

Infezione attiva da *Felis catus* papillomavirus di tipo 2 in carcinomi squamosi orali felini

Evento formativo: Il Papillomavirus felino e le neoplasie cutanee dei felidi: nuovi approcci diagnostici.

29 novembre 2019

Dr. Gennaro Altamura, PhD

Dipartimento di Medicina veterinaria e Produzioni animali

Università degli Studi di Napoli Federico II

Carcinoma squamoso orale felino (FOSCC)

Generalità

- ✓ **FOSCC: quarta neoplasia più frequente nel gatto**
60-70% delle neoplasie maligne del cavo orale
- ✓ **Manifestazione possibile in tutta la cavità orale**
Siti maggiormente affetti: lingua, mandibola, mascella
- ✓ **Tumori localmente invasivi con elevato potenziale metastatico**
Invasione dell'osso, metastasi linfonodi regionali (mandibolari), polmonari



Carcinoma squamoso orale felino (FOSCC)

3

Fattori di rischio:

- ✓ **Esposizione fumo passivo**

Mutazioni p53

- ✓ **Collari antipulci**

Contenuto pesticidi, vicinanza al cavo orale

- ✓ **Scarsa igiene orale**

Stati infiammatori cronici

- ✓ **Consumo cibo umido**

?

**Studi di associazione:
Eziologia ignota**

Carcinoma squamoso orale felino (FOSCC)

4

Terapia e prognosi

- ✓ **Chirurgia, Chemioterapia, Radioterapia**

Risultati scarsi o nulli

- ✓ **Chirurgia + radioterapia**

Risultati migliori

- ✓ **Prognosi infausta**

Tumori rapidamente progressivi

- ✓ **Eutanasia**

- ✓ **Tumore letale !**



Mod. da <https://www.cvmalpensa.com/carcinoma-squamoso-del-cavo-orale-del-gatto>

Felis catus papillomavirus di tipo 2

5

✓ Papillomaviridae

✓ Unico membro del suo genere (*dyotheta*):
caratteristiche di sequenza uniche

Proprietà biologiche peculiari?

