le premesse per positivi risultati durante il 2023.

Il costo di energia e gas, dopo il relevantissimo incremento fino all'estate 2022, ha continuato una lenta discesa nel 1° trimestre 2023 e vari operatori forniscono previsioni di una certa stabilità delle quotazioni nei prossimi trimestri del 2023. Molti produttori di energia ad oggi preferiscono non prendere rischi sulle quotazioni e offrono soprattutto prezzi variabili a 1-2 anni

L'Istituto ha un contratto per la fornitura di energia e gas a prezzi fissati nel 2021 per tutto il 2022 e parte del 2023 e sta svolgendo una gara su tali forniture per il periodo dopo la scadenza delle coperture, raccogliendo proposte da vari operatori. Sono comunque state progettate ed in parte già attivate misure di contenimento dei consumi.

PRINCIPI CONTABILI E CRITERI DI VALUTAZIONE

I principi contabili di seguito riportati sono stati adeguati con le modifiche, integrazioni e novità introdotte alle norme del Codice Civile dal D.lgs. 139/2015, che ha recepito in Italia la Direttiva contabile 34/2013/UE. In particolare, i principi contabili nazionali sono stati riformulati dall'OIC nella versione emessa il 22 dicembre 2016.

Inoltre, in data 29 dicembre 2017, l'Organismo Italiano di Contabilità ha emanato ulteriori emendamenti ai principi sulla composizione e schemi del bilancio d'esercizio, imposte sul reddito, rimanenze, immobilizzazioni materiali, immobilizzazioni immateriali, bilancio consolidato e metodo del patrimonio netto, debiti, partecipazioni, cambiamenti di principi contabili, cambiamenti di stime contabili, correzione di errori, fatti intervenuti dopo la data di chiusura dell'esercizio, e strumenti finanziari derivati.

Segnaliamo infine che, a decorrere dall'esercizio chiuso al 31 dicembre 2018 la Società ha provveduto a capitalizzare la quota parte di costo relativa all'IVA indetraibile sull'acquisto delle immobilizzazioni materiali ed immateriali nei limiti del corrispondente valore di mercato o del valore recuperabile tramite l'uso.

Immobilizzazioni immateriali

Sono iscritte al costo di acquisto o di produzione, inclusivo di IVA per la parte indetraibile che rimane a carico dell'Istituto, degli oneri accessori e dei costi direttamente imputabili al prodotto ed ammortizzate sistematicamente in ogni esercizio a quote costanti, in relazione con la loro residua possibilità di utilizzazione. Le immobilizzazioni immateriali sono iscritte con il consenso del Collegio Sindacale nei casi previsti dalla legge.

I costi di pubblicità e di ricerca sono interamente imputati a costo di periodo nell'esercizio in cui sono sostenuti.

Le migliorie su beni di terzi sono capitalizzate ed iscritte tra le "altre immobilizzazioni immateriali" se non sono separabili dai beni stessi (altrimenti sono iscritte tra le "immobilizzazioni materiali" nella specifica voce di appartenenza) e sono ammortizzate in modo sistematico al minore tra il periodo di prevista utilità futura e quello residuo della locazione, tenuto conto dell'eventuale periodo di rinnovo, se dipendente dalla Società.

Nel caso in cui, indipendentemente dall'ammortamento già contabilizzato, risulti una perdita durevole di valore, l'immobilizzazione viene corrispondentemente svalutata; se in esercizi successivi vengono meno i motivi che avevano giustificato la svalutazione, viene ripristinato il valore originario, nei limiti del valore che l'attività avrebbe avuto ove la rettifica di valore non avesse mai avuto luogo, eccezion fatta per la voce "Avviamento" ed "Oneri pluriennali" di cui al numero 5 dell'art. 2426 del Codice Civile.

Immobilizzazioni materiali

Sono iscritte al costo di acquisto o di costruzione interna, al netto degli ammortamenti effettuati nell'esercizio e nei precedenti. Nel costo sono compresi gli oneri accessori e i costi diretti e indiretti per la quota ragionevolmente imputabile al bene, relativi al periodo di fabbricazione e fino al momento dal quale il bene può essere utilizzato, oltre l'IVA per la parte indetraibile che rimane a carico della Società. Le immobilizzazioni materiali possono essere rivalutate solo nei casi in cui leggi speciali lo richiedano o lo permettano.

Le immobilizzazioni sono sistematicamente ammortizzate in ogni esercizio a quote costanti sulla base delle aliquote previste dalla normativa fiscale, ritenute rappresentative della residua possibilità di utilizzo dei beni. Le aliquote applicate sono riportate nella sezione relativa alle note di commento dell'attivo. Per le immobilizzazioni entrate in funzione nell'esercizio le aliquote sono ridotte al 50%, ipotizzando che gli acquisti siano omogeneamente distribuiti nell'arco dell'esercizio.

L'ammortamento è calcolato anche sui cespiti temporaneamente non utilizzati. Sono esclusi dall'ammortamento i terreni e le opere d'arte, la cui utilità non si esaurisce.

Nel caso in cui, indipendentemente dall'ammortamento già contabilizzato, risulti una perdita durevole di valore, l'immobilizzazione viene corrispondentemente svalutata; se in esercizi successivi vengono meno i motivi che avevano giustificato la svalutazione viene ripristinato il valore originario, nei limiti del valore che l'attività avrebbe avuto ove la rettifica di valore non avesse mai avuto luogo.

I costi di manutenzione e riparazione aventi natura ordinaria sono addebitati integralmente a conto economico. I costi di manutenzione aventi natura incrementativa sono attribuiti ai cespiti cui si riferiscono ed ammortizzati in relazione alle residue possibilità di utilizzo degli stessi.

I costi sostenuti per ampliare, ammodernare o migliorare gli elementi strutturali di un'immobilizzazione materiale sono capitalizzabili se producono un aumento significativo e misurabile della capacità produttiva, sicurezza o vita utile. Se tali costi non producono questi effetti, sono trattati come manutenzione ordinaria e addebitati al conto economico.

Le immobilizzazioni materiali nel momento in cui sono destinate all'alienazione sono riclassificate in un'apposita voce nell'attivo circolante e quindi valutate al minore tra il valore netto contabile e il valore di realizzazione desumibile dall'andamento del mercato. I beni destinati alla vendita non sono più oggetto di ammortamento.

I contributi in conto impianti sono rilevati nel momento in cui esiste una ragionevole certezza che le condizioni previste per il riconoscimento del contributo sono soddisfatte e che i contributi saranno erogati. Essi sono portati indirettamente a riduzione del costo in quanto imputati al conto economico nella voce A5 "altri ricavi e proventi", e quindi rinviati per competenza agli esercizi successivi attraverso l'iscrizione di "risconti passivi", oppure sono portati direttamente a riduzione del costo delle immobilizzazioni materiali a cui si riferiscono.

Perdite durevoli di valore (immobilizzazioni immateriali e materiali)

Le attività materiali ed immateriali sono svalutate quando eventi o modifiche delle circostanze facciano ritenere che il valore di iscrizione in bilancio non sia recuperabile.

Gli eventi che possono determinare una svalutazione di attività sono: variazione nei piani industriali, variazioni nei prezzi di mercato che possono determinare minori performance operative, ridotto utilizzo degli impianti, modifiche e aggiornamenti del settore *Health Care* in ambito normativo e regolatorio.

La decisione se procedere ad una svalutazione e la quantificazione della medesima dipendono dalle valutazioni degli Amministratori su fattori complessi e altamente incerti, tra i quali l'andamento futuro dei prezzi, l'impatto dell'inflazione e dei miglioramenti tecnologici sui fattori di produzione, i profili produttivi e le condizioni della domanda e dell'offerta su scala globale, nazionale e regionale.

Qualora sussistano le condizioni di cui sopra, la svalutazione è determinata raffrontando il valore di iscrizione in bilancio con il relativo valore recuperabile, rappresentato dal maggiore tra il *fair value*, al netto degli oneri di dismissione, e il valore d'uso determinato attualizzando i flussi di cassa attesi derivanti dall'utilizzo dell'attività al netto degli oneri di dismissione, oppure avvalendosi dell'applicazione del metodo semplificato rappresentato dalla capacità di ammortamento. I flussi di cassa attesi sono determinati alla luce delle informazioni disponibili al momento della stima sulla base di giudizi soggettivi sull'andamento di variabili future – quali prezzi, costi, tassi di crescita della domanda, profili

produttivi – e sono attualizzati utilizzando un tasso al netto delle imposte che tiene in considerazione il rischio inerente l'attività interessata.

La perdita di valore di un'attività viene ripristinata quando vi è un'indicazione che si sia ridotta o non esista più o quando vi è stato un cambiamento nelle valutazioni utilizzate per determinare il valore recuperabile.

Partecipazioni e Titoli (iscritti nelle immobilizzazioni)

Le partecipazioni ed i titoli di debito iscritti tra le immobilizzazioni sono destinati ad una permanenza durevole nel patrimonio della Società. Le partecipazioni sono valutate con il metodo del costo rettificato delle perdite durevoli di valore. I titoli di debito, rappresentati per lo più da investimenti mobiliari ricevuti in base a lasciti o donazioni con vincolo di detenzione degli stessi fino a scadenza o fino a quando riportato nella disposizione testamentaria, sono valutati con il metodo del costo ammortizzato. Il metodo del costo presuppone che il valore di iscrizione in bilancio sia determinato sulla base del prezzo di acquisto o di sottoscrizione, comprensivo dei costi accessori. Il valore di carico della partecipazione, quando viene rilevata l'esistenza di una perdita durevole di valore, viene ridotto al suo minor valore recuperabile, che è determinato in base ai benefici futuri che si prevede affluiranno all'economia della partecipante. Il valore originario della partecipazione viene ripristinato negli esercizi successivi qualora vengano meno i motivi della svalutazione effettuata.

Il costo ammortizzato di un titolo è il valore a cui il titolo è stato valutato al momento della rilevazione iniziale al netto dei rimborsi di capitale, aumentato o diminuito dall'ammortamento cumulato, utilizzando il criterio dell'interesse effettivo, su qualsiasi differenza tra il valore iniziale e quello a scadenza e dedotta qualsiasi riduzione (operata direttamente o attraverso l'uso di un accantonamento) a seguito di una perdita di valore. Il valore di iscrizione iniziale è rappresentato dal prezzo di acquisto o sottoscrizione al netto di eventuali commissioni.

Le immobilizzazioni finanziarie comprendono anche i depositi cauzionali iscritti al loro presumibile valore di smobilizzo.

Rimanenze

Le rimanenze sono iscritte al minore tra il costo di acquisto, determinato secondo il metodo del costo medio ponderato, ed il valore di presumibile realizzazione desumibile dall'andamento del mercato (art.

2426 numero 9 c.c.). Per costo di acquisto si intende il prezzo effettivo d'acquisto più gli oneri accessori, con esclusione degli oneri finanziari.

Nel caso delle merci, dei prodotti finiti, dei semilavorati e dei prodotti in corso di lavorazione si prende a riferimento per la determinazione del valore di realizzazione desumibile dall'andamento del mercato direttamente il valore netto di realizzazione di tali beni. Nel caso delle materie prime e sussidiarie che partecipano alla fabbricazione di prodotti finiti non sono oggetto di svalutazione se ci si attende che i prodotti finiti nei quali saranno incorporate sono oggetto di realizzazione per un valore pari o superiori al costo di produzione del prodotto finito.

Le rimanenze sono oggetto di svalutazione in bilancio quando il valore di realizzazione desumibile dall'andamento del mercato è minore del relativo valore contabile. Le scorte obsolete e di lento rigiro sono svalutate in relazione alla loro possibilità di utilizzo o di realizzo.

