

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE VETERINARIE

Ciclo XXXIII

Settore Concorsuale: 07/H2

Settore Scientifico Disciplinare: VET/03

INDICATORI PATOLOGICI DI RILEVANZA DIAGNOSTICA
NEL CARCINOMA SQUAMOCELLULARE
ORALE FELINO

Presentata da: Dott. Andrea Renzi

Coordinatore Dottorato

Prof. Arcangelo Gentile

Supervisore

Prof. Giuliano Bettini

Co-Supervisore

Dott.ssa Silvia Sabattini

Esame finale anno 2021

Abstract

Il carcinoma squamocellulare è il tumore maligno orale più frequente nel gatto. A causa della localizzazione la diagnosi avviene spesso tardivamente, in una fase in cui tutte le opzioni terapeutiche sono poco efficaci e la prognosi è infausta. Il tema del progetto riguarda la ricerca di marker di rilevanza diagnostica nel carcinoma squamocellulare orale felino (FOSCC), al fine di sviluppare un test non invasivo per la diagnosi precoce di questa neoplasia.

Nella prima fase è stata condotta un'analisi retrospettiva delle disregolazioni del gene oncosoppressore *TP53* e della corrispondente proteina p53 in 26 campioni istologici fissati in formalina ed inclusi in paraffina (FFPE) di FOSCC e in una popolazione di controllo, formata da 20 lesioni infiammatorie croniche orali (10 granulomi eosinofili e 10 stomatiti linfoplasmocitarie) e 10 mucose orali normali campionate in sede autoptica. In particolare sono state analizzate: la presenza di mutazioni del dominio legante il DNA di *TP53* (esoni 5-8) tramite *Next Generation Sequencing* (NGS), l'espressione immunohistochimica di p53 nelle cellule epiteliali e la correlazione fra queste due alterazioni. Con un'indagine anamnestica è stata inoltre investigata l'associazione fra disregolazioni di p53 ed esposizione a fumo passivo di tabacco.

Sono state rilevate mutazioni di *TP53* nel 69% dei FOSCC, ed anche l'espressione immunohistochimica di p53 era presente nel 69% dei tumori, con una concordanza discreta (77%, coefficiente κ pari a 0.46) fra le due alterazioni. Nella popolazione di controllo non erano presenti disregolazioni di p53 ad eccezione di un granuloma eosinofilo ed una stomatite linfoplasmocitaria con il gene *TP53* mutato. Questi risultati suggeriscono per p53 un importante ruolo nella tumorigenesi del FOSCC, nonché una sua potenziale utilità come marker diagnostico.

Nella seconda fase, retrospettiva-prospettica, è stato analizzato tramite NGS il pattern di metilazione di 10 geni noti per essere epigeneticamente alterati nel carcinoma squamocellulare orale umano (*TERT*, *ZAP70*, *GP1BB*, *LRRTM1*, *FLII*, *MiR124-1*, *MiR296*, *KIF1A*, *PARP15*, *MAGEC2*), insieme allo stato mutazionale di *TP53*, in campioni istologici di FOSCC. I risultati sono stati confrontati con campioni istologici di mucosa orale normale e lesioni infiammatorie orali del gatto, al fine di identificare un pannello di geni utile per differenziare i carcinomi dalla mucosa orale non neoplastica. Per 10 di questi soggetti le stesse indagini molecolari sono state svolte parallelamente su campioni di cellule prelevate mediante brushing orale, in modo da sondare l'utilità di queste metodiche come test di screening.

Sono stati inclusi 31 casi di FOSCC, 25 lesioni infiammatorie croniche e 12 controlli sani. Le mutazioni a carico di *TP53* erano significativamente più frequenti nei FOSCC (68%) rispetto alla mucosa orale non neoplastica (3%; $P < .001$). I risultati sulla metilazione del DNA, relativi complessivamente a 126 siti CpG indagati, sono stati elaborati tramite un'analisi di regressione *Lasso*, che ha permesso di identificare 4 geni differenzialmente metilati fra carcinomi e mucosa non neoplastica, con elevata significatività statistica e differenze di ampia magnitudo. Sulla base di questi 4 geni (*FLII*, *MiR124-1*, *KIF1A* e *MAGEC2*) e dello stato mutazionale di *TP53* è stato impostato un algoritmo diagnostico *stepwise*, che applicato alla casistica, ha consentito di differenziare i tumori dai campioni non neoplastici con sensibilità del 94% e specificità del 100% (accuratezza 97%).

Applicando l'algoritmo ai 10 brushing, la sensibilità si è ridotta al 60%, mentre la specificità era ancora del 100% (accuratezza: 80%). Questi dati indicano che anomalie della metilazione del DNA di geni specifici sono presenti nel FOSCC, oltre ad un'elevata frequenza di mutazioni di *TP53*, e che tali alterazioni potrebbero essere coinvolte nella cancerogenesi orale felina. Ulteriori studi su un maggior numero di brushing sono necessari al fine di validare questa tecnica non invasiva per l'identificazione precoce del FOSCC.

A tale proposito, nella terza fase del progetto è stato analizzato il profilo di metilazione di un pannello di geni più ampio, che comprendeva i 10 geni valutati nel lavoro precedente e 7 geni aggiuntivi (*RBI*, *CELSR3*, *EGFR*, *PDPN*, *p16/CDKN2A*, *CDH1*, *MiR363*) le cui vie molecolari hanno mostrato disregolazioni importanti in precedenti studi sul FOSCC e/o sul corrispondente tumore dell'uomo. In contemporanea è stato analizzato lo stato mutazionale di *TP53*.

La presenza di queste alterazioni molecolari è stata indagata in modo prospettico a partire da campioni citologici di FOSCC prelevati mediante brushing orale, e comparata con i brushing ottenuti da un gruppo di controllo costituito da altre neoplasie orali, lesioni infiammatorie croniche e mucosa orale normale. Sono stati inclusi 35 casi di FOSCC; il gruppo di controllo era composto da 60 casi (20 parodontopatie, 15 gengivostomatiti croniche feline, 4 granulomi piogenici, 3 granulomi eosinofili, 3 sarcomi orali e 15 mucose orali normali). Nei FOSCC, le analisi genetiche sono state effettuate in parallelo sui corrispondenti campioni istologici FFPE, quando questi erano disponibili.

Complessivamente, 17 brushing di FOSCC (48%) presentavano mutazioni di *TP53*. Nei 19 casi in cui sono stati analizzati in parallelo i corrispondenti campioni FFPE, è stata riscontrata perfetta concordanza dello stato mutazionale (100%), ma negli 11 casi mutati la VAF (*Variant Allele Frequency*) della mutazione nel campione istologico era significativamente maggiore rispetto al brushing ($P = 0,05$). Nessun brushing del gruppo di controllo presentava mutazioni di *TP53* ($P < 0.001$).

