COLLABORAZIONE FARMACOLOGIA UNIVERSITÀ - CENTRO REFERENZA NAZIONALE PER L'ONOCOLOGIA VETERINARIA E COMPARATA (IZS-PLV)









Lab. Farmacologia
DOBiG
Facoltà di Medicina e Chirurgia
Università di Genova

COLLABORAZIONE STRATEGICA:

- CELLULE STAMINALI TUMORALI DA CARCINOMA MAMMARIO:

  caratterizzazione biologica e valutazione di possibili approcci farmacologici innovativi

Cellule staminali normali

Rara popolazione cellulare presente in ciascun organo in grado di "autorinnovarsi" e dare origine a tutti i diversi tipi cellulari di un dato organo dirigendo il processo di organogenesi

Cellule staminali tumorali

Rara popolazione cellulare in grado di "autorinnovarsi" e dare origine a cellule tumorali fenotipicamente diverse dirigendo il processo di tumorigenesi

(n.b. definizione funzionale)

Cellule Staminali Tumorali: storia

- Mid-1800s. Tumors arise from misplaced embryonic cells
  J. Recamier (1829), R. Virchow (1855), J. Cohnheim (1867), F. Durante (1874)

- 1907. Microscopic analysis of ovarian teratomas: differentiated teratoma cells develop from a single *multipotent* cell (Askanazy)

- 1937. Transmission of leukemia in mice with a single cell (J. Furth et al.)

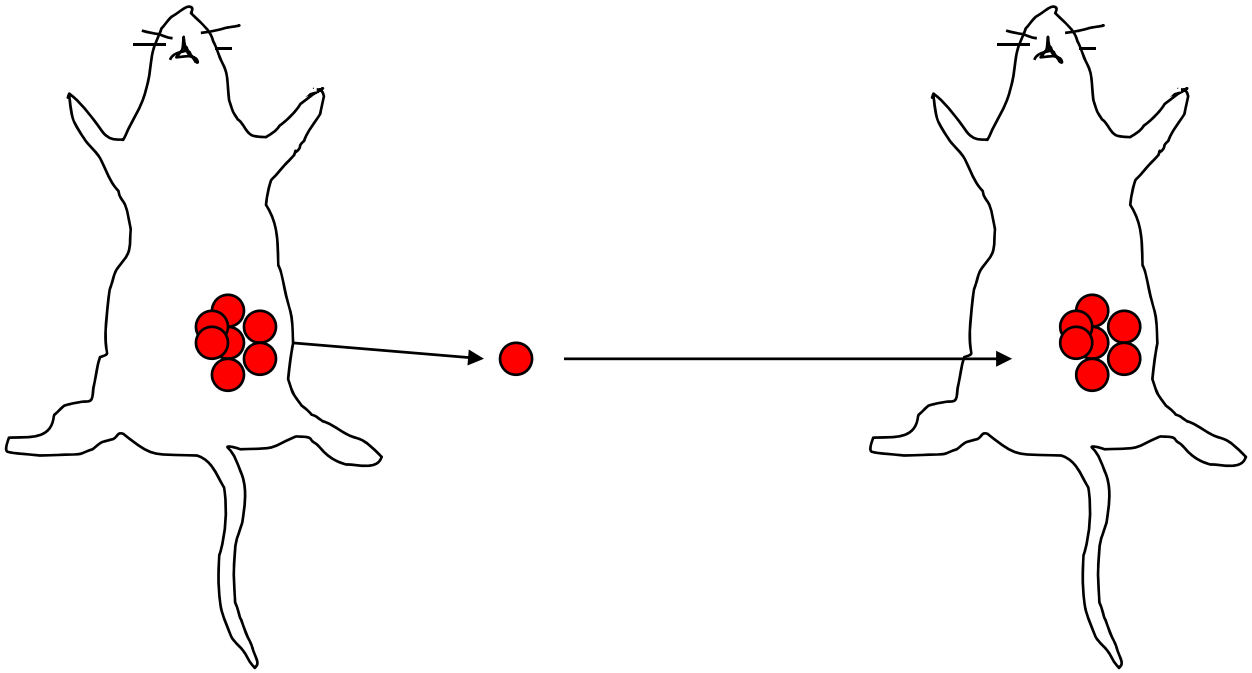
- 1973. Rare subpopulation of acute myeloid leukemia (AML) can self-renew and to give rise to new tumors (M. More et al.)

- 1997. Stem cell potential of leukemia cells in mouse (Dick et al.)
  (Bonnet and Dick isolated a subpopulation of leukaemic cells that express a specific surface marker CD34+/CD38- subpopulation is capable of initiating tumors in NOD/SCID mice that is histologically similar to the donor)

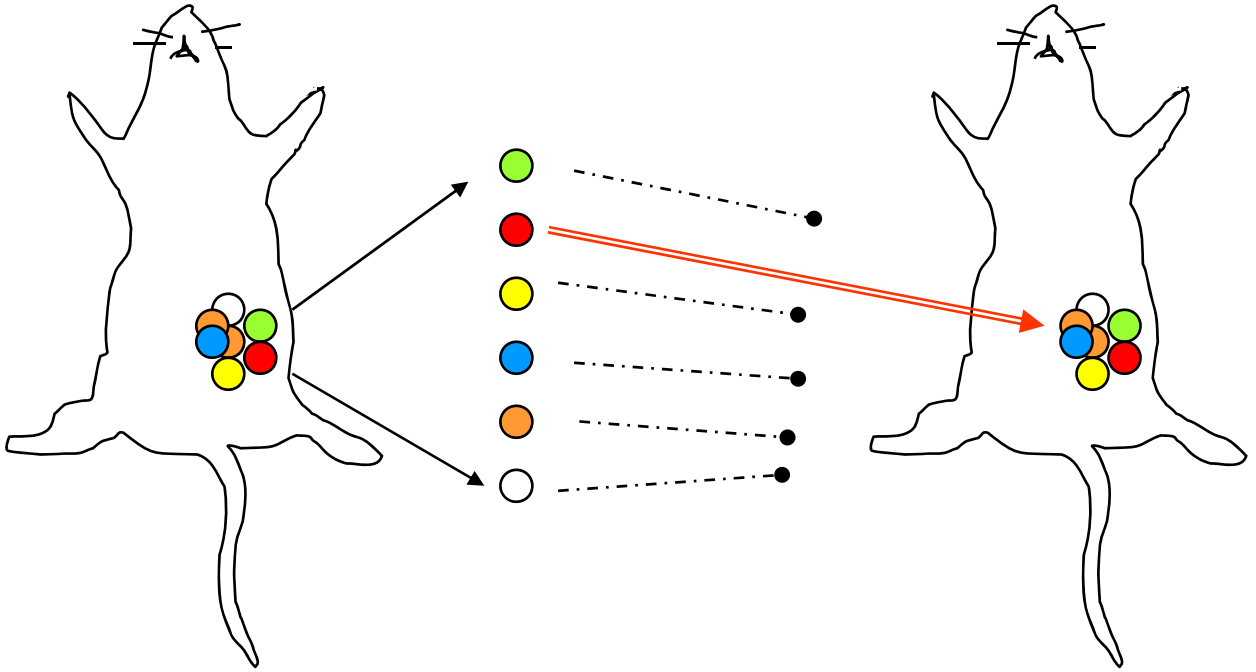
- 2003. Isolation of human leukemia stem cells (Weissman et al.)
- 2003. Isolation of human breast cancer stem cells (Clarke et al.)
- 2003. Isolation of human brain tumor stem cells (Dirks et al.)

