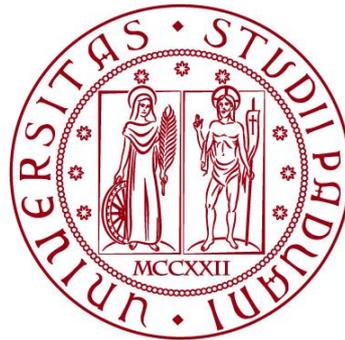


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**ANALISI IMMUNOISTOCHIMICHE E MOLECOLARI DI LESIONI ENTERICHE IN
GATTI AFFETTI DA ENTERITE CRONICA/LINFOMA INTESTINALE**

Tutor: Prof.ssa Mery Giantin

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione (BCA)

Laureando: Mattia Mosele

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE	
ABSTRACT	5
1. STATO DELL'ARTE.....	7
1.1 Contesto ed introduzione alle patologie.....	7
1.2 Panoramica sulla diagnostica tradizionale.....	7
1.3 Test ausiliari per FCE: immunoistochimica e test della clonalità.....	9
1.3.1 Immunoistochimica	9
1.3.2 Test della clonalità.....	10
2. APROCCIO SPERIMENTALE: MATERIALE E METODI	11
2.1 Campioni	11
2.2 Istopatologia.....	12
2.3 Immunoistochimica.....	14
2.3.1 Anticorpo primario	16
2.4 Test di clonalità: PARR.....	16
2.4.1 Estrazione del DNA	17
2.4.2 PCR sul gene ACTB felino per la verifica dell'amplificabilità del DNA.....	18
2.4.3 PCR TCRG1 (Moore <i>et al.</i> , 2005).....	19
2.4.4 PCR TCRG2 (Weiss <i>et al.</i> , 2011).....	21
3. RISULTATI E DISCUSSIONE	21
3.1 Esito esame istologico.....	21
3.2 Risultati immunoistochimica.....	22
3.3 Test della clonalità	23
3.4 Discussione finale.....	25

ABSTRACT

L'enterite cronica (EC) del gatto è una patologia comune del tratto gastrointestinale, che interessa soprattutto la popolazione anziana. Il termine EC fa riferimento a un gruppo di disordini idiopatici e cronici caratterizzati da segni gastrointestinali persistenti e ricorrenti. Dal punto di vista clinico, l'EC presenta notevoli analogie sintomatologiche con il linfoma alimentare. Per questo motivo il medico veterinario per giungere ad una corretta diagnosi e proporre la terapia adeguata necessita del supporto della figura del patologo. Nel presente studio sono stati inclusi cinque campioni di archivio (tessuto intestinale e linfonodo satellite) del laboratorio di istopatologia del Dip. BCA provenienti da tre gatti, che presentavano sintomi riconducibili ad EC. Tali campioni sono stati sottoposti ad indagini istopatologiche, immunoistochimiche e molecolari, al fine di ottenere una diagnosi più accurata e precisa. In particolare, per discriminare con certezza una deriva proliferativa dei linfociti T o B è stato impiegato il test di clonalità (PARR).

1. STATO DELL'ARTE

1.1 Contesto ed introduzione alle patologie

L'enteropatia cronica (EC) felina è uno dei più comuni disturbi nella popolazione felina anziana. Il disturbo è definito dalla presenza di segni clinici gastrointestinali per più di 3 settimane in assenza di cause extraintestinali o malattie intestinali infettive, ostruttive o neoplastiche localizzate (Marsilio *et al.*, 2021).

Nonostante non esista uno schema di classificazione uniforme, la maggior parte degli autori suddivide i casi in base alla risposta al trattamento in *food-responsive enteropathy* (FRE), *idiopathic inflammatory bowel disease* (IBD) (che spesso viene usato come termine alternativo per l'EC) e *small cell lymphoma* (SCL) (Marsilio *et al.*, 2021). Sebbene l'eziopatogenesi sia sconosciuta, si ritiene che l'IBD si verifichi come risultato di perturbazioni nel *crosstalk* tra l'ambiente, il sistema immunitario e il microbioma in un ospite geneticamente suscettibile (Marsilio *et al.*, 2021).

La progressione da IBD a SCL nel corso del tempo è stata a lungo sospettata sulla base della frequente coesistenza di lesioni infiammatorie e neoplastiche nei gatti con SCL e una precedente storia di IBD (Marsilio *et al.*, 2021). Per segni clinici non specifici la differenziazione di IBD da SCL richiede l'esame istopatologico, e in alcuni casi ulteriori test diagnostici come l'immunoistochimica e test di clonalità. Generalmente, il segnalamento clinico, i test di laboratorio e l'ecografia addominale non sono dei mezzi adatti e sufficienti per differenziare i diversi tipi di FCE (Marsilio *et al.*, 2021).

Mentre i gatti con IBD tendono ad essere più giovani con un'età media di circa 8 anni, i gatti con SCL presentano un'età media di circa 12,5 anni (Marsilio *et al.*, 2021). La perdita di peso è il sintomo più comune nei gatti con FCE (80-90%), seguita da vomito (70-80%), anoressia (60-70%) e diarrea (50-60%) (Marsilio *et al.*, 2021). I gatti spesso perdono la massa muscolare e possono sviluppare una significativa sarcopenia, particolarmente visibile lungo la colonna vertebrale, prima della perdita del tessuto adiposo (Marsilio *et al.*, 2021). Accanto alla sarcopenia e un basso *body condition score*, l'esame fisico può rilevare anse intestinali segmentarie o diffusamente ispessite e dolore addominale, che può essere correlato a pancreatite concomitante e/o colangiopatie (Marsilio *et al.*, 2021).

A differenza della IBD e della SCL, i gatti con linfoma a grandi cellule (LCL) solitamente mostrano un esordio più acuto e segni clinici rapidamente progressivi: come masse addominali, intussuscezione, ostruzione e persino perforazione principalmente associata alla forma più aggressiva di linfoma alimentare (Marsilio *et al.*, 2021).

1.2 Panoramica sulla diagnosi tradizionale

Attualmente, non è stato ancora identificato un singolo biomarcatore che possa discernere in modo affidabile IBD da SCL. Sebbene nei gatti una significativa perdita proteica e lo sviluppo di enteropatia proteino-disperdente siano rari, l'ipoalbuminemia è un elemento comune in entrambe le tipologie di malattia, con una percentuale fino al 100% dei gatti affetti da IBD grave o SCL (Marsilio *et al.*, 2021). Invece, la concentrazione di proteine totali spesso rimane invariata o

aumenta per la concomitante iperglobulinemia (Marsilio *et al.*, 2021). Altri test con potenziale valore diagnostico sono le concentrazioni sieriche di folato, cobalamina e fosforo inorganico (Marsilio *et al.*, 2021). La cobalamina è una vitamina idrosolubile presente nelle proteine alimentari. Nell'intestino tenue è legata a un fattore intrinseco, prodotto dalla secrezione pancreatica, e successivamente viene assorbita nell'ileo attraverso il legame del fattore ai suoi rispettivi recettori (Marsilio *et al.*, 2021). Dunque, l'ipocobalaminemia viene documentata con una diffusa malattia dell'intestino tenue distale (*e.g.* neoplasia, infiammazione, malattie fungine *etc.*), insufficienza pancreatica esocrina con carenza di fattori intrinseci e difetti recettoriali (Marsilio *et al.*, 2021). In modo simile, il folato è una vitamina idrosolubile presente in molteplici fonti alimentari e può essere prodotto anche da alcuni batteri. L'assorbimento del folato avviene soprattutto nel tratto prossimale dell'intestino tenue. Le concentrazioni di folato nel sangue possono diminuire a causa dell'infiltrazione diffusa della mucosa dell'intestino tenue, seguite da un malassorbimento, oppure aumentare a causa della produzione batterica durante la disbiosi (Marsilio *et al.*, 2021). Quando si verificano insieme ipofolatemia e ipocobalaminemia, di solito indicano una malattia significativa dell'intestino tenue e un malassorbimento non solo di queste vitamine, ma probabilmente anche di molti altri nutrienti (Marsilio *et al.*, 2021). Pertanto, sebbene l'integrazione di micronutrienti carenti possa essere utile, dovrebbe essere considerata principalmente come possibili indicatori di un significativo malassorbimento dovuto a una patologia sottostante primaria (Marsilio *et al.*, 2021). Inoltre, i livelli di cobalamina e folato possono fornire indicazioni sulla localizzazione della malattia. Nella presenza di ipocobalaminemia, le biopsie ileali possono risultare utili per aumentare le probabilità di raccogliere campioni rappresentativi del processo patologico (caso analogo con l'ipofolatemia per il tratto prossimale dell'intestino tenue).

Le tipiche anomalie ecografiche osservate nell'IBD e nel SCL includono l'ispessimento della muscolatura propria, la perdita della stratificazione della parete e la presenza di linfadenopatia. Un rapporto tra lo spessore della muscolatura e quello della sottomucosa superiore a 1 indica un segmento intestinale anomalo (Marsilio *et al.*, 2021).