Integrando i risultati di questo studio con quelli dello studio precedente, è stato implementato un algoritmo diagnostico basato su stato mutazionale di *TP53*, i 4 geni utilizzati per sviluppare l'algoritmo in precedenza (*FLII*, *MiR124-1*, *KIF1A* e *MAGEC2*), *ZAP70* e l'unico dei nuovi geni che è risultato essere differenzialmente metilato nei due gruppi (*MiR363*). Secondo questo algoritmo, la diagnosi di FOSCC poteva essere effettuata dai brushing se presente almeno uno dei due seguenti parametri: gene *TP53* mutato o positività per il *Methylation score*, un punteggio attribuito alle anomalie di metilazione dei 6 geni considerati (ipermetilazione di *ZAP70*, *FLII* e *MiR124-1* e ipometilazione di *KIF1A*, *MiR363* e *MAGEC2*). Diciassette brushing di FOSCC (48%) hanno mostrato un *methylation score* positivo, contro 2 brushing del gruppo di controllo (3%; entrambi con diagnosi di parodontite; $P < 0.001$).

Dei 19 casi di FOSCC in cui le analisi sono state svolte in parallelo sul corrispondente campione biotico, tutte e 19 le biopsie (100%) avevano un *methylation score* positivo, contro 11 brushing (58%).

Complessivamente, sono risultati positivi all'algoritmo 24/35 (69%) gatti con FOSCC, contro 2/60 (3%) controlli (sensibilità: 69%; specificità: 97%; accuratezza: 86%). La quota di FOSCC identificati era significativamente superiore nei gatti in cui il prelievo era stato effettuato in anestesia generale ($P = 0.014$).

I risultati di questo studio sono promettenti per il riconoscimento precoce del FOSCC tramite brushing orale. Il principale limite della metodica è rappresentato dalla sensibilità non eccellente, e sembra essere legato all'esecuzione del prelievo e alla diluizione delle cellule neoplastiche con cellule normali di sfaldamento, saliva e materiale necrotico. Lo stato mutazionale di *TP53* sembra essere un marker più affidabile rispetto al *methylation score*. Possibili fattori che possono migliorare la sensibilità sono il corretto contenimento dell'animale, l'esecuzione in anestesia generale e un doppio campionamento.

Sommario

Introduzione	1
Capitolo 1. Il carcinoma squamocellulare orale felino	5
1.1. Eziologia e fattori predisponenti	6
1.2. Segni clinici e presentazione	8
1.2.1 Lesioni mascellari e mandibolari	9
1.2.2 Lesioni linguali / sublinguali.....	9
1.2.3 Lesioni al palato.....	10
1.3 Diagnosi differenziali.....	10
1.4 Diagnosi e stadiazione	12
1.4.1 Diagnostica per immagini.....	13
1.4.2 Stadiazione tumorale	13
1.5 Trattamenti	16
1.5.1 Chirurgia.....	17
1.5.2 Radioterapia.....	18
1.5.3 Chemioterapia.....	19
1.5.4 Trattamenti combinati	20
1.5.5 Altri trattamenti	21
1.6 Caratteri citologici ed istologici.....	22
1.6.1 Esame citologico.....	22
1.6.2 Esame istologico	24
1.6.3 <i>Grading</i> istologico.....	28
1.7 Immunoistochimica	30
1.7.1 Marker di utilità diagnostica	30
1.7.2 Marker di utilità prognostica.....	30
Capitolo 2. p53	39
2.1. Ruolo di p53 nell'oncogenesi	37
2.1. Disregolazioni di p53 in oncologia veterinaria.....	50

2.3 Disregolazioni di p53 nel carcinoma squamocellulare felino	53
Capitolo 3. Metilazione del DNA	57
3.1 Cenni di epigenetica.....	57
3.2 Le basi molecolari della metilazione	58
3.3 Metilazione aberrante del DNA in oncologia.....	62
3.3.1 Ipometilazione del DNA nell'oncogenesi	63
3.3.2 Ipermetilazione del DNA nell'oncogenesi.....	64
3.3.3 Stato di metilazione nel carcinoma squamocellulare dell'uomo	66
3.4 Analisi della metilazione in oncologia veterinaria	70
 Contributo sperimentale	
Capitolo 4. Analisi delle disregolazioni di p53 nel carcinoma squamocellulare orale felino..	77
4.1 Introduzione	77
4.2 Materiali e metodi	78
4.2.1 Criteri d'inclusione e informazioni anamnestiche	78
4.2.2 Parametri istologici.....	79
4.2.3 Analisi immunoistochimica	80
4.2.4 Analisi mutazionale	81
4.2.5 Analisi statistica	82
4.3 Risultati	83
4.3.1 FOSCC.....	83
4.3.2 Lesioni infiammatorie croniche.....	84
4.3.3 Mucosa orale normale.....	85
4.3.4 Analisi statistica delle disregolazioni di p53.....	85
4.4 Discussione	95
Capitolo 5. Analisi preliminare di metilazione del DNA e stato mutazionale di TP53 nella	
diagnosi del carcinoma squamocellulare orale felino	101
5.1 Introduzione.....	101
5.2 Materiali e metodi.....	102
5.2.1 Criteri d'inclusione e informazioni sui pazienti	102

5.2.2	Analisi della metilazione del DNA	103
5.2.3	Analisi mutazionale di <i>TP53</i>	105
5.2.4	Analisi statistica	105
5.3	Risultati	110
5.3.1	FOSCC.....	110
5.3.2	Lesioni infiammatorie croniche.....	110
5.3.3	Mucosa orale normale.....	110
5.3.4	Analisi della metilazione e algoritmo diagnostico.....	113
5.3.5	Analisi dei <i>cytobrush</i>	115
5.4	Discussione	120
Capitolo 6. Validazione del brushing orale come tecnica non invasiva per l'identificazione del FOSCC tramite analisi genetiche ed epigenetiche.....		125
6.1	Introduzione	125
6.2	Materiali e metodi.....	126
6.2.1	Criteri d'inclusione e informazioni demografiche	126
6.2.2	Analisi genetiche ed epigenetiche	127
6.2.3	Analisi statistica	129
6.3	Risultati	134
6.3.1	FOSCC.....	134
6.3.2	Controlli.....	134
6.3.3	Stato mutazionale di <i>TP53</i>	135
6.3.4	Methylation score e algoritmo diagnostico	135
6.4	Discussione	144
Bibliografia		151

Introduzione

Il carcinoma squamocellulare (SCC, *squamous cell carcinoma*) è una neoplasia maligna composta da cellule epiteliali morfologicamente riconoscibili come cheratinociti, cioè caratterizzate da differenziazione squamosa. Può originare non soltanto nelle sedi in cui è normalmente presente un epitelio squamoso stratificato (es. epidermide, cavità nasali, mucosa orofaringea e anogenitale) ma anche da epiteli non squamosi (es. epitelio respiratorio). Inoltre alcuni epiteli, in risposta a vari stimoli nocivi, possono andare incontro a metaplasia squamosa, come avviene ad esempio nell'epitelio bronchiale dell'uomo a causa del fumo di sigaretta. Inizialmente la metaplasia squamosa avrebbe un ruolo protettivo verso gli agenti dannosi, ma se persiste nel tempo può favorire la displasia e il rischio di trasformazione neoplastica. Dai progressi scientifici degli ultimi anni in biologia molecolare, sta emergendo che le diverse entità clinico-anatomiche di SCC possiedono alcune caratteristiche in comune a livello genetico, epigenetico e di microambiente tumorale. Una maggiore comprensione di questi aspetti potrebbe aiutare nello sviluppo di nuove strategie di prevenzione, diagnosi e terapia, considerando che, ad oggi, il controllo delle forme biologicamente più aggressive è una sfida ancora irrisolta (Dotto e Rustigi, 2016). Nel gatto le due sedi di insorgenza più importanti del SCC sono cute e cavo orale. In questa specie il SCC rappresenta infatti il 10% di tutte le neoplasie cutanee e la maggioranza delle neoplasie del cavo orale (Vos e Van der Gaag, 1987; Stebbins *et al.*, 1989; Hauck e Oblak, 2019; Liptak *et al.*, 2019;).