- 2005-2008. Tumor stem cells isolation from melanoma, lung, pancreatic, colon and prostate cancers.....

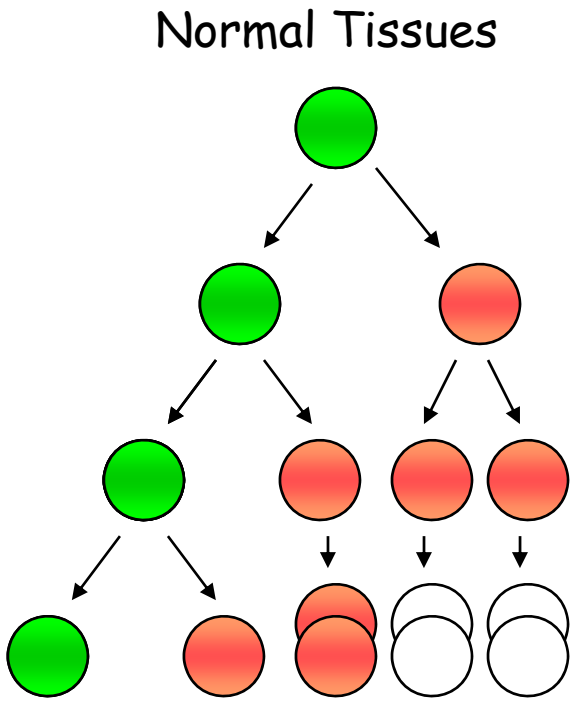
Modello di tumorigenesi tradizionale (non-tumor stem cell model): ogni cellula tumorale ha potenziale tumorigenico

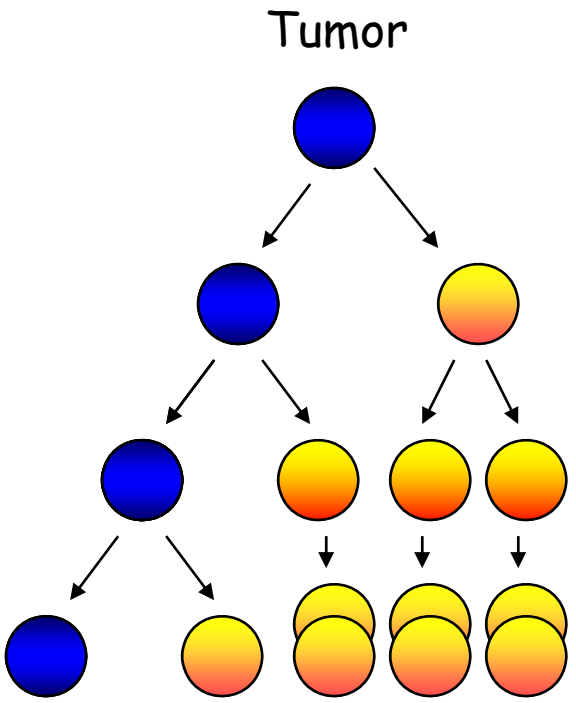


In realtà è stato dimostrato che solo una piccola sottopopolazione di cellule tumorali ha proprietà tumorigeniche: le cellule staminali tumorali