Crediti

I crediti sono rilevati in bilancio secondo il criterio del costo ammortizzato, tenendo conto del fattore temporale e del valore di presumibile realizzo. Il criterio del costo ammortizzato non è applicato quando gli effetti sono irrilevanti, ovvero quando i costi di transazione, le commissioni pagate tra le parti e ogni altra differenza tra valore iniziale e valore a scadenza sono di scarso rilievo oppure se i crediti sono a breve termine (ossia con scadenza inferiore ai 12 mesi).

I crediti commerciali con scadenza oltre i 12 mesi dal momento della rilevazione iniziale, senza corresponsione di interessi, o con interessi significativamente diversi dai tassi di interesse di mercato, ed i relativi ricavi, si rilevano inizialmente al valore determinato attualizzando i flussi finanziari futuri al tasso di interesse di mercato. La differenza tra il valore di rilevazione iniziale del credito così determinato e il valore a termine è rilevata a conto economico come provento finanziario lungo la durata del credito utilizzando il criterio del tasso di interesse effettivo.

Il valore dei crediti, come sopra determinato, è rettificato, ove necessario, da un apposito fondo svalutazione, esposto a diretta diminuzione del valore dei crediti stessi, al fine di adeguarli al loro presumibile valore di realizzo. L'importo della svalutazione è rilevato nel conto economico.

Ai sensi del punto 6) dell'Art. 2427 del Codice Civile si precisa che i crediti verso soggetti appartenenti ad aree geografiche diverse dall'Italia non sono significativi.

Attività finanziarie che non costituiscono immobilizzazioni

Tale voce accoglie i titoli di debito destinati, per decisione degli Amministratori, a non essere durevolmente investiti nella Società. Sono iscritti al minore tra il costo specifico calcolato secondo il metodo del costo medio ponderato ed il valore di mercato, determinato, per quelli quotati, sulla base del valore di quotazione alla data di chiusura dell'esercizio.

La svalutazione dei titoli al minor valore di realizzazione è effettuata singolarmente, per ogni specie di titolo. Qualora vengano meno, in tutto o in parte, i presupposti della rettifica, la rettifica stessa è annullata, sino a concorrenza del ripristino del costo.

Disponibilità liquide

Le disponibilità liquide alla chiusura dell'esercizio sono valutate al valore nominale. Le eventuali disponibilità denominate in valuta estera sono valutate al cambio di fine esercizio.

Ratei e Risconti

Nella voce ratei e risconti sono state iscritte quote di costi e di ricavi di competenza dell'esercizio, ma esigibili in esercizi successivi e quote di costi e di ricavi sostenuti entro la chiusura dell'esercizio, ma di competenza di esercizi successivi, secondo il principio della competenza temporale.

Fondi per rischi ed oneri

I fondi per rischi ed oneri sono stanziati per coprire perdite o debiti di natura determinata, di esistenza certa o probabile, dei quali tuttavia alla chiusura dell'esercizio non sono determinabili l'ammontare o la data di sopravvenienza. Gli stanziamenti riflettono la migliore stima possibile sulla base degli elementi a disposizione. I rischi per i quali il manifestarsi di una passività è soltanto possibile sono indicati nella nota di commento dei fondi, senza procedere allo stanziamento di un fondo rischi ed oneri. Gli accantonamenti ai fondi rischi e oneri sono iscritti prioritariamente nelle voci di costo di conto economico delle pertinenti classi (B, C o D). Tutte le volte in cui non è attuabile questa correlazione tra la natura

dell'accantonamento ed una delle voci alle suddette classi, gli accantonamenti per rischi e oneri sono iscritti alle voci B12 e B13 del conto economico.

Fondo trattamento di fine rapporto lavoro subordinato

Nella voce trattamento di fine rapporto è stato iscritto quanto i dipendenti avrebbero diritto a percepire in caso di cessazione del rapporto di lavoro alla data di chiusura del bilancio. Le indennità di anzianità costituenti la suddetta voce, ossia la quota di accantonamento di competenza dell'anno e la rivalutazione annuale del fondo preesistente, sono determinate in conformità alle norme vigenti. Il trattamento di fine rapporto è iscritto nella voce C del passivo ed il relativo accantonamento alla voce B9 del conto economico.

Le modifiche apportate alla normativa TFR dalla Legge 27 dicembre 2006 n. 296 ("Legge Finanziaria 2007") e dai successivi Decreti e Regolamenti attuativi, hanno modificato i criteri di contabilizzazione applicati alle quote di TFR maturate al 31 dicembre 2006 e a quelle maturande dal 1° gennaio 2007, in quanto con l'istituzione del "Fondo per l'erogazione ai lavoratori dipendenti del settore privato dei trattamenti di fine rapporto di cui all'articolo 2120 del Codice Civile" (Fondo di Tesoreria gestito dall'INPS per conto dello Stato) i datori di lavoro che hanno alle proprie dipendenze almeno 50 addetti sono obbligati a versare a tale Fondo di Tesoreria le quote di TFR maturate in relazione ai quei lavoratori che non abbiano scelto di conferire la propria quota di liquidazione ad un fondo di previdenza complementare. L'importo del Trattamento di fine Rapporto esposto in bilancio è quindi indicato al netto delle quote versate al suddetto Fondo di Tesoreria INPS.

Debiti

I debiti sono iscritti secondo il criterio del costo ammortizzato, tenendo conto del fattore temporale. Il criterio del costo ammortizzato non è applicato ai debiti qualora i suoi effetti risultino irrilevanti. Gli effetti sono considerati irrilevanti per i debiti a breve termine (ossia con scadenza inferiore ai 12 mesi). Per il criterio del costo ammortizzato vedasi quanto detto con riferimento ai crediti.

I debiti per ferie maturate dai dipendenti e per retribuzioni differite, comprensivi di quanto dovuto agli enti previdenziali, sono stanziati sulla base dell'ammontare che si dovrebbe corrispondere nell'ipotesi di cessazione del rapporto di lavoro alla data del bilancio.

Ai sensi del punto 6) dell'Art. 2427 del Codice Civile si precisa che i debiti verso soggetti appartenenti ad aree geografiche diverse dall'Italia non sono significativi.

Attività e passività denominate in valuta

I crediti e i debiti espressi originariamente in valuta estera al di fuori dell'Euro sono iscritti in base ai cambi in vigore alla data in cui sono sorti e sono convertiti ai cambi a pronti in vigore alla data di chiusura del bilancio.

Le differenze di cambio realizzate sono accreditate/addebitate al conto economico alla voce 17 bis "Utili e perdite su cambi".

L'eventuale utile netto derivante dall'adeguamento ai cambi di fine esercizio delle poste in valuta concorre alla formazione del risultato d'esercizio e in sede di approvazione del bilancio e conseguente destinazione del risultato a riserva legale, è iscritto, per la parte non assorbita dall'eventuale perdita d'esercizio, in una riserva non distribuibile sino al momento del successivo realizzo.

La fonte di rilevazione dei cambi è la Banca d'Italia.

Operazioni di *Leasing* Finanziario

Le operazioni di locazione finanziaria sono rappresentate in bilancio secondo il metodo patrimoniale, contabilizzando a conto economico i canoni corrisposti, secondo il principio di competenza.

In apposita sezione della Nota Integrativa sono fornite le informazioni complementari previste dalla legge e relative alla rappresentazione dei contratti di locazione finanziaria, secondo il metodo finanziario.

Ricavi

I ricavi per i servizi forniti nell'ambito delle attività istituzionali sono riconosciuti in base alle prestazioni effettuate nel periodo di competenza, mentre i ricavi derivanti da prestazioni rese a pazienti degenti in regime di convenzionamento con il Servizio Sanitario Nazionale sono imputati a Conto Economico al momento della dimissione, che determina la possibilità di valorizzazione della prestazione e la conseguente maturazione del ricavo.

Sulla base della normativa vigente in materia di rimborso delle prestazioni ambulatoriali, somministrazione di farmaci e di ricovero erogate ai pazienti in regime di convenzione con il Servizio

Sanitario Nazionale, i ricavi sono valorizzati, previa validazione dell'ente di riferimento, qualora disponibile, applicando le tariffe riconosciute nel limite contrattuale sottoscritto. Conseguentemente i maggiori volumi di prestazioni erogate rispetto al *budget* assegnato, per la quota non riconosciuta contrattualmente, o dall'impianto normativo successivamente introdotto, vengono rettificati tramite stanziamento di nota credito da emettere mentre, per la quota soggetta a regressione tariffaria o a tetto di sistema, vengono in parte svalutati attraverso l'accantonamento ad un apposito fondo rischi.

Le transazioni con entità correlate sono avvenute a normali condizioni di mercato e sono esposte dettagliatamente nella Relazione sulla Gestione.

Contributi per funzioni ospedaliere non tariffabili

I predetti contributi sono prudenzialmente riconosciuti al conto economico contestualmente all'incasso, in ragione dell'indeterminatezza dell'ammontare stabilito in sede di delibera regionale; pertanto gli acconti ricevuti in corso di esercizio vengono contabilizzati nei ricavi delle vendite e delle prestazioni; il saldo, qualora incassato in un esercizio successivo a quello di competenza, viene contabilizzato nelle sopravvenienze attive/passive gestionali.

Qualora invece la delibera regionale che definisce l'importo di tali contributi fosse disponibile in tempo utile alla stesura del bilancio civilistico si provvede alla contabilizzazione degli stessi per quanto complessivamente riconosciuto.

Ricavi per maggiorazioni tariffarie LR 7/2010 – DGR 350

La contabilizzazione dei predetti ricavi, in mancanza della delibera di assegnazione dell'ente di riferimento, è effettuata a conto economico stimando gli impatti della normativa vigente alla stesura del bilancio. La contabilizzazione dell'importo riconosciuto in un esercizio successivo a quello di competenza potrebbe pertanto comportare l'iscrizione di una sopravvenienza attiva o passiva gestionale.

Contributi per programmi di ricerca

I contributi in conto impianti sono rilevati come descritto sopra per le immobilizzazioni materiali.

I contributi in conto esercizio erogati dal Ministero della Salute, da Enti e da società esterne, finalizzati al finanziamento di programmi di ricerca, sono accreditati a conto economico per competenza in

relazione ai costi sostenuti. I contributi relativi ai progetti di ricerca per i quali l'Istituto risulta capofila, sono esposti al netto degli importi da riconoscere alle unità operative (*subcontractor*).

Contributi e liberalità da terzi

I contributi ricevuti da terzi a titolo di liberalità a sostegno delle attività istituzionali sono iscritti in bilancio e accreditati al conto economico nell'esercizio in cui sono incassati o ritenuti certi; se destinati ad attività di ricerca, sono accreditati al conto economico per competenza in relazione ai rispettivi costi sostenuti.

Contributo 5 per mille

La Legge n. 266 del 23 dicembre 2005, Art. 1 comma 337 contenuta nella Legge Finanziaria 2006, ha introdotto la possibilità per il contribuente di destinare la quota del 5 per mille dell'imposta sul reddito delle persone fisiche a suo carico alternativamente per il sostegno del volontariato, il finanziamento della ricerca scientifica e dell'Università, il finanziamento della ricerca sanitaria o il finanziamento di attività sociali svolte dai comuni. All'Ente destinatario spetta sia la quota del 5 per mille specificatamente attribuita dal contribuente, sia la quota proporzionale attribuita in base alle scelte generiche dei contribuenti in favore dell'area di appartenenza dell'Ente percipiente.

Il provvedimento di cui alla Legge Finanziaria 2006 è stato successivamente reiterato in analoghi provvedimenti legislativi contenuti nelle Leggi Finanziarie (di stabilità) per gli esercizi successivi.

La Legge Finanziaria per l'anno 2009 ha anche provveduto a chiarirne la qualificazione giuridica, definendo il 5 per mille un contributo a titolo di finanziamento della ricerca sanitaria oggetto di specifica pianificazione (preventiva) e rendicontazione (consuntiva) al Ministero della Salute entro la data del 31 gennaio, rispettivamente successivo alla data di incasso dei contributi e alla data di chiusura dei progetti.

