



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

Fondi 5 per mille ANNO 2020
Rendiconto finale di spesa € 1.383.457,26

Ente della Ricerca Sanitaria
Denominazione Ente: IRCCS Fondazione Casa Sollievo della Sofferenza
Codice fiscale: 00138660717
Sede legale: in San Giovanni Rotondo (FG), viale Cappuccini snc
Indirizzo di posta elettronica dell'ente: direzione generale@operapadrepio.it
Dati del rappresentante legale: Gino Gumirato, nato a Camposampiero (PD) il 14/02/1965, codice fiscale GMRGNI65B14B563W

Titolo del progetto: Sviluppo di modelli preclinici di patologia: modelli animali/5 per mille

Data di inizio progetto: 01/01/2022	Data di fine progetto: 31/12/2024
Fondi 5 per mille assegnati al progetto: € 415.037,18	

VOCI DI SPESA	QUOTA FINANZIATA CON FONDI 5 PER MILLE
Personale di ricerca (borsista, a contratto e di ruolo in quota parte)	258.618,01
Apparecchiature (ammortamento, canone di locazione/leasing)	31.824,81
Materiale d'uso destinato alla ricerca (per laboratori di ricerca, acquisto farmaci ecc.)	77.144,02
Spese di organizzazione (manifestazioni e convegni, viaggi e missioni ecc.)	47.450,34
Elaborazione dati	
Spese amministrative	
Altro (indicare quali)	
TOTALE	415.037,18

Il Responsabile del Progetto

Il Legale Rappresentante

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

Il Legale Rappresentante



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

Fondi 5 per mille ANNO 2022-2024
Abstract ed elenco pubblicazioni scientifiche

Ente della Ricerca Sanitaria

Denominazione Ente: Fondazione IRCCS Casa Sollievo della Sofferenza

Codice fiscale: 00138660717

Sede legale: Viale Cappuccini, 71013 San Giovanni Rotondo

Indirizzo di posta elettronica dell'ente: segreteria.scientifica@operapadrepio.it

Dati del rappresentante legale: Gino Gumirato

Titolo del progetto: Sviluppo di modelli preclinici di patologia: modelli animali

Abstract dei risultati ottenuti:

L’obiettivo principale di questo progetto è lo sviluppo e la caratterizzazione di modelli animali preclinici di patologie prevalentemente oncologiche, al fine di: i) caratterizzare in vivo le dinamiche tumorali; ii) indagare l’influenza del microbiota intestinale nella progressione della neoplasia, nella risposta ai farmaci e, di conseguenza, nella sopravvivenza dell’animale; iii) determinare l’effetto di trattamenti farmacologici in popolazioni tumorali con specifiche mutazioni genetiche; iv) valutare l’efficacia di terapie mirate nell’ambito della medicina di precisione. Nell’ambito delle ricerche sui tumori cerebrali (ossia il glioblastoma IDH1 wild-type), sul tumore del colon-retto, del pancreas, della mammella e su una rara forma di leucemia (T-ALL), sono stati sviluppati modelli in vivo specifici. In particolare, sono stati realizzati modelli xenogenici tramite *patient-derived tumor xenografts* (PDX) in animali immunocompromessi, mediante iniezione cellulare secondo protocolli sottocutanei, endovenosi e ortotopici, pienamente in linea con le finalità progettuali. I successivi paragrafi illustrano in modo articolato i diversi filoni di ricerca condotti nei modelli oncologici, immunologici e neurobiologici, evidenziando come l’approccio integrato basato su modelli animali, microbiota e terapie mirate abbia permesso di ottenere risultati coerenti e complementari nell’ambito della caratterizzazione preclinica.