La crescita tumorale segue regole simili a quelle dei tessuti normali





Adult stem cell = undifferentiated

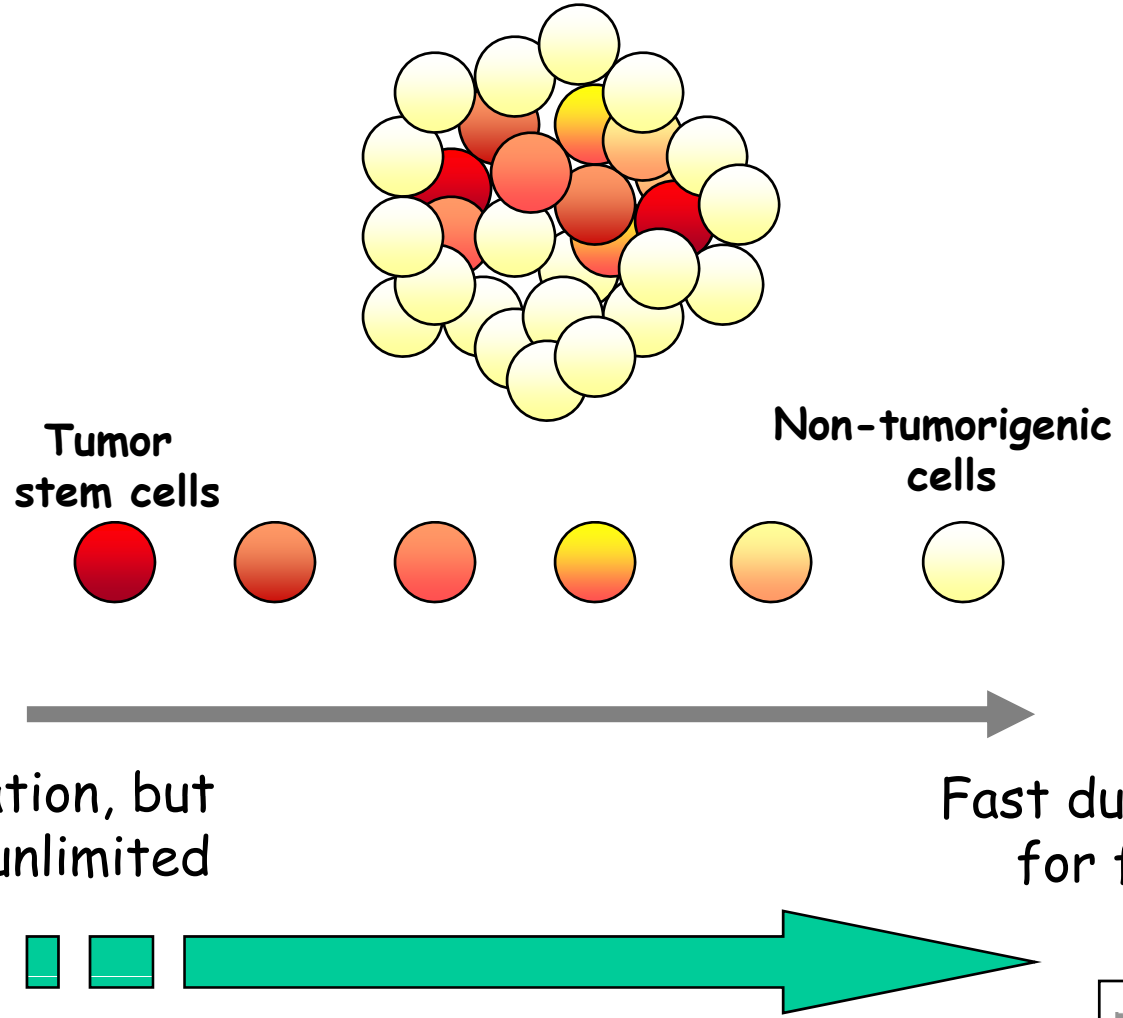
Transit amplifying cell

Normal differentiated cell

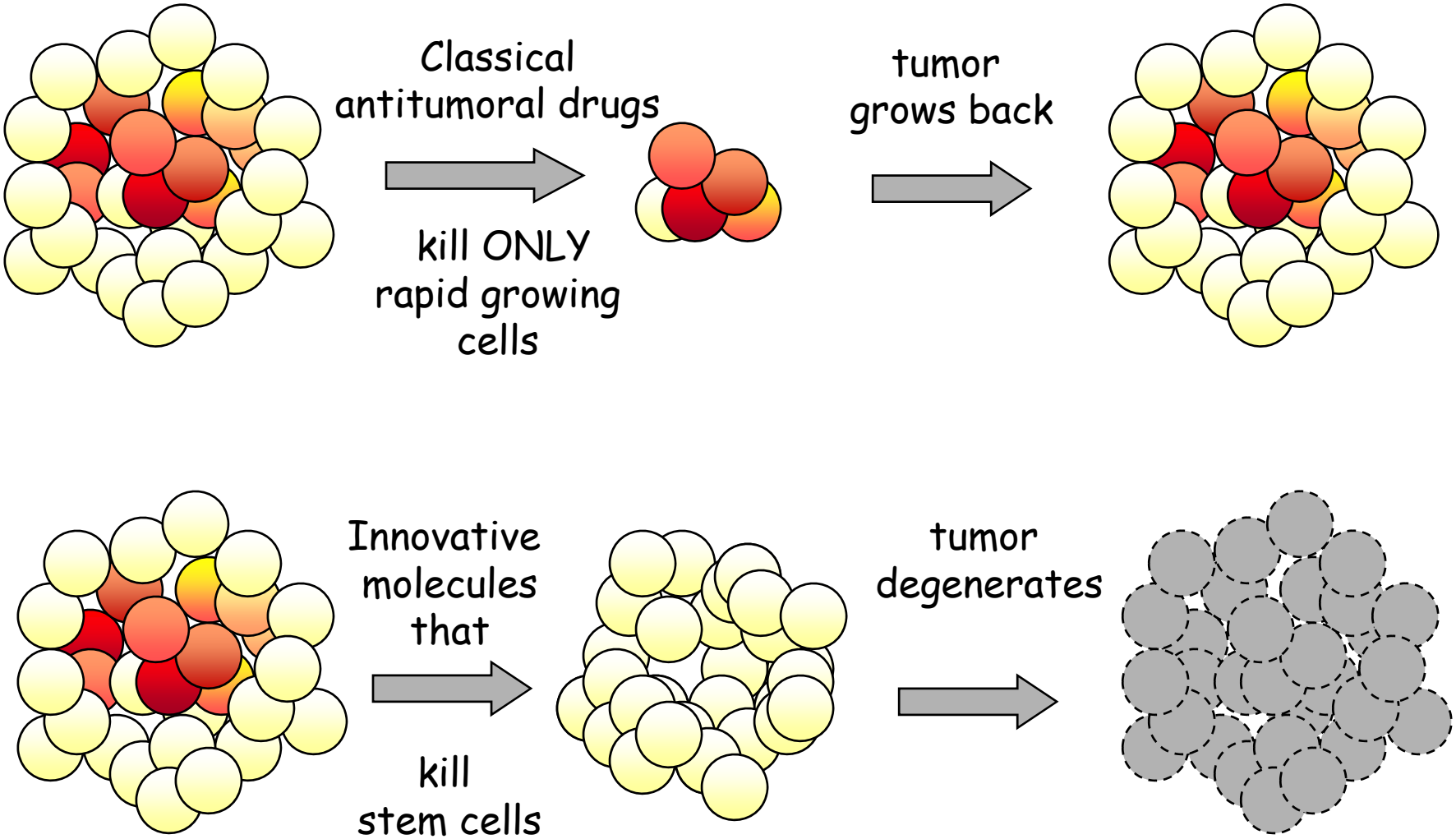
Tumor stem cell = tumorigenic

Non-tumorigenic cell

Implicazioni terapeutiche del modello delle cellule staminali tumorali



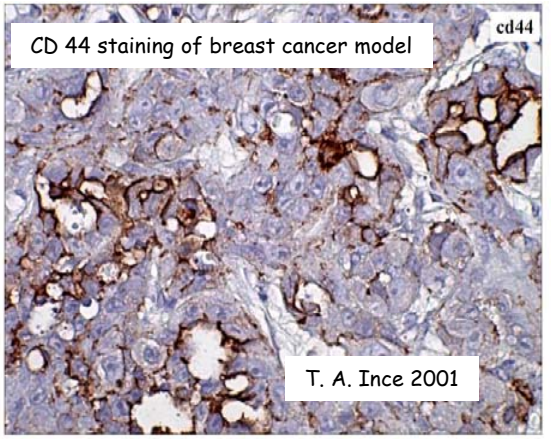
Implicazioni terapeutiche del modello delle cellule staminali tumorali