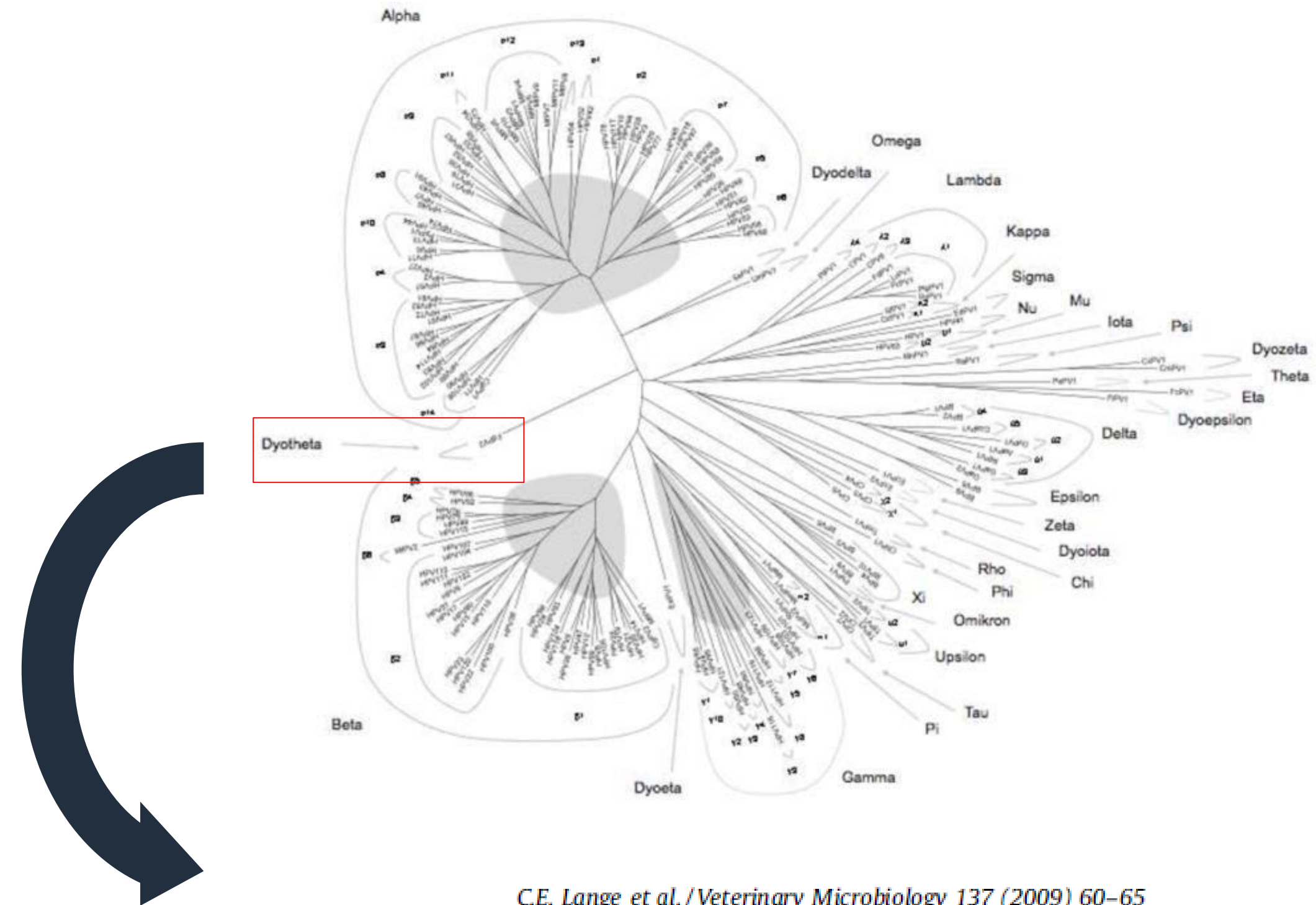
✓ Organizzazione genomica

L1/L2: capside virale

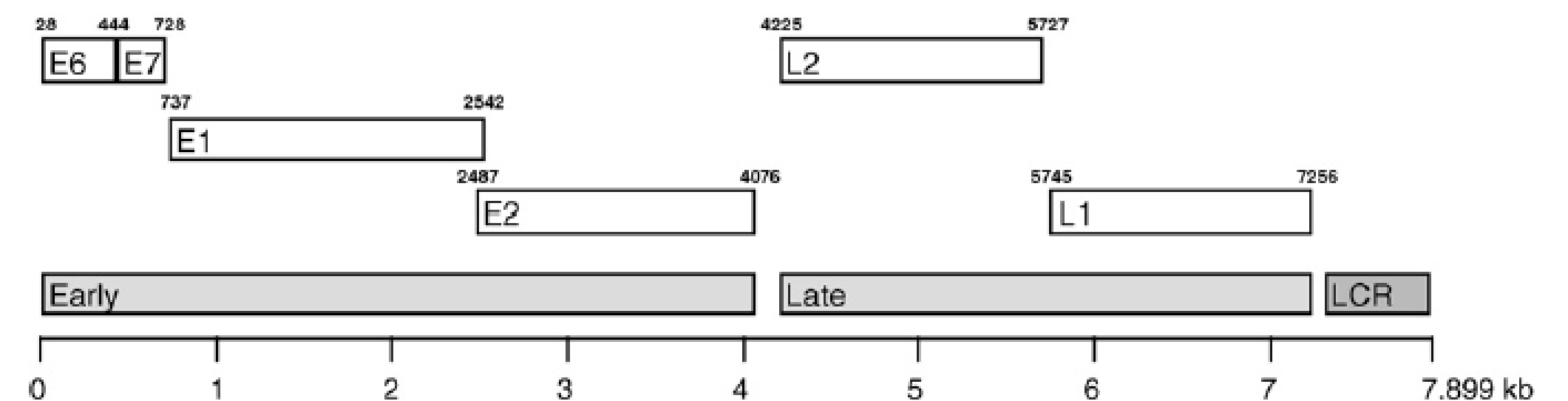
E1-E2: regolatori trascrizione e replicazione virale

E6: oncogene

E7: oncogene



C.E. Lange et al./Veterinary Microbiology 137 (2009) 60–65



Felis catus papillomavirus di tipo 2

6

- ✓ **Virus a tropismo cutaneo**

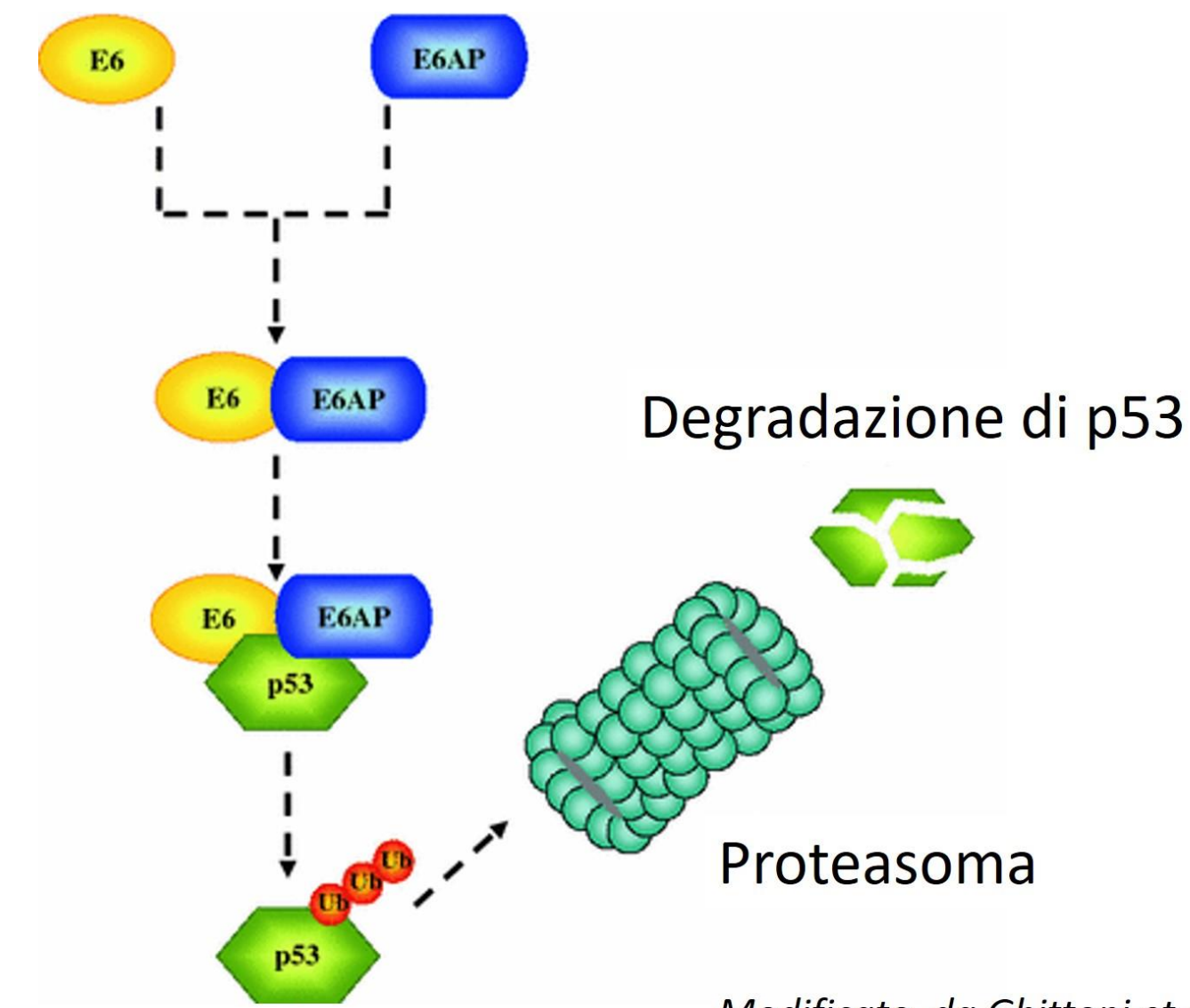
Frequentemente associato a SCC cutanei e lesioni pre-neoplastiche