1) Sviluppo di modelli ortotopici di glioblastoma e ruolo del microbiota intestinale

Nel contesto delle ricerche dedicate ai tumori solidi, con particolare attenzione al glioblastoma multiforme (GBM), sono state svolte attività di isolamento, stabilizzazione e caratterizzazione di linee staminali tumorali (CSCs) ottenute da materiale post-operatorio di pazienti. Questo lavoro ha permesso di ottimizzare un protocollo per la generazione di modelli murini ortotopici, fondamentali per studiare i meccanismi che determinano l’elevata aggressività, la farmacoresistenza del GBM e lo sviluppo di nuove terapie. L’utilizzo del modello ortotopico, basato sull’inoculo intracerebrale di CSCs derivate da

pazienti, si è rivelato cruciale in quanto solo in vivo è stato possibile osservare differenze significative nella capacità tumorigenica, nella diffusione infiltrativa e nella letalità associate ai diversi sottotipi di CSCs, riflettendosi nei dati di sopravvivenza animale e consentendo una chiara distinzione funzionale tra i sottotipi. Questo sistema sperimentale ha inoltre fornito una piattaforma clinicamente rilevante per valutare l'efficacia di nuove combinazioni terapeutiche, dimostrando il loro potenziale nel ridurre l'invasività e la progressione tumorale.

E' inoltre in fase di avvio uno studio che include l'analisi del ruolo della disbiosi intestinale nel GBM. A tal fine verranno esaminate anche le feci dei topi trapiantati con CSCs di diversi sottotipi, per verificare l'eventuale associazione tra profili microbici e comportamento tumorale, con l'obiettivo di definire una firma microbica peculiare del GBM da integrare con i dati trascrittomici.

2) Modelli murini per tumore del pancreas, disturbi neuropsichiatrici e malattie neurodegenerative: interazione tra infiammazione, metabolismo e microbiota

Nell'ambito dello studio del cancro del pancreas, abbiamo generato un modello animale in cui abbiamo testato gli effetti antinfiammatori e antitumorali del butirrato, un prodotto della fermentazione batterica delle fibre. Abbiamo osservato che la somministrazione del butirrato, da solo o combinato al trattamento chemioterapico a base di gemcitabina, ha ridotto significativamente la stromatogenesi associata al tumore, ha preservato l'integrità della mucosa intestinale, ha influenzato la composizione del microbiota fecale aumentando i batteri produttori di acidi grassi a catena corta e riducendo alcuni microrganismi pro-infiammatori, e ha inoltre migliorato le alterazioni a livello sierico di alcuni marcatori di danno renale ed epatico.

In uno studio successivo, abbiamo implementato due modelli murini di cancro del pancreas (che esprimevano rispettivamente una forma wild-type e mutata del gene KRAS), in cui abbiamo indagato gli effetti di una specifica miscela di probiotici somministrata da sola o in combinazione con trattamento chemioterapico a base di gemcitabina + nab-paclitaxel. Abbiamo osservato che la miscela di probiotici ha ridotto la stromatogenesi associata al tumore, ha contrastato la disbiosi indotta da chemioterapia ripristinando ricchezza microbica e batteri benefici produttori di acidi grassi a catena corta, ha migliorato gli effetti collaterali della terapia alleviando i danni intestinali e migliorando la conta ematica.

Nell'ambito di uno studio sui disturbi dello spettro autistico, è stato generato un modello animale inducendo l'attivazione immunitaria materna (MIA), nota come fattore di rischio per questi disturbi, ed abbiamo caratterizzato gli effetti di tale attivazione sul comportamento, sulla neuroinfiammazione e sul microbiota intestinale della prole. Nella prole sottoposta a MIA abbiamo osservato significative alterazioni comportamentali e cambiamenti in specifici gruppi tassonomici del microbiota intestinale che ricapitolano quelli osservati nei bambini con disturbi dello spettro autistico.

Nell'ambito di uno studio murino riguardante l'atassia di Friedreich, una malattia neurodegenerativa in cui un aumento dell'adiposità viscerale, dell'infiammazione e dell'aumentato rischio di diabete ne peggiorano la prognosi, abbiamo osservato una riduzione di batteri produttori di butirrato nel microbiota intestinale. Pertanto, abbiamo indagato gli effetti di una dieta arricchita in butirrato in questi animali, osservando una riduzione delle anomalie a livello del tessuto adiposo bianco viscerale ed una riduzione delle caratteristiche metaboliche simil-diabetiche.