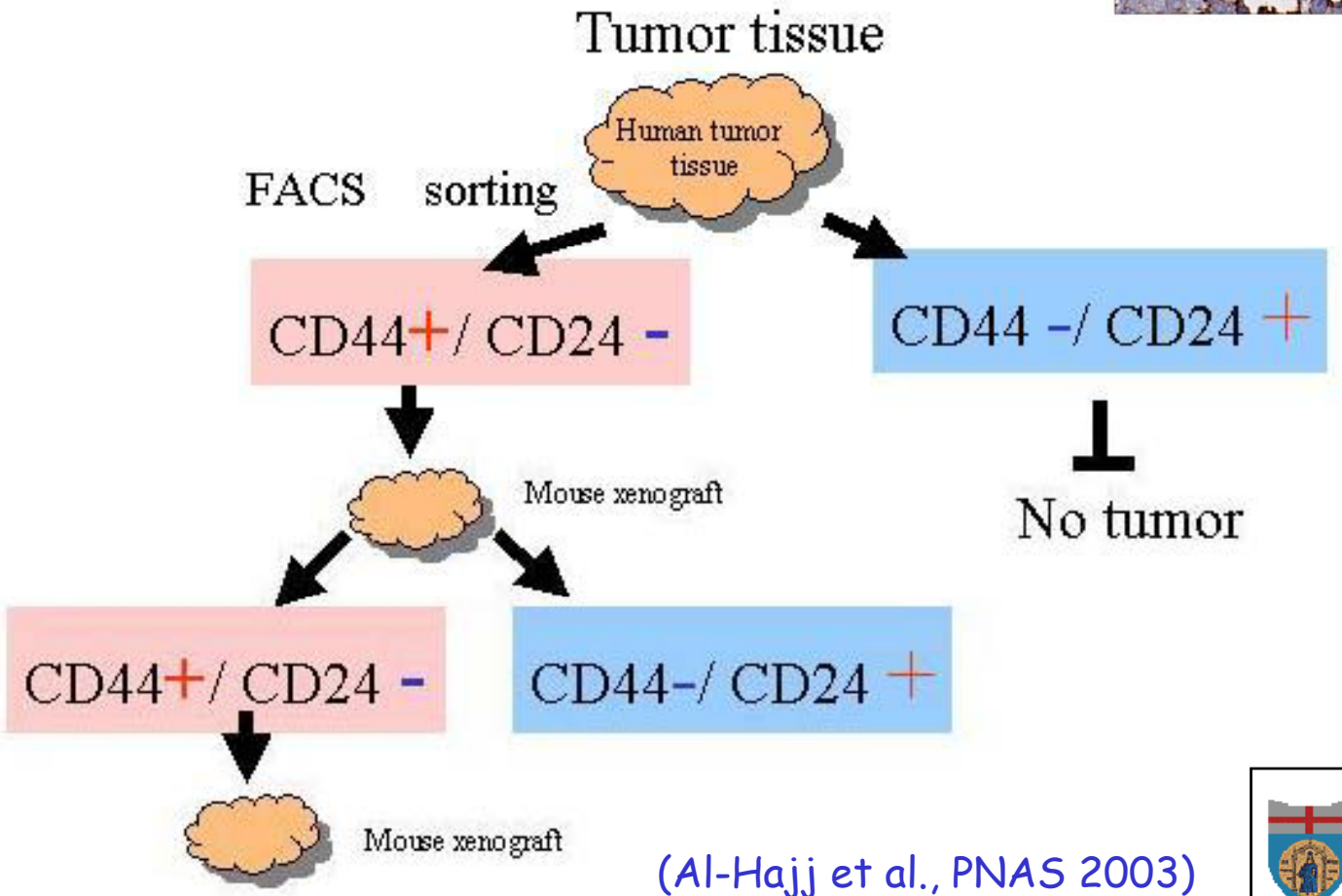


Higher fraction of $CD44^{+}/CD24^{-}$ cells is associated with:

- Shorter disease-free interval
- Shorter overall survival
- Greater incidence of metastases

(Abraham et al., CCR 2005)

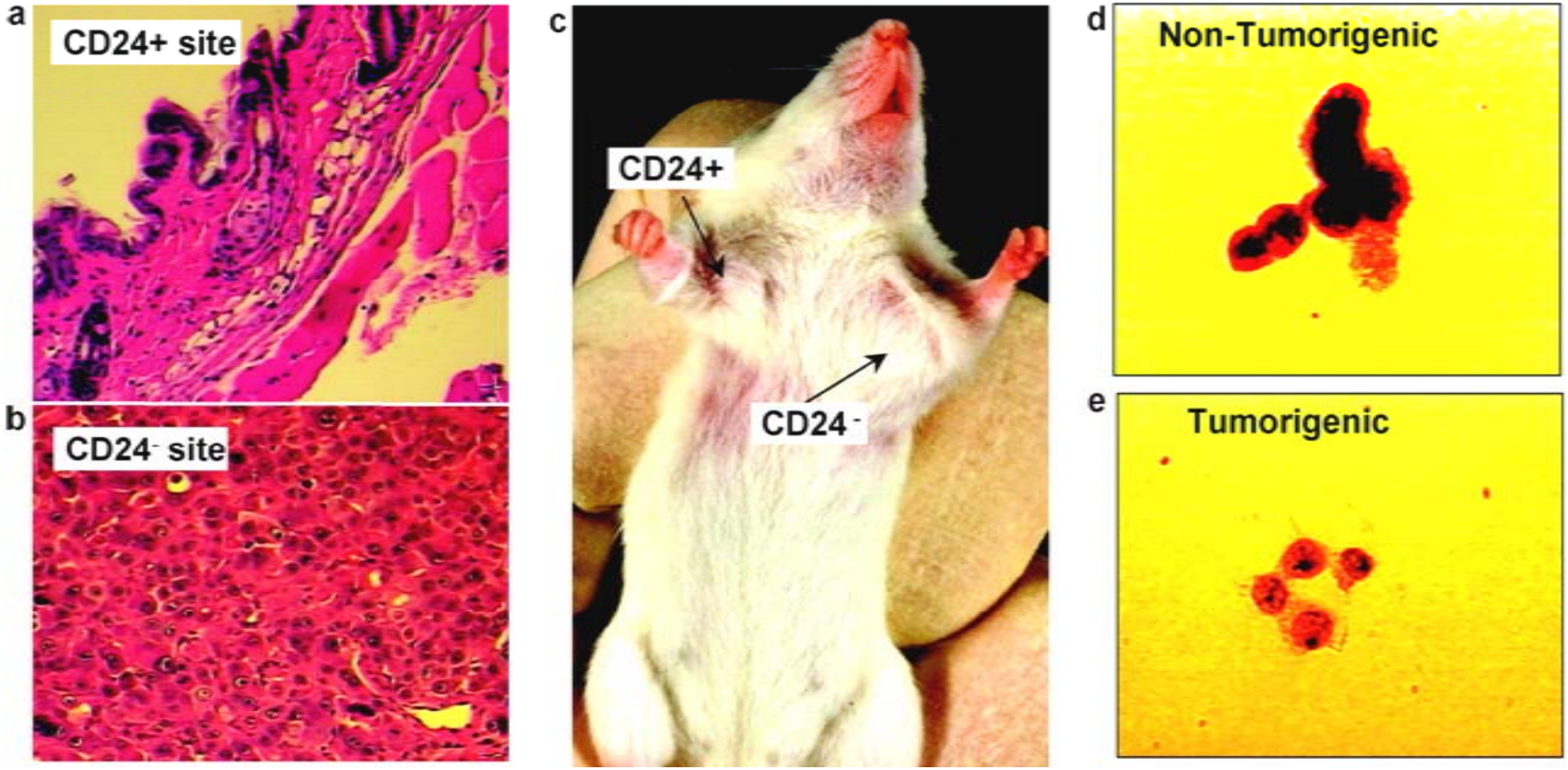




(Al-Hajj et al., PNAS 2003)

Breast Cancer Stem Cells: $CD44^{+}\ CD24^{low}\ Lin^{-}\ B38.1^{+}\ ESA^{+}$

CD44 and CD24 – adhesion molecules
B38.1 – breast/ovarian cancer-specific marker
ESA – epithelial specific antigen



(Al-Hajj et al., PNAS 2003)

Approccio sperimentale:

- Carcinoma mammario felino come modello per lo studio del comportamento biologico e sensibilità ai farmaci del carcinoma umano

RUOLO DELL'ONCOLOGIA COMPARATA NELLA RICERCA MEDICA TRASLAZIONALE:

La ricerca integrata in oncologia comparata utilizza tumori spontanei come modello di studio che possono essere utilizzati per:

1. produrre nuove informazioni sulla biologia dei tumori
2. verificare nuove scoperte in oncologia sperimentale in modelli in vivo
3. trasferire opzioni terapeutiche innovative dallo studio preclinico alla sperimentazione clinica sull'uomo

e garantisce un rapido flusso di informazioni dai laboratori sperimentali all'applicazione clinica (e viceversa)