Tuttavia, è importante notare che reperti ecografici anomali nei gatti senza sintomi non sono necessariamente indicativi di malattia intestinale. Degli studi hanno dimostrato che anomalie ecografiche, compreso l'ispessimento della muscolatura propria, possono essere riscontrate anche in gatti sani (Marsilio *et al.*, 2021). Nonostante queste limitazioni, l'ecografia continua a svolgere un ruolo essenziale nella diagnosi della EC felina, fornendo una guida preziosa per il passo diagnostico successivo.

Considerando la composizione istologica sia di IBD che di SCL, si comprende che gli aspirati con ago sottile sono generalmente inutili per la differenziazione di queste due patologie. Gli aspirati con ago sottile mancano del contesto architettonico necessario per una diagnosi corretta, e la presenza di piccoli linfociti maturi non consente alcuna conclusione definitiva, poiché sono distintivi per entrambe le malattie (Marsilio *et al.*, 2021). Tuttavia, gli aspirati con ago

sottile possono risultare utili nell'escludere altre diagnosi differenziali, come LCL o malattie fungine.

Uno degli step successivi all'ecografia è la raccolta di biopsie, che si suddivide in molteplici metodi, tra cui l'endoscopia gastrointestinale e la raccolta tramite chirurgia.

Gli svantaggi principali dell'endoscopia gastrointestinale e della raccolta di biopsie includono la limitazione alla mucosa e talvolta alla sottomucosa, il *range* limitato di azione (*e.g.* le lesioni del duodeno e le lesioni extramurali sono al di fuori del *range* endoscopico e non possono essere sottoposte a biopsia).

Però, la raccolta delle biopsie endoscopiche è poco invasiva e veloce e il tempo di recupero è molto breve, inoltre si può visualizzare la superficie della mucosa e per cui effettuare delle biopsie mirate. Le linee guida raccomandano il prelievo di un minimo di 6 biopsie di qualità adeguata dal duodeno e da 3 a 5 dall'ileo per una valutazione istopatologica affidabile (Marsilio et al., 2021). Adeguate biopsie endoscopiche possono fornire un metodo minimamente invasivo per acquisire dati fondamentali rappresentativi di un'ampia porzione della mucosa. Invece, le biopsie chirurgiche sono rappresentative solo di un sito di ciascuna sezione.

Il prelievo di campioni è uno step fondamentale nella diagnosi. Le biopsie endoscopiche possono essere troppo superficiali, piccole o troppo poche; invece, quelle chirurgiche, essendo prelevate senza visualizzazione della mucosa, possono essere non rappresentative della malattia e spesso, per il metodo di prelievo, mentre la biopsia appare grande, la mucosa risulta piccola, danneggiata o assente (Marsilio et al., 2021).

Nonostante i potenziali difetti, l'istopatologia è ancora il test diagnostico più affidabile per una diagnosi di EC. Mentre l'IBD è costituito da un infiltrato misto di linfociti e plasmacellule, il SCL presenta una popolazione monomorfa di piccoli linfociti maturi che infiltrano e cancellano la lamina propria e l'epitelio (se epiteliotropico) e a volte strati più profondi della sottomucosa e della muscolatura (Marsilio et al., 2021). Tuttavia, il SCL può avere una componente infiammatoria e, quindi risulta difficile la distinzione dall'IBD. In questi casi, può essere necessario una diagnostica avanzata come l'immunoistochimica e metodi basati sulla PCR.

1.3 Test ausiliari per FCE: immunoistochimica e test della clonalità

Anche dopo l'istopatologia possono persistere dei casi ambigui, e attualmente test aggiuntivi, tra cui immunoistochimica (IHC) e test della clonalità sono considerati utili per differenziare IBD da SCL. Nelle lesioni neoplastiche, i linfociti derivano da una singola o poche cellule precursori e quindi le cellule figlie presentano tutte la stessa specificità recettoriale, *i.e.* riarrangiamenti mono- o oligo-clonale (Marsilio et al., 2021). Invece, nei processi infiammatori i linfociti derivano da un numero maggiore di cellule precursori con diverse specificità antigene-recettore, *i.e.* riarrangiamenti policlonali (Marsilio et al., 2021). Questo concetto è alla base dell'analisi immunoistochimica e PARR (basata su PCR).

1.3.1 Immunoistochimica

L'immunoistochimica è il primo passo, dopo l'istopatologia, per ottenere un'ulteriore differenziazione tra IBD e SCL, in presenza di diagnosi ambigue. Le

colorazioni specifiche per l'IHC includono CD3 per le cellule T, CD20, CD79a o PAX-5 per le cellule B (Marsilio et al., 2021).

Le colorazioni determinano se tutti i linfociti osservati derivano da un singolo lignaggio o se l'infiltrato è costituito da una miscela di linfociti T, linfociti B e plasmacellule; il primo caso supporta una diagnosi di linfoma, mentre il secondo di infiammazione, *i.e.* IBD.

Uno studio sull'architettura della mucosa, il fenotipo e la clonalità del linfoma gastrointestinale pubblicato da Moore et al. ha dimostrato che solo circa il 16% dei linfomi alimentari era di origine a cellule B ed erano tutti considerati LCL, mentre in generale circa l'84% dei linfomi intestinali erano a cellule T di cui l'85% erano SCL (Moore et al., 2005).

I SCL spesso sono accompagnati da infiammazione e quindi una diagnosi può essere difficile anche con IHC. Pertanto, sono stati sviluppati altri metodi per valutare la clonalità dei recettori linfocitari (Moore et al., 2005).

1.3.2 Test della clonalità

La clonalità può essere valutata in molti modi, mediante citometria a flusso, Southern blot e PCR *end-point* (Marsilio et al., 2021). La tecnica PARR, ossia la PCR per la valutazione del riarrangiamento genico dei recettori dell'antigene linfocitario è il metodo più utilizzato, in quanto può essere eseguito su campioni di tessuto fissati in formalina e inclusi in paraffina (Moore et al., 2005).

I recettori dell'antigene linfocitario presentano una elevata variabilità; infatti, la diversità dell'immunoglobulina delle cellule B (Ig) o dei recettori delle cellule T (TCR) è stimato essere nell'ordine di 10^{18} (Marsilio et al., 2021). Tale variabilità è resa possibile dal riarrangiamento somatico delle sequenze di DNA germinale e i saggi di clonalità permettono di mettere in luce tale diversità.

La presenza di diversi cloni suggerisce l'esistenza di lesioni infiammatorie, mentre cloni singoli indicano lesioni neoplastiche. Tuttavia, anche se i primer usati nella PARR sono specifici, non si può determinare il lignaggio cellulare. Fino al 10% dei casi, le cellule T possono riorganizzare i geni del recettore delle cellule B e viceversa in un processo di riarrangiamento incrociato (Marsilio et al., 2021). Pertanto, i test di clonalità non possono e non devono essere utilizzati per determinare il lignaggio del clone.

In conclusione, IHC e PARR dovrebbero sempre essere interpretati insieme e nel contesto di tutti i dati disponibili per poter individuare la corretta diagnosi.

2. APROCCIO SPERIMENTALE: MATERIALE E METODI

2.1 Campioni

Nel presente studio sono stati inclusi cinque campioni di archivio (tessuto intestinale e linfonodo satellite) del laboratorio di istopatologia veterinaria del Dip. BCA provenienti da tre gatti, che presentavano sintomi riconducibili ad EC.

In particolare, per i casi GATTO 1 e GATTO 3 sono state analizzate le biopsie di intestino e linfonodo tributario, mentre per il GATTO 2 sono state prese in considerazione le sole biopsie intestinali. Di seguito si riporta il segnalamento e l'anamnesi dei tre casi oggetto di studio.

Il GATTO 1 è composto da biopsia di linfonodo e biopsia del duodeno ottenute tramite laparotomia, provenienti da un gatto comune europeo maschio castrato di 11 anni che presentava come sintomatologia diarrea e dimagrimento.

Il GATTO 2 è composto da biopsia di linfonodo, biopsia del digiuno e biopsia dell'ileo ottenute tramite laparotomia, provenienti da un gatto comune europeo maschio castrato di 6 anni con diarrea e perdita di peso.

Infine, il GATTO 3 è composto da biopsia del digiuno e linfonodo digiunale *in toto* ottenuti tramite laparotomia, provenienti da un gatto comune europeo maschio castrato di 6,5 anni con diarrea emorragica.

Tutti e tre i casi sono stati sottoposti ad analisi istologica, IHC e test di clonalità linfoide (PARR). Unendo i dati anamnestici con i dati ottenuti dalle tre analisi è stato possibile giungere ad una diagnosi della patologia; ciò dimostra che per ottenere una corretta diagnosi è necessaria un'analisi *multistep*.

2.2 Istopatologia

L'esame istologico di un campione tissutale consiste nell'analisi tramite l'attenta visione al microscopio al fine di individuare eventuali segni o anomalie.

