

## REZUMATUL ȘTIINȚIFIC FINAL PD 50/2020 ( 2021-2022)

Raportul științific de față se referă la implementarea proiectului PD 50/2020 (Etapa 1 și 2: 01.01.2021-31.12.2022) denumit ”*Expresia metaloproteinazelor matriceale, a metaloproteinazelor inhibitorii tisulare și a factorului endotelial de creștere vasculară în tumori cutanate bovine induse de papillomavirusuri*”. Scopul acestui proiect este de a analiza implicarea matrix- metaloproteinzelor, a inhibitorilor tisulari ai acestora și a factorului endotelial de creștere vasculară în substratul lezional produs de papillomavirusuri specifice bovinelor. Cercetările propuse în cadrul acestui proiect au fost realizate în cadrul Facultății de Medicină Veterinară, Universitatea pentru Științele Vieții ”Ion Ionescu de la Brad” din Iași și în cadrul Departamentului de Medicină Veterinară și Producții Animaliere, Universitatea degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia. Probele analizate în aceste etape au fost colectate de la bovine ce prezentau leziuni cutanate cu aspect conopidiform, caracteristice infecției cu papillomavirus bovin. După colectare, fiecare probă a fost împărțită în două părți: o parte fixată în formol, pentru analiza histopatologică și imunohistochimică, iar cealaltă parte congelată la  $-80^{\circ}\text{C}$  în vederea extracției ADN-ului și a analizei biochimice. Pentru a putea fi inclusă în studiu, fiecare probă a fost clasificată din punct de vedere histopatologic: diagnosticul de papilomatoză cutanată/fibropapilomatoză a coincis cu includerea probei în studiu și cu analiza moleculară ulterioară. Pentru confirmarea prezenței papillomavirusurilor bovine (BPV), ADN-ul viral a fost extras din fiecare probă cu ajutorul kiturilor de extracție PureLink™ Genomic DNA Mini Kit și a kitului Stat Nat RNA/DNA, conform instrucțiunilor producătorilor. ADN-ul viral a fost confirmat prin PCR, în primă fază utilizând primeri consensus nespecifici FAP 59/65, urmat de utilizarea primerilor specifici pentru BPV-1, BPV-2 și BPV-4. Pentru a sugera o implicare a BPV în expresia tisulară a matrix-metaloproteinazelor și a inhibitorilor acestora, s-a recurs la analiza imunohistochimică comparativă: expresie imunohistochimică a MMP-1, MMP-2, MMP-3/10, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14, a inhibitorilor TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 și a VEGF în pielea normală provenită de la bovine și în probe reprezentate de fibropapiloame cutanate bovine. Probele incluse la parafină au fost secționare la grosimea de  $4\mu\text{m}$ , deparafinate, incubate cu anticorpul primar corespunzător la diluția specificată de producător, iar vizualizarea imunosemnalului s-a realizat cu ajutorul kitului Novolink Polymer și a Diaminobenzidinei. S-a recurs la analiza biochimică a probelor luate în studiu. Probele au fost supuse extracției proteice în buffer de liză RIPA. După extracția proteică, probele au fost cuantificate cu ajutorul spectrofotometrului Eppendorf, utilizând tehnica de cuantificare Bradford micro. Pentru a putea determina ulterior nivelul de expresie proteică corespunzătoare matrix-metaloproteinazelor, a inhibitorilor acestora și VEGF, normalizarea probelor se realizează prin raportarea la expresia  $\beta$ -actină și  $\alpha$ -tubulină. În acest sens, cantități egale de extract proteic s-au încărcat în gel de poliacrilamidă, gelul a fost supus electroforezei verticale, apoi transferul proteic s-a

realizat pe membrană de nitroceluloză; blocarea situsurilor nespecifice s-a realizat cu soluție de lapte praf degresat, a urmat incubarea cu anticorpii primari anti-  $\beta$ -actină și  $\alpha$ -tubulină, apoi cu anticorpi secundari corespunzători marcați cu HRP. Vizualizarea s-a realizat prin augmentarea semnalului chemiluminescent și captarea acestuia cu ajutorul aparatului Chemidoc (Biorad)

Pentru determinarea formelor active a MMP-2 și MMP-9 s-a recurs la efectuarea zimografiei. O cantitate de 20  $\mu$ g proteine totale din probele supuse analize western blot au fost încărcate în gel de 7,5% gel de poliacrilamidă conținând un substrat de 0,1 gelatină, gelul a fost supus electroforezei, denaturat, apoi colorat cu Comassie, blue, decolorat, apoi vizualizat cu ajutorul aparatului Chemidoc (Biorad).

Rezultatele științifice obținute în cadrul acestui proiect au fost valorificate prin participarea la 5 conferințe internaționale, prin publicarea unui număr de 3 abstracte indexate ISI, prin publicarea unui articol BDI, și a unui articol ISI zona roșie ( un al doilea articol ISI la momentul redactării prezentului raport se află în curs de evaluare la jurnalul ISI, FI 3,12, zona roșie, *Frontiers in Veterinary Science*).

## RAPORT ȘTIINȚIFIC ȘI TEHNIC

### ETAPA 1 - ANALIZA HISTOPATOLOGICĂ, IMUNOHISTOCHEMICĂ ȘI BIOCHIMICĂ A TUMORILOR EPITELIALE DE ORIGINE BOVINĂ

#### Act 1.1 - Analiza histopatologică și identificarea ADN-ului BPV în tumorile epiteliale de origine bovină – grad de realizare total

**Analiza histopatologică.** În această etapă, un număr de 36 de probe au fost colectate de la bovine ce prezentau leziuni cutanate cu aspect conopidiform, caracteristice infecției cu papillomavirus bovin. După colectare, fiecare probă a fost împărțită în două părți: o parte fixată în formol soluție 10%, pentru analiza histopatologică și imunohistochimică, iar cealaltă parte congelată la  $-80^{\circ}\text{C}$  în vederea extracției ADN-ului și analizei biochimice. Pentru a putea fi inclusă în studiu, fiecare probă a fost clasificată din punct de vedere histopatologic: diagnosticul de papilomatoză cutanată/fibropapilomatoză a coincis cu includerea probei în studiu și cu analiza moleculară ulterioară. Astfel, probele fixate în formol soluție 10% au fost incluse în parafină și secționate la  $4\ \mu\text{m}$  și colorate prin metoda Hematoxilină-Eozină. Clasificarea histologică a fiecărei leziuni s-a realizat conform ghidului recomandat de OMS (*Goldschmidt, M.H., Dunstan, R.W., Stannard, A.A., et al. (1998) World Health Organization International Histologic Classification of Tumors of Domestic Animals. Histological Classification of Tumors of the Skin of Domestic Animals, 2nd series, vol. III. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C.*). Astfel, s-a urmărit gradul de proliferare epitelială și fibroblastică, prezența koilocitelor și prezența hiperkeratozei. Analiza microscopică a evidențiat în probele evaluate toate cele trei criterii enunțate, astfel fiind stabilit diagnosticul de fibropapilomatoză cutanată bovină (figura 1a). Simultan, s-a analizat histologic și piele sănătoasă, unde modificările ce pot fi asociate papillomavirusului bovin au lipsit (figura 1b).

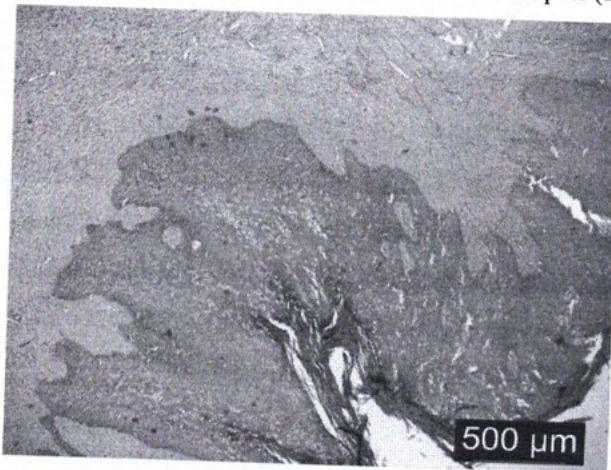


Figura 1a. Prezența proliferării epiteliale și fibroblastice, a koilocitelor și a hiperkeratozei; fibropapilom cutanat bovin, HE x 100

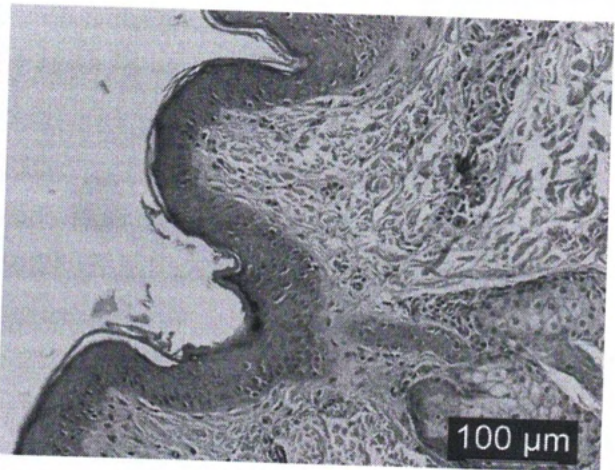


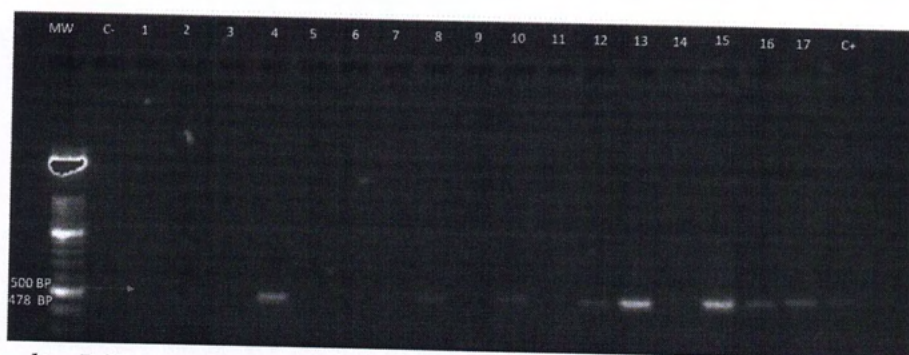
Figura 1b. Piele normală de bovină: prezența stratului epidermic, dermic și hipodermic. HE x 200

**Identificarea ADN-ului BPV prin PCR.** Izolarea ADN-ului genomic total din probele recoltate s-a realizat cu ajutorul kitului de extracție PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) și a kitului Stat Nat RNA/DNA (Biorad), conform instrucțiunilor producătorilor. ADN-ul viral a fost confirmat prin PCR convențional, în primă fază utilizând primeri consensus nespecifici, urmat de utilizarea primerilor specifici pentru BPV-1, BPV-2 și BPV-4 (Tabelul 1).

**Tabelul 1 Primeri utilizați pentru identificarea BPV**

Primeri	Regiune	Secvența	Referință
FAP 59/64	L1	5" TAACWGTIGGICAYCCWTATT 3" and 5" CCWATATCWVHCATITCICCATC 3"	Forslund O. <i>et al</i> , 1999
BPV-2	L2	5" GTTATACCACCCAAAGAAGACCCT 3" 5" CTGGTTGCAACAGCTCTCTTCTC 3"	Araldi R.P. <i>et al</i> , 2013
BPV-1	L1	5" GGAGCGCCTGCTAACTATAGGA 3" and 5" ATCTGTTGTTTGGGTGGGTGGTGAC 3"	Araldi R.P. <i>et al</i> , 2013
BPV-4	E7	5" GCTGACCTTCCAGTCTTAAT 3" 5" CAGTTCAATCTCCTCTTCA 3"	Araldi R.P. <i>et al</i> , 2013

**Rezultate.** Prin testul PCR clasic s-a identificat ADN-ul papilomaviral utilizând perechea de primeri degenerați FAP 59/64. Astfel, un fragment de 478 pb corespunzător genei L1 a fost amplificat în 11 (30%) probe (figura 2).