I tumori spontanei degli animali domestici rappresentano un importante strumento per la ricerca sul cancro

SCIENCE AND SOCIETY

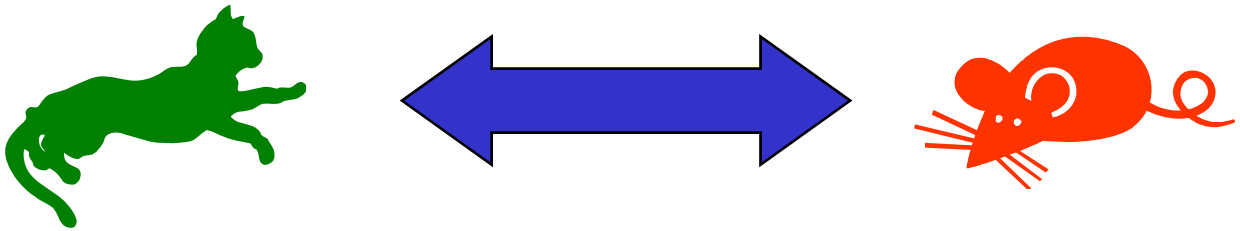
Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans

Melissa Paoloni and Chand Khanna

Abstract | Naturally occurring cancers in pet dogs and humans share many features, including histological appearance, tumour genetics, molecular targets, biological behaviour and response to conventional therapies. Studying dogs with cancer is likely to provide a valuable perspective that is distinct from that generated by the study of human or rodent cancers alone. The value of this opportunity has been increasingly recognized in the field of cancer research for the identification of cancer-associated genes, the study of environmental risk factors, understanding tumour biology and progression, and, perhaps most importantly, the evaluation and development of novel cancer therapeutics.

NATURE REVIEWS | CANCER VOLUME 8 | FEBRUARY 2008 | 147

Vantaggi dello studio di tumori spontanei di animali domestici in paragone con modelli sperimentali di tumori indotti nel topo



✓ Maggiori dimensioni degli animali

✓Immunocompetenza (vs. studi in topi$^{nu/nu}$)

✓ Eterogeneità genetica

✓ Miglior corrispondenza con i tumori umani (biologia tumorale, risposta farmacologica, ecc.)

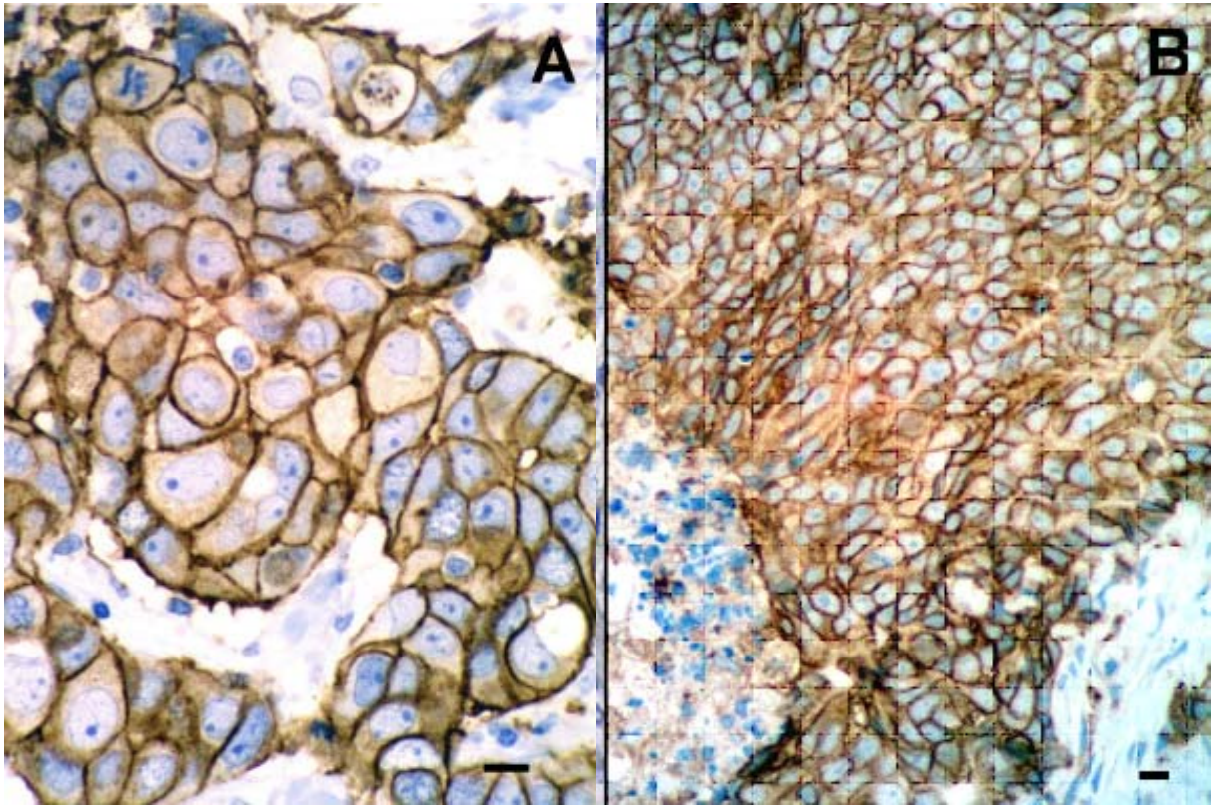
✓ Possibile valutazione del ruolo di carcinogeni ambientali (stessa esposizione uomo/animale)

✓ Miglior approccio etico (risultati utili anche per la salute degli animali)

I TUMORI MAMMARI FELINO E UMANO HANNO MOLTE CARATTERISTICHE ISTOPATOLOGICHE E CLINICHE COMUNI

- FMC e tumore umano mostrano un aspetto istologico molto simile (prevalentemente adeno-carcinomi and carcinomi tubulo-papillari)
- Le forme di FMC ormone-indipendenti (ER- and PR-negative) sono molto aggressive e resistenti alla terapia convenzionale
- Il tempo di sopravvivenza (dopo l'asportazione chirurgica) è di circa 3 anni (che rispetto alla vita media dei gatti è paragonabile ad un periodo di 10 anni nell'uomo)