L'importanza di queste due localizzazioni è altrettanto elevata nell'uomo: il SCC è il secondo tumore cutaneo maligno più frequente, ed anche il SCC orale è un'evenienza relativamente comune, che dal punto di vista clinico-patologico viene inquadrata nel contesto più ampio ed eterogeneo dei carcinomi squamocellulari della testa e del collo (HNSCC, *head and neck squamous cell carcinoma*) o del distretto cervico-facciale (Hammerman *et al.*, 2015; Thompson *et al.*, 2016; Leemans *et al.*, 2018). Le altre sedi di maggiore frequenza per il SCC umano sono esofago, polmone e cervice (Sánchez-Danés e Blanpain, 2018).

I meccanismi molecolari di carcinogenesi per queste neoplasie sono molteplici e non ancora del tutto chiariti. Alcuni di questi meccanismi sono specifici, in relazione all'epitelio di origine e alla sua esposizione a determinati stimoli esogeni, mentre altri sono comuni ed implicano fattori di cancerogenesi endogeni (Hussain *et al.*, 2001; Dotto e Rustigi, 2016).

Tipicamente il SCC felino è caratterizzato da elevata aggressività locale, con potenziale metastatico basso nella forma cutanea e relativamente più elevato nella forma orale, anche se tardivo. Le metastasi si localizzano ai linfonodi regionali o più raramente ai polmoni (Postorino-Reeves *et al.*, 1993; Theon *et al.*, 1995; Soltero-Rivera *et al.*, 2014).

I fattori di rischio riconosciuti per il SCC cutaneo del gatto sono l'esposizione prolungata alle radiazioni ultraviolette, il mantello bianco, la cute non pigmentata e la scarsità/assenza di pelo nelle sedi di insorgenza. Le localizzazioni più frequenti sono infatti *planum* nasale, pinne auricolari e palpebre. È stato inoltre ipotizzato un probabile ruolo oncogeno del Papillomavirus, in particolare per i SCC del *planum* nasale e per quelli che insorgono in sedi cutanee non esposte al sole. (Munday e Aberdeen 2012, Munday *et al.*, 2013; Hoggard *et al.*, 2018). L'età media dei gatti affetti da SCC cutaneo è di circa 11 anni (Miller *et al.*, 1991); l'insorgenza è in genere preceduta da lesioni displastiche dell'epidermide indotte dai raggi solari (cheratosi attinica/carcinoma *in situ*), che possono evolvere gradualmente nella forma invasiva (Ogilvie e Moore, 2001). Le forme iniziali di cheratosi attinica sono alterazioni eritematose, edematose, ipercheratinizzate, con evoluzione a placche crostose. Le lesioni maligne conclamate possono avere un aspetto variabile, da ulcerativo-crateriforme a proliferativo (Goldschmidt e Goldschmidt 2017; Hauck e Oblak, 2019).

Per il SCC cutaneo del gatto sono state proposte varie modalità di trattamento, tra cui chirurgia, terapia fotodinamica e radioterapia, la cui efficacia è fortemente influenzata dallo stadio clinico e dall'estensione locale della malattia (Lana *et al.*, 1997; Gasymova *et al.*, 2017; Flickinger *et al.*, 2018). Ulteriori limitazioni consistono nella volontà del proprietario di accettare gli effetti e i cambiamenti estetici conseguenti a una chirurgia radicale e nella disponibilità di attrezzature dedicate (Ogilvie e Moore, 2001).

I fattori di rischio ipotizzati per il SCC orale del gatto comprendono l'alimentazione con cibo commerciale umido, l'applicazione di collari antipulci e l'esposizione a fumo passivo (Bertone

et al., 2003; Snyder *et al.*, 2004). Il SCC orale colpisce in genere gatti adulto-anziani e può svilupparsi in qualunque zona della cavità orale. Le lesioni variano da ulcerativo-necrotiche a proliferative, con grave distruzione dei tessuti circostanti in fase avanzata. Frequentemente si verifica invasione ossea, che può causare grave dolore al paziente (Martin *et al.*, 2011; Bilgic *et al.*, 2015). A causa della localizzazione e della rapida progressione neoplastica, la diagnosi avviene spesso tardivamente, in una fase in cui le opzioni terapeutiche sono poco efficaci e provocano notevoli effetti indesiderati. Finora sono stati ottenuti risultati accettabili solo nei pazienti in cui la chirurgia radicale consentiva un'asportazione completa del tumore o la malattia microscopica residua veniva seguita da radioterapia adiuvante. Nella maggior parte dei casi la prognosi è infausta e l'inarrestabile invasione locale del tumore rende necessaria l'eutanasia dell'animale (Bilgic *et al.*, 2015).

Capitolo 1

Il carcinoma squamocellulare orale felino

I tumori del cavo orale rappresentano approssimativamente il 2,5-10% di tutte le neoplasie del gatto e il 78-89% di questi tumori è maligno. Il carcinoma squamocellulare (SCC, *squamous cell carcinoma*) è il tumore maligno orale più frequente nella specie felina, con percentuali variabili a seconda degli studi dal 59 al 72,5% di tutte le forme maligne; altre neoplasie meno comuni in questa sede sono fibrosarcoma, linfoma e carcinoma salivare (Vos e Van der Gaag, 1987; Stebbins *et al.*, 1989; Vascellari *et al.*, 2009; Manuali *et al.*, 2020). Nel cane invece il SCC orale è secondo per frequenza dopo il melanoma (Todoroff e Brodey, 1979; Liptak, 2019).

Il carcinoma squamocellulare orale felino (FOSCC, *feline oral squamous cell carcinoma*) è caratterizzato da crescita rapida e invasione dei tessuti circostanti, compreso il tessuto osseo. L'attività osteolitica sembra essere favorita dall'espressione, da parte delle cellule neoplastiche, di un peptide correlato al paratormone (PTHrP, *parathyroid hormone-related protein*) (Martin *et al.*, 2011).

Le sedi di insorgenza più frequenti sono la zona sublinguale (in particolare a livello di frenulo e faccia ventrale della lingua), la gengiva mascellare e mandibolare. Le altre sedi comprendono superficie dorsolaterale della lingua, mucosa buccale e labiale, palato, orofaringe e tonsille (Hayes *et al.*, 2007; Bilgic *et al.*, 2015; Liptak, 2019). L'età media dei gatti colpiti è di 13-14 anni, con un intervallo che spazia da uno a 22 anni (Stebbins 1989, Martin *et al.*, 2011; Murphy *et al.*, 2020a). Non esistono particolari predisposizioni di razza, sesso, lunghezza o colore del mantello (Bertone *et al.*, 2003). Nonostante il FOSCC sia stato storicamente ritenuto a basso potenziale metastatico, studi più recenti hanno evidenziato metastasi ai linfonodi mandibolari nel 31-35,7% dei casi e un possibile coinvolgimento polmonare nel 6,2-10% dei casi (Gendler *et al.*, 2010; Soltero-Rivera *et al.*, 2014). Si pensa quindi che il tasso metastatico reale sia stato sotto-stimato, poiché le metastasi diventerebbero clinicamente rilevanti più lentamente rispetto alla progressione della neoplasia primaria. Nella maggior parte dei casi non trattati, le complicanze

legate alla malattia locale portano al decesso o all'eutanasia 4-8 settimane dopo la diagnosi. Anche con svariati approcci terapeutici la prognosi è in genere infausta, con tempi di sopravvivenza che difficilmente superano 3-6 mesi (Bilgic *et al.*, 2015; Marconato *et al.*, 2019).