Nell'ambito di uno studio in vivo volto a indagare il ruolo della tossina Cytotoxic Necrotizing Factor 1 (CNF1) di *Escherichia coli*, abbiamo osservato che la somministrazione intrarettale ripetuta di CNF1 induce la formazione di foci criptici aberranti e displastici e la formazione di adenomi coloretali in un modello di malattia infiammatoria intestinale. Questi effetti sono accompagnati da un aumento dell'infiltrazione neutrofila nel tessuto del colon, da un ambiente misto di citochine pro-infiammatorie e anti-infiammatorie e dalla modulazione pro-tumorale del microbiota

fecale.

3) Modelli PDX di leucemia linfoblastica acuta T e validazione in vivo di nuovi target molecolari

Nel triennio 2022–2024, nell'ambito della leucemia linfoblastica acuta a cellule T (T-ALL), neoplasia ematologica aggressiva che origina dalla trasformazione maligna di progenitori linfocitari T bloccati in fasi precoci della differenziazione, l'attività *in vivo* ha rappresentato un elemento centrale per validare i risultati ottenuti mediante approcci trascrittomici, funzionali e immunofenotipici *in vitro*. In particolare, modelli di xenotrapianto in topi immunocompromessi (principalmente ceppi NSG) sono stati utilizzati per valutare il ruolo di specifici pathway oncogenici, recettori di superficie e microRNA nella progressione di popolazioni leucemiche umane arricchite in cellule staminali leucemiche (LSC). Per la generazione di modelli xenograft (PDX), le cellule leucemiche derivate da pazienti affetti da T-ALL sono state purificate direttamente da sangue periferico o midollo osseo e successivamente inoculate senza alcuna espansione preliminare, consentendo di riprodurre fedelmente l'eterogeneità e l'aggressività della malattia umana. L'analisi dei modelli murini ha confermato il ruolo di segnali intracellulari - tra cui vie di segnalazione mediate dai recettori NOTCH1 e β -catenina - nel sostenere la crescita leucemica, promuovere la chemioresistenza e mantenere compartimenti staminali leucemici. I risultati ottenuti *in vivo* supportano l'identificazione di nuovi target terapeutici e forniscono una base solida per lo sviluppo di strategie immunoterapiche avanzate, incluse piattaforme CAR-T dirette contro marcatori cellulari selettivi, la cui efficacia sarà ulteriormente valutata in combinazione con trattamenti antitumorali convenzionali.

4) Ruolo dei microRNA nella progressione e metastatizzazione del tumore alla mammella

Nell'ambito dello studio PORTENT, incentrato sul tumore metastatico alla mammella, gli esperimenti in vivo sono stati progettati per investigare il potenziale ruolo dei microRNA (miRNA) miR-3916 e miR-3613-5p nella regolazione delle fasi iniziali della formazione tumorale e nella loro capacità di diffusione verso organi distanti. La letteratura scientifica indica che le cellule di carcinoma mammario triple negative MDA-MB-231 possiedono una spiccata capacità di metastatizzazione spontanea in modelli murini, rendendole un modello consolidato per lo studio della progressione tumorale e della formazione di metastasi. In una fase preliminare del progetto, questa capacità metastatica è stata confermata e sono stati definiti i parametri ottimali per l'inoculo cellulare, in modo da ottenere una diffusione tumorale sistemica riproducibile. Nel primo set sperimentale, sono stati iniettati 3 milioni di cellule/mL di cloni stabili nel grasso mammario di topi immunodeficienti NOD.CB17-Prkdcscid IL2rgtm1/Bcgen (NSG). Questo approccio ha consentito la formazione di un nodulo tumorale primario e la comparsa di metastasi epatiche e polmonari entro 8 settimane dall'inoculo, confermando l'affidabilità del modello per studiare sia la crescita primaria che la disseminazione metastatica. Successivamente, sono stati generati cloni stabili di cellule MDA-MB-231 che sovraesprimono miR-3916 e miR-3613-5p, che saranno utilizzati nei prossimi mesi per valutare l'effetto della sovraespressione di questi microRNA sulla formazione del nodulo primario e sulla comparsa di metastasi. Questi studi permetteranno di determinare in modo più dettagliato il ruolo dei miRNA nella progressione tumorale, nella capacità metastatica e nello sviluppo delle metastasi a distanza, contribuendo a identificare potenziali target terapeutici per il trattamento dei tumori mammari aggressivi.