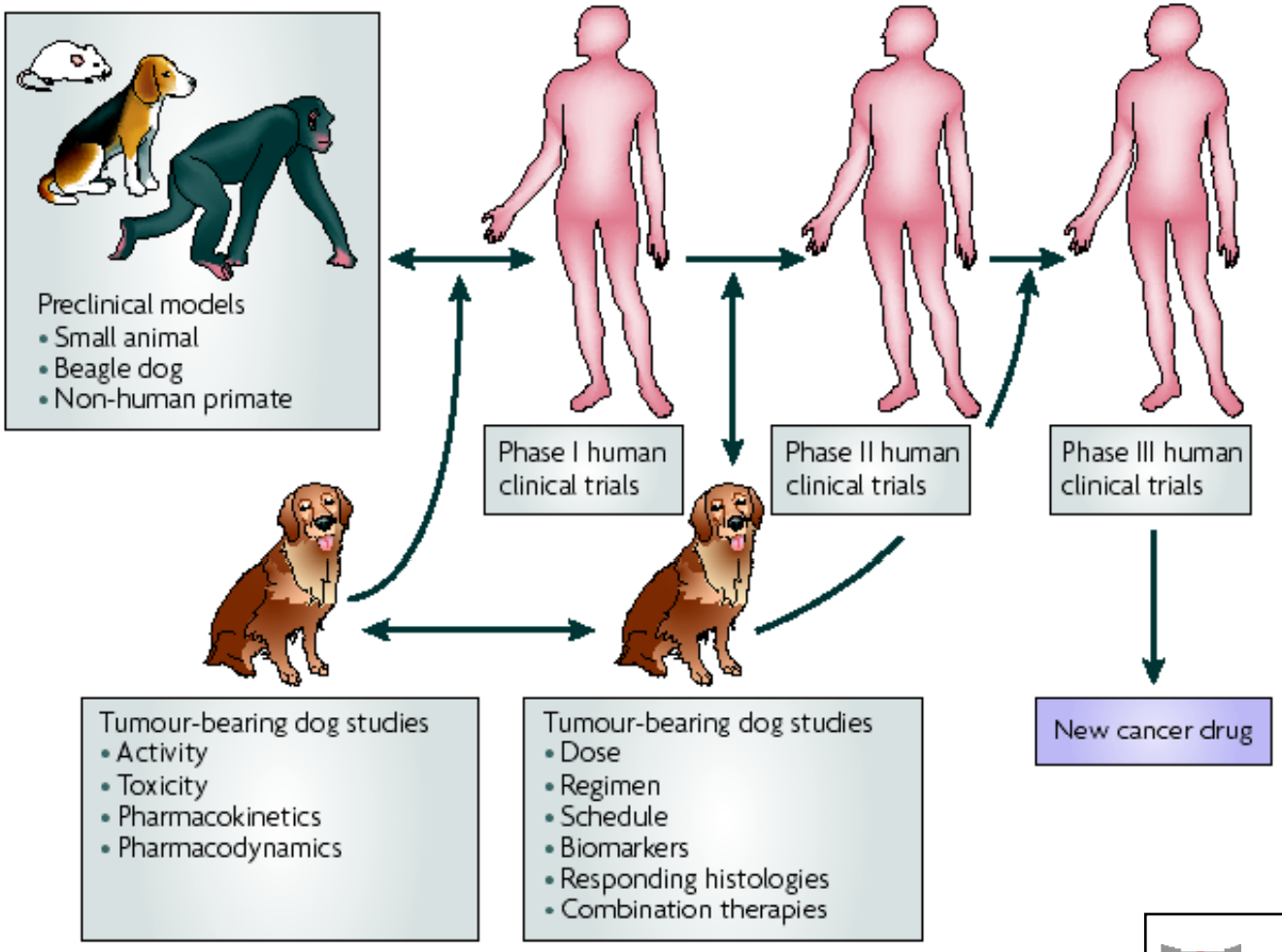
Espressione di HER-2 in carcinomi mammari umano e felino



UMANO FELINO

Ordas et al. BMC CANCER 2007

IL CARCINOMA MAMMARIO FELINO RAPPRESENTA QUINDI UN UTILE MODELLO PER LO STUDIO DEL CARCINOMA UMANO



Melissa Paoloni and Chand Khanna

Collaborazione Farmacologia-DOBiG & CEROVEC: Obiettivi generali:

1. **Sviluppare un'organizzazione di ricerca che consenta di:**

- *interagire con il territorio (rete di veterinari per acquisizione di materiale post-operatorio)*
- *sfruttare ed integrare le specifiche competenze di ricerca dei rispettivi gruppi (Farmacologia DOBiG Università di Genova e CEROVEC-IZS)*

2. **Espandere ed integrare la ricerca di base pre-clinica per quanto concerne la biologia delle cellule staminali tumorali.**
3. **Favorire lo sviluppo traslazionale in campo medico nel campo della biologia delle cellule staminali tumorali.**
4. **Sostenere possibili trials clinici derivanti da collaborazioni nel campo della ricerca traslazionale.**

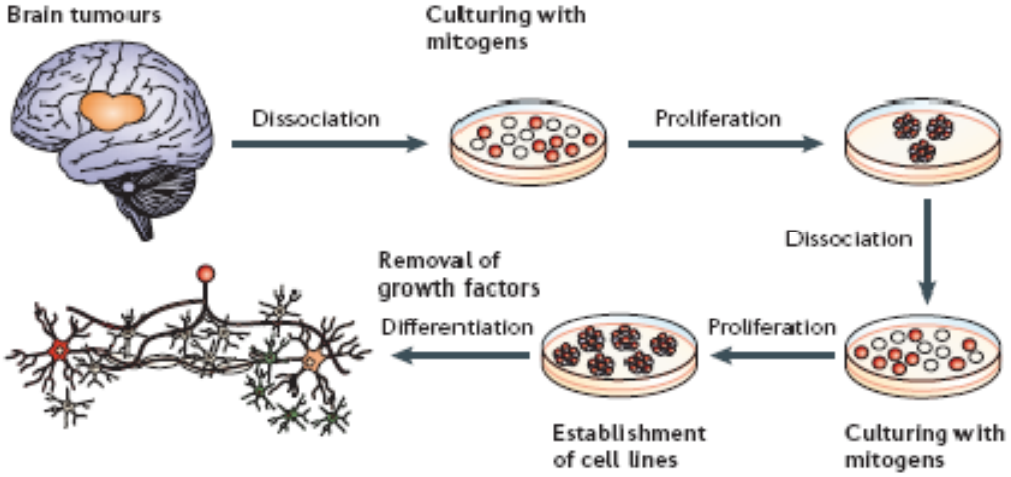
Collaborazione Farmacologia DOBiG-CEROVEC: OBIETTIVI SPECIFICI

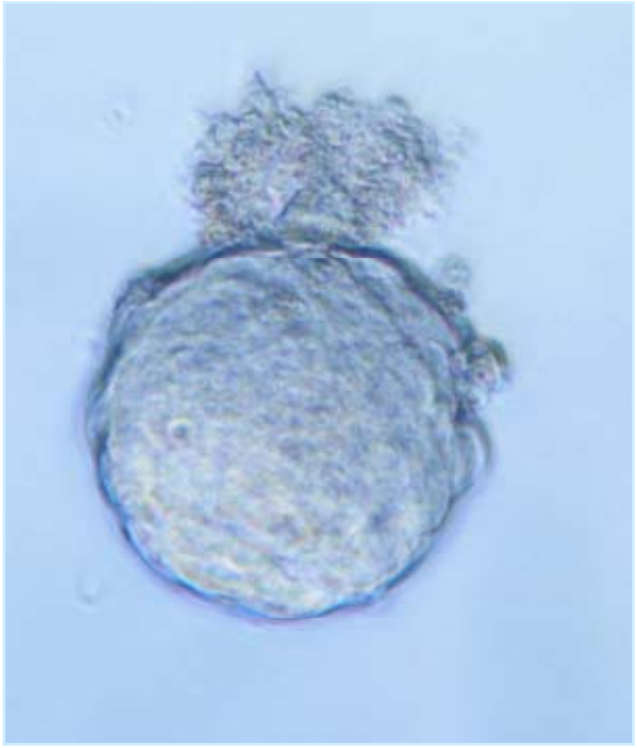
1. ISOLARE E COLTIVARE DA CARCINOMI MAMMARI FELINI CELLULE TUMORALI CON POTENZIALE STAMINALITA' (tumorigeniche)

