



FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECHNICHE
BRESCIA

I MODELLI ANIMALI SPONTANEI PER LO STUDIO DELLA FISIOLOGIA E PATOLOGIA DELL'UOMO

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECHNICHE - BRESCIA

1°2

I TUMORI SPONTANEI NEGLI ANIMALI COME MODELLI DI STUDIO PER L'ONCOLOGIA COMPARATA

PAOLO CASCIO, RAFFAELLA DE MARIA

Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

Ormai da alcuni anni si è ampiamente diffusa in ambito scientifico la consapevolezza che i tumori spontanei degli animali domestici rappresentano validi modelli sperimentali per lo studio della biologia del cancro e per lo sviluppo di nuove strategie e agenti terapeutici, i cui risultati sono a tutti gli effetti validi e utilizzabili anche in ambito dell'oncologia umana. E' lecito, quindi, chiedersi quali siano gli aspetti peculiari che costituiscono i punti di forza del cosiddetto "Modello degli animali domestici" e che hanno permesso all'oncologia comparata di valicare gli angusti confini di un interesse puramente veterinario, arrivando a ritagliarsi un ruolo di primo piano anche nel panorama estremamente ampio degli studi sui tumori umani, come dimostra il numero sempre crescente di articoli di oncologia comparata che vengono pubblicati su importanti riviste scientifiche internazionali (1-7).

Un primo motivo del successo scientifico di questo approccio sperimentale risiede nell'importante considerazione che le neoplasie degli animali domestici (*in primis* riferendosi a cane e gatto, ma non solo) si sviluppano spontaneamente, mentre i modelli sperimentali di laboratorio normalmente basati sull'utilizzo di piccoli roditori (topi, ratti, cavie) inducono i tumori o tramite il ricorso a cancerogeni artificiali di natura chimico-fisica o tramite trapianti, spesso in presenza di modificazioni artificiali del sistema immunitario, il che solleva dubbi sulla reale possibilità di generalizzare i risultati ottenuti. Importanti scoperte effettuate nel corso degli ultimi decenni hanno, infatti, permesso di evidenziare in maniera molto chiara il ruolo svolto dal sistema immunitario sia nel contrastare la crescita sia nel modificare le caratteristiche fenotipiche dei tumori tramite una progressiva selezione di varianti più aggressive e più adatte a sfuggire al controllo immunitario (8,9).

La progressiva delucidazione di questi meccanismi immunologici anti-tumorali, che riguardano sia l'immunità innata (costituita essenzialmente dall'insieme delle cellule fagocitiche, dalle cellule NK - natural killer - e dalle citochine) sia quella acquisita (basata principalmente sull'azione degli anticorpi e dei linfociti B e T) ha permesso di chiarire come l'insorgenza e il successivo sviluppo della malattia tumorale siano il risultato di una continua e dinamica interazione tra le proprietà peculiari (in particolare l'esuberanza proliferativa e la resistenza a ogni meccanismo di controllo e autolimitazione) delle cellule neoplastiche con le multiformenti attività di contrasto messe in atto a ondate successive dal sistema immunitario (10,11).

La comprensione sempre più approfondita dei complessi networks cellulari e molecolari che operano a livello dell'interfaccia tumore-sistema immunitario viene sempre più sfruttata a scopo clinico tramite nuovi farmaci (es. anticorpi monoclonali) o nuove strategie terapeutiche (es. vaccinazioni o re-infusione nei pazienti di linfociti citotossici CD8⁺ anti-tumorali espansi *in vitro*) miranti a ottenere una selettiva eliminazione delle cellule cancerose grazie a un potenziamento diretto del sistema immunitario o tramite la rimozione di meccanismi inibitori che ne limitano l'efficacia anti-neoplastica (12-14).

