

PROGETTI DI “RICERCA CORRENTE 2015” RELAZIONE FINALE

N. identificativo progetto: IZS LT 03/15RC

Progetto presentato da:

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE

LAZIO E TOSCANA “M. ALEANDRI”

Area tematica: Sanità animale

Titolo del progetto: Il Papillomavirus felino e le neoplasie cutanee dei felidi: nuovi approcci diagnostici per un virus oncogenico emergente

“Ricerca finanziata dal Ministero della Salute”

Responsabile Scientifico: Dr. ssa Giusy Cardeti

SINTESI: Progetto IZS LT 03/15 RC, anno finanziario 2015. “Il Papillomavirus felino e le neopltraslateasie cutanee dei felidi: nuovi approcci diagnostici per un virus oncogenico emergente”.

Obiettivi

- Valutare la presenza di DNA virale e l’espressione dei potenziali oncogeni di FcaPV-2 in neoplasie cutanee e mucosali in felini domestici e selvatici ed in felidi esotici.
- Mettere a punto tecniche biomelocolari per la diagnosi di papillomavirus e loro utilizzo per la diagnosi di PVs nel carcinoma squamoso di felini selvatici ed esotici.
- Chiarire il ruolo del virus oggetto dello studio nelle neoplasie cutanee e mucosali nel gatto
- Correlare filogeneticamente i ceppi identificati a quelli precedentemente isolati, descritti in letteratura.

Metodologia

Esame Anatomico-Patologico: prelievo di lesioni cutanee e mucosali neoplastiche da animali pervenuti per esame necroscopico e da animali vivi, eventualmente anestetizzati.

Esame Istologico mediante Colorazione con Ematossilina-Eosina su campioni fissati in formalina al 10% ed inclusi in paraffina.

Esame Immunoistochimico per evidenziazione su campioni inclusi in paraffina dell'antigene virale e della proteina p16 della cellula ospite.

Esami Virologici: tecniche biomolecolari per l'evidenziazione di DNA, RNA, geni strutturali, di trascrizione ed espressione; tecniche di Microscopia Elettronica in colorazione negativa per evidenziazione di particelle virali riferibili per morfologia e dimensioni a PVs.

Per le tecniche biomolecolari, i protocolli di RCA PCR, RT-PCR, PCR consensus per la diagnosi di papillomavirus felino, sono stati studiati mediante dettagliata ricerca in letteratura e quindi messi a punto per l'utilizzo. Eseguiti: metodo Sanger per sequenziamento; PCR real time quantitativa per confronto carica virale in lesioni orali neoplastiche e non; ibridazione in situ per evidenziare DNA genomico di FcaPV-2.

Risultati

Sulle 132 biopsie di cute e mucose di gatto, pervenute all'U.O. 2 IMS per l'esame istologico, nel periodo di svolgimento del progetto, sono state diagnosticate 48 neoplasie compatibili con infezione da papillomavirus di cui 44 carcinomi a cellule squamose, 2 papillomi orali e 2 cheratosi attiniche.

Complessivamente, nel periodo gennaio 2013 – aprile 2019 sono stati raccolti e selezionati, presso l'IZSLT, 85 campioni di lesioni compatibili con infezione da papillomavirus (37 presenti nell'istoteca IZSLT e 48 raccolti durante il periodo di svolgimento del progetto). Di questi, 81 erano carcinomi squamosi, 2 erano papillomi orali e 2 cheratosi attiniche; 27 coinvolgevano le mucose, in particolare quella del cavo orale (25 campioni).

Su tutti i campioni di cute e mucose, è stata valutata istologicamente la presenza di lesioni indicative di infezione da papillomavirus, in particolare la presenza dei Coilociti, cioè delle cellule epiteliali modificate dall'azione del virus, caratteristiche di tale infezione. Tali lesioni sono state individuate in un campione di carcinoma squamoso prelevato a livello del palato (Figura 4) e nei 2 casi di papillomi localizzati sulla lingua.

Tutti gli 85 campioni selezionati, sono stati sottoposti alle indagini virologiche come previsto dal progetto.

PCR RCA: permette di amplificare genomi virali a DNA circolari utilizzando random primer dotati di bassa specificità, una particolare TaqPolimerasi e, nel caso dei Papillomavirus felini, tre diversi enzimi di restrizione: *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*. La RCA-PCR seguita dalle analisi di restrizione enzimatiche ha confermato la presenza delle bande di circa 7,9Kbp in tutti i 19 campioni, confermando la presenza del genoma del Papillomavirus Felino, senza però indicare il tipo. Questi risultati hanno confermato sia la diagnosi di carcinoma squamoso effettuata mediante esame istologico che la presenza di FcaPV verificata mediante gli esami molecolari (campioni selezionati in quanto positivi o ad entrambi i protocolli di PCR specifici per il FcaPV-2 (PCR JMP e PCR E2), oppure, ad uno solo dei due protocolli di PCR panPV).