*Figura 2. Rezultat PCR reprezentativ: gel agaroză 1,5% cu benzi specifice de 478 pb, amplificate cu ajutorul primerilor degenerați FAP59/64 primers. MW – 100 bp; C-control negativ; C+ control pozitiv; 1-17 probe testate (tumori cutanate)*

Pentru identificarea BPV-2, s-a recurs la utilizarea unei perechi specifice de primeri, capabilă să amplifice un fragment de 164 pb corespunzătoare genei BPV-2 L-2. Din cele 36 probe testate, 34 (94,4%) au fost pozitive pentru BPV-2. Două probe au fost negative la testarea PCR cu ambele perechi de primeri. În ceea ce privește identificarea tipurilor BPV-1 și BPV-4, testul PCR a fost negativ în cazul tuturor probelor (tabelul 2).

**Tabelul 2 Rezultatele testelor PCR**

Probe	FAP 59/64	BPV-2	BPV- 1	BPV-4
Fibropapiloame	11/36 (30%)	34/36 (94,4%)	0/36 (0%)	0/36 (0%)

Fragmentele amplificate prin PCR au fost supuse electroforezei în gel de agaroză în concentrație de 1.5%, colorat cu SybrSafe (Invitrogen), în prezența matorului molecular de 100 pb (Invitrogen). Benzile specifice au fost vizualizate cu aparatului GelDoc (Biorad).

Rezultatele obținute în cadrul testării PCR confirmă faptul că BPV-2 este principalul papillomavirus bovin circulant la bovinele luate în studiu.

**Act 1.2 - Analiza imunohistochimică și biochimică a expresiei MMP-1, MMP-2, MMP-3/10, MMP-7, MMP-8, MMP-9, a inhibitorilor TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, VEGF și a proteinei E5 - BPV atât în fibropapiloame bovine, cât și în piele normală bovină – grad de realizare total**

**Analiza imunohistochimică.** Cele 36 de probe fixate și incluse la parafină au fost prelucrate prin metode histologice de rutină, colorate prin metoda Hematoxină-Eozină, cu scopul identificării modificărilor specifice induse de BPV și a stabilirii diagnosticului de papilomatoză. Din cauza conținutului ridicat în cheratină și a secționării dificile la microtom, 12 probe nu s-au fixat pe lame, astfel încat aceste probe nu au putut fi incluse mai departe în analiza imunohistochimică. Din cele 24 de probe corespunzătoare, s-au realizat câte 15 secțiuni care s-au etalat pe lame încărcate electrostatic (Apex, Superior Adhesive Slides, Leica).

Secțiunile au fost deparafinate în xilen pentru 30 minute, apoi rehidratate prin includere în alcool absolut 100<sup>0</sup> pentru 10 minute, apoi în alcool denaturat 100<sup>0</sup> pentru 10 minute, apoi câte 5 minute în alcool de 95<sup>0</sup>, 70<sup>0</sup> și 50<sup>0</sup>, după care probele au fost spălate cu apă distilată timp de 5 minute. Blocarea activității peroxidazelor endogene s-a realizat prin incubarea secțiunilor în cameră umedă, la temperatura camerei, timp de 20 minute cu soluție metanol:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, în raport de 1:4. Demascarea antigenului s-a realizat prin pretratamentul probelor în soluție tampon citrat, pH 6.00, la microunde, la 525 W, timp de 2 reprize a câte 5 minute fiecare, apoi s-au efectuat 3 spălări succesive a câte 5 minute fiecare cu tampon fosfat salin, pH 7.4, 0.1 M (PBS). Blocarea epitopilor nespecifici s-a realizat prin incubarea secțiunilor cu protein block (0.4% Casein în phosphate-buffered saline) timp de 30 minute. În cazul controlului negativ s-a omis anticorpul primar, iar etapele ulterioare au fost similare. După această etapă, fără a spăla secțiunile, acestea au fost incubate cu anticorpii primari corespunzători, diluați în PBS, peste noapte la 4<sup>0</sup>C, în cameră umedă (tabelul 3).

**Tabelul 3 Anticorpii primari utilizați pentru tehnica imunohistochimică**

Anticorp	Clona	Specia țintă	Diluția	Producător
MMP-1	3B6	Șoarece	1:200	Santa Cruz Biotechnology
MMP-2	2C1	Șoarece	1:50	Santa Cruz Biotechnology
MMP-3/10	F10	Șoarece	1:50	Santa Cruz Biotechnology
MMP-7	JL07	Șoarece	1:50	Santa Cruz Biotechnology
MMP-8	B-1	Șoarece	1:50	Santa Cruz Biotechnology
MMP-9	E-11	Șoarece	1:50	Santa Cruz

				Biotechnology
TIMP-1	2A5	Șoarece	1:50	Santa Cruz Biotechnology
TIMP-2	3A4	Șoarece	1:50	Santa Cruz Biotechnology
TIMP-3	B-2	Șoarece	1:50	Santa Cruz Biotechnology
VEGF	VG-1	Șoarece	1:500	Santa Cruz Biotechnology

Ulterior, după expirarea contactului cu anticorpul primar, s-au efectuat 2 spălări succesive, fiecare a 5 minute, în PBS, după care s-a aplicat anticorpul secundar Post Primary (Rabbit anti mouse IgG) timp de 30 minute la temperatura camerei. După expirarea timpului de contact cu anticorpul secundar, au urmat două spălări succesive a câte 5 minute, apoi incubarea cu complexul HPR conjugat cu streptavidină biotină (Novolink™ Polymer, Anti-rabbit Poly-HRP-IgG ) timp de 30 minute. Colorarea este completă după incubarea cu substratul cromogen DAB (diaminobenzidină), timp de 3-5 minute, rezultând un precipitat maro acolo unde este localizat antigenul căutat. Pentru colorarea nucleilor, se realizează o contracolorare cu hematoxină Mayers, timp de 5 minute, urmată de o clătire abundentă cu apă de robinet și distilată. Deshidratarea secțiunilor se face utilizând o serie crescătoare de alcooli: 50<sup>o</sup>, 80<sup>o</sup>, 95<sup>o</sup>, 2 minute fiecare, apoi câte 10 minute în alcool denaturat 100<sup>o</sup> și absolut 100<sup>o</sup>. Pentru clarificarea preparatelor se realizează 2 pasaje a câte 30 minute în xilen. Preparatele colorate sunt montate permanent, utilizând kitul Eurokitt. Examinarea preparatelor s-a realizat cu ajutorul microscopului optic. S-a urmărit prezența colorației specifice, și anume colorarea în maro a citoplasmei celulelor epiteliale și dermice. Imunoreactivitatea fiecărei probe a fost evaluată după cum urmează: negativă (-), slabă (+), moderată (++) și puternică (+++). În tabelul 4 este redată expresia imunohistochimică a fiecărei probe pentru anticorpul luat în studiu.

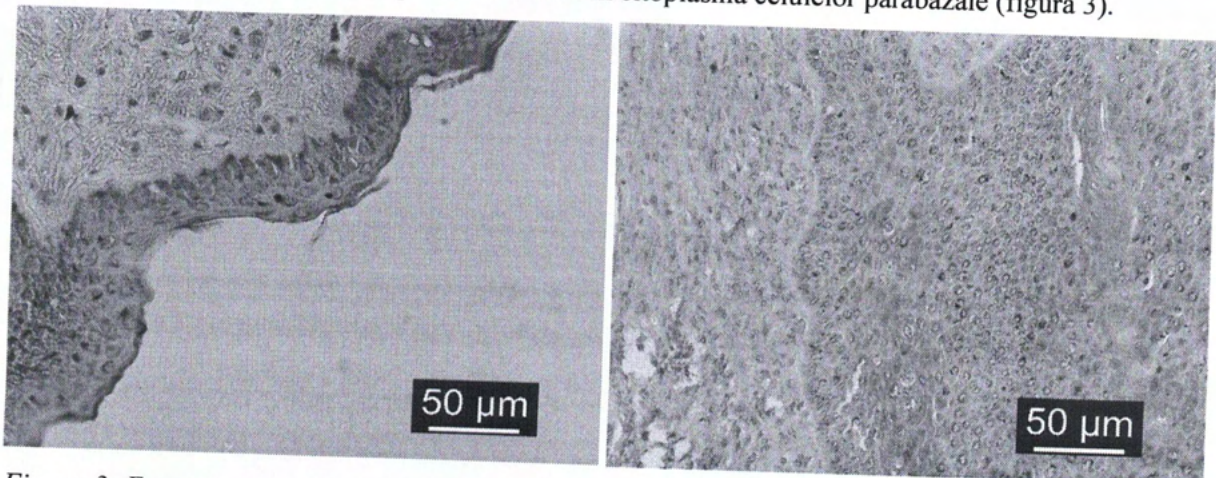
### Rezultate

In tabelul 4 este prezentat pentru fiecare probă în parte și pentru fiecare proteina analizată gradul de pozitivitate.

**Tabelul 4. Expresia imunohistochimică a metaloproteinazelor, inhibitorilor acestora și VEGF în fibropapiloame**

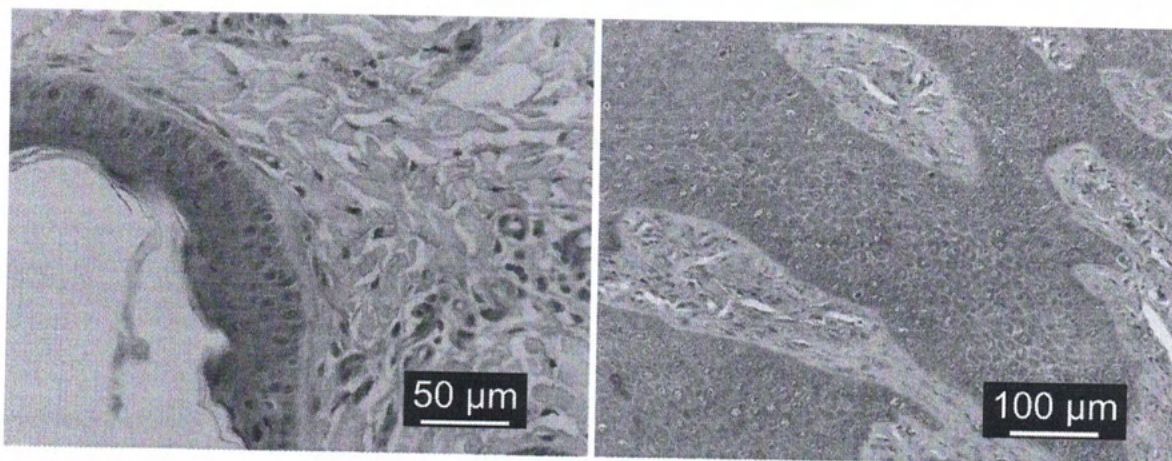
Nr. Probă tumoră	Anticorp primar utilizat									
	MMP-1	MMP-2	MMP-3/10	MMP-7	MMP-8	MMP-9	VEGF	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3
1	+	-	-	++	++	-	+++	-	-	-
2	-	-	+	+	+	-	+++	+	-	-
3	-	-	++	+	++	-	++	++	-	-
4	-	-	++	++	+++	-	+++	+	-	-
5	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-
6	++	+	+	-	+	++	+++	+	-	-
7	+	+	++	+++	+	+	+++	++	-	-
8	+	+	+++	+	-	-	+++	+	-	-
9	+	+	+	-	-	-	+++	++	-	-
10	+	+	+	-	++	-	+++	+	-	-
11	-	-	+	+	+	-	+++	-	+	-
12	-	-	+	++	+	-	+++	++	-	-
13	-	-	+	+	+	-	+++	+	-	-
14	-	-	+	+	+	-	++	-	-	-
15	+	+	++	-	+	-	+++	++	-	-
16	-	-	+	-	+	+	+++	-	-	-
17	-	-	-	-	++	+	+++	-	-	-
18	++	-	+	+	++	+	+++	+	-	-
19	++	-	+	+	++	++	+++	+	-	-
20	+	-	++	+	+++	+	+++	+	-	-
21	-	++	+++	+	+	++	+++	++	-	-
22	-	+	++	-	++	-	+++	-	-	-
23	-	-	++	-	+	-	+	++	-	-
24	+	+	+++	-	++	-	+++	-	-	-

**Expresia MMP-1.** În 13 probe (54,17%) testate imunohistochimic, expresia MMP-1 a fost negativă; 8 probe (33,33%) au prezentat un imunosemnal slab în citoplasma celulelor parabazale; 3 probe (12,5%) au prezentat un semnal pozitiv moderat în citoplasma celulelor parabazale (figura 3).