- ✓ **Geni virali E6 ed E7**

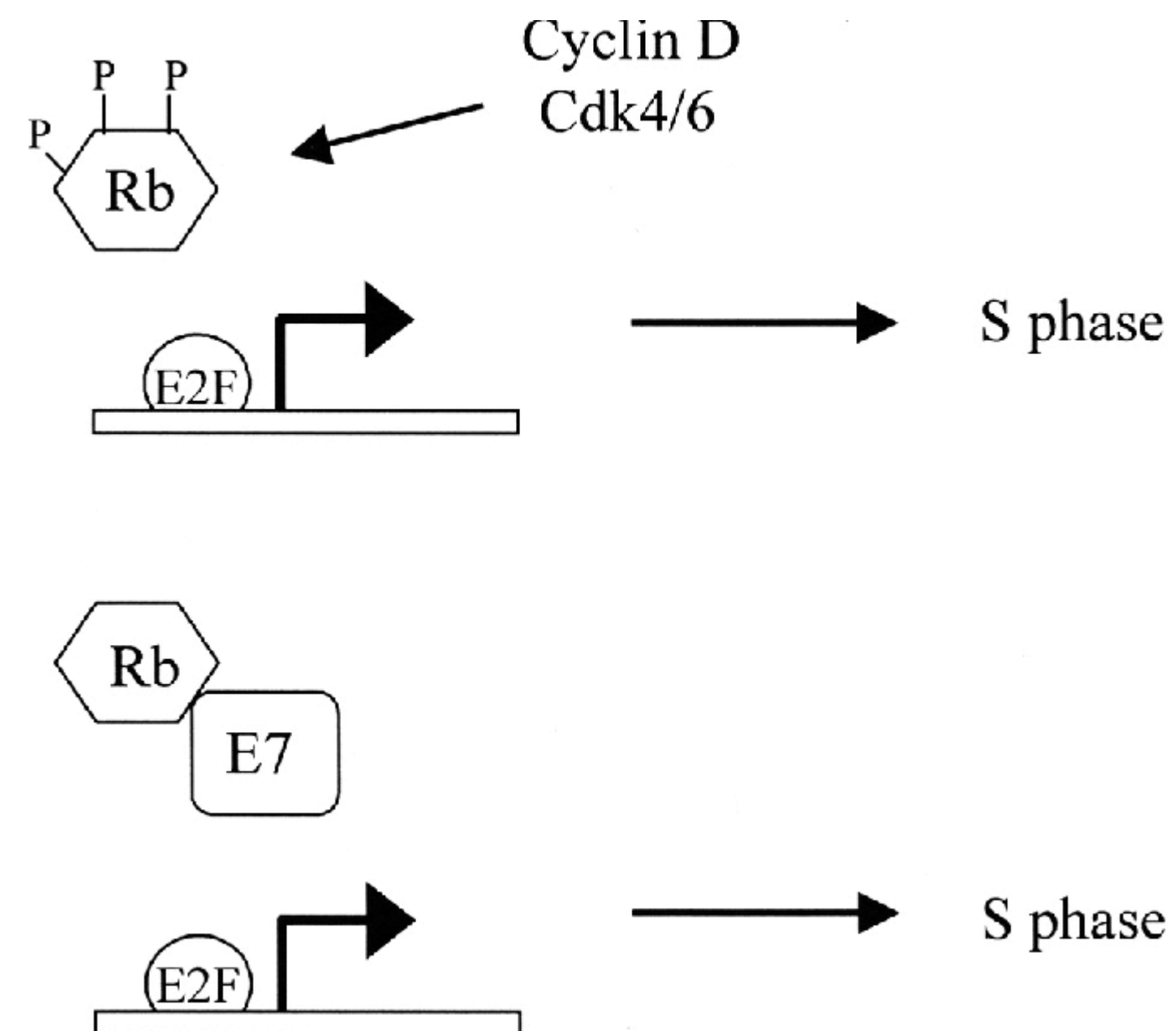
Proprietà trasformanti, degradazione oncosoppressori p53 e pRb

- ✓ **Biologicamente attivo nei tumori**

Espressione oncogeni E6 ed E7



Modificato, da Ghittoni et al., 2016



Modificato da Hamid et al., 2009

Felis catus papillomavirus di tipo 2

7

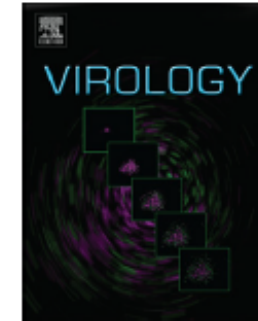
Virology 496 (2016) 1–8



Contents lists available at ScienceDirect

Virology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yviro



Transforming properties of *Felis catus* papillomavirus type 2 E6 and E7 putative oncogenes *in vitro* and their transcriptional activity in feline squamous cell carcinoma *in vivo*

Gennaro Altamura^a, Annunziata Corteggio^a, Laura Pacini^b, Andrea Conte^c,
Giovanna Maria Pierantoni^c, Massimo Tommasino^b, Rosita Accardi^b,
Giuseppe Borzacchiello^{a,*}

^a Department of Veterinary Medicine and Animal Productions, General Pathology and Pathological Anatomy Unit, University of Naples Federico II, Via Delpino 1, 80137 Naples, Italy

^b Infections and Cancer Biology Group, International Agency for Research on Cancer, 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon, France

^c Department of Molecular Medicine and Medical Biotechnologies, University of Naples Federico II, Via Pansini 5, 80131 Naples, Italy



Veterinary Microbiology 195 (2016) 96–100

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Microbiology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetmic



Short communication

Felis catus papillomavirus type 2 E6 oncogene enhances mitogen-activated protein kinases and Akt activation but not EGFR expression in an *in vitro* feline model of viral pathogenesis

Gennaro Altamura^a, Annunziata Corteggio^b, Giuseppe Borzacchiello^{a,*}

^a Department of Veterinary Medicine and Animal Productions, University of Naples Federico II, Via F. Delpino, 1, 80137 Napoli, Italy

^b Institute of Protein Biochemistry (IBP), National Council of Research (CNR), Via Pietro Castellino, 111, 80131 Napoli, Italy



SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Felis catus papillomavirus type-2 E6 binds to E6AP, promotes E6AP/p53 binding and enhances p53 proteasomal degradation