Alla luce di quanto esposto fino ad ora, risulta dunque facilmente comprensibile come dati ottenuti dallo studio di tumori spontanei, che si sviluppano pertanto nel contesto di un sistema immunitario perfettamente funzionante, abbiano un'importanza equivalente e siano sotto

molti punti di vista complementari rispetto a risultati ricavati utilizzando animali da laboratorio che, se da un lato permettano un migliore controllo di alcune variabili di tipo genetico e ambientale, dall'altro si caratterizzano normalmente per la presenza di un sistema immunitario farmacologicamente o geneticamente pesantemente compromesso quando non del tutto inattivo.

Un ulteriore aspetto che rende estremamente vantaggioso l'utilizzo del modello degli animali domestici in oncologia comparata risiede nella fondamentale osservazione che molte delle neoplasie spontanee che colpiscono gli animali d'affezione presentano un comportamento biologico, molecolare e istopatologico molto simile (quando non del tutto identico) a quello che si riscontra nei corrispondenti tumori umani. Questa considerazione, che può apparire abbastanza scontata considerando che stiamo comunque parlando di mammiferi superiori che condividono, ovviamente, i principali meccanismi cellulari, biochimici e biomolecolari di base che presiedono ai processi di differenziamento, accrescimento, adattamento e riproduzione cellulari, in realtà ha faticato non poco a essere accettata soprattutto in ambito di medicina umana, dove paradossalmente sembrava quasi che le neoplasie dell'uomo dovessero avere più somiglianze con quelle del topo piuttosto che con quelle del cane o del gatto. Questa sorta di diffidenza è stata però ormai ampiamente superata nel corso di questi ultimi anni, e oggi è ampiamente accettato che molte delle neoplasie spontanee che affliggono gli animali domestici rappresentano un valido modello sperimentale per effettuare studi di tipo biochimico, biomolecolare e farmacologico, i cui risultati possono poi essere in buona parte traslati direttamente in ambito di medicina umana.

Ulteriori considerazioni che rendono estremamente utile il ricorso agli animali domestici riguardano l'elevata taglia corporea, le risposte simili agli agenti citotossici e una più breve durata della vita, che sono tutti elementi di notevole importanza per studi che si ripropongano di traslare quanto più velocemente possibile i risultati dall'oncologia veterinaria a quella umana (15,16).

Tra le neoplasie di interesse veterinario che sono più comunemente studiate nell'ottica dell'oncologia comparata in virtù dell'estrema somiglianza da un punto di vista sia anatomico e istopatologico, sia genetico, biomolecolare e del comportamento biologico con il corrispondente tumore umano, possiamo innanzitutto citare l'osteosarcoma (OSA) canino. L'OSA rappresenta, infatti, una delle principali categorie di neoplasie maligne che forniscono la migliore possibilità di effettuare studi comparati uomo-cane, essendo in entrambi il tumore osseo più frequente e presentando molteplici analogie sia per quanto riguarda le caratteristiche cliniche e il comportamento biologico sia per le alterazioni evidenziate a livello molecolare. Numerosi studi hanno infatti contribuito a definire il ruolo di specifici pathways molecolari nella patogenesi dell'OSA, dimostrando l'importanza della valutazione di alcuni parametri quali ploidia, valutazione dell'attività proliferativa e delle eventuali mutazioni geniche, alterazione dell'espressione di oncogeni e di geni oncosoppressori, e molti di questi meccanismi sono condivisi tra l'uomo e i carnivori domestici (2,5,15,17). L'OSA umano rappresenta una neoplasia a elevata malignità che colpisce principalmente i soggetti in età pediatrica ed è caratterizzata da una prognosi sfavorevole, nonostante l'applicazione di terapie specifiche, in conseguenza dell'alta incidenza di metastasi polmonari. La prognosi dei pazienti colpiti da malattia metastatica al momento della diagnosi o per coloro che mal rispondono alla chemioterapia risulta, infatti, ancora insoddisfacente, visto che solo il 20-40% degli ammalati presenta una sopravvivenza libera da malattia pari ad almeno 5 anni.