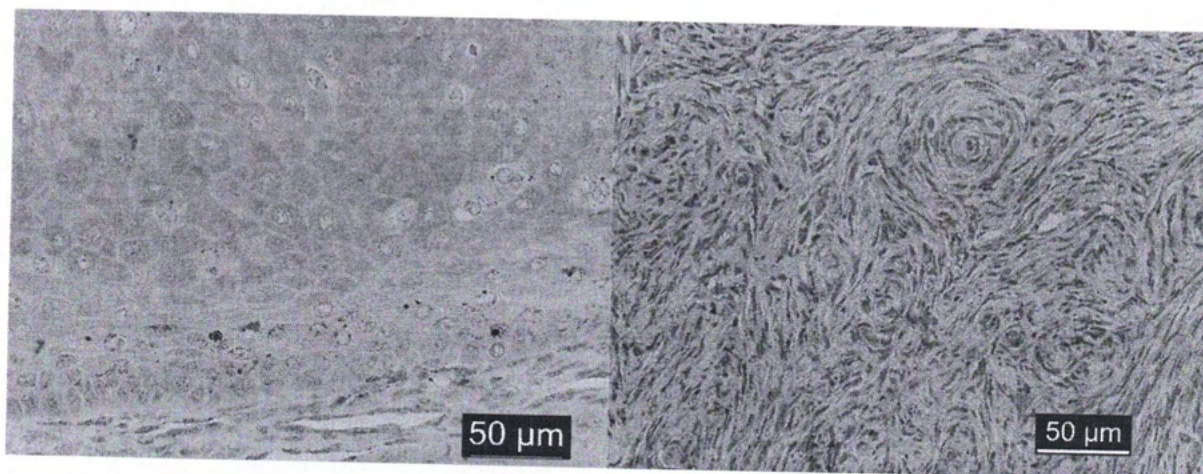
*Figura 3. Expresia imunohistochimică a MMP-1 în piele normală bovină (stânga) și în fibropapilom bovin (dreapta). X 40.*

**Expresia MMP-2.** În 15 probe (62,5%) imunosemnalul specific a fost negativ; 8 probe (33,33%) au fost imunopozitive, cu un semnal slab, moderat sau puternic citoplasmatic (figura 4) în stratul bazal epitelial, spinos și granular; 1 probă (4,17%) a prezentat un imunosemnal moderat în stratul bazal epitelial.



*Figura 4. Expresia imunohistochimică a MMP-2 în piele normală bovină (stânga) și în fibropapilom bovin (dreapta). X40, X 20.*

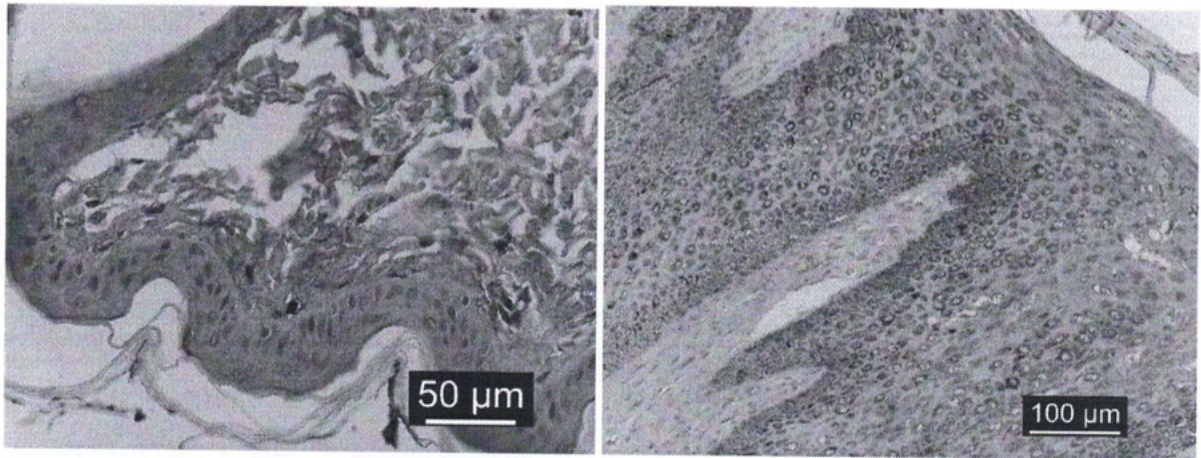
**Expresia MMP-3/10.** Din cele 24 probe, 2 (8,33%) au fost negative; 12 probe (50%) au prezentat un imunosemnal slab în citoplasma celulelor epiteliale și în fibroblaste; 7 probe (29,17%) au prezentat un imunosemnal moderat; 3 probe (12,5%) au prezentat semnal pozitiv intens în citoplasma celulelor epiteliale și fibroblaste (figura 5).



*Figura 5 Expresia MMP-3/10 în fibropapilom bovin; expresie moderată intracitoplasmatică în celulele epiteliale (stânga) și în fibroblastele din stratul dermic (dreapta). X40.*

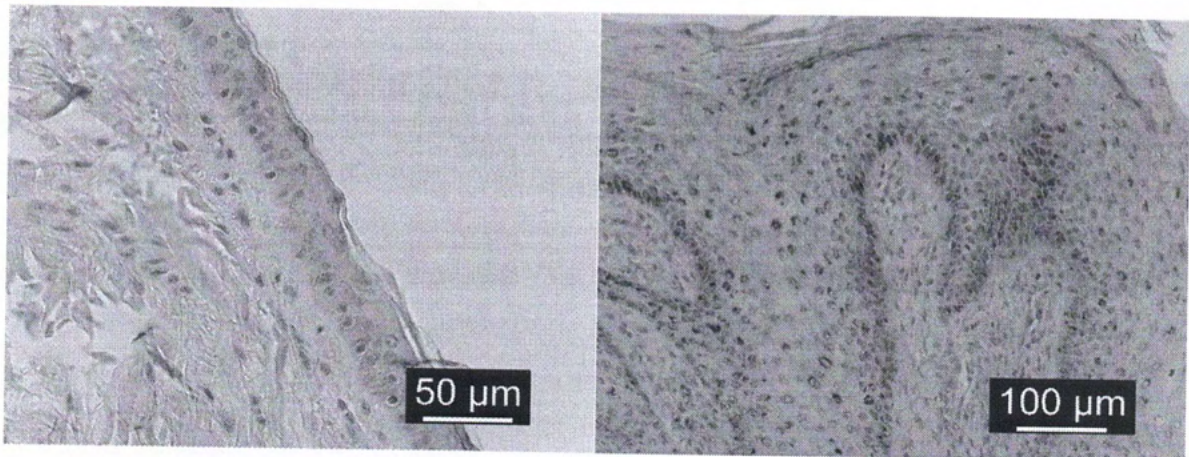
**Expresia MMP-7.** Din cele 24 probe analizate, 10 probe (41,67%) au fost negative; 10 probe (41,67%) au prezentat un imunosemnal slab și moderat în citoplasma celulelor din stratul bazal și parabazal (figura 6); 3 probe (12,5%) au prezentat un semnal pozitiv moderat; 1 probă (4,167%) a fost intens pozitivă.





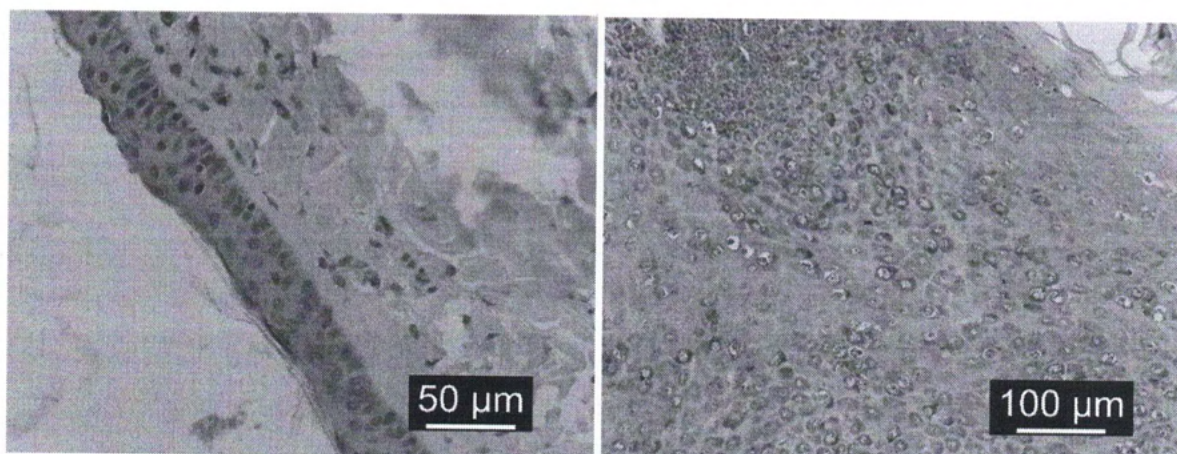
*Figura 6 Expresia MMP-7 în piele normală și în fibropapilom bovin; expresie moderată spre intensă intracitoplasmatică în celulele epiteliale din piele normală (stânga) și în citoplasma celulelor epiteliale din fibropapilom (dreapta). X40, X 20.*

**Expresia MMP-8.** Din cele 24 probe, 2 probe (8,33%) au fost negative; 12 probe (50%) au prezentat un imunosemnal slab pozitiv citoplasmatic preponderent în stratul bazal, în timp ce grupuri de keratinocite pozitive s-au observat în stratul spinos și granular (figura 7); 8 probe (33,34%) au prezentat un semnal moderat, iar 2 probe (8,33%) au prezentat un imunosemnal citoplasmatic intens în stratul granular și spinos.