Gennaro Altamura¹, Karen Power¹, Manuela Martano¹, Barbara degli Uberti²,
Giorgio Galiero², Giovanna De Luca², Paola Maiolino¹ & Giuseppe Borzacchiello¹

Received: 15 June 2018

Accepted: 7 November 2018

Published online: 03 December 2018



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II

Prime indagini: SCC cutanei e mucosali

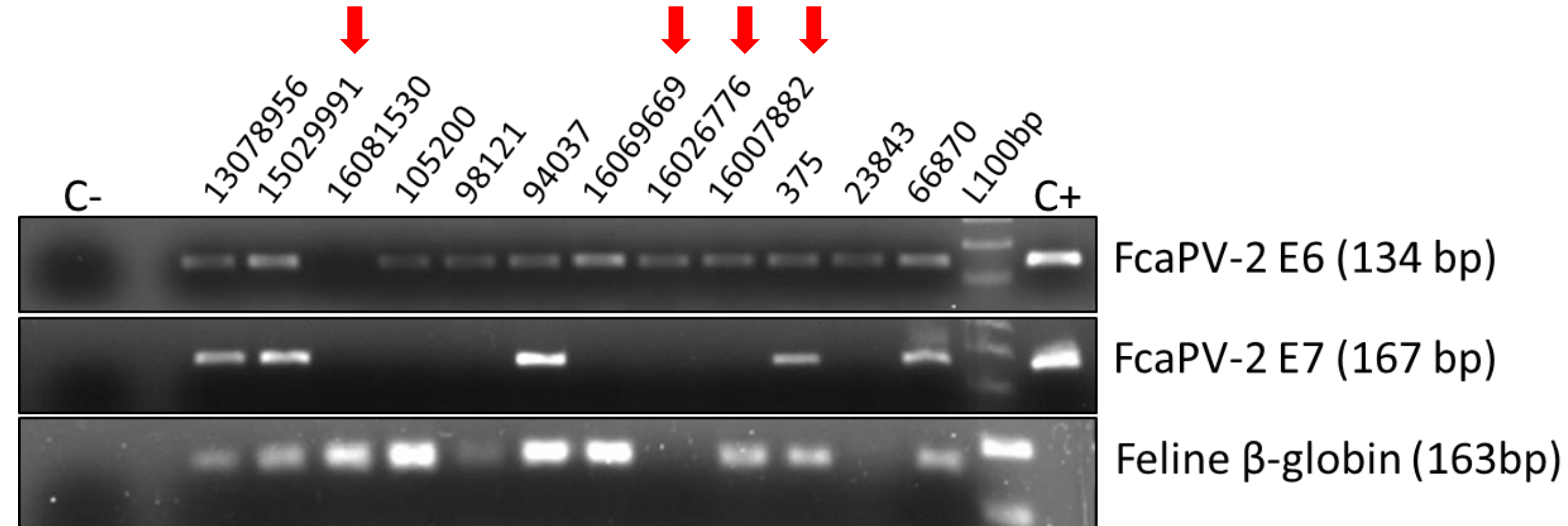
✓ **Prima batteria di campioni: IZSLT (2013-2016)**

Positivi per FcaPV-2 DNA (PCR JMP)

✓ **DMVPA-Federico II Napoli**

Presenza oncogeni virali E6 ed E7 (PCR)

Codice	Provenienza	Comune	Razza	Età	Sesso	Sede Anatomica	Diagnosi	FcaPV-2
13078956	IZSLT (2013)	Ciampino	Incrocio persiano	14	F	Padiglione auricolare	SCC	+
105200	IZSLT (2016)	Roma	Europeo	16	M	naso	SCC	+
98121	IZSLT (2016)	Roma	ESH	10	F	Padiglione auricolare	SCC	+
94037	IZSLT (2016)	Ardea	ESH	10	M	Regione sopraorbitale	SCC	+
375	IZSLT (2016)	Quarrata	ESH		F	Padiglione auricolare	SCC	+
23843	IZSLT (2016)	Firenze			M	Dito anteriore	SCC	+
66870	IZSLT (2016)	Ardea	ESH	10	M	Regione sopraorbitale	SCC	+
15029991	IZSLT (2015)	Marino	ESH		F	gengiva	SCC	+
16081530	IZSLT (2016)	Grosseto		12	F	mandibola	SCC	+
16026776	IZSLT (2016)	Roma		13	M	mandibola	SCC	+
16069669	IZSLT (2016)	Grosseto	ESH	10	F	Naso/labbro	SCC	+
16007882	IZSLT (2016)	Roma	ESH	6	M	Seni nasali	SCC	+



FcaPV-2: tropismo anche mucosale?

- ✓ **Associazione 25-30% SCC orali dell'uomo con infezione da human PV ad alto rischio (HR-HPV)**

Migliore prognosi e risposta alle terapie vs tumori non virali

- ✓ **Rilevazione di FcaPV-2 in un FOSCC e due linee cellulari derivate da tumori (Altamura e et al., 2016 Virology; Altamura et al, 2018 SciRep)**