2. STUDIARE IN QUESTE CELLULE L'ESPRESSIONE ED IL RUOLO NELLA PROLIFERAZIONE, INVASIVITÀ E METASTATIZZAZIONE DELLA CHEMOCHINA SDF1 E DEL SUO RECETTORE CXCR4

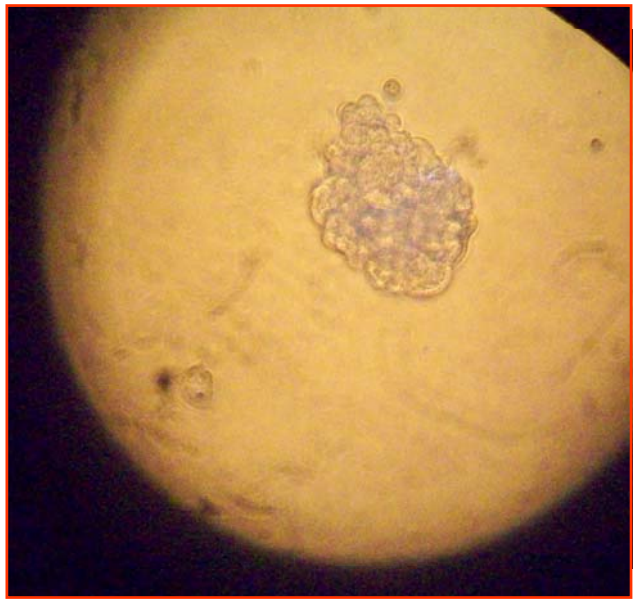
3. VALUTARE IN QUESTO MODELLO IL PATTERN DI ESPRESSIONE DI GENI E PROTEINE COINVOLTE NELLA PROLIFERAZIONE, METASTATIZZAZIONE E RESISTENZA FARMACOLOGICA DEL CARCINOMA MAMMARIO

Le cellule staminali tumorali possono essere coltivate in vitro in mezzi arricchiti con fattori di crescita dando origine ad aggregati sferoidi arricchiti in cellule a potenziale staminale (neurosfere, mammosfere)

