



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE VETERINARIE

ALLEGATO 1) PIANO DI ATTIVITA'

TITOLO DEL PROGETTO: APPROFONDIMENTI SUL SARCOIDE FELINO, METODI DIAGNOSTICI, IDENTIFICAZIONE VIRALE E CARATTERIZZAZIONE DEL MICROAMBIENTE

Docente tutor: BARBARA BRUNETTI

Durata: 12 MESI

DESCRIZIONE DELPROGETTO



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE VETERINARIE

I sarcoidi felini sono tumori rari del gatto, con localizzazione frequente nella testa, collo e arti, caratterizzati dall'essere localmente invasivi e con tendenza alla recidiva dopo escissione chirurgica. Le caratteristiche istologiche sono identiche a quelle dei sarcoidi equini, caratterizzati dalla proliferazione dei fibroblasti e con iperplasia epiteliale sovrastante. L'eziologia da Papillomavirus (PV) nei sarcoidi felini era stata già individuata nel 2001 e studi successivi hanno confermato la presenza in tutti i sarcoidi felini studiati della sequenza "FeSarPV" successivamente identificata come Papillomavirus Bovino di tipo 14 (BPV14) nel 2015 (Shulman et al., 2001; Teifke et al., 2003; Munday et al., 2021). Il BPV14 è simile agli altri BPV delta, identificabile nei fibropapillomi bovini e associato a proliferazioni mesenchimali nelle specie non bovine. Attualmente, la diagnosi di sarcoide felino è complicata e basata sull'aspetto istologico e confermata con l'analisi di PCR, quest'ultima facilmente compromessa dalla qualità del campione esaminato. Attualmente, sono poche le informazioni disponibili in letteratura, e concentrate sulle caratteristiche istologiche e la caratterizzazione virologica. E' disponibile una pubblicazione su 42 casi di sarcoide feline completi di comportamento biologico e la prognosi dei pazienti, ma la diagnosi era solo di tipo istologico (Wood et al., 2020). I meccanismi di azione del BPV14 nel causare il sarcoide feline sono del tutto sconosciuti. Risultati preliminary su 18 casi di sarcoidi felini da noi esaminati, indicano che solo una piccola porzione di questi possiede del DNA virale ancora conservato, rendendo la diagnosi di sarcoide feline incerta, e solo basata sulle caratteristiche istologiche. La degradazione del DNA è molto spesso dovuta alla fissazione dei campioni in formalina. La Next-Generation Sequencing (NGS) può essere utilizzata come metodo alternativo, altamente sensibile per l'identificazione dei PV e per la sua abilità nell'identificare il virus anche con poche copie virali presenti, tipi nuovi e/o tipi conosciuti ma distanti filogeneticamente dai primer o sonde utilizzate normalmente in altri test molecolari. In medicina umana la diagnosi di infezione da Human Papillomavirus (HPV) è fatta con la positività immunostochimica al P16, che è risaputo essere iperespresso con l'infezione da HPV di alto grado, questo perchè la proteina E7 interagisce con il Retinoblastoma (RB) alterando di conseguenza il P16. Anche se



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE VETERINARIE

probabilmente questo non è il pathway coinvolto nei sarcoidi felini, in quanto la proteina E7 dei delta PV non dovrebbero legare RB, non ci sono dati in letteratura (Munday et al., 2018), analogamente non è mai stato studiato se il p53 possa essere coinvolto. Inoltre, non vi sono dati in letteratura sulla presenza di infiltrati infiammatori nei sarcoidi felini e sul loro ruolo nell'insorgenza della neoplasia.

Scopi del Progetto:

1: selezione della casistica: implementare la nostra casistica utilizzando casi disponibili di un Laboratorio di diagnostica private (I-vet s.r.l.) con cui collaboriamo raggiungendo i 40 casi.