Prima di procedere con l'analisi istologica, il campione viene sottoposto a un trattamento di preparazione, che incomincia dal prelievo del campione. Il prelievo dei campioni viene fatto ad opera dei veterinari o da laboratori di necropsia. I campioni in questione possono essere interi organi o delle biopsie delle lesioni causate dalla patologia.

Gli organi o i campioni tissutali arrivano al laboratorio di istopatologia in formalina, così da preservare la loro struttura cellulare e prevenire il degrado biologico. Inoltre, i campioni possono essere conservati a lungo termine in formalina senza gravi alterazioni e contaminazioni, in quanto il solvente uccide i batteri e gli altri microorganismi presenti nel campione.

Una volta giunti in laboratorio i campioni vanno incontro al *trimming*, processo in cui si rimuovono parti non essenziali o non rappresentative del campione per concentrarsi sull'area specifica di interesse. I pezzi ottenuti dal *trimming* vengono posizionati in biocassette in modo da ricordare all'operatore l'orientamento della sezione di taglio.

Successivamente le biocassette vengono poste in un processore di tessuti, che con un ciclo di 10 ore elimina tutta l'acqua e la formalina, essiccando il campione permettendo nell'ultimo *step* del ciclo il riempimento di tutto il tessuto con la paraffina.

Poi, usando la centralina di infusione, si riempie un contenitore di acciaio in cui vengono posti i campioni con paraffina liquida e il tutto viene chiuso con la biocassetta. Le sezioni vengono poste nel contenitore in modo che non tocchino i bordi e devono essere posti con la sezione di taglio a contatto con la base del contenitore. Inoltre, il lato lungo del pezzo dev'essere perpendicolare al lato corto del vetrino/biocassetta, così la lama del microtomo entra in contatto con una superficie maggiore e se in una biocassetta sono posti più pezzetti, essi devono essere posti in modo sfalsato così se nel taglio la lama genera un segno non rovina tutte le sezioni. Dopo che i blocchetti si sono raffreddati e la paraffina si è solidificata, si tolgono dal contenitore in acciaio e con un bisturi si tolgono le sbavature della paraffina dalla biocassetta.

Dopo di ciò viene fatta la sgrossatura, dove, siccome le sezioni sono ricoperte di paraffina anche dal lato esterno (lato del taglio), si deve eliminare la paraffina in eccesso con dei tagli al microtomo con spessore di qualche μm , fino ad avere delle fette con il tessuto intero privo della paraffina. Questa è una tecnica che riscalda il blocchetto di paraffina, per cui devono essere subito posti a raffreddare in frigo. Ciò perché se si taglia la paraffina troppo calda, essa si comporta da cera e il foglietto ottenuto si ripiega su se stesso.

Una volta fatta la sgrossatura, con il microtomo si può procedere con il taglio del blocchetto di paraffina. Si effettuano dei tagli per generare delle fettine totalmente integre di spessore di 3-5 μm . Nel caso di un campione di linfonodo si devono effettuare dei tagli di spessore 3 μm , perché il linfonodo è un tessuto ricco di cellule, per cui si devono generare delle fettine di spessore tale da poter ottenere vetrini composti da un solo strato di cellule e non degli strati multipli.

A questo punto, prima di fare la colorazione si deve reidratare il campione posto sul vetrino, per cui si pongono i vetrini in una stufa a 70°C per almeno 30 minuti, così che la paraffina si scioglia. Dopo di ciò si può eseguire la colorazione del vetrino, per i nostri casi studi la colorazione eseguita era l'ematossilina-eosina (HE), utilizzando un coloratore di vetrini lineare automatico secondo il seguente protocollo: I) 5 min in xilolo, II) 4 min in alcol 100°, III) 2 min in alcol 95°, IV) 1 min in alcol 70°, V) 15 sec in acqua di fonte, VI) 20 sec in acqua distillata, VII) 2:30 min in Ematossilina di Mayer, VIII) 7 min in acqua di fonte, IX) 15 sec in alcol 95°, X) 50sec in Eosina-Floxina, XI) 1 min in alcol 95°, XII) 2 min in alcol 100°, XIII) 4 min in xilolo.

Dopo la colorazione si deve montare il vetrino. Le lesioni sono solo appoggiate sul vetrino, per cui si mette il vetrino copri oggetto per proteggerle e perché permette di riflettere meglio la luce ottenendo una migliore risoluzione al microscopio. Per il montaggio nel vetrino si lavora sotto cappa, perché lo xilene è un composto cancerogeno. Come prima cosa si pone una goccia di resina di montaggio nel centro, poi si bagna il vetrino nello xilene e si pone il copri oggetto tenendo il vetrino inclinato, per ridurre la formazione di bolle d'aria, infine si eliminano tutte le possibili bolle, applicando della pressione sul copri oggetto. Fatto ciò, dopo 24 ore il vetrino è pronto per essere analizzato al microscopio.

2.3 Immunoistochimica

L'immunoistochimica (IHC) è una tecnica di laboratorio utilizzata in biologia e medicina per rilevare la presenza, la distribuzione e l'abbondanza di specifiche molecole o antigeni all'interno di campioni di tessuti biologici (Alberts *et al.*, 2016). Questa tecnica combina i principi dell'immunologia con quelli dell'istochimica e consente di visualizzare e localizzare proteine, enzimi, ormoni, recettori e altri componenti molecolari all'interno delle cellule e dei tessuti.

Gli anticorpi comunemente usati in questa procedura sono purificati da antisieri in modo da rimuovere tutti gli anticorpi aspecifici, oppure sono anticorpi monoclonali specifici che riconoscono solo il bersaglio (Alberts *et al.*, 2016).

L'IHC viene eseguita su sezioni istologiche ottenute dallo stesso blocchetto già usato per l'esame istologico. Viene scelto un pannello di anticorpi, detto anticorpo primario che, posto sulla sezione istologica, si lega agli antigeni tissutali che si stanno cercando. Ciò porta a una reazione immunitaria anticorpo-antigene, successivamente rilevata da un anticorpo secondario, il quale è coniugato a una sonda fluorescente o a un enzima catalizzatore che reagisce con un substrato formando un precipitato insolubile colorato visibile al microscopio ottico. Questo metodo di rilevazione, denominato anche immunoistochimica indiretta, è molto sensibile, perché l'anticorpo primario a sua volta viene riconosciuto da molte molecole di anticorpo secondario marcato, per cui si ottiene un segnale più forte rispetto ad usare solo l'anticorpo primario marcato (Alberts *et al.*, 2016).

Questa tecnica, nella diagnostica, risulta molto spesso essenziale perché le caratteristiche fenotipiche di un tessuto permettono di riconoscere le linee cellulari coinvolte, garantendo una più precisa classificazione della patologia.

La colorazione immunoistochimica nel laboratorio Istopatologia Veterinaria del Dip. BCA, viene eseguita mediante l'impiego di un immunocoloratore semiautomatico (Ventana Banchmarck GX), che può analizzare fino a 20 vetrini contemporaneamente.

Il vetrino applicato in IHC è un vetrino particolare, definito tomo. Che sono più adesivi rispetto ai vetrini da istologia, ma non presentano la normale colla, perché il tessuto durante la colorazione viene sottoposto ad alte temperature e a processi aggressivi, che possono far legare la colla ai reagenti o al tessuto, così inibendo la colorazione. Per cui al posto della colla il copri oggetto viene adeso con un processo fisico-meccanico in cui si impone una carica elettrostatica o in alcuni casi si usa la polilesina, così da fare aderire meglio il tessuto.

Sono presenti codici a barre sia sui dispenser dei reagenti (che indicano il tipo di reagente e quanti test si possono fare con la quantità residua del dispenser) che sui vetrini (che indicano il protocollo di colorazione che deve essere eseguito); l'immunocoloratore presenta un lettore laser dei codici a barre e un carosello con i dispenser. Inoltre, è dotato di una serie di taniche di reagenti, che sono:

- EZ Prep: effettua la sparaffinatura, rimuovendo la paraffina dal tessuto. Perché essendo anticorpo e reagenti a base acquosa essi non reagiscono con la paraffina, che è lipofila;

- LCS: è una sostanza oleosa, che funziona come coverslip, generando una barriera tra i reagenti e l'aria, impedendo la loro evaporazione e genera un ambiente stabile per le reazioni;
- Reaction Buffer: una soluzione tampone usata per risciacquare i vetrini fra la fase di colorazione e fornisce un ambiente acquoso stabile per le reazioni di immunoistochimica;
- CC1: tampone di pH leggermente basico, che a temperature elevate può idrolizzare i legami covalenti formati dalla formalina nel tessuto. La rimozione dei legami permette la rinaturazione delle molecole proteiche e aumenta la possibilità di accesso degli anticorpi;
- CC2: tampone leggermente acido, che ad elevate temperature idrolizza i legami covalenti formati dalla formalina nel tessuto.