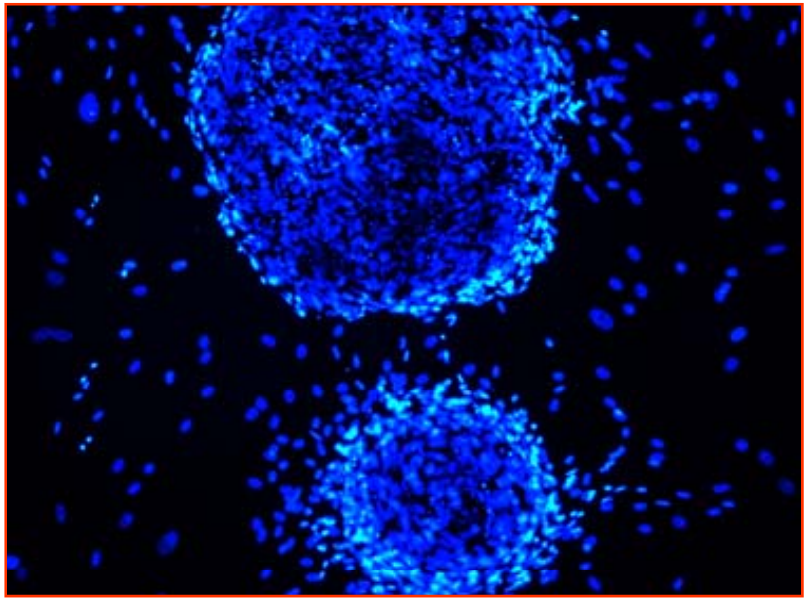




CELLULE STAMINALI DI CARCINOMA MAMMARIO FELINO



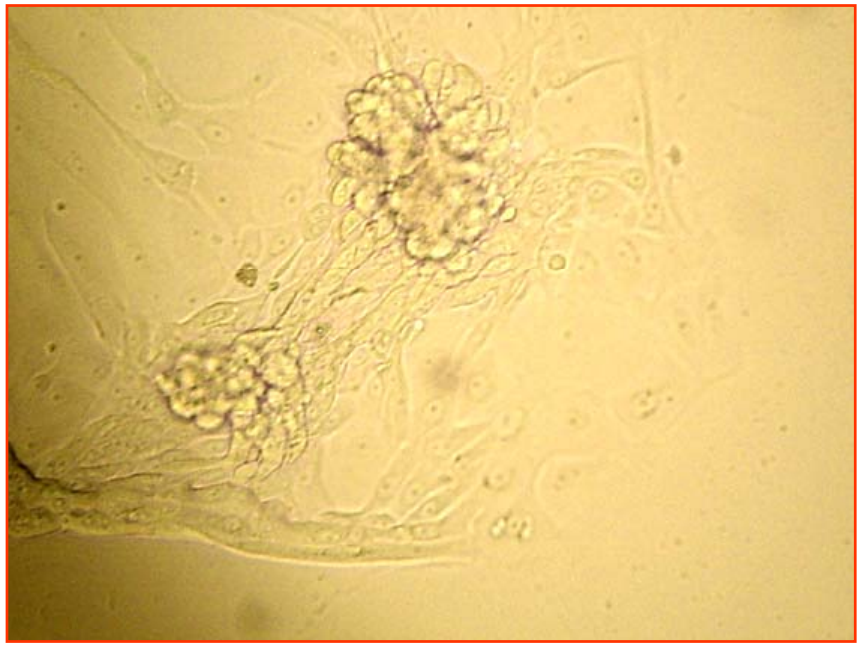
Campo chiaro



Colorazione nucleare con DAPI

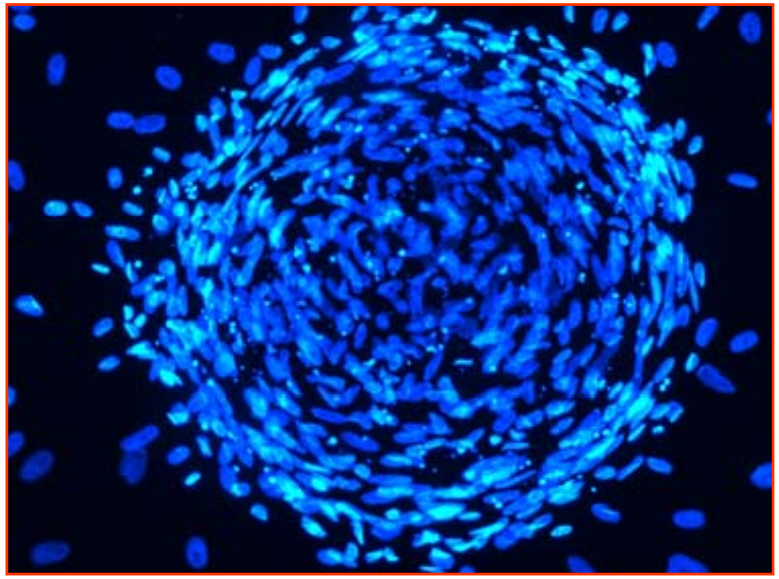
MAMMOSFERE FELINE

CELLULE STAMINALI DI CARCINOMA MAMMARIO FELINO

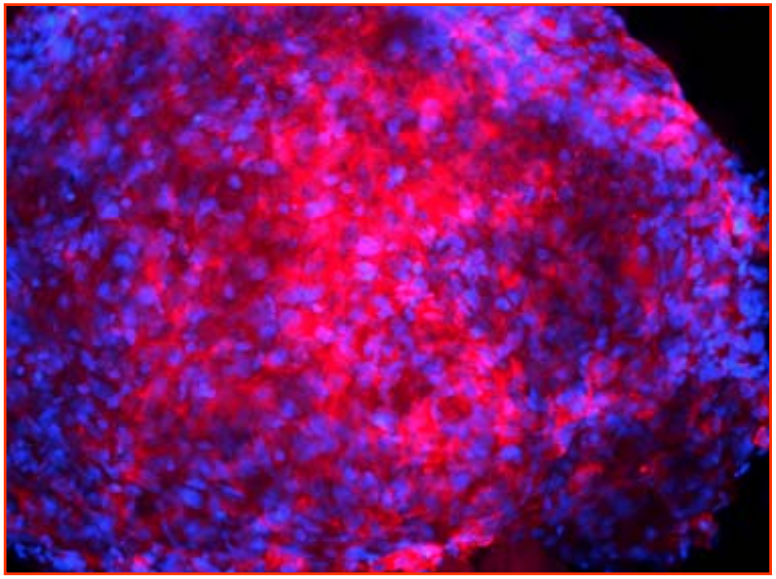


Cellule staminali di FMC differenziate rimuovendo i fattori di crescita dal mezzo di coltura.

CELLULE STAMINALI DI CARCINOMA MAMMARIO FELINO



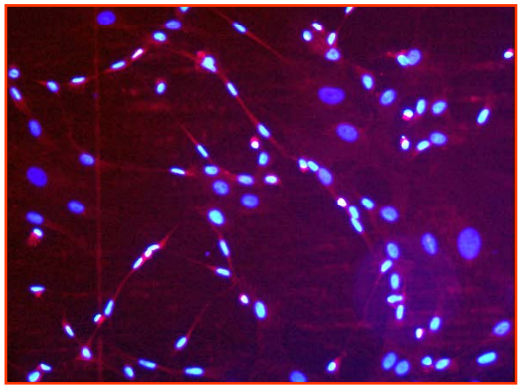
DAPI



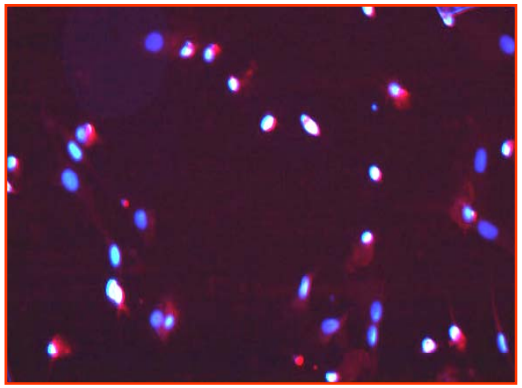
DAPI + EMA

FMC 03/08 PURIFICATO DA FIBROBLASTI

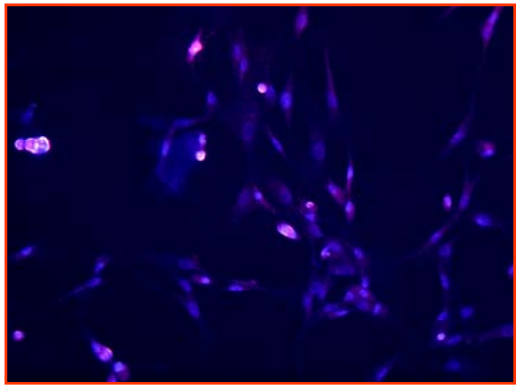
CELLULE STAMINALI DI CARCINOMA MAMMARIO FELINO



DAPI + Citocheratine



DAPI + CD44



DAPI + ER

FMC 03/08 PURIFICATO DA FIBROBLASTI

Self-renewal Assay in NOD/SCID Mice:
surgical orthotopic implantation

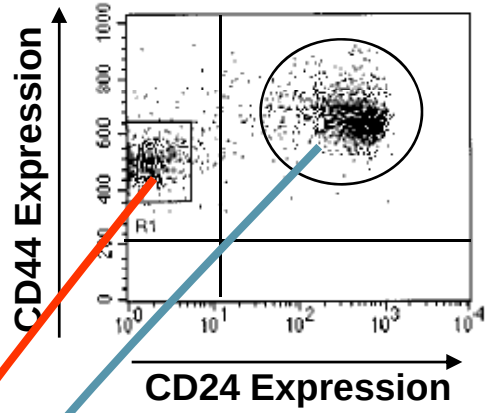


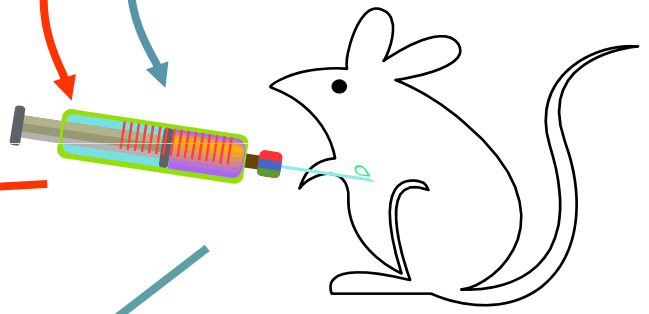
Tumore

Formazione di Sfere

Sospensione di Cellule Isolate

FACS Cell Sorter





Sviluppo di nuovi tumori con caratteristiche simili al tumore originale

Assenza di sviluppo tumorale



FARMACOLOGIA
FACOLTA' DI MEDICINA
UNIVERSITA' DEGLI STUDI
DI GENOVA

CENTRO
DI REFERENZA
NAZIONALE
PER L'ONCOLOGIA
VETERINARIA
E COMPARATA

Sezione Liguria
IZS PLV - Genova

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta
J. Altara

CEROVEC IZS-PLV

TULLIO FLORIO

LO FERRARI

ADRIANA
FEDERI RI
GATTI
ALESS TTAROZZI
ROLA PORCILE

ALESSANDRA RATTO
UMBERTO CARDELLINO
PAOLA MODESTO

GRAZIE PER L'ATTENZIONE