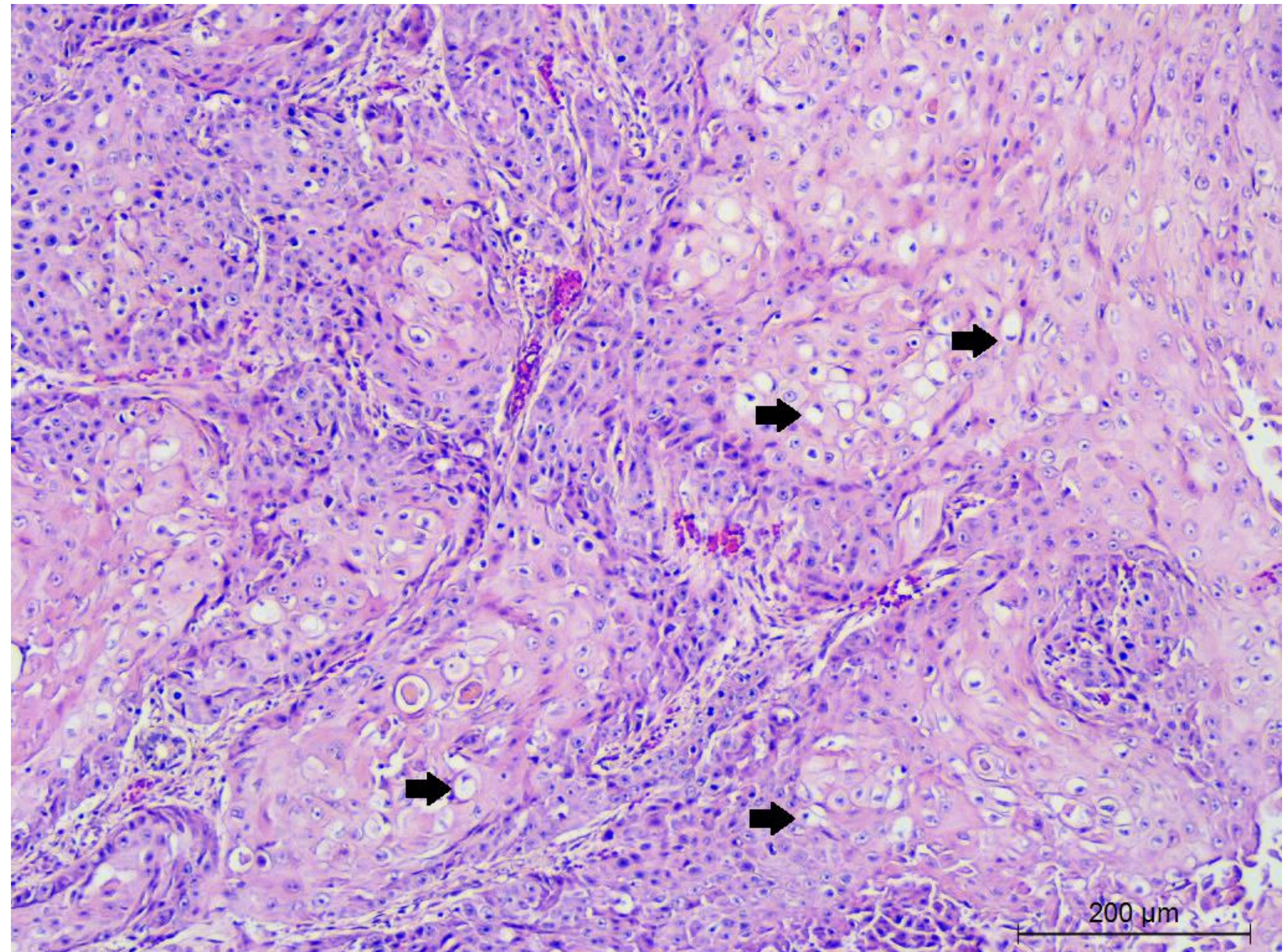
Necessità di allargare il campionamento

- ✓ **Proprietà biologiche simili ad HR-HPV mucosali**

Degradazione p53 e pRb

**Analisi su un numero più
elevato di FOSCC
Ricerca DNA di FcaPV-2 ed
espressione oncogeni virali**

- ✓ Raccolta campioni inclusi in paraffina: 32 FOSCC
- ✓ Archivio IZSLT (2013-2019): 25 campioni
- ✓ CEROVEC: 7 campioni
- ✓ Rivalutazione diagnostica
Colorazione ematossilina-eosina
- ✓ Diagnosi: SCC
Presenza di koilociti



✓ Metodologia: PCR

Primers degenerati (Es. FAP59/64): amplificazione frammenti lunghi (400-500 bp)

Non amplificano DNA virale da FOSCC archiviali (Munday et al., 2011)

✓ Primers tipo-specifici: amplificazione frammenti più corti (JMPF/R)

Gene L1, amplicone di 177 bp

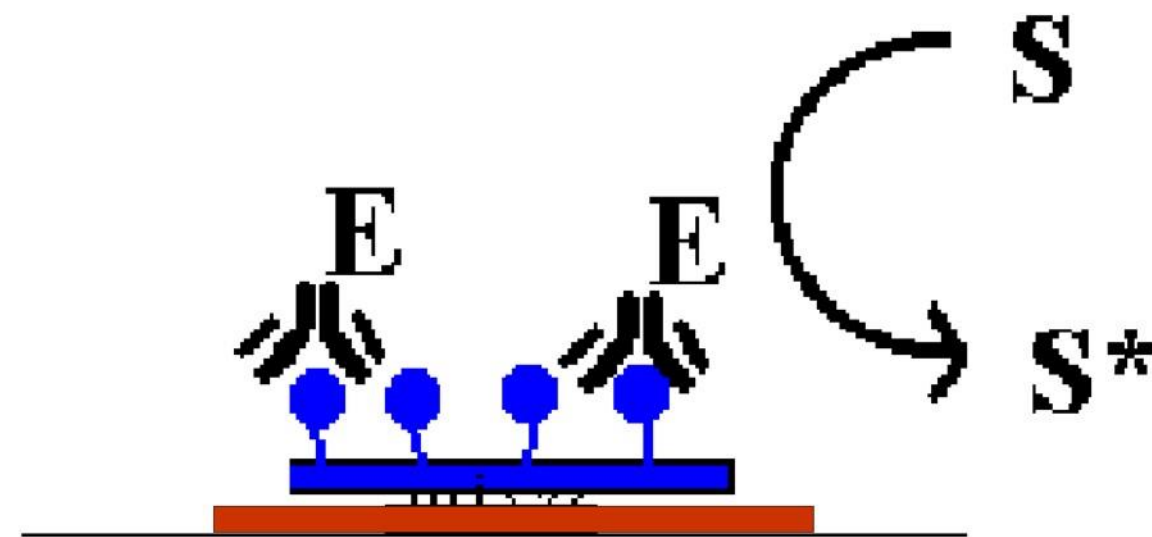
RISULTATI: 10/32 FOSCC FcaPV-2 DNA + (31%)