In considerazione di quest'ultimo chiarimento, l'Istituto destina tali contributi a specifici progetti di ricerca che sono individuati dalla Direzione dello stesso per ogni esercizio.

Conseguentemente i contributi vengono iscritti in bilancio quando certi e determinabili e sono accreditati al conto economico per competenza nell'esercizio di individuazione dei costi relativi ai progetti di ricerca cui sono stati destinati.

Costi

I costi sono contabilizzati in base al principio di competenza, indipendentemente dalla data di incasso e pagamento, al netto dei resi, degli sconti, degli abbuoni e dei premi.

Costi di ricerca

I costi di ricerca e sviluppo sono addebitati al conto economico dell'esercizio in cui sono sostenuti.

Dividendi

I dividendi derivanti dalle partecipazioni possedute sono contabilizzati nell'esercizio in cui vengono deliberati dall'Assemblea dei Soci. I dividendi sono rilevati come proventi finanziari indipendentemente dalla natura delle riserve oggetto di distribuzione.

Proventi ed oneri finanziari

I proventi ed oneri finanziari sono iscritti per competenza. I costi relativi alle operazioni di smobilizzo crediti a qualsiasi titolo e di qualsiasi natura (commerciali, finanziarie, altro) sono imputati nell'esercizio di competenza.

Imposte sul reddito dell'esercizio

Sono iscritte in base alla stima del reddito imponibile in conformità alle disposizioni in vigore, tenendo conto delle esenzioni applicabili e dei crediti d'imposta spettanti.

Le imposte differite passive e attive sono calcolate sulle differenze temporanee tra i valori delle attività e delle passività determinati secondo i criteri civilistici ed i corrispondenti valori riconosciuti a fini fiscali.

La loro valutazione è effettuata tenendo conto della presumibile aliquota fiscale che la Società si prevede sosterrà nell'anno in cui tali differenze concorreranno alla formazione del risultato fiscale, considerando le aliquote in vigore o già emanate alla data di bilancio e vengono appostate rispettivamente nel "fondo imposte differite" iscritto nel passivo tra i fondi rischi e oneri e nella voce "crediti per imposte anticipate" dell'attivo circolante.

Le attività per imposte anticipate sono rilevate per tutte le differenze temporanee deducibili, in rispetto al principio della prudenza, se vi è la ragionevole certezza dell'esistenza negli esercizi in cui le stesse si riverseranno di un reddito imponibile non inferiore all'ammontare delle differenze che si andranno ad annullare.

Per contro, le imposte differite passive sono rilevate su tutte le differenze temporanee imponibili.

Le imposte differite relative alle riserve in sospensione di imposta non sono rilevate se vi sono scarse probabilità di distribuire tali riserve ai Soci.

Uso di stime

E' da rilevare che la redazione del Bilancio di Esercizio richiede da parte degli Amministratori l'effettuazione di stime e di assunzioni che hanno effetto sui valori dei ricavi, dei costi, delle attività e delle passività di bilancio e sull'informativa relativa ad attività e passività potenziali alla data del Bilancio di esercizio.

Tali stime e assunzioni utilizzate sono basate sull'esperienza e su altri fattori considerati rilevanti. Nonostante il continuo processo di analisi delle stime incrementi l'attendibilità delle stesse, i risultati che si consuntiveranno potrebbero pertanto differire da tali stime, e in tal caso gli effetti di ogni variazione saranno riflessi a conto economico nel periodo in cui avviene la revisione di stima se la revisione stessa dovesse avere effetti solo su tale periodo, o anche nei periodi successivi se la revisione avesse effetti sia sull'esercizio corrente, sia su quelli futuri.

Di seguito sono riepilogati i processi critici di valutazione e le assunzioni chiave utilizzate dal Management nel processo di applicazione dei principi contabili riguardo al futuro e che possono avere effetti significativi sui valori rilevati nel bilancio o per le quali esiste il rischio che possano emergere rettifiche di valore significative al valore contabile delle attività e passività nell'esercizio successivo a quello di riferimento del bilancio.

Fondo svalutazione crediti e abbattimento crediti SSN

I fondi svalutazione crediti e abbattimenti SSN riflettono le stime delle perdite connesse al portafoglio crediti della Società e la miglior applicazione della normativa di riferimento disponibile alla data di stesura del bilancio. Gli accantonamenti sono effettuati a fronte di perdite attese su crediti, stimate in base all'esperienza passata con riferimento a crediti con analogia rischiosità creditizia, nonché all'attento monitoraggio della qualità del portafoglio crediti.

Pur ritenendo congrui i fondi stanziati, l'uso di ipotesi diverse o il cambiamento delle normative e delle condizioni economiche potrebbero riflettersi in variazioni di tali fondi e quindi avere un impatto sul risultato della Società. Le stime e le assunzioni sono riviste periodicamente e gli effetti di ogni variazione sono riflesse a conto economico nell'esercizio di competenza.

Rimanenze e fondo svalutazione

La valutazione delle rimanenze e del relativo fondo svalutazione riflette la migliore stima circa le previsioni per il loro utilizzo nel tempo sulla base dei dati consuntivi a disposizione. L'Istituto ritiene che le stime effettuate e i dati di input presi in considerazione consentano una corretta rilevazione delle rimanenze ed una ragionevole stima del fondo obsolescenza; tuttavia, data la natura complessa delle stime riguardanti i fattori in precedenza richiamati e le relative aree di incertezza sottostanti, non è dato di escludere che dalla revisione delle stime nei prossimi esercizi possano emergere ulteriori esigenze di accantonamenti o svalutazioni.

Recuperabilità delle imposte anticipate

Il bilancio d'esercizio espone attività per imposte anticipate che risultano connesse alla rilevazione di differenze temporanee tra i valori civilistici e i relativi valori riconosciuti ai fini fiscali, utilizzabili in esercizi successivi nei limiti della capacità della Società di generare utili imponibili. La valutazione della predetta recuperabilità tiene conto della stima dei redditi imponibili futuri e si basa sul piano approvato dagli Amministratori, frutto di assunzioni; tuttavia nel momento in cui si dovesse constatare che la Società non fosse in grado di recuperare negli esercizi futuri la totalità o parte delle predette imposte anticipate rilevate, la conseguente rettifica sarebbe imputata al Conto Economico dell'esercizio in cui si verifica tale circostanza.

Contenziosi legali e fiscali

L'Istituto effettua accantonamenti connessi prevalentemente ai contenziosi legali e fiscali in essere.

Data la natura di tali contenziosi, non è sempre oggettivamente possibile prevedere l'esito finale di tali vertenze, alcune delle quali potrebbero concludersi con esito sfavorevole.

La stima degli accantonamenti in queste materie è frutto di un processo complesso che comporta giudizi per loro natura soggettivi da parte della Direzione Aziendale e pertanto soggetti a possibili processi di revisione nel tempo.

Recuperabilità delle immobilizzazioni materiali e immateriali

Si veda quanto riportato sopra nell'ambito del paragrafo "Perdite durevoli di valore" circa l'uso di stime per la recuperabilità del valore delle immobilizzazioni materiali ed immateriali.

Proposta di destinazione dell'utile

Signori Soci, ai sensi dell'art. 2427 comma 1 n. 22-septies del Codice Civile, nel raccomandarVi l'approvazione del seguente bilancio, che presenta un utile di esercizio pari ad € 3.591.678, Vi proponiamo di destinare l'utile, come previsto dall'art. 26 dello statuto, alla riserva legale per € 359.168 ed al Fondo ricerca e sviluppo per € 3.232.510.

ALTRE INFORMAZIONI

Deroghe ai sensi del IV comma art. 2423 C.C.

Si precisa, altresì, che non si sono verificati casi eccezionali che abbiano richiesto deroghe alle norme di legge relative al bilancio ai sensi del IV comma dell'art. 2423 C.C.

Informativa sull'attività di direzione e coordinamento

Con riferimento agli adempimenti di cui all'art. 2497 bis C.C., si precisa che l'Istituto non è soggetto a direzione e coordinamento da parte di nessun soggetto in quanto tale attività è esercitata in modo autonomo dalla Direzione dell'Istituto stesso.

Informativa ai sensi dell'Art. 2427-Bis C.C. Strumenti finanziari

La Società non ha emesso o detenuto nel corso dell'esercizio strumenti finanziari derivati, mentre il valore netto contabile delle immobilizzazioni finanziarie risulta in linea con il loro *fair value* al 31 dicembre 2022.

Dati sull'occupazione

Il numero dei dipendenti al 31 dicembre 2022 confrontati con l'esercizio precedente è riepilogato nell'informativa fornita nella relazione sulla gestione.

COMMENTO ALLE VOCI DELL'ATTIVO

IMMOBILIZZAZIONI

Per le immobilizzazioni immateriali e materiali sono stati predisposti appositi prospetti, riportati nelle pagine seguenti, che indicano, per ciascuna voce, il costo storico, l'ammortamento già contabilizzato, i movimenti intercorsi nell'esercizio ed il saldo finale.

Immobilizzazioni Immateriali € **4.472.838** (2021: € **3.782.589**)

Descrizione	31.12.2022	31.12.2021
Brevetti e utilizzo opere d'ingegno		
- Software	-	-
Concessioni, licenze, marchi e diritti simili		
- Licenze d'uso pacchetti applicativi	3.430	2.512
Immobilizzazioni in corso e acconti		
- Immobilizzazioni in corso	660	659
Altre		
- Migliorie su beni di terzi	383	612
Totale Altre	383	612
TOTALI	4.473	3.783

Nel corso dell'esercizio le immobilizzazioni immateriali sono incrementate rispetto allo scorso esercizio per € 690 mila; l'ammortamento si attesta ad € 1.737 mila, gli acquisti dell'esercizio sono pari ad € 2.466 mila e i decrementi pari ad € 35 mila.

Nel corso dell'esercizio sono stati altresì capitalizzati costi relativi a concessioni, licenze, marchi e diritti simili (€ 1.653 mila) legati al miglioramento della infrastruttura informatica a supporto della gestione del paziente, dell'attività clinica, di ricerca e amministrativa.

Non risultano presenti al 31 dicembre 2022 impegni relativi alle immobilizzazioni immateriali detenute.

In sede di predisposizione del bilancio, non avendo riscontrato indicatori di perdita durevole di valore, l'Istituto ha mantenuto il valore di iscrizione in bilancio delle immobilizzazioni immateriali possedute, senza procedere alla valutazione della loro recuperabilità.

PROSPETTO DELLE VARIAZIONI NEI CONTI DELLE IMMOBILIZZAZIONI IMMATERIALI

(ESERCIZIO 2022)

	Situazione 31.12.2021			Movimenti dell'esercizio 2022				Situazione 31.12.2022		
	Costo Originario	Fondo Amm.to	Saldo 31.12.21	Incrementi	Decrementi	Riclassifiche	Amm.ti	Costo Originario	Fondo Amm.to	Saldo 31.12.22
Brevetti e utilizzo opere dell'ingegno	2.237	(2.237)	-	-	-	-	-	2.237	(2.237)	-
Concessioni, licenze, marchi e diritti simili	11.334	(8.822)	2.512	1.653	-	670	(1.405)	13.657	(10.227)	3.430
Immobilizzazioni in corso e acconti	659	-	659	710	(35)	(674)	-	660	-	660
Migliorie su beni di terzi	2.901	(2.289)	612	103	-	-	(332)	3.004	(2.621)	383
	17.131	(13.348)	3.783	2.466	(35)	(4)	(1.737)	19.558	(15.085)	4.473

Immobilizzazioni Materiali € 98.755.224 (2021: € 82.674.350)

Rientrano in tale voce dell'attivo i beni di uso durevole costituenti parte dell'organizzazione permanente dell'Istituto. Il riferirsi a fattori e condizioni durature non è caratteristica intrinseca ai beni come tali, bensì alla loro destinazione. Essi sono normalmente impiegati come strumenti di produzione del reddito della gestione caratteristica e non sono destinati né alla vendita, né alla trasformazione per l'ottenimento dei prodotti/servizi dell'Istituto.