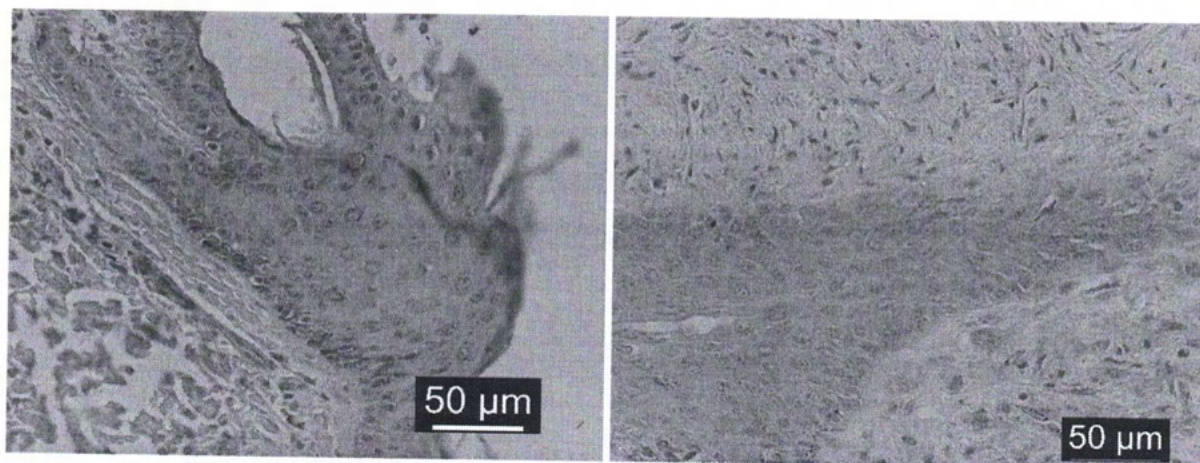
*Figura 7 Expresia MMP-8 în piele normală și în fibropapilom bovin; expresie absentă sau slabă citoplasmatică în celulele epiteliale din piele normală (stânga) și în citoplasma celulelor epiteliale din stratul bazal din fibropapilom (dreapta). X40, X 20.*

**Expresia MMP-9.** Din probele analizate, 15 probe (62,5%) au fost negative; 6 probe (25%) au prezentat o imunoreactivitate slabă în citoplasma celulelor din toate straturile epiteliale (figura 8); 3 (12,5%) probe au prezentat o imunoreactivitate moderată în toate straturile epiteliale.



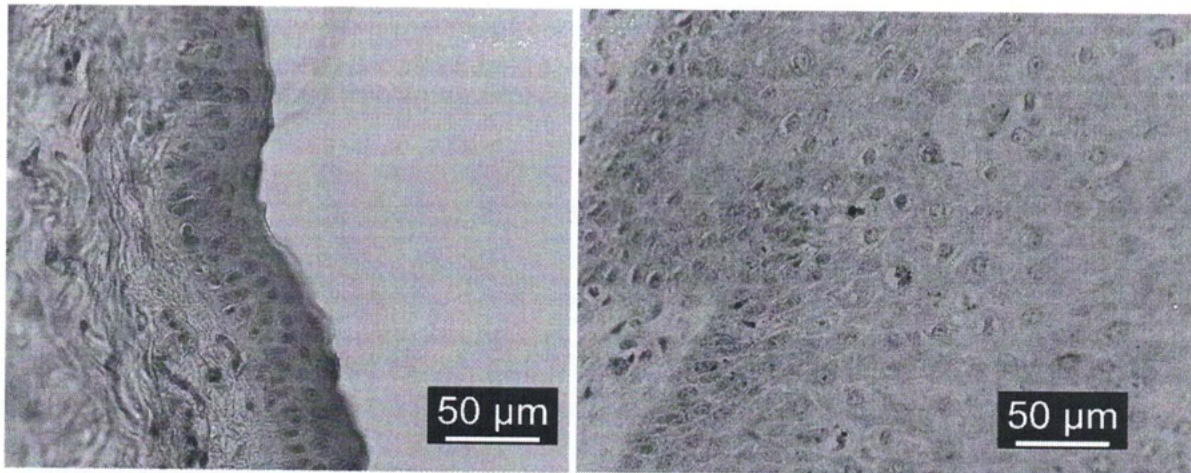
*Figura 8 Expresia MMP-9 în piele normală și în fibropapilom bovin; expresie slabă citoplasmatică în celulele epiteliale din piele normală (stânga) și în citoplasma celulelor epiteliale din stratul bazal, spinos și granular din fibropapilom (dreapta). X40, X 20.*

**Expresia VEGF.** Toate probele analizate au prezentat imunoreactivitate specifică: 2 probe (8,33%) o imunoreactivitate slabă, fină, granulară în toate straturile epiteliale; 2 probe (8,33%) au prezentat o imunoreactivitate asemănătoare; 20 probe (83,34%) au prezentat o imunoreactivitate moderată spre intensă citoplasmatică în celulele epiteliale ale stratului bazal, spinos și granular, dar și în fibroblastele din derm (figura 9).



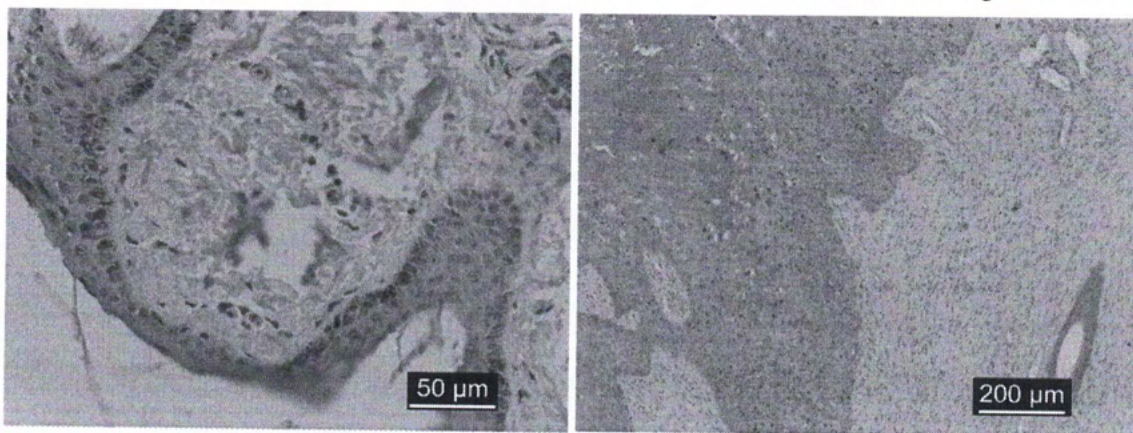
*Figura 9 Expresia VEGF în piele normală și în fibropapilom bovin; expresie slabă citoplasmatică în celulele epiteliale din stratul bazal din piele normală (stânga) și în citoplasma celulelor epiteliale din stratul bazal, spinos și granular și fibroblaste din derm din fibropapilom (dreapta). X40.*

**Expresia TIMP-1.** Din cele 24 probe, 8 probe (33,33%) au fost negative; 9 probe (37,5%) au prezentat un imunosemnal slab în citoplasma celulelor din straturile parabazale (figura 10); 7 probe (29,17%) au prezentat o imunoreactivitate caracteristică în citoplasma celulelor din straturile parabazale.



*Figura 10 Expresia TIMP-1 în piele normală și în fibropapilom bovin; expresie slabă citoplasmatică în celulele epiteliale din stratul bazal din piele normală (stânga) și în citoplasma celulelor epiteliale din stratul bazal, spinos și granular și fibroblaste din derm din fibropapilom (dreapta). X40.*

**Expresia TIMP-2.** Din cele 24 de probe analizate, 1 probă (4,17%) a prezentat un imunosemnal pozitiv slab în citoplasma din stratul bazal (figura 11), restul de 23 (95,83%) fiind negative.



*Figura 11 Expresia TIMP-2 în piele normală și în fibropapilom bovin; expresie moderată citoplasmatică în celulele epiteliale din stratul bazal din piele normală (stânga) și în citoplasma celulelor epiteliale din stratul bazal, spinos și granular și fibroblaste din derm din fibropapilom (dreapta). X40.*

**Expresia TIMP-3.** În nicio probă analizată nu s-a putut evidenția expresia imunohistochimică a TIMP-3.

Pentru a putea compara nivelul de expresie a matrix-metaloproteinazelor, a inhibitorilor acestora și a VEGF, în paralel s-au testat un număr de 5 probe reprezentate de piele provenită de la bovine sănătoase. Pielea a fost recoltată în cadrul unui abator de sacrificări bovine. Astfel, după sacrificarea acestora, s-a recoltat o porțiune de 3 cm<sup>2</sup> de piele, care a fost procesată histologic și imunohistochimic în același timp cu probele de țesut tumoral luate în studiu. Rezultatele examenului imunohistochimic sunt redată în tabelul 5.

**Tabelul 5** Expresia imunohistochimică a metaloproteinazelor, a inhibitorilor acestora și VEGF în piele sănătoasă bovină

Nr. Probă Piele	Anticorp primar utilizat									
	MMP-1	MMP-2	MMP-3/10	MMP-7	MMP-8	MMP-9	VEGF	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3
1	+	-	-	-	+++	-	+	-	-	-
2	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-
3	-	-	-	-	+++	-	+	+	-	-
4	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
5	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-

**Procesare biochimică și tehnica Western Blot.** Pentru prima etapă a analizei biochimice, extracția proteinelor a fost realizată din trei probe reprezentate de țesut cutanat normal și din șase fibropapiloame. Probele au fost cântarite și depuse în tuburi Ependorff de 2 ml, iar peste o cantitate de ~40 mg de țesut decongelat din fiecare probă a fost adăugat 1ml soluție tampon RIPA (Santa Cruz) rece. Probele au fost triturate cu ajutorul trituratorului mecanic Mikro Dismembrator S (sartorius). Pentru o omogenizare mai eficientă, în fiecare tub a fost introdusă în prealabil o bilă de omogenizare (din titan cu diametru de 3mm). După finalizarea triturării, tuburile au fost supuse centrifugării la 10.000 x rpm, apoi cu ajutorul unei tije magnetice, bilele de omogenizare au fost înlăturate. Pentru a obține extractul de proteine, tuburile au fost centrifugate la 4<sup>o</sup> C timp de alte 20 min, la final fiind recuperat supernatantul. Cuantificarea conținutului total de proteine obținut în urma extracției s-a determinat cu ajutorul kitului de dozare a proteinelor Quick start Bradford protein assay kit (Bio-Rad Laboratories), iar citirea s-a realizat cu ajutorul spectofotometrului Eppendorff, utilizând tehnica de cuantificare Bradford micro, la final obținându-se o cantitate exactă de ng proteine/ $\mu$ L pentru fiecare probă. Pentru a putea determina ulterior nivelul de expresie proteică corespunzătoare fiecărei probe, normalizarea probelor s-a realizat prin determinarea cantității de  $\beta$ -actină și  $\alpha$ -tubulină. Cantități egale de proteine din fiecare probă au fost amestecate cu un agent denaturant, și anume  $\beta$ -mercaptoetanol, apoi supuse la o temperatura de 100<sup>o</sup> C, timp de 5 min, în acest interval în prezența agentului denaturant și al căldurii având loc denaturarea (liniarizarea) proteinelor. Probele astfel preparate au fost depuse în godeurile gelului de bis/acrilamidă Gel precast MP TGX 4-15% (Biorad). După încărcarea probelor în gel, camera de migrare verticală este umplută cu tampon de migrare. Camera de migrare este decuplată de la sursa de curent, iar proteinele migrează prin gel au fost supuse transferului pe membrana de nitroceluloză, prin metoda semi-umedă cu ajutorul aparatului TransBlot Turbo (Biorad). Blocarea situsurilor nespecifice s-a realizat cu soluție de lapte praf degresat 5%, a urmat incubarea cu anticorpii primari anti-  $\beta$ -actină (Actin (C-2): sc-8432, Santa Cruz) și  $\alpha$ -tubulină ( $\alpha$  Tubulin (B-5-1-2): sc-23948, Santa Cruz), în diluție de 1:500, apoi incubarea cu anticorpii secundari corespunzători marcați cu HRP (Anticorp goat anti rabbit Igg-HRP, Biorad). Vizualizarea s-

a realizat prin augmentarea semnalului chemiluminescent cu ajutorul tamponului Western blotting luminol și captarea acestuia pe film radiologic. În fiecare probă, s-a evidențiat o bandă de 45 kda, confirmând o încărcare egală de proteine totale pentru fiecare probă. În etapa următoare, concentrația de proteine prezentă în fiecare probă va fi normalizată cu ajutorul nivelului de actină și tubulină, apoi exprimată ca raport densitometric.