Pan-papillomavirus CODHEOP PCR_FAP e PAP: entrambe le pan-PV CODHEOP PCR sono state sviluppate per la ricerca dei Papillomavirus in lesioni cutanee di una vasta gamma di mammiferi e, nel nostro lavoro, sono state testate anche su lesioni cutanee riscontrate nei rettili.

I prodotti dei 6 campioni risultati positivi in PCR panPV e confermati con le PCR JMP e E2 specifiche per FcaPV-2, sono stati sequenziati: presenza di FcaPV-2; 100% identità di sequenza e 99% query-cover con la sequenza A.N. EU796884.1, Feline Papillomavirus type 2 isolate Main Coon 2007. Dei 34 campioni inviati dal CEROVEC, 10 sono risultati positivi, di cui 5 POS anche con le PCR JMP e E2. Gli amplificati delle PCR JMP e E2 hanno mostrato: identità di sequenza del 99% e query-cover del 91% con la sequenza NC_038520.1, Feline papillomavirus type 2 isolate Main Coon 2007.

I protocolli molecolari PCR JMP e PCR E2 sono stati sviluppati considerando che il FcaPV maggiormente diffuso è il FcaPV type 2 e sono caratterizzati dall'utilizzare primer che riconoscono sequenze altamente conservate nell'ambito del genoma di FcaPV-2. I 2 protocolli sono applicabili alle analisi filogenetiche. Degli 88 campioni esaminati, 27 (30,68%) sono risultati positivi in PCR JMP e 28 (31,81%) in PCR E2. Dei 34 campioni inviati dal CEROVEC, sono risultati positivi 7 (20,58%) la PCR JMP e 12 (35,29%) con la PCR E2, di cui 5 campioni coincidevano con quelli positivi in PCR panPV. Due degli amplificati sono stati sequenziati: identità di sequenza del 99% e query-cover del 100% con la sequenza A.N. NC_038520.1, Feline papillomavirus type 2 isolate Main Coon 2007.

Per 23 campioni tra quelli positivi in PCR, è stato possibile procedere con l'esame in microscopia elettronica (ME), colorazione negativa. In quattro lesioni a sede padiglione auricolare, cute dorso, mucosa linguale e cute perioculare, di cui n.3 SCC cutanei e n.1 papilloma su lingua, sono state osservate particelle virali riferibili per morfologia e dimensioni a papillomavirus.

L'esame immunoistochimico è stato effettuato sulle 25 lesioni a sede orale (23 campioni di carcinoma a cellule squamose e 2 papillomi), risultate positive agli esami biomolecolari.

La positività è stata rilevata nei 3 campioni (1 carcinoma squamoso del palato duro e 2 papillomi linguali) che istologicamente presentavano coilociti (lesioni caratteristiche dell'infezione da papillomavirus). Uno dei 2 papillomi orali è risultato positivo anche in ME.

Sono stati studiati i primer per la messa a punto dei relativi protocolli di RT-PCR ai fini della valutazione della sintesi di particelle virali, mediante la ricerca di E1, E6 ed E7 (potenziali oncogeni) e delle proteine del capsido virale L1 e L2. Per la valutazione sia della presenza del DNA che dell'RNA virale, sono stati selezionati i geni di trascrizione E1, E6 e E7 (*Altamura G. et al, 2016*) presenti nel genoma del FcaPV-2 ed un gene presente sia nel genoma del FcaPV-1 che del FcaPV-2 (proteina L1) (*Munday J.S. et al, 2015*). Tutti questi geni sono considerati indicatori di trasformazione della cellula. Sono state studiate anche le coppie di primer per il gene E1 (FcaPV 1 e 2) ed il gene L2 (PVs).

Allo scopo di valutare la presenza di FcaPV-2 in lesioni mucosali, sono stati selezionati 32 campioni di FOSCC (feline oral SCC, localizzati su testa e collo), 2 di SCC delle cavità nasali e un papilloma orale, disponibili presso gli archivi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana e del CEROVEC e 12 lesioni ulcerative (ULs) orali non neoplastiche (conservate presso la U.O.1 EMS).