Gli ammortamenti ordinari, evidenziati nell'apposito prospetto, sono stati calcolati sulla base di aliquote ritenute rappresentative della residua possibilità di utilizzo delle relative immobilizzazioni materiali.

Le aliquote applicate sono le seguenti:

Fabbricati:	3%
Efficientamento energetico del tetto:	6,7%
Parcheggio:	10%
Impianti specifici:	12%
Impianti generici:	8%
Attrezzatura specifica:	12,5%
Attrezzatura generica:	12,5%
Biancheria:	40%
Mobili e arredi:	10%
Macchine d'ufficio:	20%
Impianti elettronici:	20%

Riepilogo valori di bilancio:

	31.12.2022	Valore netto	31.12.2021	Valore netto
Terreni	9.247		9.247	
Fondo Ammortamento	-		-	
Totale Terreni		9.247		9.247
Fabbricati	42.194		41.596	
Fondo Ammortamento	(27.891)		(26.583)	
Totale Fabbricati		14.303		15.013
Totale Terreni e Fabbricati		23.550		24.260
Impianti e macchinari	31.319		28.982	
Fondo Ammortamento	(21.231)		(19.669)	
Totale Impianti e macchinari		10.088		9.313
Attrezzature industriali e commerciali	113.908		112.870	
Fondo Ammortamento	(89.529)		(88.357)	
Totale Attrezzature industriali e commerciali		24.379		24.513
Altri beni				
. Mobili e arredi	12.302		12.129	
Fondo Ammortamento	(10.720)		(10.454)	
		1.582		1.675
. Macchine d'ufficio	9.978		9.357	
Fondo Ammortamento	(8.420)		(7.856)	
		1.558		1.501
. Impianti elettronici	12.762		11.927	
Fondo Ammortamento	(11.658)		(11.247)	
		1.104		680
Totale altri beni		4.244		3.856
Immobilizzazioni in corso e acconti	36.494		20.732	
Totale Immobilizzazioni in corso e acconti		36.494		20.732
TOTALI		98.755		82.674

Nel corso dell'esercizio le immobilizzazioni materiali hanno subito complessivamente un incremento netto pari ad € 16.081 mila, principalmente ascrivibile agli acquisti dell'esercizio pari ad € 27.225 mila e all'ammortamento per € 10.237 mila.

Gli incrementi sono prevalentemente afferenti per € 18.045 mila alle immobilizzazioni in corso, per € 6.114 mila all'aggiornamento del parco tecnologico, per € 1.357 mila ad impianti e macchinari,

per € 551 mila per Fabbricati, per € 616 mila a macchine d'ufficio, per € 171 mila a mobili e arredi e per € 371 mila ad impianti elettronici.

A fine esercizio, le immobilizzazioni in corso si riferiscono a cespiti in fase di collaudo ed acconti legati principalmente alla realizzazione del progetto "Proton Terapia" (€ 25.838 mila), di IEO3 (€ 5.253 mila), di IEO4 (€ 650 mila), ad un acceleratore lineare (€ 1.755 mila).

Si rinvia all'apposito prospetto allegato per il dettaglio analitico dei saldi e delle movimentazioni avvenute durante il periodo per ogni categoria di beni e per le aliquote di ammortamento applicate per la categoria di cespiti a cui si riferiscono.

In sede di chiusura di bilancio, non avendo riscontrato indicatori di perdita durevole di valore, l'Istituto ha mantenuto il valore di iscrizione in bilancio delle immobilizzazioni materiali detenute, senza procedere alla valutazione della loro recuperabilità.

PROSPETTO DELLE VARIAZIONI NEI CONTI DELLE IMMOBILIZZAZIONI MATERIALI
(ESERCIZIO 2022)

	Situazione al 31.12.2021			Movimenti dell'esercizio 2022					Situazione al 31.12.2022		
	Costo originario	Fondo Amm.to	Saldo 31.12.21	Incrementi	Decrementi	Riclassifiche	Realizzi f.do amm.	Amm.ti	Costo originario	Fondo Amm.to	Saldo 31.12.22
Terreni e fabbricati											
• Terreni	9.247	-	9.247	-	-	-	-	-	9.247	-	9.247
• Fabbricati	41.596	(26.583)	15.013	551	(11)	58	4	(1.312)	42.194	(27.891)	14.303
	50.843	(26.583)	24.260	551	(11)	58	4	(1.312)	51.441	(27.891)	23.550
Impianti e macchinari											
• Specifici	12.088	(8.587)	3.501	408	-	893	-	(730)	13.389	(9.317)	4.072
• Generici	16.894	(11.082)	5.812	949	-	87	-	(832)	17.930	(11.914)	6.016
	28.982	(19.669)	9.313	1.357	-	980	-	(1.562)	31.319	(21.231)	10.088
Attrezzature ind.li e comm.li											
• Specifiche	110.581	(86.852)	23.729	6.109	(5.073)	-	4.947	(5.958)	111.617	(87.863)	23.754
• Generiche	2.289	(1.505)	784	5	(3)	-	3	(164)	2.291	(1.666)	625
	112.870	(88.357)	24.513	6.114	(5.076)	-	4.950	(6.122)	113.908	(89.529)	24.379
Altri beni											
• Mobili e arredi	12.129	(10.454)	1.675	171	-	2	-	(266)	12.302	(10.720)	1.582
• Macchine d'ufficio	9.357	(7.856)	1.501	616	-	5	-	(564)	9.978	(8.420)	1.558
• Impianti elettronici	11.927	(11.247)	680	371	-	464	-	(411)	12.762	(11.658)	1.104
	33.413	(29.557)	3.856	1.158	-	471	-	(1.241)	35.042	(30.798)	4.244
Immobilizzazioni in corso e acconti	20.732	-	20.732	18.045	(778)	(1.505)	-	-	36.494	-	36.494
TOTALE	246.840	(164.166)	82.674	27.225	(5.865)	4	4.954	(10.237)	268.204	(169.449)	98.755

Il valore dei noleggi è pari ad € 823 mila ed è riconducibile alle seguenti attrezzature:

- attrezzature elettromedicali € 309 mila;
- autovetture € 243 mila;
- fotocopiatrici € 57 mila;
- attrezzature scientifiche € 54 mila;
- altro € 160 mila.

Immobilizzazioni finanziarie

Partecipazioni in controllate	€ 59.077.671	(2021: € 58.068.067)
--------------------------------------	---------------------	-----------------------------

Le partecipazioni in imprese controllate sono iscritte al costo di acquisto o costituzione, comprensivo dei costi accessori costituiti da costi direttamente imputabili all'operazione di acquisto o di costituzione quali ad esempio i costi di intermediazione bancaria e finanziaria, le commissioni, le spese e le imposte.

Le società controllate sono valutate con il metodo del costo rettificato per perdite durevoli di valore.

La voce è relativa, per € 59.078 mila alla partecipazione totalitaria nel Centro Cardiologico Monzino S.p.A..

Il Centro Cardiologico Monzino S.p.A., con sede legale in Via Filodrammatici n. 10, Milano e capitale sociale pari ad € 17.800.000, acquistato nel corso dell'anno 2000 e riconosciuto Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico dal 1982, è *leader* nel settore della cardiologia e cardiocirurgia; è una struttura monospecialistica di n. 215 letti autorizzati dalla Regione Lombardia, impiega n. 629 dipendenti (in forza al 31.12.2022) ed è sede di cattedre dell'Università degli Studi di Milano.

Il Centro Cardiologico Monzino S.p.A. ha chiuso l'esercizio 2022 registrando un risultato positivo per € 1,0 milioni (rispetto all'utile del 2021 per € 0,3 milioni) ed un patrimonio netto pari ad € 56,9 milioni.

Si ricorda che al 31 dicembre 2021 il valore netto contabile della partecipazione risultava essere pari ad € 58,1 milioni, al netto di svalutazioni ripristinabili effettuate in esercizi precedenti per € 11,1 milioni.

Gli Amministratori, consistentemente con quanto fatto negli esercizi precedenti, hanno ritenuto

opportuno ripristinare il valore della partecipazione solamente per la quota attribuibile al risultato di esercizio, pari ad € 1,0 milioni, residuando pertanto svalutazioni ripristinabili alla data del 31 dicembre 2022 pari ad ulteriori € 10,1 milioni.

Partecipazioni in altre imprese	€ 678.762	(2021: € 684.728)
--	------------------	--------------------------

La voce include la quota sottoscritta in Genextra S.p.A. pari ad € 640 mila, relativa a n. 642.334 azioni ordinarie corrispondenti allo 0,6% del capitale sociale, la quota sottoscritta nel Consorzio Alleanza contro il Cancro (15% del capitale sociale) per un valore di € 25 mila, quella in Progen (€ 5 mila) e nel Centro Europeo di Nanomedicina (€ 8 mila), Associazione "Cluster Lombardo Scienza della Vita" (€ 1 mila).

Crediti

Crediti verso altri € 1.064.182 (2021: € 1.016.913)

La voce include principalmente, oltre al deposito cauzionale relativo al contratto di affitto per lo IEO Day Centre (€ 975 mila) e al contratto di affitto Via Lampedusa (€ 30 mila), i depositi cauzionali versati alle società concessionarie in relazione ai contratti per i servizi di telefono, elettricità e gas.

ATTIVO CIRCOLANTERimanenze

Materie prime, sussidiarie e di consumo € 8.579.120 (2021 € 8.410.815)

Tale posta rappresenta il valore delle merci in giacenza a fine esercizio, così suddiviso per categoria merceologica:

	31.12.2022	31.12.2021
Medicinali	5.344	4.980
Presidi sanitari	3.831	4.038
Materiali di consumo	29	57
	9.204	9.075
Fondo obsolescenza	(625)	(664)
TOTALE	8.579	8.411

Il valore delle rimanenze è stato calcolato con il metodo del costo medio ponderato ed include il fondo obsolescenza per un importo totale di € 625 mila, in considerazione della lenta movimentazione di taluni *items*.

Immobilizzazioni destinati alla vendita € 779.700 (2021: € 60.000)

La posta si riferisce a n. 4 immobili, ricevuti in eredità destinati alla vendita.

Crediti € 52.950.725 (2021: € 54.048.594)

Tutti i crediti di cui alle poste che seguono hanno scadenza entro i 12 mesi, se non diversamente esplicitato.

Crediti verso clienti € 38.140.668 (2021: € 48.051.989)

La voce, relativa alle prestazioni caratteristiche dell'Istituto, risulta così composta:

	31.12.2022	31.12.2021
Crediti esigibili entro l'esercizio successivo		
- fatturati	24.647	33.679
- da fatturare	16.669	17.357
	41.316	51.036
Crediti esigibili oltre l'esercizio successivo	-	-
Fondo Svalutazione Crediti	(3.175)	(2.984)
TOTALE	38.141	48.052

I crediti registrano un decremento complessivo di € 9,9 milioni rispetto allo scorso esercizio riferibili per € 8,6 milioni all'ATS Città Metropolitana di Milano e per € 1,5 milioni ai crediti diversi.

La riduzione relativa ai crediti verso l'ATS Città di Metropolitana di Milano è ascrivibile principalmente all'incasso, avvenuto nell'esercizio, dei Saldi 2020 e 2021.

I crediti per prestazioni fatturate, esigibili entro l'esercizio successivo, comprendono i crediti verso clienti solventi, nonché crediti verso Enti Pubblici (ATS, Regione Lombardia e Ministero della Salute) per i quali l'importo del credito risulta riconosciuto da delibera dell'ente debitore.