Il kit che è stato usato per la colorazione immunoistochimica è l'*ultraView* Universal DAB Detection Kit, composto da:

- 25 ml *ultraView* Universal DAB Inhibitor (3% H₂O₂): inibitore delle perossidasi endogene. Tali enzimi si trovano normalmente nei tessuti e possono dare colorazioni aspecifiche, perché non vengono distinte da quelle del sistema sperimentale;
- 25 ml *ultraView* Universal HRP Multimer (~55 µg/mL): anticorpo secondario anti-mouse/rabbit coniugato con la perossidasi;
- 25 ml *ultraView* Universal DAB Chromogen (0.2% w/v DAB) (3,3-diaminobenzidinatetraidrocloreuro);
- 25 ml *ultraView* Universal DAB H₂O₂ (0.04% H₂O₂): è il substrato della perossidasi che catalizza la riduzione della DAB liquida in DAB solida;
- 25 ml *ultraView* Universal DAB Copper (5 g/L CuSO₄): il solfato di rame rende la DAB di un colore più vivo.

La procedura prevede:

1. Prima di effettuare la colorazione i vetrini vengono posti in stufa per togliere l'umidità. Buona prassi è tagliare il tessuto uno o due giorni prima, così da togliere già in parte l'umidità, così da sottoporre il tessuto a un breve ciclo ad alte temperature (circa 5-6 minuti), mentre se il taglio viene eseguito appena prima la colorazione il vetrino deve essere messo in stufa a 40° per mezz'ora.
2. I vetrini vengono posti nell'immunocoloratore e come prima cosa si ha la sparaffinatura a opera del EZ Prep.
3. Dopo avviene lo smascheramento dei siti antigenici tramite i reagenti CC1 e CC2.
4. Poi si ha l'aggiunta manuale dell'anticorpo primario.
5. Successivamente la macchina aggiunge l'anticorpo secondario legato alla perossidasi.
6. Infine, avviene l'aggiunta del cromogeno con il quale la perossidasi reagisce formando un precipitato insolubile colorato visibile al microscopio ottico.

Inoltre, nella colorazione vengono inseriti dei controlli positivi e negativi. I controlli negativi sono una copia del campione in cui non si pone l'anticorpo

primario così da vedere dove avviene la marcatura. Mentre i controlli positivi servono per vedere se la reazione è avvenuta o meno, perché il controllo positivo è un campione in cui la reazione di colorazione avviene sicuramente, per cui se la colorazione non avviene a livello del controllo positivo significa che ci devono essere stati degli errori durante la procedura.

2.3.1 Anticorpo primario

Il sistema immunitario adattativo è un sofisticato sistema di difesa, dipendente dai linfociti T e B che, durante il loro sviluppo, riarrangiano particolari sequenze di DNA in varie combinazioni cosicché, nel loro complesso, possano produrre una varietà di recettori T e B (Alberts *et al.*, 2016).

Qualunque sostanza capace di stimolare i linfociti T o B a iniziare una risposta immunitaria adattativa specifica contro di essa è definita antigene (Alberts *et al.*, 2016). Ogni antigene è composto da uno o più determinanti antigenici, i quali determinano la specificità della reazione anticorpo-antigene.

Disponendo dell'anticorpo specifico qualsiasi antigene può essere evidenziato tramite l'IHC, ciò permette quindi di definire la tipologia di popolazione linfoide.

Il pannello di anticorpi usato in laboratorio per la determinazione del linfoma intestinale in gatto è costituito dagli anticorpi anti-CD3 (*Monoclonal Mouse Anti-Human CD3*) in diluizione 1:50 e anti-CD20 (*Rabbit Anti-CD20 Polyclonal Antibody*) in diluizione 1:600, che marcano, rispettivamente, popolazioni di linfociti T e di linfociti B.

L'anticorpo anti-CD3 è specifico per il recettore delle cellule T. Se si osserva un'abbondante presenza di cellule che esprimono CD3 nel tessuto intestinale, questo suggerisce la presenza di cellule T, che sono coinvolte in risposte immunitarie. La distribuzione e la densità delle cellule T possono fornire indicazioni sulla gravità dell'infiammazione o sulla presenza di infiltrazione linfocitaria. Mentre, l'anticorpo anti-CD20 è specifico per il recettore delle cellule B. La presenza di cellule B esprimenti CD20 può suggerire una potenziale proliferazione anormale di queste cellule, che potrebbe indicare la presenza di un linfoma a cellule B. Tuttavia, va notato che il linfoma intestinale può coinvolgere sia le cellule T che le cellule B, quindi l'assenza di marcatori B-cellulari non esclude necessariamente un linfoma.

La valutazione immuno-fenotipica può aumentare l'indice di sospetto di neoplasia quando la maggior parte delle cellule esprime lo stesso fenotipo (Moore *et al.*, 2005).

2.4 Test di clonalità: PARR

La diagnosi di linfoma viene attualmente per lo più effettuata sulla base di criteri clinici e morfologici. L'evidenza istologica di un linfoma comprende la presenza di una marcata infiltrazione cellulare, un aspetto monomorfo dei linfociti infiltrati, l'imaturità citologica dell'infiltrato linfoide e l'interruzione, l'eliminazione e la sostituzione delle strutture normali del tessuto coinvolto da parte delle cellule infiltranti (Moore *et al.*, 2005). La valutazione immunologica può aumentare l'indice di sospetto di neoplasia quando la maggior parte delle cellule esprime lo stesso fenotipo. Tuttavia, l'espansione delle popolazioni di cellule T si verifica nel MALT intestinale nell'IBD e nel linfoma intestinale felino, che è in gran parte un

linfoma a cellule T (Moore *et al.*, 2005). La distinzione tra IBD e linfoma a cellule T in base ai soli criteri morfologici può quindi porre delle difficoltà.

La valutazione molecolare dello stato di clonalità degli infiltrati di cellule T, nelle malattie intestinali feline, risulta un valido complemento alla valutazione morfologica. L'analisi del riarrangiamento genico del TCR è una metodica utilizzata per rilevare la clonalità nelle popolazioni di cellule T (Moore *et al.*, 2005). L'individuazione di una popolazione clonale in una lesione linfoproliferativa equivoca può essere utilizzata come importante strumento diagnostico aggiuntivo per determinare la probabilità di neoplasia, se interpretata insieme ai risultati clinici, morfologici e immunofenotipici (Moore *et al.*, 2005).

2.4.1 Estrazione del DNA

Per l'estrazione del DNA da campione FFPE, matrice difficile in quanto il metodo di conservazione stesso diminuisce la qualità del DNA (ne provoca la frammentazione e di conseguenza difficoltà di amplificazione in PCR) (Granato *et al.*, 2014), è stato necessario mettere a punto un protocollo specifico.

Il kit usato per l'estrazione è QIAamp DNA FFPE tissue kit (QIAGEN), che è stato applicato a tutti e 5 i campioni, i quali sono stati forniti sottoforma di 4 fettine di ciascun blocchetto dallo spessore di 10 µm, conservati in Eppendorf. Ad ogni microtubo si aggiungono 1,5 mL di xilene, per sciogliere e rimuovere la paraffina, poi si vortexa e si centrifuga il campione a 20.000xg a temperatura ambiente per 3 min, infine si elimina il surnatante mantenendo il pellet di tessuto e si ripete il lavaggio per 3 volte. Successivamente si effettuano 3 lavaggi con 1,5 mL di etanolo 100%, per eliminare lo xilene, dopo l'aggiunta dell'etanolo si vortexa a lungo e si elimina il surnatante dopo una centrifugata a 20.000xg per 2 min. Per completare l'eliminazione dell'etanolo si lascia asciugare il pellet a 37°C in termoblocco. A questo punto, si risospende il pellet con 200 µL di Buffer ATL, si flicchetta e si aggiungono 20 µL di proteinasi k (lisa la membrana cellulare). Dopo di ciò si incuba in termoblocco a 56°C per tutta la notte e, se il mattino seguente il campione non è ancora completamente digerito, si aggiungono 5 µL di proteinasi k e si incuba fino a lisi completa. Finita la lisi si mettono i campioni in incubazione a 90°C per 1 ora in termoblocco. Nel mentre si prepara una mix con 200 µL di Buffer AL (provoca ulteriore lisi cellulare) e 200 µL di etanolo 100% per ogni campione, poi si distribuiscono 400 µL della mix ad ogni campione, si vortexa e spinnia. Il campione viene quindi trasferito in una colonnina in silice a cui si lega il DNA, e si elimina il filtrato dopo centrifugazione a 6000xg per 1 min. Successivamente si aggiungono 500 µL di Buffer AW1, si centrifuga per 1 min a 6000xg e si elimina il filtrato. Si effettua la stessa procedura con il Buffer AW2 e poi si centrifuga per 3 min a 20.000xg per eliminare ogni traccia di Buffer AW2 residuo. A questo punto si getta il tubo e si sposta la colonnina in un microtubo da 1,5 mL e si incuba a temperatura ambiente per 5 min, dopo l'aggiunta di 30 µL di Buffer ATE, che causa il distacco del DNA dalla matrice di silice, grazie al cambiamento di pH. Si centrifuga a 20.000xg per 1.5 min, caricando nuovamente sulla colonnina il filtrato per aumentare la concentrazione del DNA.