1.1 Eziologia e fattori predisponenti

L'eziologia del FOSSC è ancora poco chiara e probabilmente multifattoriale. È stato ipotizzato un ruolo predisponente per la normale attività di *grooming*, che potenzialmente favorisce l'esposizione della mucosa orale felina a cancerogeni ambientali presenti sul mantello.

Con questo presupposto, uno studio epidemiologico caso-controllo ha valutato la presenza di fattori di rischio ambientali per il FOSSC, confrontando 36 gatti affetti dalla neoplasia con 112 gatti affetti da insufficienza renale. Secondo gli autori, l'esposizione dei gatti a fumo passivo di tabacco in ambiente domestico comporterebbe un rischio di FOSSC 2 volte maggiore (Bertone *et al.*, 2003). Uno studio successivo ha riportato una possibile associazione fra esposizione a fumo di tabacco e sovraespressione della proteina p53 nei FOSSC, rispetto ai tumori di animali non esposti (Snyder *et al.*, 2004). I risultati di questi due studi tuttavia non hanno raggiunto la significatività statistica.

La proteina p53, prodotta dal gene oncosoppressore *TP53*, ha un ruolo cruciale nella regolazione della crescita e proliferazione cellulare, prevenendo divisioni cellulari incontrollate dopo un danno al DNA. Mutazioni di *TP53* sono comuni nelle neoplasie e possono provocare un accumulo di p53 alterata nelle cellule. Alcune mutazioni di *TP53* possono essere specificamente indotte dai carcinogeni presenti nel tabacco, come avviene nell'uomo in corso di carcinoma polmonare e carcinoma squamocellulare di testa e collo (HNSCC, *head and neck squamous cell carcinoma*) (Pfeifer *et al.*, 2002). Rimane quindi possibile che alterazioni di p53 indotte dal fumo passivo possano essere coinvolte anche nella patogenesi del FOSSC.

Sempre nello studio di Bertone *et al.* è stata riscontrata un'associazione significativa fra l'uso di collari antiparassitari e rischio di FOSSC (5,3 volte superiore), mentre l'utilizzo di shampoo antipulci comportava una riduzione del rischio, suggerendo che l'applicazione di lavaggi potrebbe ridurre la quantità di contaminanti chimici sul mantello. Inoltre, valutando il tipo di alimentazione, è emerso che la dieta a base di *petfood* umido comportava un rischio 3,6 volte

maggiore rispetto a alla dieta con prevalenza di *petfood* secco. In particolare il consumo di tonno in scatola era associato a un rischio di FOSCC 4,7 volte maggiore. L'aumento del rischio in questo caso potrebbe essere imputabile a differenze nella composizione del *petfood* umido rispetto al secco o ad una maggiore incidenza di parodontopatie nei soggetti che lo consumano (Bertone *et al.*, 2003). Nell'uomo infatti la scarsa igiene orale e le malattie parodontali aumentano il rischio di HNSCC (Gillison 2007).

Il Papillomavirus umano (HPV, *Human Papillomavirus*) ha un ruolo conclamato nella patogenesi di un sottogruppo di HNSCC, localizzati soprattutto a livello di orofaringe (Sabatini e Chiocca, 2020). Per il gatto inoltre è riconosciuto un ruolo probabile del Papillomavirus felino FcaPV2 nell'insorgenza del 28-35% dei SCC cutanei, prevalentemente quelli non esposti ai raggi ultravioletti e quelli del *planum* nasale (Munday e Aberdein 2012, Munday *et al.*, 2013; Thomson *et al.*, 2016, Hoggard *et al.*, 2018). Un evento chiave della trasformazione neoplastica HPV-indotta è la sintesi delle proteine virali E6 ed E7, che interferendo rispettivamente con la funzione di p53 e della proteina retinoblastoma pRb, mantengono la cellula ospite nella fase S del ciclo, permettendo al virus di replicare il proprio genoma insieme a quello cellulare (Thomson *et al.*, 2016). L'inattivazione di pRb determina a sua volta un incremento della proteina p16 nelle cellule infette, che può essere rilevata con immunistoichimica e rappresenta un marker surrogato per la presenza del virus oncogeno (Munday *et al.*, 2011a; Lewis 2012). Diversi studi hanno indagato la presenza di Papillomavirus umano o felino in campioni di FOSCC, ma il DNA virale è stato rilevato solo nello 0-8% dei casi (Munday *et al.*, 2009; Munday *et al.*, 2011b; O'Neill *et al.*, 2011, Munday *et al.*, 2019; Chu *et al.*, 2020). Due di questi studi hanno anche valutato la sovraespressione immunistoichimica di p16, presente nel 6,7–19% dei casi, ma in nessun campione neoplastico con sovraespressione di p16 è stato amplificato il DNA virale tramite PCR (Munday *et al.*, 2011b; Munday *et al.*, 2019a). Tuttavia, una recente pubblicazione ha evidenziato prove più consistenti: è stato rilevato DNA di FcaPV2 in 10 FOSCC su 32 (31%), e in 7 di questi casi era presente anche RNA virale, relativo ai geni L1, E2 ed E6/E7 (Altamura *et al.*, 2020a). Questi reperti supportano un possibile ruolo di FcaPV2 nello sviluppo di una certa quota di FOSCC, ma saranno necessari ulteriori studi per confermarlo, e delucidare i meccanismi molecolari che favorirebbero la trasformazione e la progressione neoplastica. Da studi *in*

vitro sembra che alcuni aspetti molecolari dell'infezione da FcaPV2 siano simili alla controparte umana, come la degradazione di p53 mediata da E6, mentre altri non corrispondono (Altamura *et al.*, 2018; Altamura *et al.*, 2020b). Anche se verrà confermato, il ruolo del Papillomavirus nel FOSSC sembra comunque essere marginale (Chu *et al.*, 2020).

1.2 Segni clinici e presentazione

I gatti con SCC orale possono manifestare iporessia o anoressia, perdita di peso, letargia, scarsa cura del mantello, ptialismo, emorragia buccale, alitosi, disfagia, dolore all'apertura della bocca, deformità facciali e fratture patologiche (Bilgic *et al.*, 2015, Murphy *et al.*, 2020a).

Spesso il gatto viene portato in visita per un calo di appetito, imputabile non solo direttamente alla neoplasia ma anche a mobilità dentale nella zona coinvolta. La mobilità di uno o più denti deve rappresentare un campanello d'allarme per il clinico, soprattutto se non si notano altri segni di parodontopatia nel resto della cavità orale. In questi casi l'estrazione dei denti mobili può migliorare temporaneamente l'appetito, ma il sito di estrazione può evolvere in una lesione ulcerata che non tende a cicatrizzare (Liptak, 2019; Bilgic *et al.*, 2015).