I crediti per prestazioni da fatturare (€ 16.669 mila), si riferiscono principalmente a:

- fatture da emettere relative a trials clinici (€ 5.927 mila);
- fatture da emettere relative alle maggiorazioni tariffarie 2022 (€ 1.075 mila);
- fatture da emettere relative alle prestazioni ambulatoriali 2022 (€ 2.967 mila);
- fatture da emettere solventi (€ 3.583 mila);
- fatture da emettere al Ministero della Salute per progetti di Ricerca Finalizzata ed altri (€ 637 mila).

Infine, di seguito si fornisce il dettaglio per natura dei crediti sopra indicati:

	2022	2021
Crediti non afferenti all'ATS:		
Crediti verso clienti solventi	19.528	19.061
Crediti diversi	13.466	14.993
Crediti verso Ministero	637	604
Crediti per rimborsi regionali	100	169
TOTALE	33.731	34.827
Crediti verso ATS:		
Crediti verso ATS per DRG e maggiorazioni e funzioni	2.833	6.773
Crediti verso ATS per attività ambulatoriale e screening	2.795	9.161
Crediti per farmaci in file f	1.957	275
TOTALE	7.585	16.209
TOTALI	41.316	51.036

Il fondo svalutazione crediti, pari ad € 3.175 mila, relativo ai rischi di inesigibilità nei confronti dei pazienti solventi e di altri crediti di natura commerciale, si è complessivamente incrementato nell'anno per € 191 mila a fronte di accantonamenti per € 1.225 mila ed utilizzi per € 1.034 mila.

In base alla documentazione ed alle informazioni disponibili e tenuto conto della consistenza del fondo stanziato, si ritiene recuperabile l'importo netto dei crediti indicato, ancorché siano possibili, da parte degli enti pubblici debitori, conguagli che potrebbero modificare la stima dell'accantonamento effettuato a fondo rischi (fondo abbattimento crediti SSN).

I crediti per le prestazioni rese nel 2022 a pazienti del SSN sono iscritti in bilancio secondo il valore di presumibile realizzo.

Nel mese di giugno 2022 l'Istituto ha sottoscritto il contratto integrativo con la ATS (in base a quanto previsto dalla D.G.R. n. XI/6387 del 16 maggio 2022) nel quale è stato assegnato all'Istituto Europeo di Oncologia un *budget* per l'anno 2022 pari ad € 52.437.649 per le attività di ricovero (€ 20.835.864 a favore dei cittadini residenti in Regione Lombardia), di cui € 1.966.412 legati al raggiungimento di obiettivi specifici per migliorare l'offerta di ricovero e cura, ed un *budget* pari ad € 37.683.667 per le attività di specialistica ambulatoriale e diagnostica strumentale (€ 18.374.893 a favore dei cittadini residenti in

Regione Lombardia), di cui € 2.338.260 legati al raggiungimento di obiettivi specifici per l'attività specialistica ambulatoriale. I rimborsi sono assoggettati a regressioni tariffarie crescenti a valere fino a quota 106%, oltre tale limite non viene garantita la remunerazione delle prestazioni. Nel mese di ottobre 2022, inoltre, l'Istituto ha firmato una rimodulazione contrattuale per prestazioni di ricovero con la ATS (in ottemperanza alla D.G.R. n. XI/6866 del 02/08/2022), nella quale sono state rimodulate, per € 1.580.089, le quote economiche del tetto previsto per i cittadini fuori regione verso il tetto previsto per i cittadini lombardi portando lo stesso ad € 22.415.953.

In considerazione dei maggiori volumi di prestazioni ambulatoriali erogate nel 2022 rispetto al *budget* assegnato, sono state conseguentemente appostate note credito per € 3.306 mila.

Ai sensi del punto 6 art. 2427 Codice Civile si precisa che, alla data del presente bilancio, non sono significativi i crediti verso soggetti esteri.

Crediti verso imprese controllate	€	142.106	(2021: €	167.250)
--	----------	----------------	-----------------	-----------------

L'importo è relativo a crediti commerciali per servizi resi dall'Istituto a favore della controllata Centro Cardiologico Monzino S.p.A. per prestazioni di servizi centralizzati e servizi clinici.

Crediti tributari	€	2.045.956	(2021: €	1.492.737)
--------------------------	----------	------------------	-----------------	-------------------

La posta include per € 1.375 mila il credito d'imposta per gli investimenti sui nuovi beni (agevolazioni relative ai cd. "*superammortamento*" e "*iperammortamento*"), per € 594 mila il credito IVA, per € 77 mila il credito relativo a ritenute subite.

Crediti per imposte anticipate	€	2.478.515	(2021: €	2.794.441)
---------------------------------------	----------	------------------	-----------------	-------------------

Tale posta accoglie il credito per imposte anticipate calcolato principalmente sui fondi rischi e oneri (cui si fa rimando).

Crediti verso altri € 979.299 (2021: € 1.542.177)

Il dettaglio della voce è così composto:

	31.12.2022	31.12.2021
Crediti diversi	897	1.504
Crediti verso Istituti di Credito	66	23
Crediti per note spese	11	11
Prestiti al personale	5	4
TOTALE	979	1.542

La posta include per € 754 mila i crediti relativi a eredità ricevute. Risultano altresì iscritti crediti verso un istituto bancario per € 66 mila riferibili ad operazioni contabilizzate nei primi giorni dell'esercizio 2023.

Crediti verso altri esigibili oltre l'esercizio € 9.164.181 (2021: € -)

La posta accoglie il credito relativo alla Donazione ricevuta dal dr. Braggiotti a copertura della progettazione, realizzazione e allestimento del Breast Cancer Centre all'interno del programma di ampliamento "IEO4".

Disponibilità liquide € 55.740.460 (2021: € 46.465.325)

Depositi bancari e postali € 55.632.349 (2021: € 46.314.110)

La voce comprende depositi di c/c bancario per € 55.632 mila remunerati a tassi di mercato. Non sono inclusi investimenti di nessuna natura o fondi vincolati.

Denaro e valori in cassa € 108.111 (2021: € 151.215)

Rappresentano assegni e numerario di cassa e versamenti disposti in chiusura di esercizio e non contabilizzati dagli Istituti di credito.

RATEI E RISCONTI	€ 4.358.243	(2021: € 4.171.750)
-------------------------	--------------------	----------------------------

Ratei attivi	€ 2.774.216	(2021: € 2.493.178)
---------------------	--------------------	----------------------------

La voce è relativa principalmente alla contropartita contabile dei ricavi per contributi alla ricerca assegnati da European Commission (€ 924 mila), Regione Lombardia (€ 674 mila), Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (€ 281 mila), enti privati (€ 173 mila), Fondazione Regionale Ricerca biomedica (€ 137 mila), Fondazione Umberto Veronesi (€ 117 mila), AIFA (€ 100 mila), Lega Italiana Lotta contro i Tumori (€ 80 mila).

Risconti attivi	€ 1.584.027	(2021: € 1.678.572)
------------------------	--------------------	----------------------------

La voce include i risconti di costi di competenza dell'esercizio 2023 relativi principalmente a premi assicurativi (€ 1.278 mila), canoni di manutenzione (€ 230 mila), abbonamenti (€ 19 mila) e altri (€ 57 mila).

COMMENTO ALLE VOCI DEL PASSIVO**PATRIMONIO NETTO**

Patrimonio Netto € 140.076.411 (2021: € 136.484.733)

La movimentazione delle poste che costituiscono il patrimonio netto è fornita in allegato:

	31.12.2022	31.12.2021
Capitale sociale	80.579.007	80.579.007
Riserva legale	7.709.624	7.489.374
Fondo ricerca e sviluppo	48.196.102	46.213.850
Utile/(Perdita) dell'esercizio	3.591.678	2.202.502
TOTALE	140.076.411	136.484.733

Le variazioni rispetto al 31 dicembre 2021 rivengono dall'esecuzione della delibera assembleare di destinazione del risultato d'esercizio.

Il Capitale sociale risulta ripartito in n. 14 quote, ciascuna avente un valore unitario superiore ad € 51.645, come previsto dallo Statuto.

Si precisa, inoltre, che le riserve disponibili, ai sensi del punto n. 5 del I comma dell'art. 2426 C.C., fino a che l'ammortamento dei costi di impianto e ampliamento e di sviluppo non è completato possono essere distribuiti dividendi solo se residuano riserve disponibili sufficienti a coprire l'ammontare dei costi non ammortizzati.

Riserva legale € 7.709.624 (2021: € 7.489.374)

La riserva accoglie il 10% della destinazione dell'utile degli scorsi esercizi.

Fondo Ricerca e Sviluppo € 48.196.102 (2021: € 46.213.850)

Trattasi di una riserva costituita come previsto dall'art. 26 dello Statuto incrementatasi a seguito della destinazione del risultato dello scorso esercizio per € 1.982 mila.

Si fornisce di seguito l'analisi delle voci di patrimonio netto – così come richiesta dall'articolo 2427 del Codice Civile – suddivise in base alla loro origine, alla possibilità di utilizzazione e distribuibilità.

Natura/descrizione	Importo (€ migliaia)	Possibilità di utilizzazione	Quota disponi- bile	Riepilogo delle utilizzazioni effettuate negli ultimi tre esercizi	
				Per copertura perdite	Per altre ragioni
Capitale	80.579				
Riserve di utili:					
Riserva legale	7.710	B	-		
Fondo ricerca e sviluppo	48.196	B	-	-	-

Legenda: A: per aumento di capitale - B: per copertura perdite - C: per distribuzione ai soci

Per il prospetto di movimentazione del Patrimonio netto si fa qui riferimento al prospetto di dettaglio riportato in calce al presente documento.

FONDI PER RISCHI E ONERI

Altri fondi € 9.803.756 (2021: € 9.645.903)

Il fondo rischi e oneri comprende per un importo pari ad € 4.474 mila il Fondo Rischi Assicurativi, il Fondo Abbattimento Crediti SSN per € 3.572 mila, il Fondo imposte differite per € 525 mila e il fondo altri rischi per € 1.233 mila.

Il Fondo Abbattimento Crediti SSN include una quota a titolo di rettifica sulla produzione per complessivi € 3.572 mila, di cui € 1.705 mila per le prestazioni ambulatoriali, € 1.516 mila per l'attività di ricovero, ed € 351 mila per l'attività di somministrazione di farmaci antitumorali.

Nel corso dell'esercizio 2022, la ATS Città Metropolitana di Milano ha comunicato gli importi riconosciuti relativi alla produzione 2021 per l'attività ambulatoriale, di ricovero e di somministrazione farmaci, alle maggiorazioni tariffarie 2020 e 2021 oltre ai rimborsi covid; si è provveduto pertanto al completo utilizzo del relativo fondo abbattimento crediti SSN accantonato nell'esercizio 2021 contabilizzando altresì sopravvenienze per complessivi € 6.518 mila.

Il fondo rischi assicurativi incrementa complessivamente di € 169 mila, a fronte di accantonamenti per € 996 mila e utilizzi per € 827 mila che hanno comportato sopravvenienze attive per € 386 mila.

L'incremento della voce Altri Fondi rischi è da riferirsi ad accantonamenti per € 410 mila a fronte di utilizzi € 150 mila del fondo rischi per la copertura dei costi di bonifica dell'area prospiciente alla palazzina IEO Office.

Il fondo imposte differite si riferisce agli effetti riconducibili al disavanzo di fusione per incorporazione con Sogego Srl avvenuta nel dicembre 2020.

Si riporta di seguito il prospetto relativo alla movimentazione dei fondi sopradescritti.