Infine, si valuta mediante spettrofotometro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) la concentrazione dell'estratto (picco di assorbanza a 260nm) e la qualità del DNA (rapporto assorbanza a 260 e 280 nm per valutare la contaminazione di proteine, valore ottimale 1.8-2.0, e 260/230 per la contaminazione di reagenti residui, valore ottimale 2.0-2.2).

2.4.2 PCR sul gene ACTB felino per la verifica dell'amplificabilità del DNA

Questa PCR viene effettuata per verificare l'amplificabilità dei campioni, perché essendo dei campioni d'archivio e conservati da tempo in paraffina, il DNA può essere molto frammentato e contenere degli inibenti che possono interferire con l'amplificazione in PCR. A tale scopo è stato scelto il gene codificante la β -actina (ACTB) di gatto, in quanto espresso in tutte le cellule e in un numero elevato di copie. L'amplificabilità dei campioni è stata valutata utilizzando prima 50 ng di DNA e successivamente 100 ng. A tale scopo gli estratti di DNA sono stati diluiti in acqua e la loro concentrazione finale è stata verificata mediante l'utilizzo dello spettrofotometro Nanodrop (Tabella1).

Campione	Ci (ng/ μ L)	D1	Cf (ng/ μ L)
1	2124.45	1:10	267.0
2	324.20	1:6	58.8
3	1399.20	1:10	154.0
4	94.00	1:2	48.1
5	181.20	1:3.5	41.2
campione	Ci (ng/ μ L)	D2	Cf (ng/ μ L)
1	267.0	1:5	47.2
3	154.0	1:3	46.1

Tabella 1 Ci: concentrazione iniziale; D1: prima diluizione; D2: seconda diluizione; Cf: concentrazione finale. I campioni sono numerati nel seguente ordine: 1 e 2 sono rispettivamente le biopsie intestinali e linfonodali del GATTO 1; 3 corrisponde alle biopsie intestinali del GATTO 2; 4 e 5 sono rispettivamente le biopsie intestinali e linfonodali del GATTO 3.

I primer (ACTB-for: TTGGACTTCGAGCAGGAGATG e ACTB-rev: GTCGCACTTCATGATGGAGTTGA) sono stati disegnati sul gene ACTB presente sul cromosoma E3 e in particolare in una porzione di gene (che ha in totale 6 esoni), che comprende la porzione terminale dell'esone 4, l'introne 4 e la porzione iniziale dell'esone 5, per un totale di 287pb.

La mix per la reazione di PCR, comprensiva della Phire HotStart II DNA Polymerase (Thermo Scientific), è stata preparata seguendo lo schema riportato in Tabella2.

	PCR1	PCR2	
	1X (μ L)	1X (μ L)	11x (μ L)
H2O	13.1	13.1	144.1
dNTPs 10 mM	0.5	0.5	5.5
Buffer	5	5	55
dNTPs	0.5	0.5	5.5
ACTB-for	1.25	1.25	13.75
ACTB-rev	1.25	1.25	13.75
Taq	0.4	0.4	4.4
DNA (50 o 100 ng)	3	3	
V tot	25	25	

Tabella 2 Composizione della mix utilizzata nella PCR per l'amplificazione del gene ACTB.

Il protocollo termico utilizzato per l'amplificazione di ACTB è stato il seguente: denaturazione iniziale a 95°C per 45 sec, poi 40 cicli divisi in una fase di denaturazione a 98°C per 5 sec, una di *annealing* a 67°C per 5 sec e una di estensione a 72°C per 5 sec ed infine una di estensione finale di 90 sec a 72°C. Per questa fase è stato usato il termociclatore Proflex (Thermofisher Scientific).

Una volta ottenuti gli amplificati è stata effettuata una elettroforesi su gel di agarosio al 2% in presenza di SYBR™ Safe DNA Gel Stain, a 100 V per circa 20min.

PCR TCRG1 (Moore *et al.*, 2005)

I primer e le condizioni di questa PCR sono tratti dal lavoro pubblicato da Moore *et al.* nel 2005.

Durante lo sviluppo dei linfociti T nel timo, le cellule T riorganizzano i loro geni del recettore per l'antigene TCRA, TCRB, TCRG e TCRD, e nel processo creano due lignaggi di cellule T (cellule $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$) (Moore *et al.*, 2005). Ma il riarrangiamento del gene TCRG avviene nella maggior parte delle cellule T, indipendentemente dal fenotipo. Il prodotto proteico del TCRG è il TCR γ , che contiene un dominio variabile, codificato da due segmenti di DNA, il segmento variabile (V) e quello di unione (J) (Moore *et al.*, 2005). Il riarrangiamento genico durante lo sviluppo porta all'unione di un segmento V con uno J, portando alla formazione di un esone completo del dominio V (Moore *et al.*, 2005). Dall'inserzione casuale di N nucleotidi tra i due segmenti a opera dell'enzima transferasi terminale, si crea la terza regione ipervariabile CDR3 (Moore *et al.*, 2005). Nello studio di Moore l'allineamento dei due segmenti di TCRG ha rilevato regioni altamente conservate, che hanno permesso di sviluppare primer per l'amplificazione della regione CDR3; nello specifico il primer forward è stato disegnato sul segmento V, mentre il reverse sul segmento J. Si riportano qui di seguito le sequenze dei primer degenerati:

TCRG1-for: 5' - AAGAGCGAYGAGGGMGTGT -3',

TCRG1-rev: 5' - CTGAGCAGTGTGCCAGSACC-3'.

La mix per la reazione di PCR è stata preparata seguendo lo schema riportato in Tabella3.

	1X (μ L)	12,5X (μ L)
H2O	14.1	176.25
Buffer	5	62.5
dNTPs	0.5	6.25
Pfor	1.25	15.6
Prev	0.75	9.4
Taq	0.4	5
DNA (50 o 100 ng)	3	
V tot	25	

Tabella 3 Composizione della mix utilizzata nella PCR per l'amplificazione del gene TCRG1. Solamente per il campione 3 è stato usato una concentrazione di DNA pari a 7,8 ng/ μ L per i problemi di amplificabilità che ha riportato.

Per l'amplificazione è stato usato un protocollo di PCR Touch Down, ossia una PCR in cui la temperatura di *annealing* è inizialmente alta e progressivamente si abbassa verso la temperatura ottimale per la coppia di primer. Questo procedimento serve per ottenere un'elevata specificità di appaiamento nelle fasi iniziali, in quanto temperature di *annealing* iniziali più elevate fanno diventare la reazione di appaiamento più selettiva, per cui termodinamicamente sono favoriti gli appaiamenti *perfect match*.

Il protocollo termico è stato il seguente: denaturazione iniziale a 95°C per 45 sec, poi 5 cicli divisi in 98°C per 5 sec e 70°C per 12 sec, altri 5 cicli divisi in 98°C per 5 sec e 68°C per 12 sec, ulteriori 35 cicli divisi in 98°C per 5 sec e 65,5°C per 5 sec e alla fine del protocollo si effettua un'estensione finale a 72°C per 90 sec per completare la sintesi di eventuali *duplex* incompleti. I controlli positivi e negativi sono stati amplificati in singolo mentre i campioni incogniti in doppio.

Dopo la PCR viene eseguita l'analisi degli *heteroduplex*, ponendo gli amplificati per 5 min a 95°C e subito dopo in ghiaccio per 30 min. L'analisi viene fatta per vedere se gli ampliconi sono prodotti su un unico riarrangiamento o se sono frutto dell'appaiamento di più riarrangiamenti simili, ma non identici. La prima fase a 95°C serve per denaturare il doppio filamento di DNA, mentre la seconda in ghiaccio favorisce il riappaiamento dei *perfect match*; in caso di perfetto riallineamento in gel si evidenzierà una banda precisa e intensa, mentre in caso di pseudoclonalità, al gel si visualizzeranno bande distinte ma diverse nei due replicati dello stesso campione.

Infine viene effettuata un'elettroforesi su gel di agarosio al 3,5%, caricando 10 µL di amplificato per tutti i campioni con 2 µL di BBP, per 20 min a 100 V.

2.4.3PCR TCRG2 (Weiss et al., 2011)

I primer e le condizioni di questa coppia di PCR (denominate A e B) sono tratti dal lavoro pubblicato da Weiss et al. nel 2011. Lo studio descrive un saggio di PCR, che consente il completo sequenziamento dei geni della catena γ del TCR ricombinati clonalmente da campioni di linfomi felini (Weiss et al., 2011). Questi test si basano sul fatto che i geni che codificano per i TCR dei linfociti neoplastici sono riarrangiati clonalmente (Weiss et al., 2011). Questi geni subiscono un riarrangiamento somatico durante lo sviluppo. In questo processo la diversità è ottenuta mediante selezione casuale e l'unione imprecisa di diversi segmenti V e J danno luogo a una lunghezza unica della regione CDR3 (Weiss et al., 2011).