În etapa următoare ne propunem determinarea prin tehnica Western Blot și zymografie a nivelului de expresie biochimică a MMP-1, MMP-2, MMP-3/-10, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13 și MMP-14, a inhibitorilor TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 și a VEGF în fibropapiloame BPV-2 pozitive în comparație cu nivelul expresiei acestor proteine în pielea normală.

### **Indicatori de rezultate realizați - etapa 1**

#### **Act 1.3 - Diseminarea rezultatelor – grad de realizare total**

Conform planului de realizare, diseminarea parțială a rezultatelor obținute în cadrul acestei etape s-a concretizat prin participarea online la 4 conferințe internaționale (deoarece în contextul pandemic aceste conferințe nu s-au mai putut desfășura fizic).

#### **Participări internaționale:**

- 1) 4th Joint ESVP, ECVP and ESTP Cutting Edge Pathology Congress, 15-17 septembrie 2021 – Online – prezentare poster *Florentina Bocaneti Daraban, Anca Mihaela Dascalu, Oana Irina Tanase, Sorin Pasca, Mihai Mares - Expression of matrix metalloproteinase -1 and its tissue inhibitor in bovine fibropapilloma*, Journal of Comparative Pathology, Volume 191, February 2022, Page 43, <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2021.11.096>, Factor impact 1,311.
- 2) European Biotechnology Congress, 23-25 septembrie 2021 – Virtual – prezentare poster - *Florentina Daraban Bocaneti, Anca Mihaela Dascalu, Oana Irina Tanase, Mihai Mares - Detection of Papillomavirus DNA in cutaneous lesions in cattle from Iasi County, Romania*. "Poster presentation" The EuroBiotech Journal, vol.5, no.s2, 2021, pp.65-112. <https://doi.org/10.2478/ebtj-2021-0031>
- 3) International Scientific Congress Life Science Today for Tomorrow, Universitatea pentru Științele Vieții Ion Ionescu de la Brad, din Iași, 21-22 octombrie 2021 – prezentare orală - *Florentina (Bocăneți) Daraban, Anca Mihaela Dascălu, Oana Irina Tănase, Sorin Aurelian Pașca, Mihai Mares - Bovine papillomavirus type 2 is harboured in cattle cutaneous warts*. The Journal "Scientific papers - Veterinary Medicine", volum 64(3), 18-21, CNCSIS B+.
- 4) IPVC 2021 - The 34 th International Papillomavirus Conference, Toronto 15-19 noiembrie 2021 – Virtual – prezentare poster - *Florentina Bocaneti Daraban, Anca Mihaela Dascalu, Oana Irina Tanase, Sorin Pasca, Mihai Mares - Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Matrix Metalloproteinase 3/10 in bovine cutaneous fibropapilloma*. Abstract book.

## ETAPA 2 - 2022

### ETAPA 2. ANALIZA IMUNOHISTOCHIMICȘ, BIOCHIMICĂ ȘI ENZIMATICĂ A MMP IN FIBROPAPILOAME CUTANATE BOVINE ȘI PIELE SĂNĂTOASĂ

**Activ. 2.1. Analiza imunohistochimica si biochimica a expresiei MMP-1, MMP-2, MMP-3/10, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13, MMP-14, a inhibitorilor TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, VEGF atat in fibropapiloame bovine, cat si in piele normală – grad de realizare total**

**Analiza imunohistochimică.** Cele 36 de probe fixate și incluse la parafină au fost prelucrate prin metode histologice de rutină, colorate prin metoda Hematoxilină-Eozină, cu scopul identificării modificărilor specifice induse de BPV și a stabilirii diagnosticului de papilomatoză. Din cauza conținutului ridicat în cheratină și a secționării dificile la microtom, 12 probe nu s-au fixat pe lame, astfel încât aceste probe nu au putut fi incluse mai departe în analiza imunohistochimică. Din cele 24 de probe corespunzătoare, s-au realizat câte 15 secțiuni care s-au etalat pe lame încărcate electrostatic (Apex, Superior Adhesive Slides, Leica). În acea etapă, analiza imunohistochimică a presupus urmarea aceluiași protocol descris la activitatea 1.2 din etapa 1 de realizare a prezentului proiect. Anticorpii primari utilizați în această etapă sunt descriși în tabelul 6.

**Tabelul 6. Anticorprii primari utilizați pentru tehnica imunohistochimică**

Anticorp	Clona	Specia țintă	Diluția	Producător
MMP-12	A2-133151	Șoarece	1:200	Santa Cruz
MMP-13	MA5-14238	Șoarece	1:25	Thermofisher
MMP-14	PA5-104459	Iepure	1:200	Thermofisher
TIMP-2	MA5-12207	Șoarece	1:200	Thermofisher
TIMP-3	B2-373839	Mouse	1:200	Santa Cruz

**Procesare biochimică și tehnica Western Blot.** Pentru această etapă, extracția proteinelor a fost realizată din patru probe reprezentate de țesut cutanat normal și din nouă fibropapiloame. Probele au fost cântărite și depuse în tuburi Eppendorf de 2 ml, iar peste o cantitate de ~40 mg de țesut decongelat din fiecare probă a fost adăugat 1ml soluție tampon RIPA (Santa Cruz) rece. Probele au fost triturate cu ajutorul trituratorului mecanic Mikro Dismembrator S (sartorius). Pentru o omogenizare mai eficientă, în fiecare tub a fost introdusă în prealabil o bilă de omogenizare (din titan cu diametru de 3mm). După finalizarea triturării, tuburile au fost supuse centrifugării la 10.000 x rpm, apoi cu ajutorul unei tije magnetice, bilele de omogenizare au fost înlăturate. Pentru a obține extractul de proteine, tuburile au fost centrifugate la 4°C timp de alte 20 min, la final fiind recuperat supernatantul. Cuantificarea conținutului total de proteine obținut în urma extracției s-a determinat cu ajutorul kitului de dozare a proteinelor Quick start Bradford protein assay kit (Bio-Rad Laboratories), iar citirea s-a realizat cu ajutorul spectrofotometrului Eppendorf, utilizând tehnica de cuantificare Bradford micro, la final obținându-se o cantitate exactă de ng proteine/ $\mu$ L pentru fiecare probă. Pentru a putea determina

ulterior nivelul de expresie proteică corespunzătoare fiecărei probe, normalizarea probelor s-a realizat prin determinarea cantității de  $\beta$ -actină și  $\alpha$ -tubulină. Cantități egale de proteine din fiecare probă au fost amestecate cu un agent denaturant, și anume  $\beta$ -mercaptoetanol, apoi supuse la o temperatură de  $100^{\circ}\text{C}$ , timp de 5 min, în acest interval în prezența agentului denaturant și al căldurii având loc denaturarea (liniarizarea) proteinelor. Probele astfel preparate au fost depuse în godeurile gelului de bis/acrilamidă Gel precast MP TGX 4-15% (Biorad). După încărcarea probelor în gel, camera de migrare verticală este umplută cu tampon de migrare. Camera de migrare este decuplată de la sursa de curent, iar proteinele migrate prin gel au fost supuse transferului pe membrana de nitroceluloză, prin metoda semi-umedă cu ajutorul aparatului TransBlot Turbo (Biorad). Blocarea situsurilor nespecifice s-a realizat cu soluție de lapte praf degresat 5%, a urmat incubarea cu anticorpii primari anti-  $\beta$ -actină (Actin (C-2): sc-8432, Santa Cruz) și  $\alpha$ -tubulină ( $\alpha$  Tubulin (B-5-1-2): sc-23948, Santa Cruz), în diluție de 1:500, apoi incubarea cu anticorpii secundari corespunzători marcați cu HPR (Anticorp goat anti rabbit Igg-HPR, Biorad). Vizualizarea s-a realizat prin augmentarea semnalului chemiluminescent cu ajutorul tamponului Western blotting luminol, iar captarea semnalului chemiluminescent s-a realizat cu ajutorul aparatului Chemidoc (Biorad). În fiecare probă, s-a evidențiat o bandă de 45 kda, confirmând o încărcare egală de proteine totale pentru fiecare probă. Concentrația de proteine prezentă în fiecare probă a fost normalizată cu ajutorul nivelului de actină și tubulină, apoi exprimată ca raport densitometric.

Pentru determinarea nivelului de expresie proteică pentru metaloproteinazele luate în studiu, membranele de nitroceluloză au fost incubate cu anticorpii primari anti-MMP-1, MMP-2, MMP-3/10, MMP-7, MMP-8, MMP-9, MMP-12, MMP-13 și MMP-14, a inhibitorilor TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 și a VEGF (vezi tabelul 3 și 6) în fibropapiloame BPV-2 pozitive în comparație cu nivelul expresiei acestor proteine în pielea normală. Ulterior, membranele de nitroceluloză au fost incubate cu anticorpii secundari corespunzători marcați cu HPR (Anticorp goat anti rabbit Igg-HPR, Biorad). Vizualizarea s-a realizat prin augmentarea semnalului chemiluminescent cu ajutorul tamponului Western blotting luminol, iar captarea semnalului chemiluminescent s-a realizat cu ajutorul aparatului Chemidoc (Biorad). Analiza densitometrică pentru cuantificarea proteică s-a realizat cu ajutorul softului ImageLab) Biorad, iar concentrația proteică s-a normalizat cu nivelul de  $\beta$ -actin și exprimat ca raport densitometric.

În cadrul acestei etape a fost prevăzută o vizită de lucru de lucru (4 săptămâni, la Departamentul de Medicină Veterinară și Producții Animaliere, Universitatea degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italia, vizită prevăzută în planul de realizare a proiectului mai sus menționat, pentru analiza și interpretarea rezultatelor biochimice. Vizita s-a desfășurată în perioada 27.06-17.07.2022, respectând planul de lucru stabilit anterior.

## Rezultate activitate 2.1

**Expresia MMP-1.** Analiza biochimică a MMP-1 a relevat prezența unei benzi specifice cu greutate moleculară de 52 kDa, atât în probele reprezentate de piele normală (NS1-NS4), cât și în probele tumorale (T1-T9). Analiza densitometrică a evidențiat o expresie scăzută a MMP-1 în fibropapiloame comparativ cu pielea normală (figura 12).

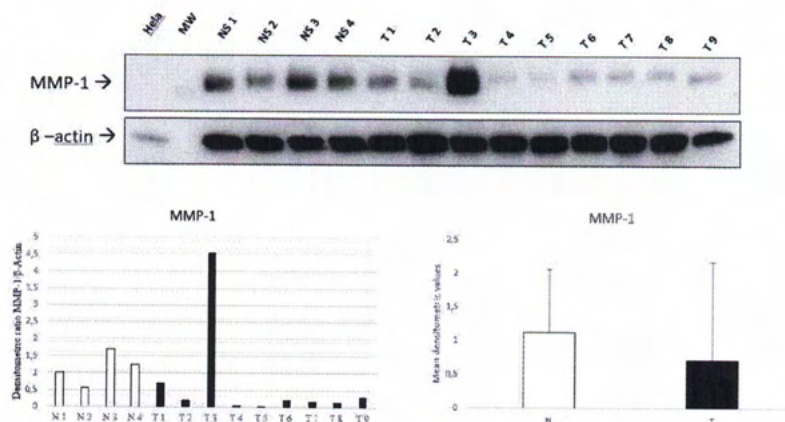


Figura 12. Western blot și analiza densitometrică a MMP-1 în piele normală (NS1-NS4) și tumori (T1-T9). Gel reprezentativ care arată o cantitate scăzută de MMP-1 în tumori versus piele normală. Bloturile au fost curățate și reprobate cu anticorp anti- $\beta$ -actină, pentru a confirma încărcarea de cantități egale de proteine în fiecare godeu și pentru a realiza normalizarea. Valori densitometrice individuale (jos stânga) ale MMP-1 pentru fiecare probă, exprimate ca raport densitometric cu  $\beta$ -actin; valori densitometrice medii +/- deviație standard pentru MMP-1 între grupurile NS vs T (jos dreapta).