Descrizione	Saldo al 31.12.2021	Utilizzo	Accantonamento	Saldo al 31.12.2022
Fondo abbattimento crediti SSN	3.838	(3.838)	3.572	3.572
Fondo rischi assicurativi	4.305	(827)	996	4.474
Altri fondi rischi	973	(150)	410	1.233
Fondo imposte differite	530	(5)	-	525
	9.646	(4.820)	4.978	9.804

TRATTAMENTO DI FINE RAPPORTO DI LAVORO SUBORDINATO

Trattamento di fine rapporto di lavoro subordinato € 5.370.939 (2021: € 5.232.975)

La voce è stata calcolata in base alle disposizioni della legge n. 297 del 29.5.1982 e successive modificazioni e comprende le quote maturate a favore del personale in essere alla data del 31 dicembre 2022. Dall'esercizio 2007 vengono smobilizzate le quote maturate nel periodo e trasferite ai fondi secondo le modalità previste dal D. Lgs. n. 252 del 5/12/2005.

Con l'istituzione del Fondo per l'erogazione ai lavoratori dipendenti del settore privato dei trattamenti di fine rapporto di cui all'articolo 2120 del Codice Civile (Fondo di Tesoreria gestito dall'INPS per conto dello Stato), i datori di lavoro che hanno alle proprie dipendenze almeno 50 addetti sono obbligati a versare a tale Fondo di Tesoreria le quote di TFR maturate in relazione a quei lavoratori che non abbiano scelto di conferire la propria quota di liquidazione ad un fondo di previdenza complementare. L'importo del Trattamento di Fine Rapporto esposto in bilancio è quindi indicato al netto delle quote versate al suddetto Fondo di Tesoreria INPS e fondi complementari.

Il personale in forza alla data del 31 dicembre 2022 è pari a n. 1.375 unità ed è così ripartito:

	2022	2021
Altre figure sanitarie	676	653
Amministrativi	377	381
Medici e specializzati	322	301
Totale (di cui n. 4 con qualifica di dirigente)	1.375	1.335

Nel corso del 2022 il Fondo Trattamento di Fine Rapporto si è così movimentato, in migliaia di Euro:

Saldo al 31.12.2021	Accantonamento	Utilizzi	Tfr su retribuzioni differite (*)	Trasferimenti	Anticipi	Saldo al 31.12.2022
5.233	4.168	(1.785)	9	(1.849)	(405)	5.371

(*) La posta ha come contropartita un debito verso il personale classificato tra gli altri debiti

La voce trasferimenti riguarda il giroconto del TFR al Fondo Tesoreria Inps (€ 652 mila), al Fondo CAIMOP (€ 788 mila), al fondo Mario Negri (€ 39 mila) ed a fondi aperti (€ 370 mila).

DEBITI

Tutti i debiti di cui alle poste che seguono hanno scadenze entro i 12 mesi.

Ai sensi del punto 6 art 2427 C.C. si precisa che non sono significativi i debiti verso soggetti appartenenti ad aree geografiche diverse dall'Italia.

Debiti verso fornitori	€	60.372.506	(2021: €	49.587.060)
-------------------------------	----------	-------------------	-----------------	--------------------

La voce rappresenta quanto dovuto ai fornitori per beni e servizi fatturati (€ 42.543 mila) e da fatturare (€ 17.830 mila), relativi ad acquisti di fattori produttivi, attrezzature e prestazioni di servizi.

Debiti verso imprese controllate	€	12.637.220	(2021: €	12.611.489)
---	----------	-------------------	-----------------	--------------------

La posta si riferisce per € 12.501 mila ai debiti verso la controllata Centro Cardiologico Monzino spa relativi all'operazione *cashpooling* oltre a debiti commerciali per servizi resi dalla stessa.

Debiti tributari	€	3.929.381	(2021: €	4.037.351)
-------------------------	----------	------------------	-----------------	-------------------

I debiti tributari comprendono principalmente € 3.239 mila per ritenute sulle retribuzioni del personale dipendente, € 87 mila per IRAP, € 326 mila per IRES, € 99 mila per ritenute su compensi di lavoratori autonomi, € 79 mila per ritenute sulle prestazioni derivanti da collaborazioni coordinate e continuative e € 23 mila per ritenute sulle prestazioni derivanti da borsisti.

Debiti verso Istituti di previdenza € 5.001.725 (2021: € 4.435.657)

Rappresentano i debiti verso INPS, FASDAC, Fondo Previdenza Dirigenti Aziende del Commercio, CAIMOP e INAIL, nonché verso i fondi pensione come di seguito riportati.

Descrizione	2022	2021
<u>ISTITUTI DI PREVIDENZA</u>		
- INPS e INAIL	3.712	3.538
- CAIMOP	259	122
- ENPAM MEDICI	85	85
- INPS LAVORATORI AUTONOMI	68	64
- Dirigenti	27	4
<u>FONDI T.F.R.</u>		
- Fondo Tesoreria INPS	253	273
- CAIMOP	432	215
- Fondi Diversi	166	135
TOTALE	5.002	4.436

Nei debiti verso INPS sono compresi i debiti contributivi sulle competenze differite.

Altri debiti 19.229.502 (2021: € 16.376.681)

Tale voce si riferisce principalmente alla libera professione intramoenia (€ 4.669 mila), a debiti per Università LP (€ 2.945 mila), a debiti verso dipendenti per il conguaglio delle retribuzioni del mese di dicembre (€ 2.411 mila), a ferie residue (€ 2.286 mila), a debiti per progetti di ricerca (€ 793 mila) a premi di incentivazione (€ 1.662 mila), ad arretrati per rinnovo CCNL (€ 1.018 mila), a MBO/Bonus (€ 768 mila), a welfare aziendale (€ 549 mila), a debiti legati alle eredità (€ 499 mila), ad acconti da clienti (€ 371 mila), a debiti per Università (€ 402 mila), alle refusioni franchigie (€ 341 mila), a debiti per le competenze dei collaboratori progetto (€ 281 mila) e borsisti (€ 166 mila), a quattordicesima mensilità (€ 27 mila).

Di seguito l'evoluzione dei saldi 2021 – 2022 per le voci soggette a conguaglio.

	Saldo iniziale	Importi erogati	Sopravvenienze	Importo maturato	Saldo finale
Libera Professione dipendenti	4.121	(3.757)	-	4.305	4.669
Ferie Residue	1.720	-	-	566	2.286
Premi incentivazione	1.602	(1.454)	-	1.514	1.662
Arretrati CCNL	1.239	(854)	(61)	694	1.018
MBO/Bonus	653	(515)	-	630	768
Quattordicesima	27	(27)	-	27	27
TOTALE	9.362	(6.607)	(61)	7.736	10.430

RATEI E RISCONTI € 30.035.485 (2021: € 20.971.282)

Ratei passivi € 45.792 (2021: € 60.000)

Trattasi di importi relativi principalmente a contratti di assicurazioni.

Risconti passivi	€ 29.989.693	(2021: € 20.911.282)
-------------------------	---------------------	-----------------------------

La posta include i risconti dei contributi in conto capitale, legati alla donazione del dr. Braggiotti (€ 8.504 mila al netto della relativa imposta), dal Ministero della Salute, dalla Fondazione AIRC per la Ricerca sul Cancro e dalla Fondazione IEO – CCM per € 1.502 mila.

Per la restante parte trattasi principalmente di contributi ricevuti da terzi per programmi di ricerca rinviati all'esercizio successivo, sulla base dello stato di avanzamento dei singoli progetti, il cui dettaglio è il seguente

Ente	Importo
Contributo 5 per 1000	10.963
Fondazione IEO-CCM	2.081
Fondazione AIRC	1.891
Credito d'imposta	1.508
Ministero della Salute	1.105
Imprese Private	1.081
European Commission	676
Altri	335
FUV	249
Ricerca corrente	95
Totale	19.984

COMMENTO ALLE VOCI DEL CONTO ECONOMICO

VALORE DELLA PRODUZIONE

Valore della produzione	€	264.481.892	(2021: € 258.373.840)
-------------------------	---	-------------	-----------------------

Ricavi delle vendite e delle prestazioni	€	216.783.979	(2021: € 207.867.986)
--	---	-------------	-----------------------

	2022	2021
Degenze SSN	52.617	51.477
Prestazioni ambulatoriali SSN	39.566	39.863
Rimborso farmaci SSN	28.552	27.362
Totale ricavi SSN	120.735	118.702
Degenze solventi	42.762	40.136
Prestazioni ambulatoriali solventi	39.199	37.119
Altri ricavi clinici	166	114
Prestazioni cliniche infragruppo	154	167
Totale ricavi solventi	82.281	77.536
Totale attività medico-sanitaria	203.016	196.238
Contributi funzioni ospedaliere	5.916	5.280
Attività di ricerca – trials	7.799	6.327
Attività di formazione	52	21
TOTALE	216.783	207.866

L'incremento dei ricavi e delle vendite delle prestazioni per complessivi € 8,9 milioni (4,3%) rispetto all'esercizio precedente deriva prevalentemente dall'incremento dell'attività medico sanitaria determinato dai seguenti effetti:

- ✓ un incremento significativo dei ricavi solventi pari ad € 4,7 milioni (6,1%);
- ✓ un incremento dei ricavi SSN pari ad € 2,0 milioni (1,7%), principalmente ascrivibili per € 1,2 milioni al "rimborso farmaci SSN" (ossia dei ricavi per farmaci antitumorali somministrati ambulatorialmente, che vengono rimborsati dal Servizio Sanitario ed il cui costo

è incluso nei costi dei medicinali, ad € 1,1 milioni all'incremento delle prestazioni SSN di ricovero.

Si segnala che nella voce "Degenze SSN" è compreso l'importo stimato per le maggiorazioni tariffarie ex DGR n. 350 del 2010 per € 2.688 mila (€ 2.771 mila nel 2021).

Per quanto riguarda i dati di attività, nel corso del 2022 sono stati dimessi n. 16.550 pazienti (n. 16.935 nel 2021) di cui n. 11.840 ordinari (n. 12.067 nel 2021).

Nell'esercizio 2022, n. 12.813 pazienti (n. 13.385 nel 2021) hanno usufruito della convenzione con il Servizio Sanitario Nazionale, mentre i restanti n. 3.737 (n. 3.550 nel 2021) si riferiscono a pazienti solventi.

I ricavi derivanti dall'attività convenzionata si attestano complessivamente ad € 120,7 milioni (€ 118,7 milioni nel 2021) e rappresentano il 59,5% (60,5% nel 2021) del totale dell'attività medico sanitaria.

Nel corso dell'esercizio, si è provveduto a contabilizzare una nota credito da emettere per € 3.306 mila riferibile alle prestazioni ambulatoriali eccedenti il *budget* assegnato.

Si segnala altresì che, a fronte di eventuali decurtazioni da parte degli organi di controllo sanitario, è stato effettuato l'accantonamento a Fondo abbattimento crediti SSN per € 3.572 mila, a cui si fa rimando.

La Regione Lombardia ha riconosciuto € 5.916 mila a titolo di rimborso per funzioni non tariffabili (€ 5.280 mila nel 2021).

I ricavi per *trials* clinici (€ 7.799 mila) incrementano di € 1.472 rispetto allo scorso esercizio (€ 6.327 mila).

Altri ricavi e proventi € 47.697.913 (2021: € 50.505.854)

La voce comprende:

	2022	2021
Contributi per programmi di ricerca	20.879	20.401
Contributi Ricerca 5 per mille	5.978	6.723
Totale contributi per programmi di ricerca	26.857	27.124
Recuperi da terzi	7.718	10.703
Sopravvenienze gestionali	8.733	10.488
Contributi Vari	2.021	257
Ricavi infragruppo	1.440	1.333
Contributo in conto capitale	528	492
Plusvalenze alienazione cespiti	400	109
Totale proventi diversi	20.840	23.382
TOTALE	47.697	50.506

Gli altri ricavi e proventi decrementano per € 2,8 milioni rispetto allo scorso esercizio.