SAMPLE	BREED	AGE	SEX	ANATOMICAL SITE	DIAGNOSIS	FcaPV-2 DNA
T1	UK	UK	UK	GINGIVA	SCC	-
T2	UK	UK	UK	MOUTH	SCC	-
T3	UK	UK	UK	GINGIVA	SCC	-
T4	UK	UK	UK	TONGUE	SCC	-
T5	UK	UK	UK	ESOPHAGUS	SCC	-
T6	UK	UK	UK	MOUTH	SCC	-
T7	UK	UK	UK	GINGIVA	SCC	-
T8	UK	UK	UK	MAXILLA	SCC	-
T9	UK	UK	UK	TONGUE	SCC	-
T10	ESH	UK	F	GINGIVA	SCC	+
T11	UK	UK	UK	GINGIVA	SCC	-
T12	UK	UK	UK	GINGIVA	SCC	-
T13	UK	13	M	MANDIBLE	SCC	+
T14	ESH	10	F	LIP/NOSE	SCC	+
T15	UK	12	F	MANDIBLE	SCC	+
T16	ESH	6	M	NASAL SINUSES	SCC	+
T17	ESH	10	F	GINGIVA	SCC	-
T18	ESH	14	F	ORAL CAVITY	SCC	-
T19	ESH	10	M	TONGUE	SCC	-
T20	ESH	10	F	TONGUE	SCC	-
T21	ESH	10	F	GINGIVA	SCC	+
T22	ESH	6	F	ORAL CAVITY	SCC	-
T23	ESH	15	F	ORAL CAVITY, CHEEK	SCC	+
T24	ESH	12	M	HARD PALATE	SCC	+
T25	ESH	13	F	TONGUE	SCC	+
T26	ESH	12	F	GINGIVA	SCC	+
T27	ESH	UK	M	NARIX	SCC	+
T28	ESH	UK	F	HARD PALATE	SCC	+
T29	ESH	UK	M	ORAL MUCOSA	SCC	-
T30	PERSIAN	UK	F	TONGUE	SCC	-
T31	ESH	UK	F	TONGUE	SCC	-
T32	ESH	UK	F	ORAL CAVITY	SCC	-
T33	ESH	UK	M	TONGUE	SCC	-
T34	ESH	UK	M	MAXILLA/GINGIVA	SCC	-
T35	ESH	2	UK	TONGUE/PALATE	PAPILLOMA	+

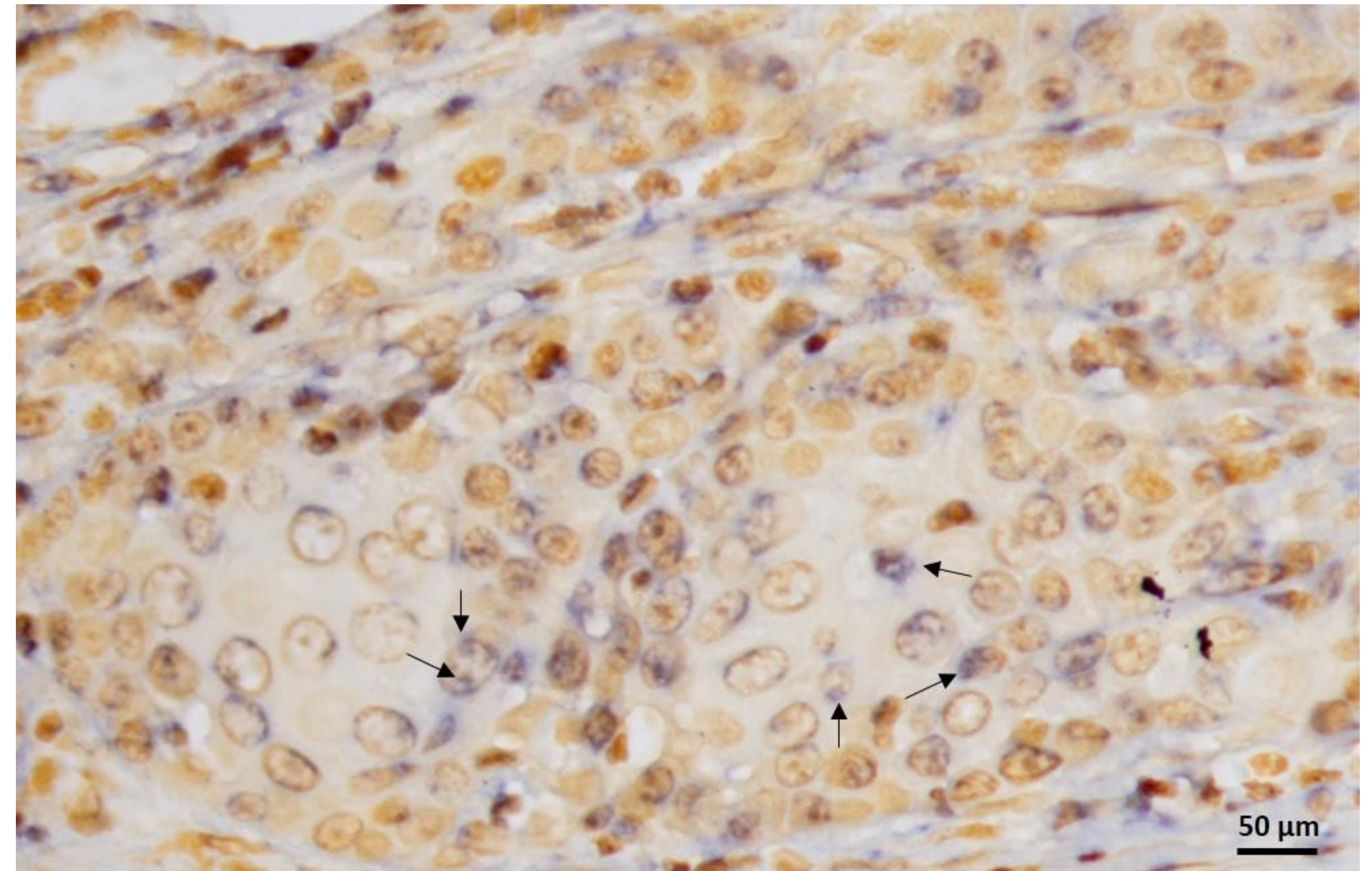
✓ **Metodologia: ibridazione in situ (ISH)**

Sonda per DNA FcaPV-2 marcata con digossigenina

✓ In collaborazione con il Dipartimento di Biologia, Università Federico II-Napoli