I risultati hanno dimostrato la presenza dell'amplicone specifico relativo al DNA di FcaPV-2 in 10/32 FOSCC (31%), nei 2 campioni di SCC nasali e nel papilloma.

Le metodiche molecolari sono state affiancate da ibridazione in situ (ISH) (*Vascellari et al, 2019*). Dei 10 campioni di FOSCC positivi per il DNA virale, n°9 erano disponibili per questa tecnica. Questi sono stati processati per ISH utilizzando una sonda specifica per il DNA gnomico di FcaPV-2 già disponibile in letteratura. I risultati hanno mostrato una reazione positiva in 4/9 (44%) campioni, confermando la presenza di materiale genetico virale all'interno delle cellule neoplastiche.

Per verificare l'espressione dei geni virali, l'RNA proveniente dai campioni positivi in PCR, è stato sottoposto a metodologia di reverse transcription PCR (RT-PCR), impiegando primer specifici per i trascritti del gene della proteina capsidica L1, del gene regolatore E2 e degli oncogeni E6E7. I risultati hanno dimostrato attività trascrizionale del virus in 7 campioni su 10 FOSCC positivi per DNA.

Dal momento che FcaPV-2 è altamente prevalente anche nella popolazione di gatti sani, per poter ipotizzare un possibile ruolo causale del virus, i campioni positivi per il DNA virale sono stati analizzati mediante Real-time PCR quantitativa (qPCR) unitamente a campioni di ulcera mucosale non neoplastici, ma positivi per FcaPV-2, per la valutazione del viral load (*Mazzei et al, 2017*). I risultati dell'analisi di quantizzazione hanno dimostrato che il viral load era più alto nei campioni neoplastici rispetto a quelli non neoplastici, in particolare nei campioni che esprimevano gli oncogeni E6E7.

Allo scopo di valutare ulteriormente l'azione biologica di FcaPV-2 nei tumori, i campioni disponibili (11/13 totali) per immunoistochimica (IHC), sono stati sottoposti a tale metodica utilizzando un

anticorpo anti-p16, proteina del ciclo cellulare considerata marker di infezione da HR-HPVs nei SCC orali e cervicali dell'uomo. I risultati hanno mostrato che p16 era espressa in 6/9 campioni (67%). La richiesta di proroga della data di scadenza del progetto, è stata supportata anche da un problema di numerosità campionaria e di lento approvvigionamento dei reagenti necessari alla messa a punto dei protocolli diagnostici.

Discussione e Conclusioni

Le indagini immunoistochimiche, virologiche e biomolecolari condotte sui campioni esaminati nel periodo del progetto, hanno evidenziato sia la presenza di FcaPV-2 nelle lesioni da SCC di cute e mucose del gatto, sia il suo ruolo biologicamente attivo.

I protocolli di PCR messi a punto si sono rilevati sensibili e specifici.

Il ceppo virale evidenziato in 25 lesioni da SCC e 1 lesione da papilloma è stato sempre lo stesso, identificato come *Feline papillomavirus type 2 isolate Main Coon 2007*.

Nel periodo di svolgimento del progetto, in letteratura sono stati pubblicati alcuni lavori scientifici di rilievo sull'argomento, avvaloranti il ruolo attivo del FcaPV nei carcinomi cutanei del gatto (Vascellari et al, 2018). È stato inoltre pubblicato un lavoro sulla presenza dei tipi FcaPV 1-2-3-4 in Italia (Mazzei et al, 2017). Sulla base anche di questa evoluzione delle conoscenze, si è voluto approfondire il ruolo di FcaPV-2 nel SCC orale del gatto, pervenendo a risultati molto interessanti.

Per valutare la trascrizione degli oncogeni E6, E7 e la sintesi della proteina capsidica L1 di FcaPV-2, sono stati messi a punto gli specifici protocolli di RT-PCR per l'evidenziazione di FcaPV-2 biologicamente attivi in tumori SCC orali, in quanto tipo virale più frequentemente riscontrato nei SCC cutanei. È anche quello meglio caratterizzato dal punto di vista dell'attività biologica in vivo e in vitro, visto che i geni virali E6 ed E7 mostrano caratteristiche trasformanti simili a quelli dei PVs umani ad alto rischio (HR-HPVs).

In seguito ai risultati ottenuti si può asserire quanto segue:

- ✓ Una percentuale di FOSCC è associata ad infezione da FcaPV-2 (positività in 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 aumentata)
- ✓ Gatto come modello animale: FOSCC felini da FcaPV-2 comparabili a HNSCC umani da HR-HPV