I contributi del Ministero della Sanità per la Ricerca Corrente e Finalizzata, inclusi nei Contributi per programmi di ricerca, ammontano rispettivamente a € 9.820 mila e € 1.142 mila (€ 8.600 mila e € 1.287 mila nel 2021), evidenziando complessivamente un incremento pari al 10,9% rispetto allo scorso esercizio, pari ad € 1.074 mila. Si segnala che nel corso dell'esercizio si è provveduto a riscontare, per € 95 mila, il contributo per Ricerca Corrente 2021 assegnato nel mese di novembre; tale importo si riferisce, secondo le indicazioni ricevute dal Ministero della Salute, ad impegni di spesa assunti entro la fine dell'esercizio.

Sono stati confermati i contributi, seppur con importi variabili rispetto ai precedenti esercizi, della Fondazione AIRC per la Ricerca sul Cancro ETS per € 5.839 mila, da parte della Commissione Europea per € 1.687 mila, della Regione Lombardia € 331 mila, della Fondazione Umberto Veronesi per € 251 mila, del Ministero della Salute per € 561 mila, della Fondazione IEO – CCM per € 150 mila, i rimanenti contributi sono stati erogati da altri Enti italiani ed internazionali.

L'importo di competenza dei contributi in conto capitale è pari ad € 528 mila.

Risultano iscritti contributi relativi al contributo 5 per mille sulle dichiarazioni dei redditi relativi diverse campagne per € 5.978 mila come riepilogato nella tabella seguente:

	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	residui	totale
Campagna 2006 (redditi 2005)	2.200	2.335	2.382	929													7.846
Campagna 2007 (redditi 2006)		1.000	2.000	1.078	1.838	744											6.660
Campagna 2008 (redditi 2007)			1.670	3.260	943												5.873
Campagna 2009 (redditi 2008)				4.635	580												5.215
Campagna 2010 (redditi 2009)					4.802	74											4.876
Campagna 2011 (redditi 2010)						3.941	766										4.707
Campagna 2012 (redditi 2011)							2.556	823									3.379
Campagna 2013 (redditi 2012)								4.857									4.857
Campagna 2014 (redditi 2013)									3.610	693							4.303
Campagna 2015 (redditi 2014)										5.049	1.458						6.507
Campagna 2016 (redditi 2015)											5.477	1.207	-				6.684
Campagna 2017 (redditi 2016)												6.530	658				7.188
Campagna 2012 MIUR												641	-				641
Campagna 2014 MIUR												11	487	500	20		1.018
Campagna 2018 (redditi 2017)													7.287	-			7.287
Campagna 2019 (redditi 2018)													-	6.223	1.567		7.790
Campagna 2020 (redditi 2019)														-	4.391	3.300	7.691
																7.663	7.663
Totale	2.200	3.335	6.052	9.902	8.163	4.759	3.322	5.680	3.610	5.742	6.935	8.389	8.432	6.723	5.978	10.963	100.185

I recuperi da terzi comprendono i riaddebiti di spese per € 5.344 mila, (per € 2.923 mila contributi della Fondazione IEO – CCM), i ricavi per parcheggi per € 801 mila, addebiti vari ai pazienti per € 110 mila, i ricavi per la ristorazione per € 83 mila, e i ricavi per servizi vari per € 1.380 mila.

I ricavi infragruppo si riferiscono nel 2022 principalmente al riaddebito di quota parte del compenso dell'Amministratore Delegato, Direzioni centrali alla controllata Centro Cardiologico Monzino S.p.A. alla luce dell'assetto organizzativo del gruppo.

Le sopravvenienze attive gestionali, inferiori rispetto allo scorso esercizio per € 1.755, sono costituite da maggiori riconoscimenti di ATS Città di Milano e Regione Lombardia a valere sullo scorso esercizio (per attività ambulatoriale € 2,7 milioni, drg € 2,6 milioni, funzioni ospedaliere € 0,9 milioni, "File F" € 0,4 milioni), dal rimborso Agenzia delle Entrate (€ 0,6 milioni), da note credito su costi degli esercizi precedenti (€ 0,4 milioni), da maggiori ricavi derivanti da esercizi precedenti (€ 0,3 milioni), dalla proventizzazione del fondo rischi assicurativi (€ 0,4 milioni), dalla proventizzazione di debiti per costi del personale (€ 0,4 milioni).

COSTI DELLA PRODUZIONE

Costi della produzione € 260.160.703 (2021: € 255.541.284)

	2022	2021
Materie prime, sussidiarie, di consumo e merci	63.091.327	62.340.716
Variazione delle rimanenze	(168.305)	569.491
TOTALE	62.923.022	62.910.207

I consumi di merci, connessi all'attività svolta sono dettagliati come segue:

	2022	2021
Medicinali	33.026	32.693
Presidi sanitari	27.964	28.199
Materiali di consumo	565	647
Emocomponenti	1.368	1.371
TOTALE	62.923	62.910

I consumi sono in linea rispetto allo scorso esercizio.

Costi per servizi € 58.881.287 (2021: € 59.498.507)

Comprendono le seguenti voci:

	2022		2021	
Appalti per servizi di:				
. Ristorazione	2.438		2.314	
. Pulizia e disinfestazione	2.034		2.128	
. Gestione stabulario	660		698	
. Smaltimento rifiuti	563		458	
. Lavanderia	519		525	
. Vigilanza	424		506	
. Gas medicali	409		267	
. Trasporto del personale	210		210	
. Servizi Scientifici	212		174	
. Gestione Impianti	-		287	
		7.469		7.567
Consulenze e prestazioni professionali		15.748		15.747
Manutenzioni diverse		12.464		13.243
Convenzioni Universitarie		11.182		10.853
Utenze		3.773		3.848
Borse di studio dirette		2.135		2.286
Assicurazioni		1.804		2.207
Viaggi, riunioni, congressi e formazione		1.067		626
Emolumenti agli Organi Sociali		936		936
Altri servizi e collaborazioni d'ufficio		898		757
Pubblicità e promozione		592		645
Oneri bancari per carte di credito e altre commissioni		312		286
Prestazioni cliniche intragruppo		225		196
Spese postali		173		186
Trasporti		92		109
Varie		8		7
Documentazione tecnica		3		-
		51.412		51.932
TOTALE		58.881		59.499

I costi per servizi evidenziano, rispetto allo scorso esercizio, un decremento complessivo dell'1,4% pari ad € 618 mila.

Si evidenziano decrementi relativi alle manutenzioni per € 779 mila, alle assicurazioni per € 403 mila,

alle borse di studio per € 151 mila, alla gestione impianti per € 287 mila, alla pulizia e disinfestazione per € 94 mila.

Si evincono incrementi per € 441 mila ai viaggi, riunioni e congressi, per € 329 mila alle convenzioni universitarie, per € 142 mila al gas medicale e per € 141 mila altri servizi e collaborazioni d'ufficio, per € 105 mila al costo di smaltimento rifiuti.

La partita "Emolumenti agli organi sociali" comprende i compensi spettanti al Consiglio di Amministrazione (€ 850 mila), al Collegio Sindacale (€ 55 mila), nonché al costo dell'Organo di Vigilanza (€ 31 mila).

Gli onorari riconosciuti alla società di revisione rientrano nella voce altri servizi e collaborazioni di ufficio per € 62 mila, di cui € 40 mila per la revisione contabile e la sottoscrizione delle dichiarazioni fiscali, € 12 mila per la redazione del Bilancio sociale, € 4 mila per le procedure di verifica 350, € 3 mila per le procedure concordate per la verifica dei costi sostenuti per il personale dipendente impiegato nei programmi di ricerca e sviluppo ammessi alla deduzione IRAP ed e € 3 mila per la verifica sul bilancio XBRL.

Costi per godimento di beni di terzi **€ 6.750.189** **(2021: € 6.741.309)**

Tali costi sono relativi principalmente a canoni d'affitto IEO Day Centre (€ 3.844 mila), canoni d'affitto per laboratori di ricerca presso il Campus IFOM – IEO (€ 1.697 mila), noleggio elettromedicali (€ 309 mila), noleggio autovetture (€ 243 mila), affitto ambulatori IEO centro (€ 156 mila), altri affitti e noleggi (€ 160 mila), affitto via Lampedusa (€ 110 mila), noleggio attrezzature scientifiche (€ 54 mila), noleggi attrezzature d'ufficio (€ 57 mila), affitto Mirasole (€ 72 mila) e concessioni (€ 12 mila).

Costo per il personale € 95.782.233 (2021: € 91.393.997)

La voce comprende i costi sostenuti per le prestazioni di lavoro subordinato e lavoro interinale.

	€ per migliaia		Forza media	
	2022	2021	2022	2021
Retribuzioni e oneri accessori				
. Medici e laureati specializzati sanitari e di ricerca non medici	47.981	44.910	312	304
. Altre figure tecnico sanitarie				
Personale dipendente	30.556	29.808	666	653
. Amministrativi				
Personale dipendente	17.098	16.634	377	377
	95.635	91.352	1.355	1.334
Altri costi del personale	147	42	-	-
TOTALI	95.782	91.394	1.355	1.334

Il costo del personale dipendente incrementa per € 4.388 mila (4,8%).

L'aumento complessivo del costo per il personale è principalmente riferibile per € 3.071 mila (6,8%) all'incremento del costo per i medici, per € 748 mila (2,5%) all'incremento nel costo per i sanitari e per € 464 mila (2,8%) all'incremento del costo del personale amministrativo. L'aumento del costo per i medici è ascrivibile per € 874 mila ai maggiori riconoscimenti sull'attività libero professionale.

Il costo è comprensivo dell'accantonamento per rinnovi contrattuali pari a € 894 mila (€ 464 mila per altre figure sanitarie, € 240 mila per medici e laureati specializzati, ed € 190 mila per amministrativi).

La voce "Amministrativi" include anche il personale amministrativo a supporto dell'attività clinica e di ricerca (servizio accettazione, segreterie di reparto, personale di *reception*, centralino, servizi generali, sistemi informativi, *data manager*) che costituisce i due terzi del personale amministrativo dell'Istituto.

Gli "Altri Costi del Personale" si riferiscono principalmente a importi erogati nel corso dell'anno.

Ammortamento delle immobilizzazioni immateriali	€ 1.736.567	(2021: € 1.506.699)
--	--------------------	----------------------------

Ammortamento delle immobilizzazioni materiali	€ 10.237.221	(2021: € 9.786.182)
--	---------------------	----------------------------

Svalutazioni dei crediti compresi nell'attivo circolante e delle disponibilità liquide

€ 1.224.729	(2021: € 1.373.203)
--------------------	----------------------------

La voce si riferisce all'accantonamento in previsione del possibile rischio di inesigibilità relativo ai crediti solventi e a taluni crediti commerciali.

Accantonamenti per rischi	€ 4.977.890	(2021: € 4.877.866)
----------------------------------	--------------------	----------------------------

La posta include un importo pari ad € 3.572 mila relativo a stime su abbattimenti a fronte di crediti in essere dei quali non risulta determinato a tutt'oggi l'esatto ammontare incassabile relativi ad attività di ricovero, ambulatoriale e di somministrazione di farmaci antitumorali.

Si segnala che, alla luce dell'evoluzione della normativa regionale, l'Istituto ha provveduto ad appostare note di credito a storno della produzione non riconosciuta per € 3.306 mila, riferibili alle prestazioni ambulatoriali.

Nella posta contabile sono inclusi, inoltre, l'accantonamento al fondo rischi ed oneri a fronte di ulteriori eventuali rischi nei confronti di richieste di danni avanzati dai pazienti (€ 996 mila) nonché l'accantonamento con riferimento agli oneri di bonifica delle aree prospicienti la palazzina leo Office (€ 410 mila).