Il polimorfismo in lunghezza può essere visualizzato mediante l'amplificazione, usando un set di primer diretti contro regioni conservate, che rispecchiano le varianti più presenti nei linfociti neoplastici felini (Weiss et al., 2011), nello specifico:

-F1: FTGFR2f1: 5'-GGTCAGCTACATCCACTGGTAC-3'

-F2: FTGFR2f1: 5'-ATCCACTGGTACCTCCACCAG-3'

-R1: FTGFR4r1: 5'-ACCCTGAGAGTGTGCCAG-3'

-R2: FTGFR4r2: 5'-GAGTTACTATGAGCTTAGTTCCTTC-3'

-R3: FTGFR4r3: 5'-GTAATCCAGATCTCAGGTTTGG-3'

Tali primer possono essere usati in 4 possibili combinazioni (A, B, C e D), di cui abbiamo usato le prime due (A e B), perché sono le due più sensibili. In particolare, si effettua prima la B, essendo la più sensibile, e se non si ottengono dei risultati chiari e distinti si effettua la A.

Le mix per le reazioni di PCR sono state preparate secondo lo schema riportato in Tabella4.

PCR B	1X (uL)	12,5x (uL)	PCR A	1X (uL)	12,5x (uL)
H2O	12.35	154.375	H2O	13.6	170
Buffer	5	62.5	Buffer	5	62.5
dNTPs	0.5	6.25	dNTPs	0.5	6.25
F1	1.25	15.625	F1	1.25	15.625
R2	1.25	15.625	R1	1.25	15.625
R3	1.25	15.625	-	-	-
Taq	0.4	5	Taq	0.4	5
DNA	3		DNA	3	
V tot	25		V tot	25	

Tabella 4 Composizione delle due mix (A e B) utilizzate nella PCR per l'amplificazione del gene TCRG2. Anche qui per il campione 3 è stata utilizzata una concentrazione di DNA più elevata

La PCR A segue il seguente protocollo termico: una fase a 98°C per 45sec, 12 cicli divisi in 98°C per 30sec, 68°C per 15sec e 72°C per 45sec, altri 10 cicli divisi in 98°C per 30sec, 62°C per 15sec e 72°C per 45sec, poi altri 20 cicli divisi in 98°C per 30sec, 60°C per 15sec e 72°C per 45sec e infine 72°C per 5min. Mentre per la PCR B si ha il seguente protocollo termico: una fase a 98°C per 45sec, 10 cicli divisi in 98°C per 30sec e 72°C per 1min, altri 10 cicli divisi in 98°C per 30sec, 69°C per 15sec e 72°C per 45sec, poi altri 20 cicli divisi in 98°C per 30sec, 67°C per 15sec e 72°C per 30sec e infine 72°C per 5min. Dopo le due PCR si effettua l'analisi degli *heteroduplex* e l'elettroforesi su gel di agarosio.

3. RISULTATI E DISCUSSIONE

3.1 Esito esame istologico

Nel GATTO 1 (Fig. 1) la biopsia del duodeno è stata divisa in sezioni, che sono interessate da una popolazione cellulare atipica monomorfa che è presente diffusamente nella lamina propria superficiale e profonda con lieve estensione nella sottomucosa e focalmente la muscolatura. Tale popolazione è composta da elementi di dimensioni pari a circa un

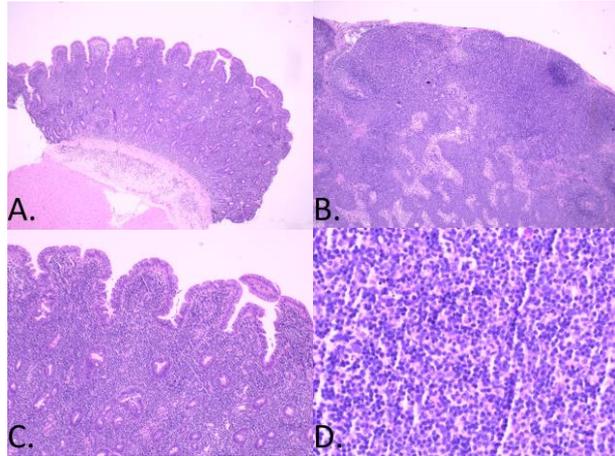


Figura 1 Sezioni delle biopsie del GATTO1 con colorazione HE. A: sezione del duodeno in 4X B: sezione del linfonodo in 4X C: sezione del duodeno in 10X D: sezione del linfonodo in 40X

globulo rosso (circa 7,5 μ m), con alone citoplasmatico chiaro, disomogeneo, nucleo rotondeggiante, spesso indentato, cromatina grossolanamente granulare e nucleolo non sempre visibile. Nel campione di biopsia di linfonodo si osserva una diffusa espansione paracorticale di elementi monomorfi simili a quanto osservato in sede intestinale, che sposta e comprime le strutture follicolari.

Diagnosi: sospetto di presenza di linfoma intestinale.

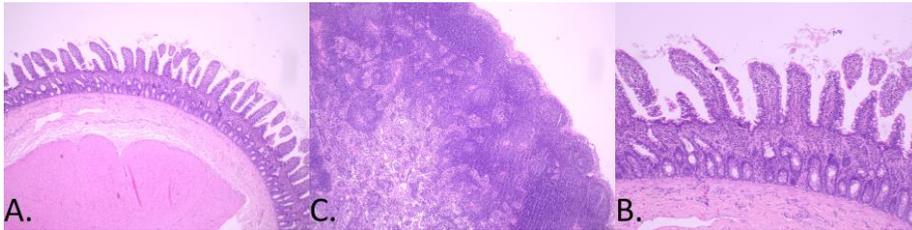


Figura 2 Sezioni delle biopsie del GATTO 2 con colorazione HE. A: sezione di intestino in 4X; B: sezione di intestino in 10X; C: sezione di linfonodo in 4X.

Nel GATTO 2 (Fig. 2) le biopsie di digiuno e ileo presentano a livello della lamina propria un moderato infiltrato infiammatorio diffuso, uno stroma lievemente edematoso, rappresentato prevalentemente da linfociti ipercromatici frammisti ad eosinofili ed occasionali plasmacellule. I linfociti infiltrano frequentemente l'epitelio ghiandolare e di rivestimento.

Diagnosi: EC diffusa con lievi caratteri di atipia (diagnosi differenziale con un linfoma intestinale in fase iniziale).

La biopsia di linfonodo presenta parenchima linfonodale caratterizzato dalla presenza di occasionali follicoli linfoidi e moderata espansione della componente paracorticale; in questo caso la diagnosi è di un campione nella norma.

Infine, nel GATTO 3 (Fig. 3) si osserva a livello della biopsia del digiuno, nella lamina propria, un infiltrato linfoide moderato associato ad occasionali plasmacellule e rari polimorfonucleati. Tali elementi non sono evidenti a carico dell'epitelio. L'epitelio è eroso sulla superficie. Gli elementi linfoidi sono tondeggianti con scarso citoplasma, nucleo tondeggiante, raramente indentato con occasionale nucleolo. Non si evidenziano mitosi.

Diagnosi: compatibile con EC e sospetta infiltrazione linfoide atipica.

A carico delle sezioni di linfonodo digiunale si osserva la presenza di una popolazione cellulare omogenea e monomorfa nel 70% del tessuto analizzato, in

particolare a livello paracorticalico. Gli elementi cellulari si presentano tondeggianti con citoplasma scarso. Il nucleo è tondeggiante, raramente indentato con occasionale nucleolo. Non si osservano delle mitosi. Nel restante parenchima si rileva la presenza di residui di centri germinativi.

Diagnosi: reperto istopatologico compatibile con sospetto linfoma.

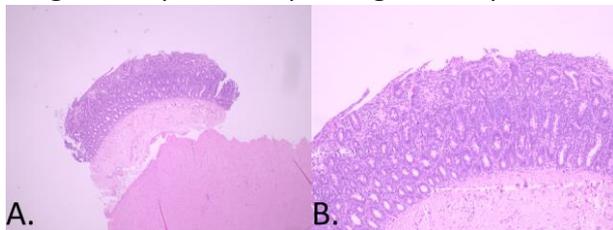


Figura 3 Sezioni delle biopsie del GATTO 3 con colorazione HE. A: sezione di intestino in 4X; B: sezione di intestino in 10X.

3.2 Risultati immunoistochimica

Dall'analisi IHC sono stati osservati i seguenti risultati. Il GATTO 1 (Fig.4) presenta nella biopsia del duodeno la popolazione della lamina propria diffusamente negativa per l'anticorpo anti-CD20, mentre risulta diffusamente positiva per l'anticorpo anti-CD3, anche a livello intraepiteliale. Al contrario la biopsia del linfonodo presenta una rara e disseminata positività per l'anti-CD20 e una diffusa positività per l'anti-CD3. Queste osservazioni portano a una diagnosi di possibile linfoma intestinale a fenotipo T.