**Expresia MMP-2.** Analiza biochimică a MMP-2 a relevat prezența unei benzi specifice cu greutate moleculară de 72 kDa, atât în probele reprezentate de piele normală (NS1-NS4), cât și în probele tumorale (T1-T9). Analiza densitometrică a evidențiat o expresie crescută a MMP-2 în fibropapiloame comparativ cu pielea normală (figura 13).

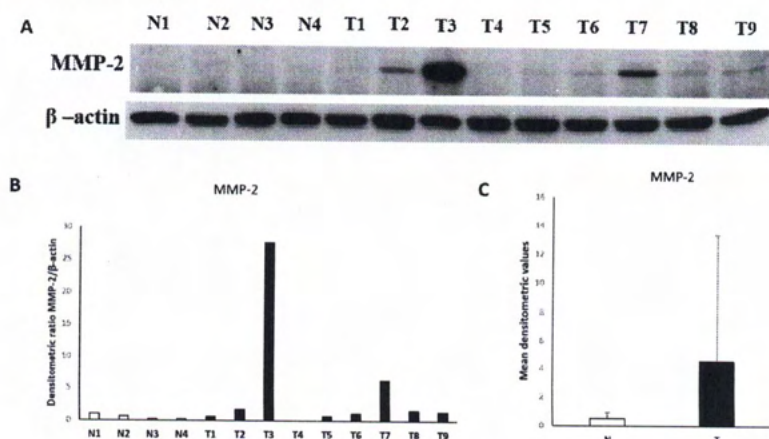


Figura 13. Western blot și analiza densitometrică a MMP-2 în piele normală (NS1-NS4) și tumori (T1-T9). Gel reprezentativ care arată o cantitate crescută de MMP-2 în tumori versus piele normală (A). Bloturile au fost curățate și reprobate cu anticorp anti- $\beta$ -actină, pentru a confirma încărcarea de cantități egale de proteine în fiecare godeu și pentru a realiza normalizarea. Valori densitometrice



individuale (B) ale MMP-2 pentru fiecare probă, exprimate ca raport densitometric cu  $\beta$ -actin; valori densitometrice medii  $\pm$  deviație standard pentru MMP- între grupurile NS vs T (C).

**Expresia MMP-3/-10.** Analiza biochimică a MMP-3/-10 a relevat prezența unei benzi specifice cu greutate moleculară de 57 kDa, atât în probele reprezentate de piele normală (NS1-NS4), cât și în probele tumorale (T1-T9). Analiza densitometrică a evidențiat o expresie crescută a MMP-3/-10 în fibropapiloame comparativ cu pielea normală (figura 14).

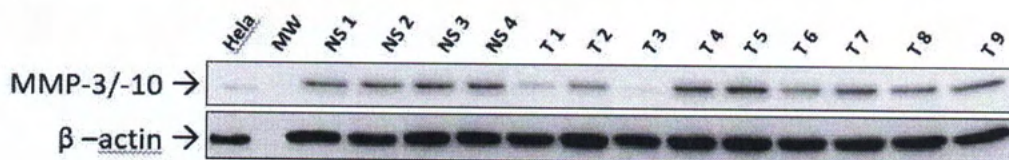


Figura 14. Western blot și analiza densitometrică a MMP-3/-10 în piele normală (NS1-NS4) și tumori (T1-T9). Gel reprezentativ care arată o cantitate crescută de MMP-3/-10 în tumori versus piele normală (A). Bloturile au fost curățate și reprobate cu anticorp anti-  $\beta$ -actină, pentru a confirma încărcarea de cantități egale de proteine în fiecare godeu și pentru a realiza normalizarea.

**Expresia MMP-7.** Analiza biochimică a MMP-7 a relevat prezența unei benzi specifice cu greutate moleculară de 32-34 kDa, atât în probele reprezentate de piele normală (NS1-NS4), cât și în probele tumorale (T1-T9). Analiza densitometrică a evidențiat o expresie crescută a MMP-7 în fibropapiloame comparativ cu pielea normală (figura 15).

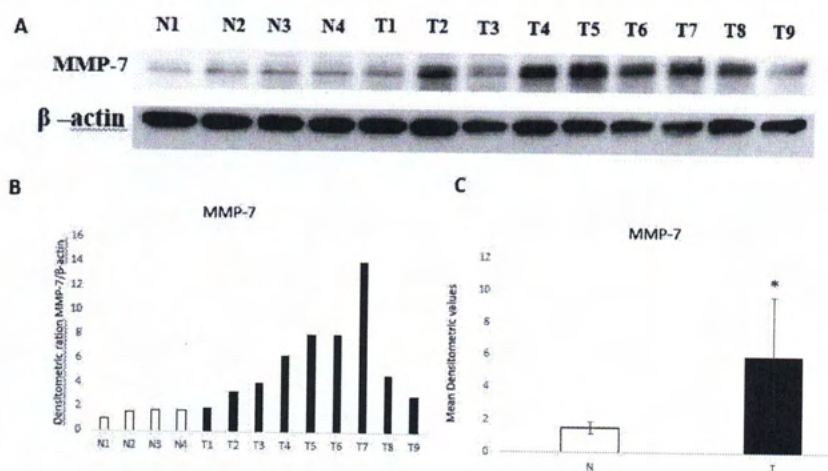


Figura 15. Western blot și analiza densitometrică a MMP-7 în piele normală (NS1-NS4) și tumori (T1-T9). Gel reprezentativ care arată o cantitate crescută de MMP-7 în tumori versus piele normală (A). Bloturile au fost curățate și reprobate cu anticorp anti-  $\beta$ -actină, pentru a confirma încărcarea de cantități egale de proteine în fiecare godeu și pentru a realiza normalizarea. Valori densitometrice individuale (B) ale MMP-7 pentru fiecare probă, exprimate ca raport densitometric cu  $\beta$ -actin; valori densitometrice medii  $\pm$  deviație standard pentru MMP-7 între grupurile NS vs T (C).

**Expresia MMP-8.** Analiza biochimică a MMP-8 a relevat prezența unei benzi specifice cu greutate moleculară de 50-65 kDa, atât în probele reprezentate de piele normală (NS1-NS4), cât și în probele tumorale (T1-T9). Analiza densitometrică a evidențiat o expresie crescută a MMP-8 în fibropapiloame comparativ cu pielea normală (figura 16).

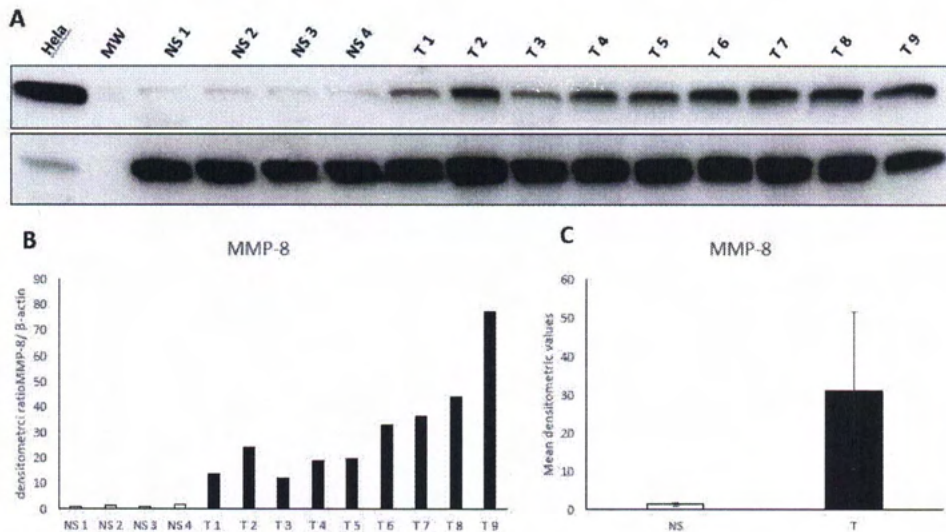


Figura 16. Western blot și analiza densitometrică a MMP-8 în piele normală (NS1-NS4) și tumori (T1-T9). Gel reprezentativ care arată o cantitate crescută de MMP-8 în tumori versus piele normală (A). Bloturile au fost curățate și reprobate cu anticorp anti- $\beta$ -actină, pentru a confirma încărcarea de cantități egale de proteine în fiecare godeu și pentru a realiza normalizarea. Valori densitometrice individuale (B) ale MMP-8 pentru fiecare probă, exprimate ca raport densitometric cu  $\beta$ -actin; valori densitometrice medii +/- deviație standard pentru MMP-8 între grupurile NS vs T (C).

**Expresia MMP-9.** Analiza biochimică a MMP-9 a relevat prezența unei forme pro-active specifice cu greutate moleculară de 92 kDa, atât în probele reprezentate de piele normală (NS1-NS4), cât și în probele tumorale (T1-T9). În plus, s-a evidențiat prezența unei forme active de aproximativ 82 kDa doar în fibropapiloame. Analiza densitometrică a evidențiat o expresie crescută atât a formei pro-active, cât și a celei active a MMP-9 în fibropapiloame comparativ cu pielea normală (figura 17).

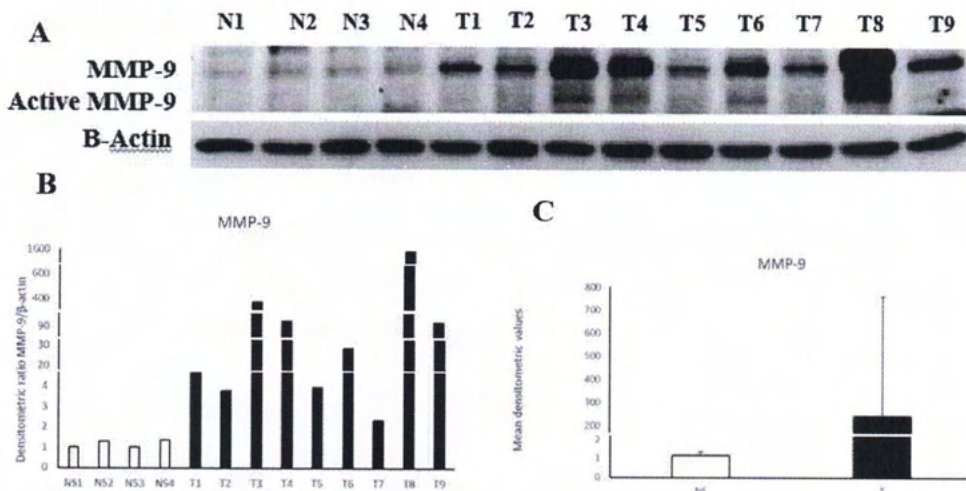


Figura 17. Western blot și analiza densitometrică a pro-MMP-9 și active-MMP-9 în piele normală (NS1-NS4) și tumori (T1-T9). Gel reprezentativ care arată o cantitate crescută de pro-MMP-9 în tumori versus piele normală (A). Bloturile au fost curățate și reprobate cu anticorp anti- $\beta$ -actină, pentru a confirma încărcarea de cantități egale de proteine în fiecare godeu și pentru a realiza normalizarea. Valori densitometrice individuale (B) ale pro-MMP-9 pentru fiecare probă, exprimate ca raport densitometric cu  $\beta$ -actin; valori densitometrice medii +/- deviație standard pentru pro-MMP-9 între grupurile NS vs T (C).