Oneri diversi di gestione

€ 17.647.565

(2021: € 17.453.314)

Sono costituiti dalle seguenti voci:

	2022	2021
Sopravvenienze passive e insussistenze dell'attivo	2.392	1.944
Oneri contributo INPS 10%	665	616
Contributo cattedre universitarie	419	548
Libri e giornali	320	353
Quote associative	98	102
Oneri contributo ENPAM	85	85
Altri	50	80
Totale	4.029	3.728
Imposte e tasse:		
. IVA indetraibile (pro-rata)	12.392	12.749
. IMU	632	628
. Tassa smaltimento rifiuti	278	253
. Altre	317	94
Totale	13.619	13.724
TOTALI	17.648	17.452

L'aliquota di indetraibilità dell'IVA si attesta all'80%, evidenziando un decremento di n. 1 punto percentuale rispetto all'esercizio precedente.

Le sopravvenienze passive e le insussistenze di attivo considerano per € 681 mila il *write-off* di costi progettuali capitalizzati negli scorsi esercizi nonché per € 789 gli impatti su un'eredità del 2020.

PROVENTI E ONERI FINANZIARI

Proventi e oneri finanziari	€ (96.668)	(2021: € (43))
------------------------------------	-------------------	-----------------------

Proventi da partecipazioni	-	(2021: € 167.007)
-----------------------------------	----------	--------------------------

La voce, lo scorso esercizio, considerava il dividendo incassato di Genextra.

Interessi e commissioni da altri e proventi vari	€ 33.138	(2021: € 28.220)
---	-----------------	-------------------------

La voce si riferisce principalmente per € 20 mila agli interessi riconducibili agli interessi attivi maturati sul c/c e per € 12 mila agli interessi maturati su depositi cauzionali.

Interessi e altri oneri finanziari verso controllate	€ 50.045	(2021: € 52.727)
---	-----------------	-------------------------

La posta considera gli interessi passivi pari allo 0,4% annuo maturati in seguito all'attivazione del *cash pooling* verso la controllata Centro Cardiologico Monzino SpA.

Interessi e altri oneri finanziari	€ 114.313	(2021: € 124.745)
---	------------------	--------------------------

Sono costituiti principalmente da € 44 mila per oneri su fideiussioni, da € 70 mila da sconti e abbuoni passivi.

Utili e perdite su cambi	€ 34.552	(2021: € (17.798))
---------------------------------	-----------------	---------------------------

La voce considera le differenze cambi sia positive sia negative sulle partite in valuta.

RETTIFICHE DI VALORE DI ATTIVITÀ FINANZIARIE

Rivalutazioni partecipazioni	€ 1.009.604	(2021: € 650.947)
-------------------------------------	--------------------	--------------------------

La voce accoglie il parziale ripristino di valore – nell'ambito di precedenti valutazioni – del costo storico di acquisto della controllata Centro Cardiologico Monzino S.p.A. pari al risultato dell'esercizio 2022 della stessa.

Svalutazioni partecipazioni	€ 5.966	(2021: € -)
------------------------------------	----------------	--------------------

La voce accoglie la parziale svalutazione di valore di Genextra.

IMPOSTE SUL REDDITO DELL'ESERCIZIO CORRENTI, DIFFERITE ED ANTICIPATE**Imposte sul reddito dell'esercizio, correnti, differite ed anticipate**

Imposte correnti	€ 1.325.958	(2021: € 966.590)
-------------------------	--------------------	--------------------------

Le imposte correnti di competenza dell'esercizio sono relative ad IRAP per € 982 mila e ad IRES per € 381 mila. Tale voce ricomprende inoltre le sopravvenienze attive relative alle imposte riferibili allo scorso esercizio per complessivi € 37 mila.

Si segnala che le perdite riportabili sono state completamente utilizzate e che dal 2013 l'Amministrazione finanziaria, in risposta ad interpelli predisposti, ha ritenuto che l'Istituto potesse fruire della riduzione di metà dell'aliquota IRES così come previsto dall'art. 6, comma 1, lettera a) del D.P.R. n. 601 del 1973 che prevista per gli enti ospedalieri.

Di seguito si fornisce il prospetto di riconciliazione dell'aliquota fiscale teorica ed effettiva al netto dell'imposta anticipata:

	Esercizio 2022			Esercizio 2021		
	Imponibile	Imposta	Aliquota	Imponibile	Imposta	Aliquota
			%			%
IRAP						
Valori teorici	106.306	4.146	3,90%	100.478	3.919	3,90%
Variazione in aumento	22.076	861	0,81%	19.794	772	0,77%
Variazioni in diminuzione	(103.203)	(4.025)	(3,79)%	(97.257)	(3.793)	(3,78)%
Valori effettivi IRAP	25.179	982	0,92%	23.014	898	0,89%
IRES						
Valori teorici	5.228	1.255	24,00%	2.203	529	24,00%
Variazione in aumento	11.422	2.741	52,44%	12.241	2.938	133,38%
Variazioni in diminuzione	(11.681)	(2.803)	(53,62)%	(9.539)	(2.289)	(103,94)%
Valori effettivi IRES	4.969	1.193	22,81%	4.904	1.177	53,44%
Utilizzo perdite pregresse	(2.362)	(567)	(10,8)%	(3.923)	(942)	(42,7)%
Deduzione ACE	(372)	(89)	(1,71)%	(704)	(169)	(7,67)%
Totale IRES	2.235	536	10,26%	277	67	3,02%
Impatto Ires agevolato	58,04%			58,52%		
	1.297	156	12,00%	162	19	12,00%
Impatto Ires non agevolato	41,96%			41,48%		
	938	225	24,00%	115	28	24,00%
Valori effettivi IRES Agevolato	2.235	381	7,28%	277	47	2,14%

(*) I dati di confronto relativi al 2021 sono quelli riportati nella dichiarazione Redditi 2022 (periodo d'imposta 2021)

Imposte differite e anticipate € 310.523 (2021: € 314.368)

Nella voce Fondi Rischi ed oneri, cui si fa rimando, sono iscritte imposte differite (€ 525 mila) a seguito degli effetti riconducibili al disavanzo di fusione per incorporazione con Sogego Srl avvenuta nel dicembre 2020.

La voce crediti per imposte anticipate (€ 2.478 mila), cui si fa rimando, è stata iscritta tenendo conto della movimentazione dei fondi.

migliaia di euro

Descrizione	Esercizio 2022		
	Imponibile	Imposta	Aliquota Effettiva
			%
IMPOSTE DIFFERITE			
Disavanzo di fusione allocato su fabbricato 1/1/2022 non riconosciuto fiscalmente	2.523	530	21,00%
Ammortamento indeducibile 2022	(26)	(5)	21,00%
Disavanzo di fusione allocato su fabbricato 31/12/2022 non riconosciuto fiscalmente	2.497	525	
IMPOSTE ANTICIPATE			
Fondo per rischi ed oneri 1/1/2022	9.116	1.916	21,00%
Utilizzi	(4.815)	(1.011)	
Accantonamenti	4.978	1.045	
Fondo per rischi ed oneri 31/12/2022	9.279	1.949	
Fondo svalutazione Crediti 1/1/2022	1.258	215	17,10%
Utilizzi	(884)	(151)	
Accantonamenti	1.018	174	
Fondo svalutazione Crediti 31/12/2022	1.392	238	
Fondo rischi per adeguamento CNL 1/1/2022	1.445	303	21,00%
Utilizzi	(1.028)	(216)	
Accantonamenti	894	188	
Fondo rischi per adeguamento CNL 31/12/2022	1.311	275	
Perdita fiscale IRES 1/1/2022	2.114	361	17,10%
Utilizzi	(2.114)	(361)	
Accantonamenti	0	0	
Perdita fiscale IRES 31/12/2022	0	0	
Importo dovuto definizione agevolata (Art. 1, commi da 186 a 202, L. 197/2022) al 1/1/2022	0	0	21,00%
Accantonamenti	78	16	
Importo dovuto definizione agevolata (Art. 1, commi da 186 a 202, L. 197/2022) al 31/12/2022	78	16	
TOTALE IMPOSTE ANTICIPATE	12.060	2.478	
CREDITO IMPOSTE ANTICIPATE		2.478	
IMPATTO NETTO IMPOSTE ANTICIPATE		(316)	

Impegni, garanzie e passività potenziali non risultanti dallo stato patrimoniale

Si riporta di seguito il dettaglio degli impegni, delle garanzie e delle passività potenziali non risultanti dallo stato patrimoniale al 31 dicembre 2022.

Fideiussioni a favore di terzi € **9.117.334** (2021: € **6.900.812**)

La composizione è la seguente:

Natura	Beneficiario	Importo
Finanziamento cattedre	Università di Milano	4.706
Contributi per la ricerca	Ministero Istruzione	311
Locazione laboratori di ricerca via Serio	Fabrica Immobiliare	3.945
Bollo Virtuale	Ministero delle Finanze	155
TOTALE		9.117



Riportiamo di seguito le informazioni richieste per l'esercizio 2021 dall'Art. 1, comma 125, della legge 4 agosto 2017, n. 124 relative agli incassi ricevuti nell'esercizio.

Ente Erogante	Causale	Data	Totale	
ATS Città di Milano	Funzioni 2020	21.10.2022	1.533.479	
	Funzioni 2021	07.11.2022	946.257	
	Funzioni 2022		28.01.2022	491.860
			28.02.2022	491.860
			28.03.2022	491.860
			27.04.2022	491.860
			27.05.2022	491.860
			28.06.2022	491.860
			28.07.2022	491.860
			29.08.2022	494.570
			27.09.2022	494.570
			27.10.2022	494.570
			29.11.2022	494.570
			22.12.2022	494.570
Totale ATS Città di Milano			8.395.606	
Ministero della Salute	Ricerca Finalizzata	25.03.2022	179.998	
		28.03.2022	164.698	
		22.04.2022	143.998	
		16.05.2022	134.998	
		17.05.2022	134.998	
		14.09.2022	42.996	
		19.09.2022	89.899	
		14.12.2022	64.998	
	5*1000 2021	27.09.2022	7.663.319	
	Ricerca Corrente 2022	02.11.2022	4.140.817	
		22.12.2022	5.006.587	
	Ricerca corrente reti 2022	12.12.2022	1.111.168	
Totale Ministero della Salute			18.878.474	
Totale complessivo			27.274.080	



Informazioni complementari

Per una maggiore informativa sulle variazioni intervenute nell'esercizio nella situazione patrimoniale e finanziaria, si allega il Prospetto di movimentazione del patrimonio netto.

PROSPETTO DI MOVIMENTAZIONE PATRIMONIO NETTO

	Capitale Sociale	Riserva sovrapprezzo quote	Riserva legale	Fondo Ricerca e Sviluppo	Riserva statutaria	Utile (Perdita) eser.prec.	Utile (Perdita) Esercizio	TOTALE
Destinazione risultato d'esercizio 2017			597	5.378			(5.975)	
Utile (Perdita) d'esercizio 2018							8.519	8.519
Saldi 31.12.2018	80.579		5.721	30.300			8.519	125.119
Destinazione risultato d'esercizio 2018			852	7.667			(8.519)	
Utile (Perdita) d'esercizio 2019							8.367	8.367
Saldi 31.12.2019	80.579		6.573	37.967			8.367	133.486
Destinazione risultato d'esercizio 2019			837	7.530			(8.367)	
Utile (Perdita) d'esercizio 2020							796	796
Saldi 31.12.2020	80.579		7.410	45.497			796	134.282
Destinazione risultato d'esercizio 2020			79	717			(796)	
Utile (Perdita) d'esercizio 2021							2.203	2.203
Saldi 31.12.2021	80.579		7.489	46.214			136.485	136.485
Destinazione risultato d'esercizio 2021			221	1.982			(2.203)	
Utile (Perdita) d'esercizio 2022							3.592	3.592
Saldi 31.12.2022	80.579		7.710	48.196			3.592	140.076