L'aspetto delle lesioni è variabile a seconda dell'estensione, della sede, della presenza di ulcerazione, necrosi e infezioni secondarie.

Talvolta le lesioni iniziali possono crescere a livello submucosale o intraosseo, in assenza di una tumefazione e difficilmente palpabili; in altri casi è presente una piccola neoformazione rilevata rotondeggiante o una zona ulcerata, che può essere confusa con una gengivostomatite proliferativa o ulcerativa. In realtà la neoplasia tende ad essere più estesa ed infiltrante rispetto all'apparenza clinica e spesso viene identificata solo tardivamente (Bilgic *et al.* 2015, Murphy *et al.*, 2020a).

Le forme più avanzate sono di forma irregolare, nodulari o multinodulari, di colore grigio-rosastro e consistenza friabile, con superficie ulcerata facilmente sanguinante. La consistenza può essere compatta o dura in caso di desmoplasia e/o reazione osteoproduttiva del periostio infiltrato (Murphy *et al.*, 2020a).

Le sindromi paraneoplastiche in corso di FOSSC, così come nelle altre neoplasie orali del cane e del gatto, sono rare (Liptak, 2019). In letteratura è riportato un caso di FOSSC con metastasi associato a ipercalcemia (Klausner *et al.*, 1990).

1.2.1 Lesioni mascellari e mandibolari

Le neoplasie della gengiva mascellare invadono spesso il tessuto osseo adiacente, causando grave osteolisi e distruzione del processo palatino del mascellare, dell'incisivo e dell'arcata zigomatica, con la comparsa lesioni crateriformi. Le lesioni mascellari caudali mostrano in genere un pattern ulcerativo, ma può coesistere una componente di proliferazione reattiva (sia ossea che dei tessuti molli) attorno alla zona ulcerata. Si verifica di frequente un deficit di retrazione del bulbo oculare, anche se la neoplasia orale sembra di piccole dimensioni. Le lesioni mascellari rostrali, meno frequenti delle caudali, insorgono in prossimità dei denti canini e/o incisivi e causano instabilità o caduta dentale, in assenza di segni evidenti di parodontopatia (Bilgic *et al.*, 2015).

Il carcinoma squamocellulare della regione mandibolare può avere un aspetto simile alla forma mascellare, con ulcere e mobilità dentale, oppure presentarsi come una tumefazione non ulcerata, con evidenza di proliferazione periostale ed osteolisi (Bilgic *et al.*, 2015; **Figure 1.1** e **1.2**). Viene inoltre segnalata la rara possibilità del SCC mandibolare intraosseo, simile a quello riportato in medicina umana (Bilgic *et al.*, 2015). Si tratta di una neoplasia di origine incerta, che secondo l'ipotesi più accreditata si svilupperebbe da residui di epitelio odontogenico (Tiwari, 2011).

1.2.2 Lesioni linguali / sublinguali

La localizzazione linguale o sublinguale è una tipica presentazione del FOSSC, che macroscopicamente può simulare una reazione da corpo estraneo. Spesso il carcinoma origina dal frenulo o dalla mucosa sublinguale, per poi invadere rapidamente la muscolatura della lingua, con associata desmoplasia reattiva che determina indurimento e ispessimento diffuso dell'organo. La conseguente riduzione della motilità linguale contribuisce al calo dell'appetito. L'ulcerazione è frequente, e talvolta a causa di fenomeni di trombosi e necrosi ischemica può verificarsi il

distacco della parte distale della lingua. Con l'aumentare delle dimensioni della massa, la lingua può sporgere dalla bocca e subire traumatismi per azione dei denti, con sanguinamento, disfagia e incapacità di chiudere la bocca (Bilgic *et al.*, 2015; **Figura 1.3**).

1.2.3 Lesioni al palato

Le forme di SCC localizzate alla mucosa del palato si manifestano come placche ulcerate, che tendono ad invadere e distruggere le ossa sovrastanti (mascellari, palatine e incisivi), e successivamente le vie nasali e turbinati, con conseguenti disturbi respiratori (Murphy *et al.*, 2020a).

1.3 Diagnosi differenziali

Le diagnosi differenziali per il FOSSC comprendono malattie parodontali, soprattutto in relazione alla perdita o mobilità dei denti, altri tumori orali maligni, tumori benigni, lesioni proliferative simil-neoplastiche e patologie infettive del cavo orale. Ulteriori neoplasie maligne che possono insorgere in cavità orale sono fibrosarcoma, linfoma, tumore della guaina dei nervi periferici, osteosarcoma, condrosarcoma, adenocarcinoma salivare, tumore a cellule granulari, emangiosarcoma, mastocitoma, plasmocitoma e carcinoma tiroideo ectopico (Reed *et al.*, 2011, Bilgic *et al.*, 2015).

Le lesioni benigne che possono essere confuse con il FOSSC includono iperplasia gengivale, espansione dell'osso alveolare, granuloma eosinofilo, polipi nasofaringei, e tumori odontogenici, fra cui ameloblastoma convenzionale, ameloblastoma con produzione di amiloide e tumore odontogenico induttivo felino. Pur essendo considerati benigni, alcuni tumori odontogenici possono invadere localmente i tessuti (Bilgic *et al.*, 2015; Murphy *et al.*, 2020b).

Le forme infettive che possono simulare clinicamente un FOSSC comprendono sia processi di natura batterica, come ascessi, granulomi e osteomieliti, che micotica (es. criptococcosi e blastomicosi) (Bilgic *et al.*, 2015).



Figura 1.1 FOSSC a livello di regione mandibolare destra.

Figura 1.2 FOSSC a livello di emimascella destra. La lesione si presenta nodulare ed esofitica con multifocali ulcerazioni.

Figura 1.3 FOSSC occupante la base della lingua e il frenulo.

1.4 Diagnosi e stadiazione

Il FOSCC è un tumore molto aggressivo, per il quale diagnosi precoce e trattamento tempestivo sono fondamentali per cercare di migliorare la prognosi.

La conferma microscopica della diagnosi di SCC può avvenire mediante esame citologico o istologico. Il campionamento citologico di una lesione orale, anche se rapido e poco invasivo, può risultare problematico in un animale sveglio e poco collaborativo. In condizioni di anestesia è consigliabile effettuare anche una biopsia istologica incisionale o tramite punch. In questo modo, se la citologia è sufficiente per confermare la diagnosi verranno impostate rapidamente le decisioni cliniche più opportune; in caso contrario si attenderà il risultato dell'esame istologico, che richiede tempi di processazione più lunghi ma è la tecnica raccomandata per la diagnosi definitiva, poiché oltre alla morfologia cellulare consente di valutare l'architettura dei tessuti (Morrison e DeNicola, 1993 Bilgic *et al.*, 2015).

Uno studio ha valutato la capacità diagnostica della citologia rispetto all'istopatologia per le neoformazioni orali del cane (85 casi) e del gatto (29 casi). La concordanza dell'esame citologico, effettuato con agoaspirazione, agofissione o impronta dal campione chirurgico, era rispettivamente dell'83%, 87% e 75% nel cane, mentre nel gatto 92%, 92% e 86%. Tuttavia, per non sovrastimare questi risultati bisogna considerare che i campioni non diagnostici (per ipocellularità, emodiluizione o necrosi) sono stati esclusi dall'analisi statistica. Questi campioni corrispondevano al 25%, 24% e 13% del totale, rispettivamente ai tre tipi di prelievo (Bonfanti *et al.*, 2015).