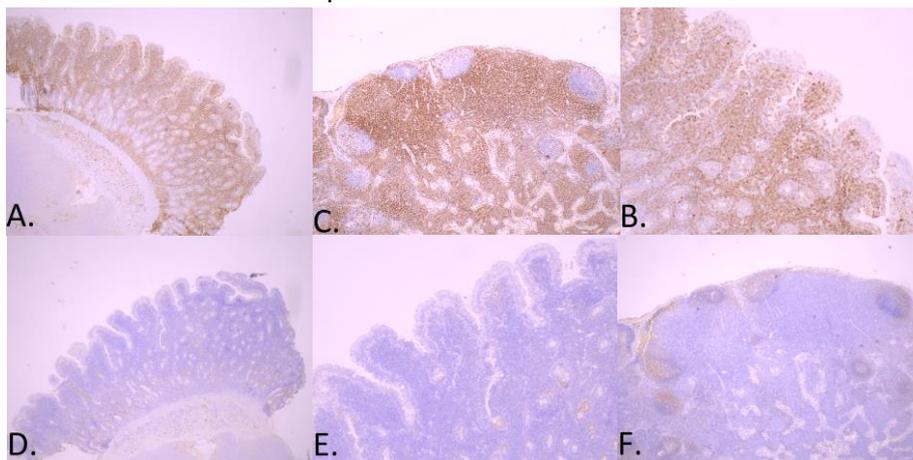


Figura 4 Sezioni delle biopsie del GATTO1 con A, B e C in colorazione IHC CD3, mentre D, E e F con colorazione IHC CD20. A: sezione di digiuno in 4X; B: sezione di digiuno in 10X; C: sezione di linfonodo in 4X; D: sezione di digiuno in 4X; E: sezione di digiuno in 10X; F: sezione di linfonodo in 4X.

L'intestino del GATTO 2 (Fig. 5) presenta nella lamina propria una popolazione raramente positiva per l'anti-CD20 e disseminatamente positiva per l'anti-CD3, anche a livello intraepiteliale. Invece, il linfonodo presenta una disseminata e occasionale positività per l'anti-CD20 soprattutto a livello subcapsulare, follicolare e midollare e una diffusa positività per l'anti-CD3 nella zona paracorticalica. Ciò porta a una diagnosi di sospetto linfoma intestinale a fenotipo T e possibile iperplasia linfonodale paracorticalica atipica. Infine, del GATTO 3 si osserva a livello della lamina propria dell'intestino una popolazione linfoide negativa per l'anti-CD20 e positiva per l'anti-CD3, soprattutto a livello intraepiteliale. Mentre il linfonodo presenta una rara e occasionale positività per l'anti-CD20 e una diffusa positività per l'anti-CD3 nella zona paracorticalica. Tutto ciò suggerisce come diagnosi l'EC con infiltrazione linfoide intraepiteliale e possibile iperplasia linfonodale paracorticalica atipica.

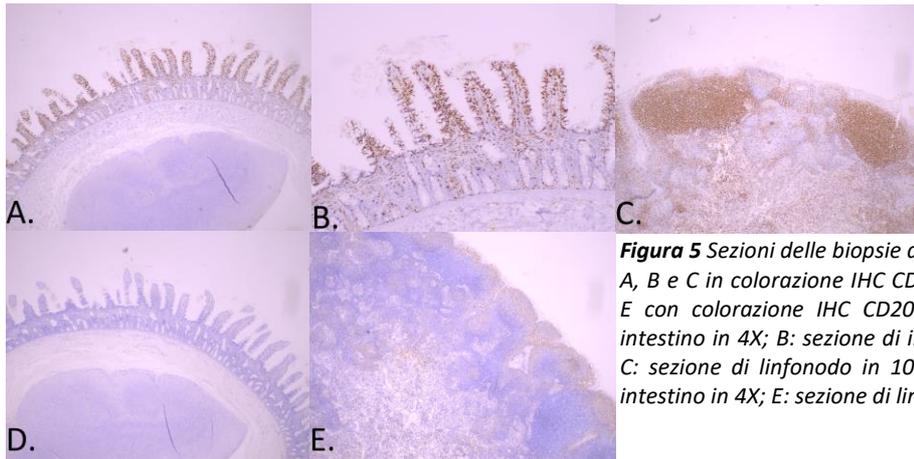


Figura 5 Sezioni delle biopsie del GATTO 2 con A, B e C in colorazione IHC CD3, mentre D ed E con colorazione IHC CD20. A: sezione di intestino in 4X; B: sezione di intestino in 10X; C: sezione di linfonodo in 10X D: sezione di intestino in 4X; E: sezione di linfonodo in 4X.

3.3 Test della clonalità

In generale gli estratti di DNA dei 5 campioni sono risultati conformi in termini di qualità e sufficientemente concentrati: si riportano i risultati in Tabella 5.

Tabella 5

Campione	Concentrazione (ng/ μ L)	A260/280	A260/230
1	2124.45	1.95	2.28
2	324.20	1.96	2.26
3	1399.22	1.95	2.22
4	94.02	1.97	1.98
5	181.22	1.96	1.97

Si è poi proceduto con la prova di amplificabilità. A seguito della PCR dell'ACTB è attesa una banda di 287 pb; se non si evidenzia la banda significa che il campione in questione non è amplificabile. In tale caso occorre ripetere la PCR una seconda volta; tale problema si può verificare con i campioni FFPE, a causa della frammentazione del DNA e della presenza di inibitori della PCR (Granato *et al.*, 2014).

Dal gel della PCR per l'amplificabilità (Fig. 6A) si osserva che il GATTO 1 presenta sia nella biopsia dell'intestino (campione 1) che in quella del linfonodo (estratto 2) la prima banda più intensa della seconda, per cui si ipotizza la presenza di inibitori della PCR, perché all'aumentare della concentrazione di DNA usata

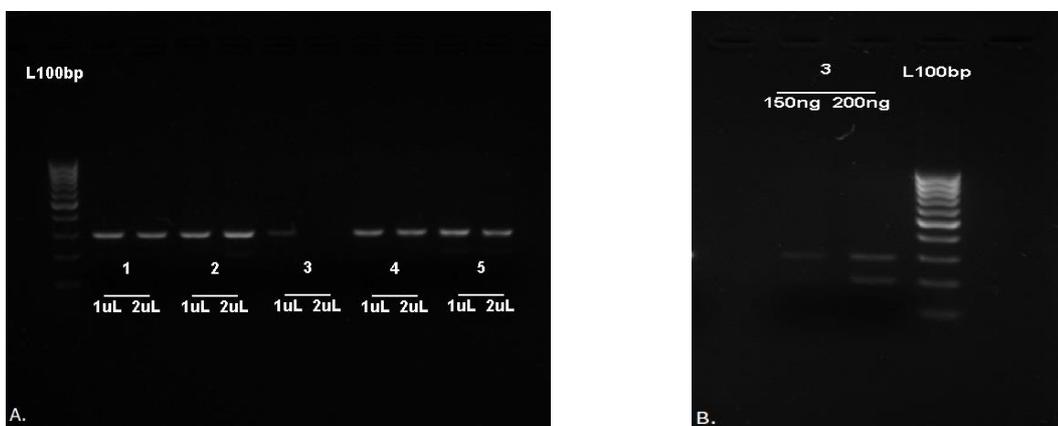


Figura 6 La figura A riguarda la prima PCR ACTB, mentre la B la seconda effettuata solo per il campione 3 diminuisce l'intensità e quindi l'efficienza della reazione. Invece, il campione 3 (GATTO 2) risulta per entrambe le concentrazioni poco amplificabile, per cui sono

state effettuata due nuove PCR con quantità di DNA pari a 150 ng e 200 ng totali (Fig. 6B), dove si osserva che all'aumentare della concentrazione di DNA aumenta l'efficienza delle PCR, ciò perché i campioni FFPE a conservazioni per lungo periodo vanno incontro alla frammentazione del DNA che provoca problemi di amplificazione; dunque, a concentrazioni maggiori di DNA si ha una maggiore efficienza della PCR (Granato *et al.*, 2014). Infine, per il GATTO 3 si hanno degli esiti analoghi al GATTO 1 ma con una meno accentuata differenza di intensità tra le bande (campione 4 e 5).

Quindi, dai risultati della PCR ACTB si comprende che tutti i campioni sono amplificabili e si può procedere con le PCR di Moore e Weiss del gene TCRG per la clonalità.

I risultati attesi per la PCR TCRG1 sono i seguenti:

- Il controllo negativo non deve presentare bande.
- Il controllo positivo deve presentare una banda di circa 100pb.
- I campioni incogniti in caso di riarrangiamento monoclonale devono presentare una o più bande intese e precise nella regione compresa tra 80 e 120pb (ricordando che un riarrangiamento mono- o oligo-clonale suggerisce una proliferazione neoplastica, mentre uno policlonale la presenza di un'inflammatione, quindi EC (Marsilio *et al.*, 2021)).