2: analisi istologica: tutte le sezioni in Ematossilina-Eosina saranno riviste e le analisi o confermate o confutate. Altri tumori mesenchimali della cute del gatto saranno selezionati ed utilizzati come controlli negativi.

3: PCR e NGS: inizialmente sarà fatta una prima identificazione con Pan-papillomavirus CODHEOP PCR_FAP e primer PAP e di seguito PCR specifiche per il BPV usando primer jmpSA-F/-R. In seguito sarà fatta l'analisi con NGS (presso il Laboratorio di patologia molecolare del Policlinico Sant'Orsola-Malpighi). Il panel sarà disegnato con Ion AmpliSeq Designer Tool (Thermo Fisher Scientific) per permettere l'amplificazione e il sequenziamento di tutte le sequenze codificanti (CDSs) del BPV14. Gli ampliconi di lunghezza attesa saranno sequenziati con metodica Sanger. La sequenza dei nucleotidi sarà sottoposta ad analisi BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) per confermare il tipo di BPV.

4: CISH: verrà utilizzata una sonda specifica per BVP14 per RNAscope (ACD); La tecnica con RNAscope è già stata utilizzata dal nostro Gruppo di ricerca per localizzare il BVP nei sarcoidi di cavallo.

5: western blot per i linfociti CD4+ e CD8+. Verranno utilizzati tessuti di linfonodi freschi di gatto per testare la specificità degli anticorpi.



ALMA MATER STUDIORUM
UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE VETERINARIE

6: caratterizzazione del microambiente tumorale: La presenza di cellule infiammatorie, la loro localizzazione e quantità saranno testate con immunistoichimica per i linfociti T (CD3+), linfociti T regolatori (FoxP3+), linfociti B (CD20+), macrofagi (CD68+), e marcatori PD-1 e PDL-1. Inoltre, dopo i test di western blot anche l'immunistoichimica per linfociti CD4+ e CD8+ verrà effettuata. L'immunistoichimica verrà effettuata con Ventana Discovery Ultra System (Roche) che permette l'identificazione sulla medesima sezione di 5 differenti anticorpi.

7 Analisi di immagine: l'analisi della localizzazione e quantificazione delle cellule infiammatorie nel microambiente tumorale verrà effettuata utilizzando programmi di analisi di immagine (Qupath).

8 Analisi statistica: l'analisi statistica verrà utilizzata per testare differenze di cellule infiammatorie (localizzazione e quantità) nel microambiente tumorale tra due gruppi (sarcoidi felini ed altri tumori mesenchimali cutanei del gatto) utilizzando il programma R (versione 4.2.1. per Windows, Vienna. Austria).

Bibliografia

- 1: Schulman FY, Krafft AE, Janczewski T. Feline cutaneous fibropapillomas: clinicopathologic findings and association with papillomavirus infection. *Vet Pathol.* 2001 May;38(3):291-6. doi: 10.1354/vp.38-3-291. PMID: 11355659.
- 2: Teifke A, Lehr HA, Vomweg TW, Hlawatsch A, Thelen M. Outcome analysis and rational management of enhancing lesions incidentally detected on contrast-enhanced MRI of the breast. *AJR Am J Roentgenol.* 2003 Sep;181(3):655-62. doi: 10.2214/ajr.181.3.1810655. PMID: 12933456.
- 3: Munday JS, Thomson NA. Papillomaviruses in Domestic Cats. *Viruses.* 2021 Aug 22;13(8):1664. doi: 10.3390/v13081664. PMID: 34452528; PMCID: PMC8402708
- 4: Wood CJ, Selmic LE, Schlag AN, Bacmeister C, Séguin B, Culp WTN, Ayres SA, Sumner JP, Byer B, Mayer UK, Liptak JM. Biological behaviour and clinical outcome in 42 cats with sarcoids (cutaneous fibropapillomas). *Vet Comp Oncol.* 2020 Dec;18(4):699-705. doi: 10.1111/vco.12598. Epub 2020 May 4. PMID: 32304135