

## ALLEGATO 1 – PIANO DI ATTIVITA'

**TITOLO DEL PROGETTO:** Ricerca di marcatori molecolari di utilità diagnostica nel carcinoma squamocellulare orale felino

**Docente tutor:** Prof. Giuliano Bettini

**Durata:** 12 mesi

**DESCRIZIONE DEL PROGETTO** (*Descrizione degli obiettivi del progetto e delle attività che verranno svolte dal beneficiario e i Settori Scientifici Disciplinari e/o European Research Council (ERC) di riferimento*)

**Settore Scientifico Disciplinare:** VET/03

**Settori ERC:** LS4\_6 – Cancer and its biological basis; LS6\_13 -Veterinary medicine

### **Introduzione**

Il carcinoma squamocellulare (CSC) è il tumore orale più frequente nel gatto, caratterizzato da crescita rapida e spiccata invasività locale. A causa della localizzazione, la diagnosi avviene spesso tardivamente, e anche con approcci terapeutici multimodali la sopravvivenza supera difficilmente 3-6 mesi. Anche nell'uomo il CSC è il tumore orale più frequente, e presenta similitudini con la controparte felina dal punto di vista clinico, biologico e molecolare; per questo motivo il gatto è stato proposto come modello animale spontaneo per il CSC orale umano. Di recente, l'Istituto delle Scienze Neurologiche del Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie (DIBINEM) dell'Università di Bologna ha sviluppato un test di *screening* non invasivo per il CSC umano mediante la ricerca di alterazioni epigenetiche da campioni di cellule prelevate tramite *brushing* orale. In collaborazione con il DIBINEM, il nostro gruppo di ricerca ha già evidenziato in geni felini ortologhi dell'uomo alterazioni epigenetiche e genetiche utili per differenziare il CSC da lesioni orali non neoplastiche e mucosa normale. Da un'analisi di 18 geni, ne sono stati infatti selezionati 7 con alterazioni significative (mutazione del gene oncosoppressore *TP53*, ipermetilazione di *ZAP70*, *FLII* e *MiR124-1* e ipometilazione di *KIF1A*, *MiR363* e *MAGEC2*) nei CSC. Un algoritmo diagnostico basato su questi geni ha permesso di discriminare campioni bioptici di CSC felini da controlli con accuratezza del 97%. Nonostante questi risultati promettenti, la metodica ha dimostrato *performance* inferiori quando applicata a campioni di *brushing* orale (sensibilità: 69%; specificità: 97%; accuratezza: 86%). Si ritiene che la sensibilità non eccellente dei *brushing* rappresenti un limite della metodica se applicata con finalità di *screening* e sia principalmente legata a fattori tecnici relativi all'esecuzione del prelievo e alla diluizione delle cellule neoplastiche con cellule di sfaldamento, aspetti che richiedono ulteriori indagini.

### **Obiettivi**

Questo progetto ha lo scopo di identificare alterazioni molecolari precoci nel CSC felino. Le anomalie genetiche ed epigenetiche già identificate preliminarmente dal nostro gruppo di ricerca verranno analizzate per sviluppare un test di *screening* non invasivo mediante *brushing* orale. Rispetto agli studi precedenti, le analisi saranno effettuate su un maggior numero di casi, approfondendo tutti i fattori che possono influenzare la sensibilità del test, quali il campionamento in anestesia, le pratiche di contenimento, le modalità di esecuzione del prelievo e il confronto fra diversi modelli di *brush*.