Sia per l'esame citologico che istologico è preferibile effettuare prelievi multipli, anche in funzione delle dimensioni della lesione, cercando di evitare aree di necrosi, infiammazione secondaria e tessuto di granulazione che potrebbero falsare la diagnosi (Ehrhart, 1998; Bettini, 2002). La biopsia incisionale va essere eseguita senza disperdere cellule neoplastiche nei tessuti limitrofi, per non compromettere l'esito di una successiva chirurgia curativa o radioterapia (Liptak, 2019).

1.4.1 Diagnostica per immagini

La diagnostica per immagini è importante per definire la localizzazione del tumore, la sua estensione e per pianificare l'eventuale intervento chirurgico. L'esame radiografico è utile per valutare la presenza di osteolisi, reazione periostale e riassorbimento odontoclastico. Tuttavia, poiché l'osteolisi è apprezzabile radiograficamente solo quando il contenuto minerale si è ridotto del 30-50%, l'invasione ossea della neoplasia potrebbe essere sottostimata (Langland *et al.*, 2002; Bilgic *et al.*, 2015). Sia la tomografia computerizzata TC che la risonanza magnetica consentono una migliore caratterizzazione della malattia locale, con la TC preferibile per riconoscere le alterazioni ossee (Liptak, 2019). La visualizzazione dei tessuti molli con TC, compresi i linfonodi, può comunque essere implementata con l'utilizzo di un mezzo di contrasto. I reperti TC indicativi di metastasi linfonodali sono l'aumento di volume e l'abnorme captazione del mezzo di contrasto (Bilgic *et al.*, 2015). In uno studio su 18 casi di FOSCC, le dimensioni tumorali rilevate mediante immagini TC non erano significativamente diverse da quelle misurate durante l'ispezione orale del paziente anestetizzato (Gendler *et al.* 2010).

Altra metodica di imaging, che sembra essere più precisa della TC nel definire l'infiltrazione dei tessuti molli e la presenza di metastasi regionali, ma difficilmente reperibile, è la tomografia con emissione di positroni combinata alla TC (PET-TC) (Yoshikawa *et al.*, 2013; Randall *et al.*, 2016).

1.4.2 Stadiazione tumorale

I linfonodi regionali devono essere palpati durante l'esame clinico per apprezzare un eventuale aumento di volume o asimmetrie, anche se ciò non è sufficiente per confermare o escludere una metastasi, che potrebbe essere presente in un linfonodo clinicamente normale, oppure assente in un linfonodo reattivo (Williams e Packer, 2003). Inoltre, in uno studio su 31 cani e gatti con neoplasie orali e maxillo-facciali, solo il 54,5% delle metastasi interessava i linfonodi mandibolari; negli altri casi le metastasi erano localizzate ai linfonodi parotidei o retrofaringei, in genere non apprezzabili clinicamente (Herring *et al.*, 2002). Idealmente, in presenza di una neoplasia orale maligna tutti i linfonodi regionali andrebbero indagati con agoaspirazione, indipendentemente dall'aspetto clinico (Herring *et al.*, 2002; Williams e Packer, 2003).

Diversi studi in medicina veterinaria hanno valutato l'attendibilità della citologia agoaspirativa nella ricerca di neoplasie linfonodali, riportando una sensibilità complessiva del 66-100% e una specificità del 91-96% rispetto all'istopatologia. In questi studi i casi citologici non diagnostici, che variavano dal 5,7 al 25%, sono stati esclusi dalle analisi statistiche. (Langenbach *et al.*, 2001; Ku *et al.*, 2017; Fournier *et al.*, 2018). La maggior parte dei campioni inadeguati deriva dal prelievo di linfonodi non aumentati di volume e/o in siti anatomici profondi. (Fournier *et al.*, 2018). La tecnica più attendibile per la ricerca di metastasi regionali rimane quindi l'esame istopatologico dell'intero linfonodo. La scelta del linfonodo o dei linfonodi da esaminare può essere critica, poiché alcuni linfonodi metastatici possono apparire normali anche alla TC, e non sempre il linfonodo anatomicamente più vicino al tumore corrisponde al linfonodo sentinella, cioè il primo a ricevere il drenaggio linfatico. Pertanto, analogamente a quanto avviene in campo umano, anche in oncologia veterinaria sono state messe a punto varie tecniche per l'identificazione del linfonodo sentinella (Randall *et al.*, 2020).

La ricerca di metastasi polmonari, anche se poco comuni, può essere effettuata con esame radiografico del torace a tre proiezioni o TC. Va comunque ricordato che, in corso di FOSCC, la maggior parte dei gatti soccombe a causa della malattia primaria, indipendentemente dallo sviluppo o meno di metastasi (Bilgic *et al.*, 2015).

Nell'uomo la stadiazione del SCC avviene secondo la classificazione *Tumor, Node, Metastasis* (TNM). Nel 1980 l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha proposto un adattamento della classificazione TNM dell'uomo per le neoplasie orali del cane e del gatto, che attualmente viene largamente impiegato in medicina veterinaria. Tuttavia questo adattamento ha dimostrato alcune criticità, *in primis* il fatto che nello stadio III ricadono neoplasie del cane molto variabili in termini di osteolisi e coinvolgimento linfonodale, mascherandone così differenze prognostiche. Inoltre, le dimensioni del tumore non vengono rapportate alla taglia del cane, e la classificazione dei linfonodi su base esclusivamente su una valutazione clinica.

Sulla base di queste considerazioni, alcuni autori hanno proposto un nuovo sistema classificativo per le neoplasie orali dei piccoli animali, che tiene conto anche degli aggiornamenti avvenuti in campo umano nel corso degli anni, con l'obiettivo di fornire indicazioni prognostiche più accurate (Munday *et al.*, 2017; **Tabella 1.1**).

In questo schema di stadiazione, come della versione più aggiornata per il SCC umano, tutte le neoplasie orali con invasione ossea vengono considerate di stadio IV, e vengono poi suddivise in 3 sottogruppi A, B e C in base all'entità dell'invasione e alla presenza di metastasi.

Altre differenze importanti rispetto al sistema del 1980 sono l'assenza delle dimensioni tumorali fra i criteri per stadio IV, e la valutazione linfonodale basata esclusivamente sulla ricerca istologica o citologica di metastasi (Munday *et al.*, 2017).

Tabella 1.1 Sistema TNM e stadiazione delle neoplasie orali negli animali domestici (Munday *et al.*, 2017).