- Anticorpi anti-dig coniugati con E
- Sonda marcata con 11-dig-dUTP
- DNA denaturato fissato
- E fosfatasi alcalina, perossidasi,...
- S substrato



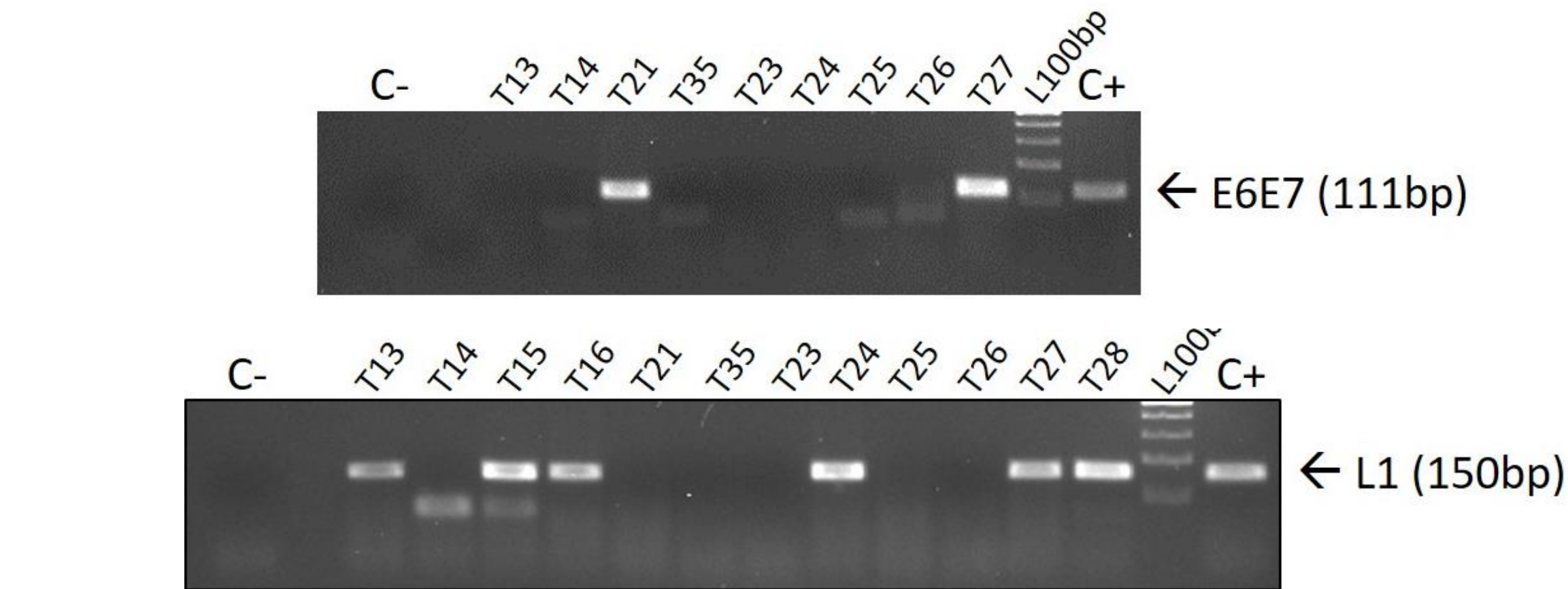
RISULTATI: segnale di ibridazione in 4/9 FcaPV-2 DNA + FOSCC (44%)

✓ **Metodologia:** Reverse transcription (RT-) PCR per geni virali

- L1 (capside) → infezione produttiva?
- E2 (regolazione trascrizione virale) → Virus biologicamente attivo?
- E6E7 (oncogeni) → Trasformazione neoplastica?

✓ **RISULTATI:** Trascrizione geni virali FcaPV-2 in 7/10 FOSCC (70%)

- L1: 5/10 (50%)
- E2: 3/10 (33%)
- E6E7: 5/10 (50%)



Sample	FcaPV-2 mRNA		
	L1	E2	E6E7
T10	+	+	+
T13	+	+	-
T14	-	-	-
T15	+	-	+
T16	+	-	-
T21	-	+	+
T23	-	-	-
T24	+	-	-
T25	-	-	-
T26	-	-	+
T27	+	-	+
T28	+	-	+

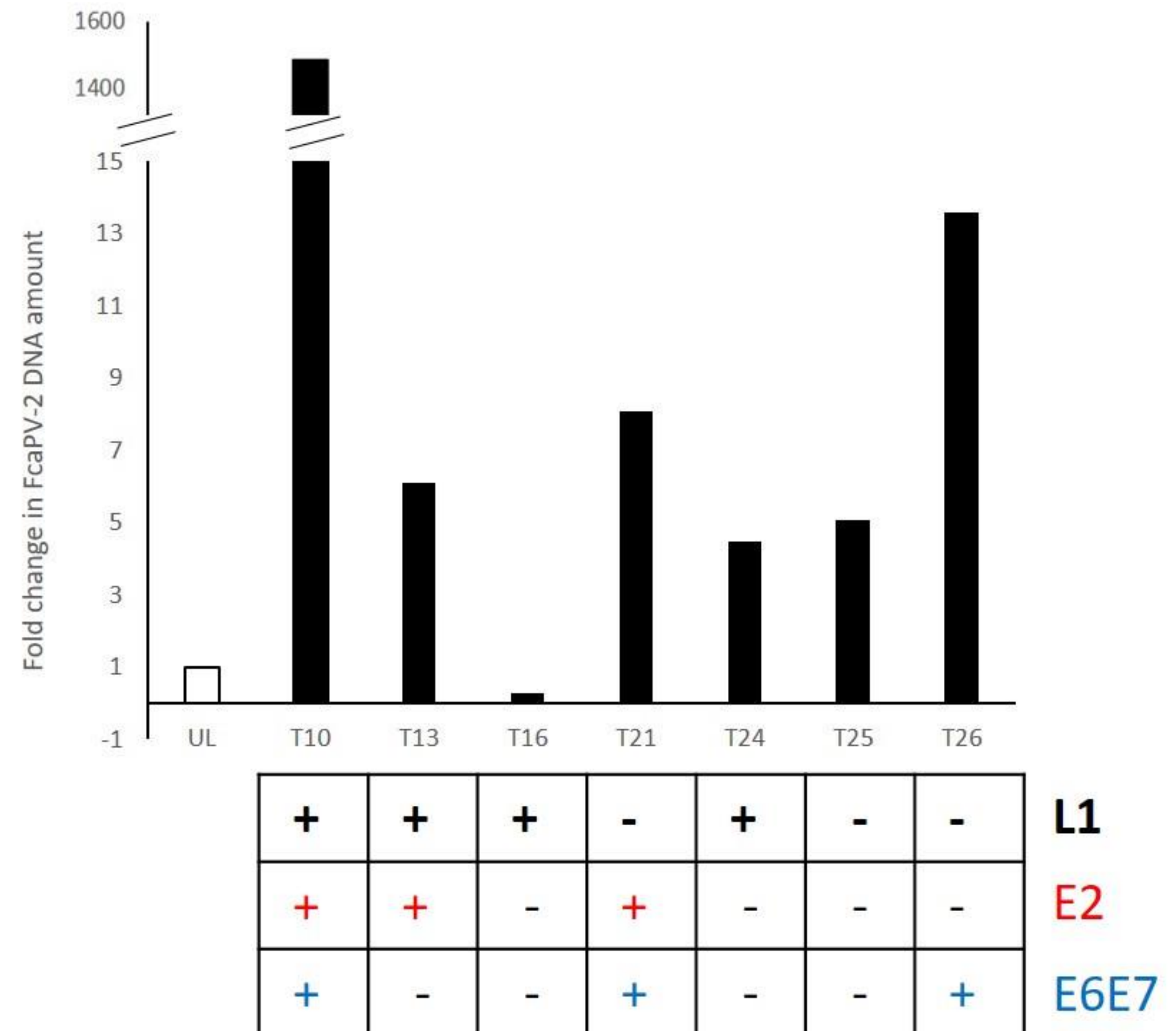
✓ **Metodologia: Real-time PCR quantitativa (qPCR)**