**Expresia MMP-12.** Analiza imunohistochimică a evidențiat expresia citoplasmatică a MMP-12, în timp ce analiza biochimică a MMP-12 a relevat prezența unei forme specifice cu greutate moleculară de 48 kDa, atât în probele reprezentate de piele normală (NS1-NS4), cât și în probele tumorale (T1-T9). Analiza densitometrică a evidențiat o expresie crescută a MMP-12 în fibropapiloame comparativ cu pielea normală (figura 18).

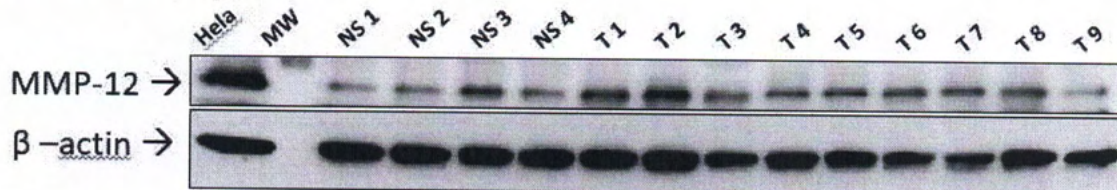


Figura 18. Western blot și analiza densitometrică a MMP-12 în piele normală (NS1-NS4) și tumori (T1-T9). Gel reprezentativ care arată o cantitate crescută de MMP-12 în tumori versus piele normală (A). Bloturile au fost curățate și reprobate cu anticorp anti- $\beta$ -actină, pentru a confirma încărcarea de cantități egale de proteine în fiecare godeu și pentru a realiza normalizarea.

**Expresia MMP-13.** Analiza imunohistochimică a evidențiat expresia citoplasmatică a MMP-13, în timp ce analiza biochimică a MMP-13 a relevat prezența unei forme specifice cu greutate moleculară de 48 kDa, atât în probele reprezentate de piele normală (NS1-NS4), cât și în probele tumorale (T1-T9). Analiza densitometrică a evidențiat o expresie crescută a MMP-13 în fibropapiloame comparativ cu pielea normală (figura 19).

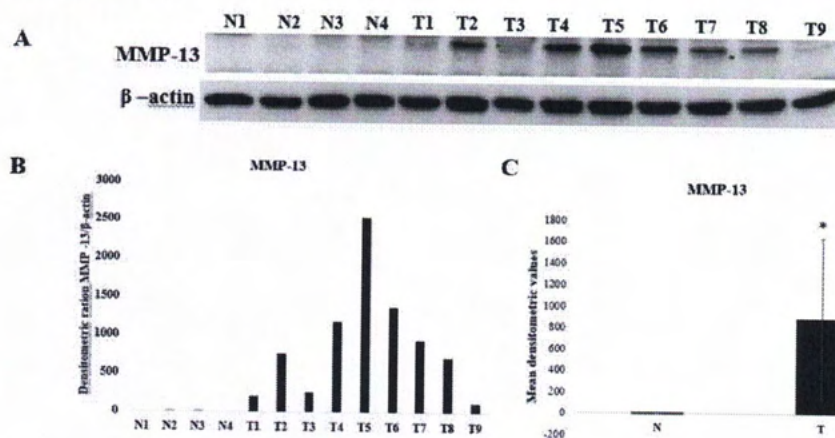


Figura 19. Western blot și analiza densitometrică a MMP-13 în piele normală (NS1-NS4) și tumori (T1-T9). Gel reprezentativ care arată o cantitate crescută de MMP-13 în tumori versus piele normală (A). Bloturile au fost curățate și reprobate cu anticorp anti- $\beta$ -actină, pentru a confirma încărcarea de cantități egale de proteine în fiecare godeu și pentru a realiza normalizarea. Valori densitometrice individuale (B) ale MMP-13 pentru fiecare probă, exprimate ca raport densitometric cu  $\beta$ -actin; valori densitometrice medii  $\pm$  deviație standard pentru MMP-13 între grupurile NS vs T (C).

**Expresia MMP-14.** Analiza imunohistochimică evidențiat expresia intracitoplasmatică a MMP-14, în timp ce analiza biochimică a MMP-14 a relevat prezența unei forme specifice cu greutate moleculară de 60 kDa, atât în probele reprezentate de piele normală (NS1-NS4), cât și în probele tumorale (T1-

T9). Analiza densitometrică a evidențiat o expresie scăzută a MMP-14 în fibropapiloame comparativ cu pielea normală (figura 20).

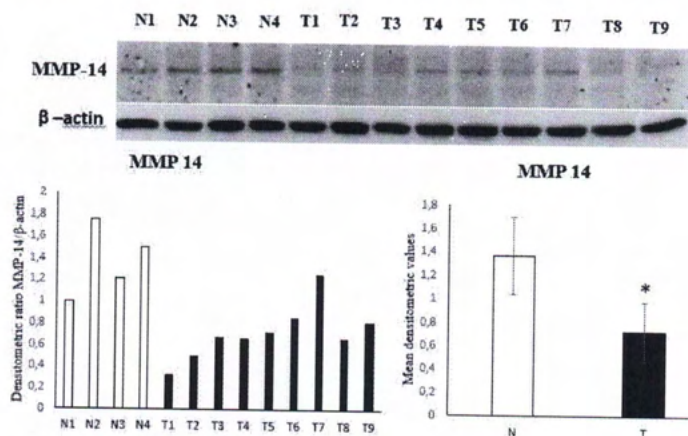


Figura 20. Western blot și analiza densitometrică a MMP-14 în pielea normală (NS1-NS4) și tumori (T1-T9). Gel reprezentativ care arată o cantitate scăzută de MMP-14 în tumori versus pielea normală (A). Bloturile au fost curățate și reprobate cu anticorp anti-  $\beta$ -actină, pentru a confirma încărcarea de cantități egale de proteine în fiecare godeu și pentru a realiza normalizarea. Valori densitometrice individuale (B) ale MMP-14 pentru fiecare probă, exprimate ca raport densitometric cu  $\beta$ -actin; valori densitometrice medii +/- deviație standard pentru MMP-14 între grupurile NS vs T (C).

**Expresia TIMP-1.** Analiza biochimică a TIMP-1 a relevat prezența unei forme specifice cu greutate moleculară de 23 kDa, atât în probele reprezentate de pielea normală (NS1-NS4), cât și în probele tumorale (T1-T9). Analiza densitometrică a evidențiat o expresie scăzută a TIMP-1 în fibropapiloame comparativ cu pielea normală (figura 21).

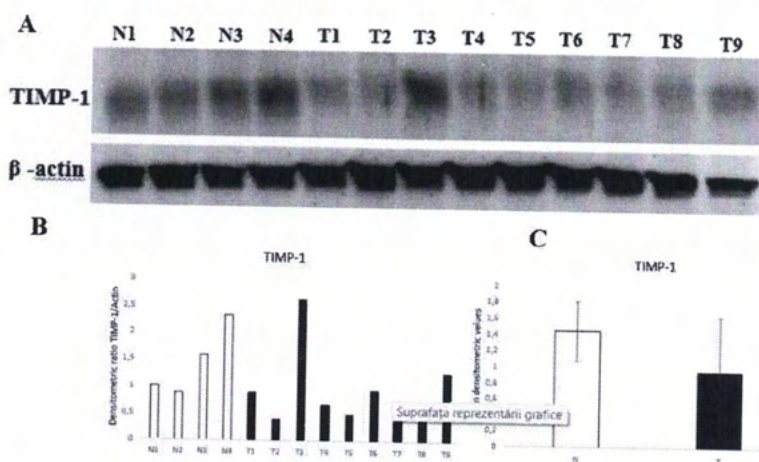


Figura 21. Western blot și analiza densitometrică a TIMP-1 în pielea normală (NS1-NS4) și tumori (T1-T9). Gel reprezentativ care arată o cantitate scăzută în tumori versus pielea normală (A). Bloturile au fost curățate și reprobate cu anticorp anti-  $\beta$ -actină, pentru a confirma încărcarea de cantități egale de proteine în fiecare godeu și pentru a realiza normalizarea. Valori densitometrice individuale (B) ale TIMP-1 pentru fiecare probă, exprimate ca raport densitometric cu  $\beta$ -actin; valori densitometrice medii +/- deviație standard pentru TIMP-1 între grupurile NS vs T (C).

**Expresia TIMP-2.** Analiza imunohistochimică a evidențiat expresia citoplasmatică a TIMP-2, în timp ce analiza biochimică a TIMP-2 a relevat prezența unei forme specifice cu greutate moleculară de

25 kDa, atât în probele reprezentate de piele normală (NS1-NS4), cât și în probele tumorale (T1-T9). Analiza densitometrică a evidențiat o expresie scăzută a TIMP-2 în fibropapiloame comparativ cu pielea normală (figura 22).

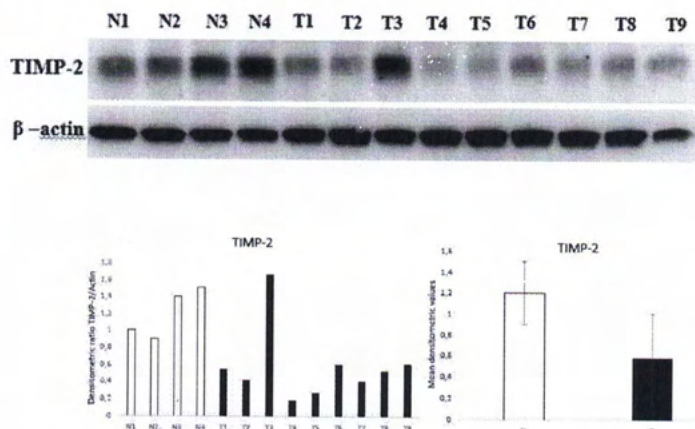


Figura 22. Western blot și analiza densitometrică a TIMP-2 în piele normală (NS1-NS4) și tumori (T1-T9). Gel reprezentativ care arată o cantitate scăzută în tumori versus piele normală (A). Bloturile au fost curățate și reprobate cu anticorp anti-β-actină, pentru a confirma încărcarea de cantități egale de proteine în fiecare godeu și pentru a realiza normalizarea. Valori densitometrice individuale (B) ale TIMP-2 pentru fiecare probă, exprimate ca raport densitometric cu β-actin; valori densitometrice medii +/- deviație standard pentru TIMP-2 între grupurile NS vs T (C).

**Expresia TIMP-3.** Analiza imunohistochimică a evidențiat expresia citoplasmatică a TIMP-3, în timp ce analiza biochimică a TIMP-3 a relevat prezența unei forme specifice cu greutate moleculară de 30 kDa, atât în probele reprezentate de piele normală (NS1-NS4), cât și în probele tumorale (T1-T9). Analiza densitometrică a evidențiat o expresie scăzută a TIMP-3 în fibropapiloame comparativ cu pielea normală (figura 23).

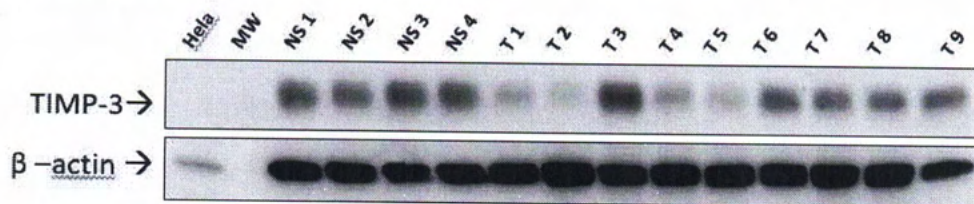


Figura 23. Western blot și analiza densitometrică a TIMP-3 în piele normală (NS1-NS4) și tumori (T1-T9). Gel reprezentativ care arată o cantitate scăzută de TIMP-3 în tumori versus piele normală (A). Bloturile au fost curățate și reprobate cu anticorp anti-β-actină, pentru a confirma încărcarea de cantități egale de proteine în fiecare godeu și pentru a realiza normalizarea.