Prodotti della Ricerca (correlati al progetto):

Elenco pubblicazioni su riviste indicizzate

- 1: Fontana A, Barbano R, Pasculli B, Mazza T, Palumbo O, **Binda E**, Trivieri N, Mencarelli G, Laurenzana I, Lamorte D, De Luca L, Caivano A, Biagini T, Rendina M, Lo Mele A, Prencipe G, Bravaccini S, Murgo R, Ciuffreda L, Morritti M, Valori VM, Di Lisa FS, Vici P, Castelvetero M, Carella M, Graziano P, Maiello E, Copetti M, Esteller M, **Parrella P**. Development of a microRNA-based prognostic model for accurate prediction of distant metastasis in breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2025 Sep 29;27(1):170. doi: 10.1186/s13058-025-02124-4. PMID: 41024243; PMCID: PMC12482499.
- 2: Tamiro, F., Padovano, C., De Santis, E., Di Iasio, S., Sansico, D. F., Canistro, V., Colucci, M., Di Nunzio, C., Bruno, G., Doshi, K., Totaro, A., Gu, E., Santodirocco, M., Weng, A. P., & **Giambra, V.** (2025). NOTCH1 dimeric signaling is essential for T-cell leukemogenesis and leukemia maintenance. *Blood*, 145(24), 2887–2902. <https://doi.org/10.1182/blood.2024027020>
- 3: Tozzi M, Fiore A, Travaglione S, Marcon F, Rainaldi G, Germinario EAP, Laterza I, Donati S, Macchia D, Spada M, Leoni O, Quattrini MC, Pietraforte D, Tomasoni S, Torrigiani F, Verin R, Matarrese P, Gambardella L, Spadaro F, Carollo M, Pietrantonì A, Carlini F, Panebianco C, **Pazienza V**, Colella F, Lucchetti D, Sgambato A, Sistigu A, Moschella F, Guidotti M, Vincentini O, Maroccia Z, Biffoni M, De Angelis R, Bracci L, Fabbri A. E. Coli cytotoxic necrotizing factor-1 promotes colorectal carcinogenesis by causing oxidative stress, DNA damage and intestinal permeability alteration. *J Exp Clin Cancer Res.* 2025 Jan 29;44(1):29. doi: 10.1186/s13046-024-03271-w.
- 4: Colucci M, Trivieri N, Mencarelli G, De Santis E, Sansico F, Tamiro F, Visioli A, Barile C, Pracella R, Rossi G, **Binda E**, **Giambra V**. A functional role of Ephrin type-B receptor 6 (EPHB6) in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Biomark Res.* 2023 Oct 20;11(1):92. doi: 10.1186/s40364-023-00531-3. PMID: 37858274; PMCID: PMC10588013.
- 5: Visioli A, Trivieri N, Mencarelli G, Giani F, Copetti M, Palumbo O, Pracella R, Cariglia MG, Barile C, Mischitelli L, Soriano AA, Palumbo P, Legnani F, DiMeco F, Gorgogliione L, Pesole G, Vescovi AL, **Binda E**. Different states of stemness of glioblastoma stem cells sustain glioblastoma subtypes indicating novel clinical biomarkers and high-efficacy customized therapies. *J Exp Clin Cancer Res.* 2023 Sep 21;42(1):244. doi: 10.1186/s13046-023-02811-0. PMID: 37735434; PMCID: PMC10512479.
- 6: Turchi R, Sciarretta F, Ceci V, Tiberi M, Audano M, Pedretti S, Panebianco C, Nesci V, **Pazienza V**, Ferri A, Carotti S, Chiurchiù V, Mitro N, Lettieri-Barbato D, Aquilano K. Butyrate prevents visceral adipose tissue inflammation and metabolic alterations in a Friedreich's ataxia mouse model. *iScience.* 2023 Aug 28;26(10):107713. doi: 10.1016/j.isci.2023.107713. eCollection 2023 Oct 20.
- 7: Murgo, E., De Santis, E., Sansico, F., Melocchi, V., Colangelo, T., Padovano, C., Colucci, M., Carbone, A., Totti, B., Basti, A., Gottschlich, L., Relogio, A., Capitano, N., Bianchi, F., Mazzocchi, G., & **Giambra, V.** (2023). The circadian clock circuitry modulates leukemia initiating cell activity in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR, 42(1), 218. <https://doi.org/10.1186/s13046-023-02799-7>