Comparazione relativa del viral load rispetto a lesioni ulcerative orali non neoplastiche (UL)

FcaPV-2 DNA detettabile in 4/11 UL (36%), conferma tropismo mucosale

✓ **RISULTATI: Viral load più alto in FOSCC vs UL**

Viral load ↑↑↑ → espressione E6E7



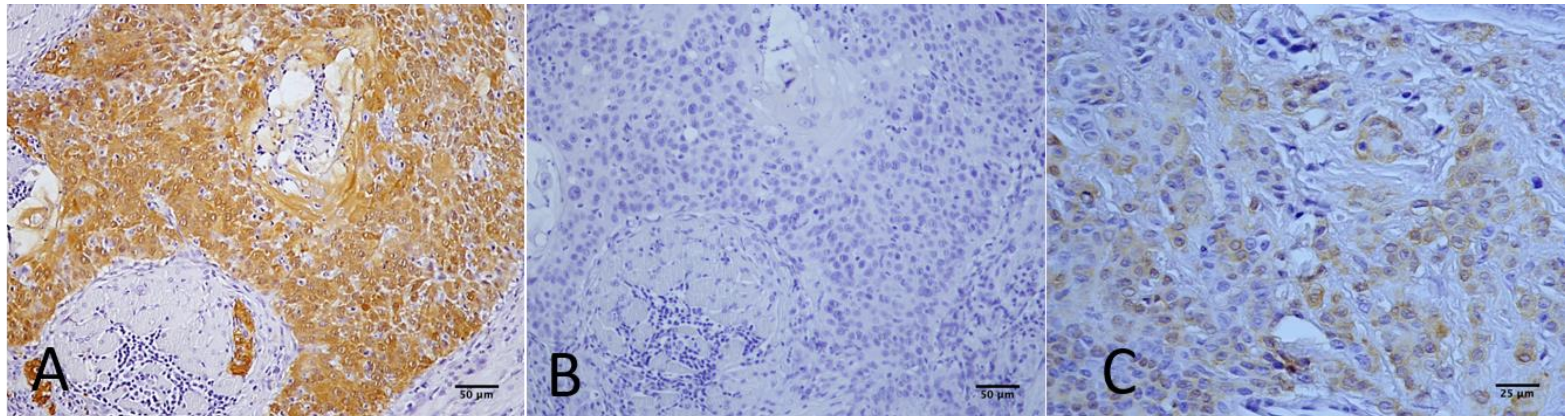
✓ **Metodologia:** immunoistochimica p16

Marker di infezione da PV in OSCC umano, pathway pRb

✓ **RISULTATI:** espressione p16 in 6/9 campioni (69%)

4/9: colorazione intensa in 80-90% cellule neoplastiche

2/9: colorazione moderata in 20-30% cellule neoplastiche



- ✓ Una percentuale di FOSCC è associata ad infezione da FcaPV-2 (PCR, ISH)
- ✓ L'infezione è attiva e può essere produttiva (espressione E2 ed L1)
- ✓ Il virus può avere attività trasformante (viral load, espressione E6E7, p16)
- ✓ Gatto come modello animale: FOSCC FcaPV-2 + → OSCC umano HR-HPV +

Prospettive future

- ✓ Screening HPV in OSCC umano: IHC p16, PCR, ISH, espressione genica
- ✓ Le medesime tecniche sono applicabili ai FOSCC: è tempo di eseguire screening e follow-up?
- ✓ Possibili implicazioni prognostiche: FOSCC FcaPV-2+ vs tumori non virali
- ✓ Profilassi: vaccino anti-HR-HPVs e vaccino anti-FcaPV-2

HNSCC

FOSCC



Ringraziamenti

17

✓ **Sezione Patologia generale e Anatomia patologica, DMVPA, Università Federico II di Napoli**

Prof. Giuseppe Borzacchiello, Prof. Paola Maiolino, Prof. Manuela Martano

✓ **Dipartimento di Biologia, Università Federico II di Napoli**

Prof. Gionata De Vico, Prof. Francesca Carella

✓ **IZSLT**

Dott.ssa Claudia Eleni, Dott.ssa Giusy Cardeti, Dott.ssa Antonella Cersini

✓ **CEROVEC**

Dott.ssa Elisabetta Razzuoli

Grazie per l'attenzione