**Expresia VEGF.** Analiza biochimică a VEGF a relevat prezența unei forme specifice cu greutate moleculară de 25 kDa, atât în probele reprezentate de piele normală (NS1-NS4), cât și în probele tumorale (T1-T9). Analiza densitometrică a evidențiat o expresie scăzută a TIMP-3 în fibropapiloame comparativ cu pielea normală (figura 23).

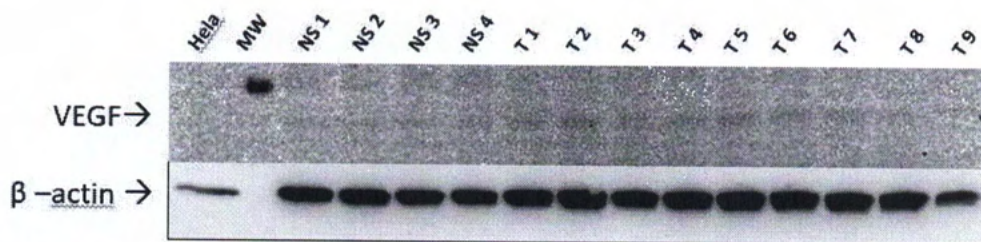


Figura 23. Western blot și analiza densitometrică a VEGF în piele normală (NS1-NS4) și tumori (T1-T9). Gel reprezentativ care arată o cantitate crescută de VEGF în tumori versus piele normală (A). Bloturile au fost curățate și reprobate cu anticorp anti-  $\beta$ -actină, pentru a confirma încărcarea de cantități egale de proteine în fiecare godeu și pentru a realiza normalizarea.

### Activ. 2.2. Evaluarea activitatii gelatinazelor MMP active si latente prin intermediul gelatin-zimografiei in vitro – grad de realizare total

Activitatea enzimatică poate fi evidențiată pentru gelatinaze, mai exact MMP-2 și MMP-9. Activitatea enzimatică a MMP-2 și MMP-9 a fost analizată cu ajutorul gelatin-zimografiei, cu gel de poliacrilamidă 7,5% conținând 0,1% gelatină (Sigma Aldrich) ca substrat. O cantitate de 20  $\mu$ g de proteine extrase din fiecare probă (probele analizate biochimic anterior) a fost diluată în raport de 1:1 cu tampon de încărcare nendenaturat (Biorad); probele au fost încărcate în gel de poliacrilamidă, iar electroforeza s-a realizat în condiții nendenaturante, la o intensitate de 120 V, timp de 1 h și 30 minute. După electroforeză, au urmat două spălări a 30 minute fiecare cu tampon de evidențiere a zimogramei (2.5% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>). Mai departe, gelul a fost incubat peste noapte la 37° C cu tampon de incubare conținând factori necesari reacției gelatinazelor (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>), apoi colorat cu tampon de colorare (40% metanol, 10 % acid acetic, 50 ml apă deionizată, 0.5 g Commasie Blue) timp de 1 h la temperatura camerei. Decolorarea gelului s-a realizat cu ajutorul soluției de decolorare (40 % metanol, 10 % acid acetic, 500 ml apă deionizată), până când benzile au devenit vizibile. Imaginea digitală a fost captată cu ajutorul dispozitivului de scanare Chemidoc (Bio-Rad Laboratories), iar analiza densitometrică a fost realizată cu ajutorul softului ImageLab.

### Rezultate activitate 2.2

Activitatea enzimatică a MMP-2 și MMP-9 a fost analizată comparativ, între pielea normală bovină și fibropapiloame. Formele pro- și active ale MMP-2 au fost evidențiate cu ajutorul electroforezei zimogram gelatinazei. Probele tumorale au prezentat o supra-exprimare a formei active MMP-2 comparativ cu pielea normală, lucru demonstrat și de analiza densitometrică individuală și mediană. Interesant, atunci când activitatea MMP-9 a fost analizată, forma sa activă cu o greutate de 82 kDa a fost evidențiată cu ușurință în toate probele tumorale (T1-T9), în timp ce în pielea normală forma activă a fost la un nivel nedetectabil sau foarte scăzut, rezultate ce sunt în concordanță cu

rezultatele analizei western blot. Analiza densitometrică individuală și mediană a evidențiat rezultate similare cu cele ale analizei Western blot, confirmând validitatea rezultatelor (figura 24).

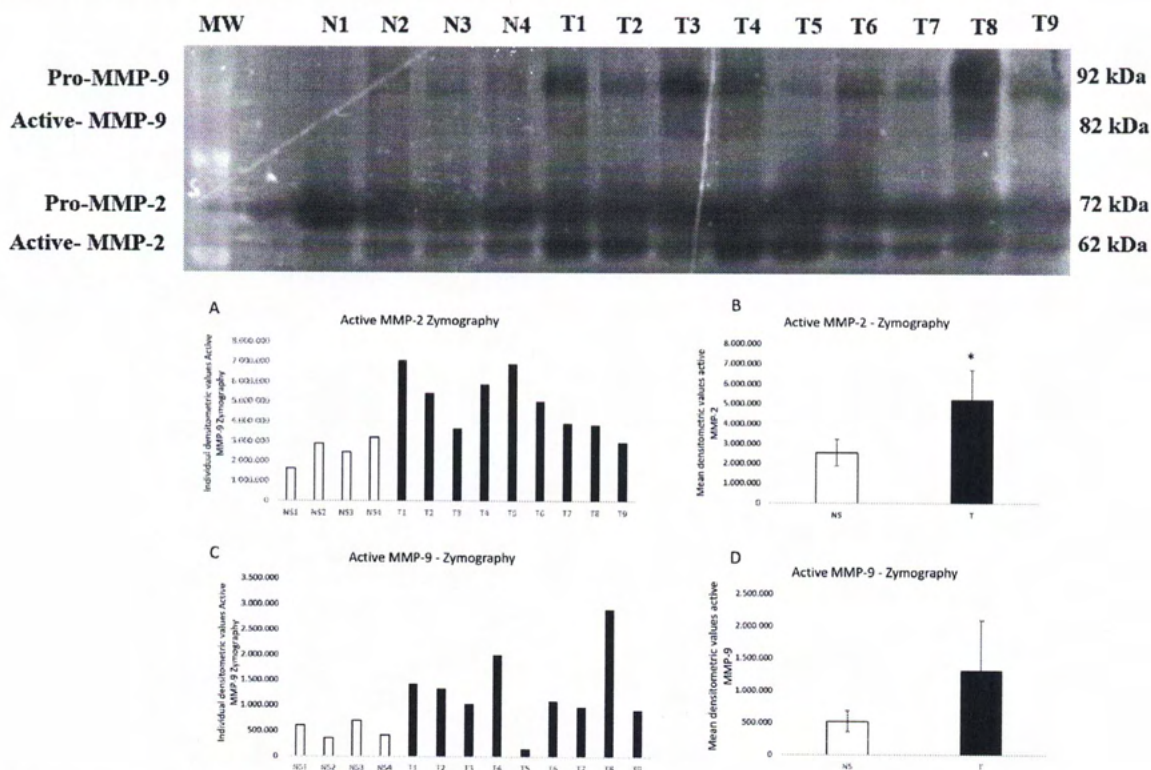


Figura 24 Analiza zimografică a activității gelatinazelor în piele normală bovină (N1-N4) și în fibropapiloame (T1-T9). În toate probele tumorale (T1-T9) MMP-2 este prezent ca pro-MMP-2 (72 kDa) și active form MMP-2 (62 kDa); forma activă a MMP-9 (82 kDa) este prezentă în cantitate crescută în fibropapiloame (imagine gel). Valori densitometrice individuale active – MMP-2 și MMP-9 (A și C); Valori densitometrice medii piele normală vs tumori +/- deviații standard (B și D)

## Indicatori de rezultate realizați - etapa 2

### Activitatea 2.3. Diseminarea rezultatelor

#### Act 1.3 - Diseminarea rezultatelor – grad de realizare parțial

Conform planului de realizare, diseminarea rezultatelor obținute în cadrul acestei etape s-a concretizat prin participarea la o conferință internațională, publicarea unui articol ISI în zona roșie, iar un al doilea articol se află în evaluare la un jurnal ISI din zona roșie.

#### Participări conferințe internaționale:

1. European Biotechnology Congress 2022, Praga, Cehia – prezentare poster "Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-3 and BPV-E2 in bovine cutaneous warts induced by bovine papillomavirus" - Florentina Bocaneti Daraban, Anca Mihaela Dascalu, Oana Irina Tanase, Sorin Pasca, Ozana Hritcu, Mihai Mares. Deoarece conferința s-a desfășurat în perioada 05-07 octombrie 2022, lucrările prezentate încă nu au fost publicate și nu au primit DOI, urmând ca acest lucru să se întâmple în perioada următoare.

## Publicare articole ISI

1. Florentina Daraban (Bocaneti), Gennaro Altamura, Annunziata Corteggio, Oana Irina Tanase, Mihaela Anca Dascalu, Sorin Aurelian Pasca, Ozana Hritcu, Mihai Mares, Giuseppe Borzacchiello, 2022. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) -2/-7/-9/-14 and tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) -1/-2 in bovine cutaneous fibropapillomas associated with BPV-2 infection. *Frontiers in Veterinary Science*, 9:1063580. doi: 10.3389/fvets.2022.1063580 – accepted. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2022.1063580/abstract>. **Zona rosie, subdomeniul Veterinary Sciences, Factor de Impact 3.21.**
2. Florentina Daraban (Bocaneti), Gennaro Altamura, Annunziata Corteggio, Oana Irina Tanase, Mihaela Anca Dascalu, Sorin Aurelian Pasca, Ozana Hritcu, Mihai Mares, Giuseppe Borzacchiello. Expression of collagenases (matrix metalloproteinase-1, -8, -13) and tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP-3) in naturally occurring bovine cutaneous fibropapillomas. *Frontiers in Veterinary Science* - **in evaluare**. Articolul de află în evaluare, s-a primit evaluare favorabilă de la un evaluator, însă se așteaptă evaluarea realizată de un al doilea referent.

## Realizarea raportului științific

1. Realizarea raportului tehnic și științific pentru toată durata proiectului.

## Pagina web a proiectului unde sunt prezentate succint rezultatele obținute:

[https://www.uaiasi.ro/PD/PD-50\\_2020/](https://www.uaiasi.ro/PD/PD-50_2020/)

## Impactul estimat al rezultatelor obținute, cu sublinierea celui mai semnificativ rezultat obținut.

În urma cercetărilor realizate în cadrul acestui proiect am obținut rezultate semnificative, în premieră internațională. Pentru prima dată, la nivel internațional s-a evidențiat expresia imunohistochimică și biochimică a metaloproteinazelor matriceale și a inhibitorilor acestora TIMP în tumori cutanate bovine induse de papillomavirusul bovin. De asemenea, cu ajutorul zimografiei s-a evidențiat pentru prima dată formele active ale MMP-2 și MMP-9. Deoarece rezultatele obținute sunt de un real interes pentru comunitatea științifică, în special cea care studiază procesul oncogenic în infecția cu papillomavirus, am valorificat acest aspect prin redactarea a două articole care au fost trimise la un jurnal de top din zona roșie, cu factor de impact 3,21, unul din articole fiind acceptat, iar cel de-al doilea aflând-se în curs de evaluare. Importanța rezultatelor obținute este astfel confirmată de acceptarea spre publicare.

Director Proiect,  
Șef lucrări doctor,  
Florentina Daraban Bocaneti