Similmente, anche nella specie canina l'OSA (che rappresenta l'85% delle forme tumorali a localizzazione scheletrica nel cane) rappresenta una delle neoplasie più aggressive e meno responsive ai trattamenti attualmente disponibili a causa del suo elevato potere di metastatizzazione. Infatti, nonostante il trattamento combinato di chirurgia e chemioterapia, solo il 20-

25% dei cani sopravvive oltre i 2 anni dall'intervento, mentre i restanti pazienti sviluppano metastasi polmonari in genere entro l'anno.

Appare, pertanto, giustificabile l'utilizzo dell'OSA canino quale modello sperimentale, applicabile anche all'uomo, sia per lo studio di molecole e pathways specificamente coinvolti nello sviluppo e nella progressione neoplastica (quali, ad esempio, HSP90, via di segnale Wnt/beta-catenina, survivina, GSK3B, CXCR4/CXCL12, recettori tirosin chinasi, p53, Rb, CDK4, MMP2, MMP9, TIMPs, RANK/RANKL/OPG), sia per valutare l'efficacia di sostanze inibitrici delle molecole suddette.

Un'altra neoplasia degli animali domestici che mostra diverse analogie con il corrispondente tumore umano da un punto di vista istologico, molecolare e per comportamento clinico è il melanoma maligno canino (MMC) (18). Il MMC è il più comune tumore orale nel cane e, nonostante i progressi terapeutici, circa il 75-80% dei cani non sopravvive a un anno dalla diagnosi. Tutti i melanomi orali nei cani sono considerati maligni (tasso metastatico superiore all'80%), mentre per quelli digitali e sub-ungueali è stato riportato un tasso di disseminazione metastatica nel 50-58% dei casi. Il tipo istologico (epitelioide, fusiforme e misto) e il grado di pigmentazione non sono considerati fattori prognostici, e gli unici parametri che hanno dimostrato influenzare l'evoluzione della malattia sono la localizzazione e la stadiazione clinica.

Recentemente, diversi studi hanno dimostrato che sia il MMC che il melanoma maligno umano presentano profonde somiglianze a livello molecolare soprattutto per quanto riguarda l'espressione di recettori tirosin chinasi (TKRs) e di antigeni associati al tumore (TAA) (19,20). Complessivamente questi dati rendono il MMC un modello pre-clinico adatto per lo studio e lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici come l'immunoterapia e l'uso di farmaci anti-tirosin chinasi (TKI), i cui risultati potranno poi essere direttamente utilizzati per pianificare sperimentazioni cliniche nell'uomo (5,21).

Un altro tumore degli animali domestici che presenta caratteristiche cliniche, patologiche e biomolecolari analoghe a quello umano e si presta perciò ad essere un buon modello per lo sviluppo di nuovi markers prognostici e per lo studio di nuove terapie farmacologiche è anche il mesotelioma del cane (22,23). Il Mesotelioma Pleurico Maligno (MPM) è una neoplasia estremamente aggressiva che origina dal mesotelio che riveste la superficie della cavità pleurica, normalmente a seguito di esposizione diretta o indiretta a fibre di amianto. Dati epidemiologici indicano che nei prossimi 30 anni questa patologia causerà circa 250.000 decessi in Europa Occidentale (17). Infatti, benché attualmente siano stati adottati provvedimenti molto severi per limitare ulteriori esposizioni all'amianto, il periodo di latenza estremamente prolungato della malattia comporterà un drammatico incremento dell'incidenza della patologia nei prossimi anni. La situazione in Italia riguardo questa forma tumorale appare estremamente grave. Dall'archivio del Registro Nazionale Mesoteliomi (ReNaM), aggiornato a dicembre 2011, emergono informazioni relative a 15.845 casi di Mesotelioma Maligno diagnosticati in Italia dal 1993 al 2008 (1056 in media all'anno) e di questi ben il 93% a carico della pleura; ulteriori 1464 casi di malattia sono stati segnalati nel corso del solo 2012. L'incidenza del MPM, è strettamente correlata con l'esposizione, sia di natura professionale sia ambientale e domestica, alle fibre di amianto. In Italia, infatti, l'amianto è stato estratto e ampiamente utilizzato fino alla metà degli anni Ottanta del secolo scorso per la produzione di cemento-amianto, filati e tessuti, materiali d'attrito, costruzione e manutenzione di rotabili ferroviarie. Va inoltre considerato che su tutto il territorio nazionale vi era, e vi è in parte tuttora, una diffusa presenza di coibenti e altri manufatti in amianto.