Inoltre, un campione viene considerato positivo, cioè rivelatore di una espansione linfocitaria monoclonale, quando almeno un saggio mostra una o più bande nette e precise e non uno smear.

Dai risultati del gel della PCR TCRG1 (Fig. 7) si osserva che il GATTO 1 (campione 1 e 2) è composto da due tipi di cloni, con buona corrispondenza tra intestino e linfonodo, per cui si ha un riarrangiamento oligo-clonale (dato da due cloni) che suggerisce la presenza di un linfoma intestinale. Invece, nel caso del GATTO 2 la PCR non ha prodotto amplificati, nonostante il tentativo di aumentare la quantità di DNA (vedi risultati ACTB). Infine, il GATTO 3 (campione 4 e 5) presenta un riarrangiamento policlonale (presenza di uno smear al posto di una banda ben definita); inoltre il riarrangiamento risulta essere diverso tra intestino e linfonodo. I controlli positivo e negativo risultano in ordine.

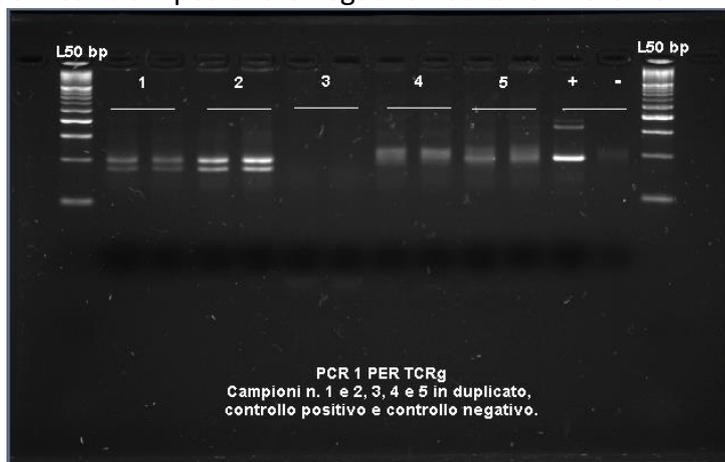


Figura 7 Immagine del gel della PCR TCRG1

I risultati per le due PCR TCRG2 sono i seguenti:

- Il controllo negativo non deve presentare bande.
- Il controllo positivo FT-1 deve presentare una banda di circa 300pb.

- I campioni incogniti possono presentare bande comprese tra 250 e 280pb; in caso di popolazioni linfocitarie si evidenzia uno smear, mentre con popolazioni clonali una banda distinta.

Dai gel degli amplificati delle due PCR TCRG2 A e TCRG2 B (Fig. 8) si osserva che nel GATTO 1 (campione 1 e 2) si ha un'espansione monoclonale, per la presenza di un'unica banda, e in particolare i cloni sono uguali tra il campione di intestino e quello di linfonodo. Invece il campione 3 (GATTO 2) risulta ancora non amplificabile, per ambedue le PCR. Infine, il GATTO 3 (campione 4 e 5) non presenta una banda unica, bensì uno smear che indica la presenza di un'espansione policlonale. Inoltre, nel gel della PCR A si può osservare la presenza di una banda anche nel controllo negativo ciò è dovuto a delle cross-contaminazioni con il controllo positivo in termociclatore, mentre nella PCR B si può notare in tutti i campioni e nei due controlli la presenza di una banda più bassa all'altezza della base del ladder, che corrisponde alla nuvola dei primer.

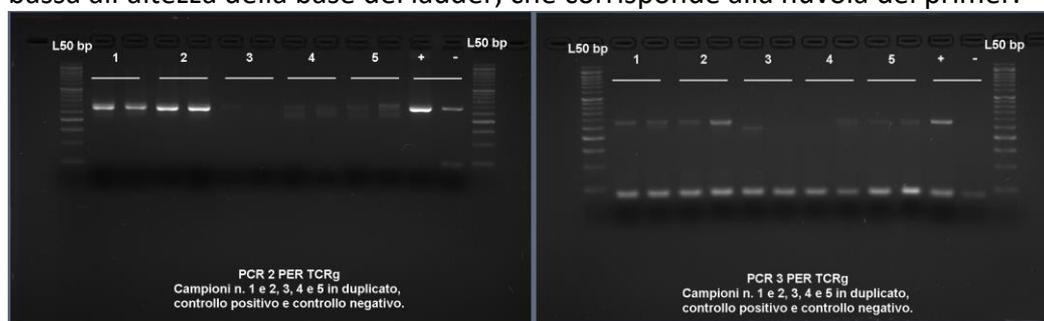


Figura 8 Immagine dei gel delle due PCR TCRG A e B. In particolare, la PCR 2 equivale alla PCR A e la PCR 3 alla PCR b

3.3 Discussione finale

Per poter differenziare l'EC dal linfoma intestinale è necessario effettuare uno studio approfondito che metta a confronto la sintomatologia del paziente con vari test di analisi effettuati, tra i quali l'IHC ed il test di clonalità.

Un esempio di tale approccio è stato fornito dai tre casi presi in esame in questo studio dove si possono notare delle discordanze e delle analogie tra le varie analisi effettuate. In particolare, si può osservare come nel caso del GATTO 1 tutte le analisi effettuate, a partire dall'esame istologico fino al test della clonalità, abbiano dato lo stesso esito, permettendo di affermare con maggiore certezza la presenza di un'espansione oligo-clonale riconducibile a un linfoma a fenotipo T. Però si osserva che le PCR TCRG1 e TCRG2 hanno dato due risultati diversi; la prima un'espansione oligo-clonale di due cloni, mentre la seconda ne ha riconosciuta una monoclonale. Ciò può essere riconducibile sia alla diversa sensibilità dei saggi, sia e soprattutto alla variabilità delle regioni genomiche utilizzate per il disegno dei saggi. I primer, infatti, mostrano spesso una diversa efficienza di appaiamento a causa dell'eventuale presenza di mismatch, a parità di campione e di tutte le altre condizioni; di fatto per questo motivo non si utilizza un unico saggio. Comunque, in questo caso i risultati differenti riconducono sempre alla stessa diagnosi finale di linfoma intestinale.

Invece, il caso del GATTO 2 mette in luce come gli esiti dell'esame istologico e dell'IHC possano portare a formare delle diagnosi discordanti tra di loro. Mentre l'istologico indica la presenza di EC nell'intestino e di un linfonodo nella norma, l'IHC evidenzia la presenza di un'elevata positività per l'anti-CD3, soprattutto a

livello linfonodale che porta al sospetto di presenza del linfoma. In questo caso il test della clonalità avrebbe potuto sbilanciare la decisione verso una delle due diagnosi, però come visto in precedenza l'estratto del campione intestinale del GATTO 2 non era amplificabile.

Infine, anche nel caso del GATTO 3 si ha una concordanza dei nei risultati ottenuti dai tre approcci analitici: tutti e tre conducono alla diagnosi di EC, anche se inizialmente l'esame istologico aveva indotto il sospetto di linfoma in fase iniziale a causa del quadro presente a livello linfonodale. Successivamente però l'IHC aveva messo in luce una possibile iperplasia linfonodale paracorticalica atipica, confermata dal risultato del test della clonalità (espansione policlonale).

Dunque, dalle evidenze portate in questo studio si comprende come sia necessario, nei casi più insidiosi, utilizzare più approcci analitici, confrontare i dati ottenuti e soprattutto mettere in relazione i risultati con l'anamnesi del paziente per poter giungere ad una corretta diagnosi.

BIBLIOGRAFIA

- Marsilio S. Feline chronic enteropathy. J Small Anim Pract. 2021 Jun;62(6):409-419. doi: 10.1111/jsap.13332. Epub 2021 Apr 5. PMID: 33821508.
- Moore PF, Woo JC, Vernau W, Kosten S, Graham PS. Characterization of feline T cell receptor gamma (TCRG) variable region genes for the molecular diagnosis of feline intestinal T cell lymphoma. Vet Immunol Immunopathol.

2005 Jul 15;106(3-4):167-78. doi: 10.1016/j.vetimm.2005.02.014. PMID: 15963816.

- Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, David Morgan, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. *Biologia molecolare della cellula*. Sesta edizione a cura di Aldo Pagano
- Granato A, Giantin M, Ariani P, Carminato A, Baratto C, Zorzan E, Vascellari M, Bozzato E, Dacasto M, Mutinelli F. DNA and RNA isolation from canine oncologic formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for downstream "-omic" analyses: possible or not? *J Vet Diagn Invest*. 2014 Jan;26(1):117-24. doi: 10.1177/1040638713509378. Epub 2014 Jan 7. PMID: 24398906.
- Weiss AT, Klopffleisch R, Gruber AD. T-cell receptor γ chain variable and joining region genes of subgroup 1 are clonally rearranged in feline B- and T-cell lymphoma. *J Comp Pathol*. 2011 Feb-Apr;144(2-3):123-34. doi: 10.1016/j.jcpa.2010.08.001. Epub 2010 Sep 16. PMID: 20846665.