## **Materiali e metodi**

Gatti con CSC orale, lesioni orali di diversa natura e controlli sani saranno reclutati presso l'Ospedale Veterinario Universitario del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) o veterinari liberi professionisti. Per ciascun paziente, la superficie della lesione (o la mucosa orale per i controlli sani) verrà strofinata delicatamente 5 volte con apposito spazzolino (*brush*). Il prelievo sarà ripetuto due volte, per testare l'utilità della rimozione del materiale necrotico superficiale. Da ogni gatto con sospetto CSC sarà inoltre prelevato, sempre tramite spazzolamento, un campione di mucosa clinicamente normale, distante dalla lesione, per valutare la presenza di alterazioni molecolari suggestive di una cancerizzazione di campo. La procedura sarà effettuata con 3 diversi modelli di *brush* e, in un gruppo ristretto di casi, saranno effettuati prelievi multipli con ciascun modello. Il prelievo verrà praticato in anestesia o con paziente vigile, a seconda delle esigenze cliniche. Le variabili legate alla modalità di prelievo verranno registrate ai fini della comparazione statistica. Le procedure saranno effettuate previa autorizzazione del proprietario e firma di un documento per il consenso informato.

Qualora fosse clinicamente indicato un esame istologico a conferma della natura della lesione, campioni tissutali di mucosa orale saranno esaminati presso il servizio di Anatomia Patologica del DIMEVET. Saranno inclusi soltanto casi di CSC con conferma citologica o istologica.

I gatti con lesioni orali di possibile significato preneoplastico o neoplastico dubbio saranno monitorati nel tempo per valutare un'eventuale evoluzione del quadro.

I campioni ottenuti saranno esaminati presso i laboratori del DIBINEM tramite *Next Generation Sequencing* con sistema Illumina per l'analisi mutazionale di *TP53* e il profilo di metilazione degli altri geni selezionati. L'analisi dei dati sarà condotta in *cloud computing* su piattaforma *Galaxyproject* e per ciascun gene indagato verrà confrontato il *methylation ratio* di casi e controlli. L'accuratezza dell'algoritmo diagnostico già impostato sarà confrontata nelle diverse condizioni di prelievo, al fine di individuare la procedura di campionamento ottimale.

Il beneficiario dell'assegno sarà incaricato del reclutamento dei casi, della raccolta dei campioni e si occuperà interamente delle analisi bioinformatiche e di elaborazione dei dati. Si stima che per il raggiungimento di una dimensione campionaria statisticamente adeguata, le analisi dovranno essere svolte su almeno 50 CSC e cento controlli, equamente suddivisi tra mucose orali sane e lesioni di altra natura (es. gengivostomatite caudale, parodontite, granuloma eosinofilo, granuloma piogenico, altre neoplasie).

Le collaborazioni già in essere con la Società Italiana di Oncologia Veterinaria, la Società Italiana di Odontostomatologia Veterinaria e con diverse cliniche private e centri di referenza odontoiatrici saranno strategiche, in quanto potranno garantire il reclutamento di una casistica numericamente ampia e adeguatamente gestita sotto il profilo medico.

## **Risultati attesi**

Il progetto potrà permettere lo sviluppo di una metodica per l'identificazione precoce del CSC felino o di lesioni orali ad alto rischio di trasformazione neoplastica mediante prelievo non invasivo che, grazie ai costi contenuti e alla semplicità di realizzazione, potrà essere utilizzato come test di screening nella pratica ambulatoriale veterinaria ed eventuale oggetto di brevetto (come il test analogo sviluppato nell'uomo dai partner di questo progetto).

La prosecuzione delle attività di un team multidisciplinare orientato alla ricerca oncologica traslazionale e la condivisione dei risultati ottenuti su una specie diversa

potranno inoltre apportare nuove conoscenze sui meccanismi molecolari di cancerogenesi e progressione tumorale attualmente studiati nell'uomo, anche in considerazione della maggiore frequenza di questo tumore nel gatto, della maggiore disponibilità di matrici biologiche e della più rapida evoluzione della malattia in questa specie.

Infine, i dati ottenuti permetteranno di intraprendere strategie finalizzate alla richiesta di nuovi finanziamenti riguardanti i marcatori identificati e il loro eventuale utilizzo come marker prognostici o target terapeutici, anche in ragione della congruenza con i temi prioritari dei finanziamenti europei alla ricerca.