Anche nel cane l'insorgenza della neoplasia è strettamente dipendente dall'esposizione ambientale alle fibre di amianto, e campioni di polmone di animali affetti da MPM presentano una quantità di fibre di asbesto e di corpi ferruginosi molto maggiore rispetto a quella di animali sani (25-27).

Da un punto di vista clinico, il MPM è una patologia caratterizzata da esito generalmente infausto a causa della generale resistenza a tutti i trattamenti terapeutici disponibili (28), per cui a prescindere dalla terapia utilizzata la mediana di sopravvivenza risulta inferiore a un anno (29). In considerazione, quindi, del fatto che il Mesotelioma Pleurico Maligno (MPM) canino è eziologicamente, clinicamente, morfologicamente e dal punto di vista biomolecolare simile a quello umano, che i mesoteliomi in animali residenti in ambienti urbani/industriali presentano, come nell'uomo, un'incidenza superiore rispetto ai residenti in aree extraurbane e che il periodo di latenza nel cane è sensibilmente inferiore, appare estremamente indicato l'utilizzo del mesotelioma spontaneo canino come modello sperimentale per studi farmacologici con ricadute e applicazioni valide anche in ambito umano. Nel caso specifico del MPM, particolare importanza riveste, inoltre, la considerazione che il cane condivide con l'uomo gli stessi ambienti di vita ed essendo, quindi, sottoposto agli stessi rischi ambientali, potenzialmente può svolgere un'importantissima funzione di specie sentinella.

Un ulteriore tumore spontaneo che rappresenta un modello eccellente in oncologia comparata è il tumore mammario felino. Questo tumore colpisce in prevalenza gatte intere e tende nella sua progressione tumorale a perdere l'espressione dei recettori per ER (recettore per estrogeni) e PR (recettore per progesterone). Questa sua caratteristica lo rende molto simile dal punto di vista biologico al tumore "*hormone resistant*" che colpisce la donna, contro cui non esistono terapie biologiche e che ha una prognosi negativa. Studi recenti in oncologia comparata hanno inoltre dimostrato che entrambi i tumori in queste due specie sono molto simili dal punto di vista clinico istologico e molecolare (30-32).

Il tumore mammario che colpisce la popolazione canina invece insorge nelle cagne sottoforma di un istotipo misto e uno semplice con un'incidenza delle due forme del 50%. Da un punto di vista comparato solo la forma semplice è analoga a quella umana, mentre la forma mista non è presente nella popolazione umana (33).

I tumori appena descritti sono quelli maggiormente studiati in oncologia comparata e sui quali esiste una significativa documentazione scientifica. Malgrado ciò, in questo capitolo verrà fatto cenno anche ad altri tumori spontanei che insorgono negli organismi acquatici quali i pesci e i molluschi. Sebbene essi siano degli organismi filogeneticamente lontani dai mammiferi e quindi differenti anche dal punto di vista fisiologico e immunologico, rappresentano dei modelli molto interessanti per quanto riguarda l'effetto di sostanze nocive presenti negli ambienti acquatici e per il meccanismo di cancerogenesi da esse mediato. Diversi lavori hanno infatti dimostrato che questi organismi, in presenza di particolari sostanze, sviluppano tumori a livello sia della cute sia del sistema nervoso, rappresentando quindi delle importanti sentinelle per il monitoraggio ambientale (34,35).