- 8: Panelli, P., De Santis, E., Colucci, M., Tamiro, F., Sansico, F., Miroballo, M., Murgo, E., Padovano, C., Gusscott, S., Ciavarella, M., Chavez, E. A., Bianchi, F., Rossi, G., Carella, A. M., Steidl, C., Weng, A. P., & **Giambra, V.** (2023). Noncanonical β -catenin interactions promote leukemia-initiating activity in early T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 141(13), 1597–1609. <https://doi.org/10.1182/blood.2022017079>
- 9: Panebianco C, Pisati F, Villani A, Andolfo A, Ulaszewska M, Bellini E, Ferro C, Lombardi R, Orsenigo F, Latiano TP, Belmonte B, Tripodo C, Perri F, **Pazienza V.** Counteracting gemcitabine+nab-paclitaxel induced dysbiosis in KRAS wild type and KRASG12D mutated pancreatic cancer in vivo model. *Cell Death Discov.* 2023 Apr 5;9(1):116. doi: 10.1038/s41420-023-01397-y.
- 10: Colangelo, T., Panelli, P., Mazzarelli, F., Tamiro, F., Melocchi, V., De Santis, E., Cuttano, R., Palumbo, O., Rossi, G., Bianchi, F., & **Giambra, V.** (2022). Extracellular vesicle microRNAs contribute to Notch signaling pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Molecular cancer*, 21(1), 226. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01698-3>
- 11: Mazzarelli A, Giancola ML, Fontana A, Piselli P, **Binda E**, Trivieri N, Mencarelli G, Marchioni L, Vulcano A, De Giuli C, Panebianco C, Villani A, Copetti M, Perri F, Fontana C, Nicastri E, Pazienza V. Gut microbiota composition in COVID-19 hospitalized patients with mild or severe symptoms. *Front Microbiol.* 2022 Dec 6;13:1049215. doi: 10.3389/fmicb.2022.1049215. PMID:36560946; PMCID: PMC9763305.
- 12: Trivieri N, Visioli A, Mencarelli G, Cariglia MG, Marongiu L, Pracella R, Giani F, Soriano AA, Barile C, Cajola L, Copetti M, Palumbo O, Legnani F, DiMeco F, Gorgoglione L, Vescovi AL, **Binda E.** Growth factor independence underpins a paroxysmal, aggressive Wnt5a^{High}/EphA2^{Low} phenotype in glioblastoma stem cells, conducive to experimental combinatorial therapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 2022 Apr 12;41(1):139. doi: 10.1186/s13046-022-02333-1. PMID: 35414102; PMCID: PMC9004109.
- 14: Tartaglione AM, Villani A, Ajmone-Cat MA, Minghetti L, Ricceri L, **Pazienza V**, De Simone R, Calamandrei G. Maternal immune activation induces autism-like changes in behavior, neuroinflammatory profile and gut microbiota in mouse offspring of both sexes. *Transl Psychiatry.* 2022 Sep 14;12(1):384. doi: 10.1038/s41398-022-02149-9.
- 15: Panebianco C, Villani A, Pisati F, Orsenigo F, Ulaszewska M, Latiano TP, Potenza A, Andolfo A, Terracciano F, Tripodo C, Perri F, **Pazienza V.** Butyrate, a postbiotic of intestinal bacteria, affects pancreatic cancer and gemcitabine response in in vitro and in vivo models. *Biomed Pharmacother.* 2022 Jul;151:113163. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113163. Epub 2022 May 24.

Data 03/12/2025

Il Responsabile del Progetto

Dott.ssa Elena Binda

Il Legale Rappresentante
Firmato digitalmente da: Gino
Gumirato
Data: 04/12/2025 14:12:07

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

Il Legale Rappresentante