Classificazione corrente per gli animali domestici (OMS)*	Classificazione proposta, sulla base di quella del SCC orale dell'uomo
T: grandezza ed estensione del tumore solido	
Tis: carcinoma in situ	Tis: carcinoma in situ
T1: <2 cm di diametro T1a senza interessamento osseo T1b con interessamento osseo	T1: <2 cm di diametro
T2: 2-4 cm di diametro T2a senza interessamento osseo T2b con interessamento osseo	T2: 2-4 cm di diametro
T3: >4 cm di diametro T3a senza interessamento osseo T3b con interessamento osseo	T3: >4 cm di diametro
	T4: qualsiasi dimensione con interessamento osseo T4a (labbro) infiltrazione dell'osso corticale, del pavimento della bocca, della cute T4a (orale) infiltrazione dell'osso corticale, del muscolo profondo della lingua, del seno mascellare, della cute della faccia T4b (labbro e orale) infiltrazione dello spazio masticatorio, del piatto pterigoideo, del cranio o accerchiamento dell'arteria carotide interna

N: interessamento dei linfonodi regionali							
N0: nessuna evidenza d'interessamento		N0: nessuna evidenza d'interessamento					
N1: linfonodo ipsilaterale mobile		N1: presenza di metastasi al solo linfonodo ipsilaterale					
N1a: non ipotizzata presenza di metastasi							
N1b: ipotizzata presenza di metastasi							
N2: linfonodo controlaterale o bilaterali mobili		N2: presenza di metastasi a più linfonodi ipsilaterali					
N2a: non ipotizzata presenza di metastasi							
N2b: ipotizzata presenza di metastasi							
N3: linfonodi fissi		N3: presenza di metastasi linfonodale bilaterale					
M: metastasi a distanza							
M0: nessuna metastasi a distanza		M0: nessuna metastasi a distanza					
M1: presenza di metastasi a distanza		M1: presenza di metastasi a distanza					
Stadio							
I	T1	N0, N1a, N2a	M0	I	T1	N0	M0
II	T2	N0, N1a, N2a	M0	II	T2	N0	M0
III	T3	N0, N1a, N2a	M0	III	T1, T2	N1	M0
	qualsiasi T	N1b	M0		T3	N0, N1	M0
IV	qualsiasi T	N2b, N3	M0	IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	qualsiasi T	qualsiasi N	M1		T4a	N0, N1, N2	M0
				IVB	qualsiasi T	N3	M0
				T4b	qualsiasi N	M0	
				IVC	qualsiasi T	qualsiasi N	M1

^a Le neoplasie labiali negli animali domestici sono classificate come T1: diametro <2 cm con crescita esofitica, T2: diametro <2 cm con minima crescita infiltrante, T3: diametro >2cm o infiltrazione profonda, T4: presente invasione ossea.

1.5 Trattamenti

Le opzioni terapeutiche per il FOSCC comprendo chirurgia, radioterapia, chemioterapia, terapie adiuvanti e protocolli multimodali. La malattia locale è il principale ostacolo al prolungamento della sopravvivenza, e attualmente purtroppo può essere controllata in modo efficace solo nella minoranza di casi in cui la neoplasia è totalmente asportabile. A prescindere dal tipo

di trattamento scelto, è importante informare il proprietario che l'ospedalizzazione può essere lunga e costosa, con la necessità un sondino nasogastrico o una gastrostomia durante il ricovero e fin quando il paziente non sia di nuovo in grado di alimentarsi spontaneamente (Marconato *et al.*, 2012).

1.5.1 Chirurgia

Nella maggior parte dei casi il FOSSC non può essere asportato chirurgicamente, a causa della spiccata invasività e della diagnosi in fase avanzata. Tuttavia per carcinomi di dimensioni ridotte e localizzati rostralmente, in particolare a livello mandibolare, la chirurgia può essere praticabile (Bilgic *et al.*, 2015). Uno studio retrospettivo su 21 FOSSC trattati con mandibulectomia (e con terapie aggiuntive in 8 casi) ha evidenziato un tempo di sopravvivenza mediano di 217 giorni, con tasso di sopravvivenza dopo 1 anno e 3 anni rispettivamente del 43 e 28%. In 8 casi (38%) si è verificata una recidiva locale durante il follow-up (Northrup *et al.*, 2006). Un altro studio su 7 gatti con SCC mandibolare trattato con mandibulectomia e radioterapia ha riportato un tempo di sopravvivenza mediano di 14 mesi, con sopravvivenza a un anno del 57% e comparsa di recidiva in 6 casi su 7 (Hutson *et al.*, 1992). Gli elevati tassi di recidiva sono attribuibili sia a difficoltà nel valutare correttamente l'estensione del tumore che alle ridotte dimensioni cranio-facciali del gatto, per le quali è difficile garantire margini chirurgici adeguati (maggiore di 1 cm) (Bilgic *et al.*, 2015). Altri studi sulla mandibulectomia hanno riportato una sopravvivenza inferiore a 6 mesi. (Bradley *et al.*, 1984; Penwick e Nunamaker 1987). L'esito di una chirurgia demolitiva è variabile, e strettamente influenzato dalle cure di supporto postoperatorio. La qualità di vita può ritornare buona in alcuni casi, mentre in altri possono permanere effetti collaterali quali ptialismo, protrusione della lingua, difficoltà nella prensione e nel *grooming* (Bradley *et al.* 1984; Penwick e Nunamaker 1987; Northrup *et al.* 2006). In uno studio il 12% dei gatti sottoposti a mandibulectomia non ha mai ripreso ad alimentarsi autonomamente (Northrup *et al.*, 2006). In un recente lavoro su 8 gatti sottoposti a mandibulectomia radicale, è stato stimato al termine del *follow-up* un tempo di sopravvivenza mediano di 712 giorni. Tutti i pazienti sono stati alimentati con sondino esofageo o gastrico fino alla ripresa

dell'alimentazione autonoma, avvenuta in 6 gatti su 8 dopo un periodo post-operatorio variabile da un giorno a 12 settimane (Boston *et al.*, 2020).

1.5.2 Radioterapia

Il FOSCC è un tumore radioresponsivo, in quanto le cellule neoplastiche hanno un elevato tasso di proliferazione e rispondono rapidamente alle radiazioni. Tuttavia dopo l'irradiazione si verifica altrettanto rapidamente un ripopolamento da parte di subcloni cellulari radioresistenti (Bilgic *et al.*, 2015). Per questo motivo la radioterapia come trattamento unimodale è risultata poco efficace nel controllo del FOSCC (Liptak, 2019).

I protocolli curativi convenzionali prevedono in genere la somministrazione di una quantità totale cospicua di radiazioni, ripartita in numerose piccole dosi giornaliere, ad esempio 5 giorni a settimana per varie settimane. Questo tipo di frazionamento si è rivelato inadatto a contrastare i subcloni neoplastici radioresistenti, pertanto sono stati proposti dei protocolli accelerati, nei quali la dose complessiva di radiazioni viene somministrata in un tempo minore, con l'applicazione di due dosi giornaliere o una dose tutti i giorni della settimana (Bilgic *et al.*, 2015).

In uno studio su 9 FOSCC trattati con protocollo radioterapico accelerato (14 frazioni da 3.5 Gy somministrate BID nell'arco di 9 giorni), il tempo di sopravvivenza mediano è stato di 86 giorni. Per i gatti con risposta completa (3 su 9) il tempo di sopravvivenza mediano è stato di 289 giorni, anche se questa differenza non era statisticamente significativa. Inoltre il trattamento è stato ben tollerato, con tossicità limitata sia in fase acuta che tardiva (Fidel *et al.*, 2007).

In alternativa ai protocolli con intento curativo, sono stati impiegati quelli di tipo palliativo, detti ipofrazionati e caratterizzati dalla somministrazione di una quantità totale inferiore di radiazioni, ripartita in dosi maggiori per singola seduta (Bilgic *et al.*, 2015). In uno studio, un miglioramento della qualità di vita è stato ottenuto nel 65% dei pazienti che hanno completato il trattamento palliativo, mentre il tempo di sopravvivenza mediano (92 giorni) non differiva molto da quelli riportati per altri protocolli radioterapici (Sabhlok e Ayl 2014). Un altro studio ha valutato un protocollo ipofrazionato accelerato su 21 gatti, riportando una risposta parziale o completa in 17 casi (81%), sopravvivenza mediana di 176 giorni e buona tollerabilità. L'unico fattore prognostico predittivo era lo stadio del tumore: per i carcinomi minori di 2 cm (T1), il

periodo mediano libero da malattia era di 590 giorni. Quattro gatti hanno sviluppato metastasi a distanza in assenza di progressione locale della neoplasia (Poirier *et al.*, 2012).

Con radioterapia stereotassica palliativa in 20 casi di FOSSC, è stata ottenuta risposta completa nel 39% dei soggetti e sopravvivenza mediana di 106 giorni. La morbilità post-trattamento era tuttavia elevata, con frattura mandibolare in sei casi su 11, fibrosi in 3 carcinomi linguali su 6 e una fistola oro-nasale su 3 carcinomi mascellari (Yoshikawa *et al.*, 2016).

1.5.3 Chemioterapia

La chemioterapia si è dimostrata scarsamente efficace nel controllo del FOSSC, sia come unico trattamento che come adiuvante alla chirurgia o alla radioterapia. Alcune delle molecole indagate sono doxorubicina, ciclofosfamide, un analogo liposomiale del cisplatino, carboplatino e mitoxantrone, ottenendo con tutte risposte insoddisfacenti (Ogilvie *et al.*, 1993; Mauldin *et al.*, 1998; Fox *et al.*, 2000; Martinez-Ruzafa *et al.*, 2009).

Risultati più incoraggianti sono emersi da uno studio retrospettivo sull'impiego dell'inibitore tirosinchinasico toceranib (Palladia) e dei FANS. La sopravvivenza mediana dei gatti con FOSSC trattati con toceranib era significativamente più lunga (123 giorni) rispetto a quelli non trattati (45 giorni). Anche i FANS erano associati ad un prolungamento della sopravvivenza, maggiore quando erano somministrati in combinazione col toceranib. Per determinare il relativo contributo dei due farmaci sono necessari ulteriori studi che ne valutino l'efficacia singolarmente e in modo prospettico (Wiles *et al.*, 2017).

Il razionale del possibile effetto antitumorale dei FANS consiste nell'inibizione della ciclossigenasi, enzima catalizzatore della sintesi delle prostaglandine. Le prostaglandine modulano numerosi eventi patologici implicati nello sviluppo e progressione delle neoplasie, fra cui l'inibizione dell'apoptosi, l'angiogenesi, l'immunosoppressione e la proliferazione cellulare (Dempke *et al.*, 2001).

Fra gli inibitori tirosinchinasici, è stato preso in considerazione anche il farmaco umano gefitinib, che agisce sul recettore per il fattore di crescita epidermico EGFR (*epidermal growth factor receptor*) espresso in una percentuale elevata di FOSSC. In uno studio il gefitinib ha determinato una riduzione della proliferazione di linee cellulari feline, seguita però da fenomeni di resistenza non associati a

mutazioni del dominio tirosinchinasico di EGFR. La combinazione con piccoli RNA interferenti (*small interfering RNA*, siRNA) ha consentito di superare tale resistenza *in vitro* (Bergkvist *et al.*, 2011b).

Il pamidronato disodico, un bifosfonato con attività antiosteoclastica, ha la capacità di inibire la proliferazione di neoplasie osteo-invasive sia *in vitro* che *in vivo*. Uno studio pilota ha valutato il trattamento palliativo con pamidronato (singolarmente o in combinazione con altre terapie, inclusi FANS), per 5 FOSCC, riportando una sopravvivenza mediana di 170 giorni e buona tollerabilità (Wypij e Heller 2014).

Un'altra tipologia molecolare di potenziale interesse è rappresentata dagli inibitori delle poliammine. Le poliammine sono importanti nella proliferazione cellulare e la loro produzione è disregolata in molte neoplasie. In uno studio preliminare, è stata somministrata a 13 gatti con FOSCC la difluorometilornitina (DMFO, inibitore dell'enzima ornitina decarbossilasi) insieme a MQT 1426, un inibitore del trasporto delle poliammine. Dopo il trattamento è stata rilevata una riduzione significativa del livello di poliammine nel tessuto neoplastico. In due soggetti è stata ottenuta regressione del tumore, in altri sei malattia stabile (Skorupski *et al.*, 2011). La DMFO è stata sperimentata anche in monoterapia, ottenendo un effetto molecolare simile. L'effetto tossico più comune è stato la perdita dell'udito (Lewis *et al.*, 2013).

1.5.4 Trattamenti combinati

In alcuni casi un approccio terapeutico multimodale può migliorare i tempi di sopravvivenza rispetto ad una monoterapia. In uno studio su 7 gatti con FOSCC trattati con radioterapia adiuvante dopo la mandibulectomia, si è verificata recidiva locale in 6 casi (85%), in un tempo di variabile di 3-36 mesi (tempo mediano 12,5 mesi); un gatto è stato soppresso dopo 14 mesi per una patologia non correlata al tumore orale (Hutson *et al.*, 1992).

Anche la combinazione di chemioterapici o farmaci radiosensibilizzanti con la terapia radiante può migliorare i tassi di risposta e la sopravvivenza, anche se di poco. Ad esempio, la somministrazione dell'antineoplastico mitoxantrone insieme alla radioterapia in 7 gatti ha determinato un tempo di remissione e una sopravvivenza mediana rispettivamente di 138 e 184 giorni (Bilgic *et al.*, 2015). La radioterapia combinata alla somministrazione intratumorale di etanidazolo, un

radiosensibilizzante delle cellule in ambiente ipossico, ha fornito buona regressione del tumore (riduzione di volume mediana del 70%), ma con risposta di breve durata e sopravvivenza mediana di 116 giorni (Evans *et al.*, 1991).

La gemcitabina è un farmaco citotossico che combinato alla radioterapia nella cura del FOSSC ha mostrato un discreto tasso di risposta, ma è stata sconsigliata per gli effetti tossici importanti, quali infiammazione delle mucose locali e mielosoppressione (Jones *et al.*, 2003; LeBlanc *et al.*, 2004). Un altro studio ha valutato un protocollo radioterapico accelerato abbinato al carboplatino su 31 FOSSC, ottenendo sopravvivenza mediana di 163 giorni (range 53-770). La remissione completa della malattia a 30 giorni e la sede del tumore erano due importanti fattori predittivi della sopravvivenza. In particolare i FOSSC tonsillari e linguali erano quelli con migliore risposta alla terapia, evidenziando una sopravvivenza media di 724 giorni e un tempo mediano non raggiunto. Quattro di questi casi erano ancora in vita alla chiusura del *follow-up* (Fidel *et al.*, 2011). Infine, un recente studio retrospettivo ha valutato l'efficacia di un protocollo radioterapico accelerato ed ipofrazionato, combinato ad una terapia sistemica antiangiogenica con bleomicina, piroxicam e talidomide. Questo trattamento multimodale è stato applicato a 27 gatti con FOSSC non asportabili chirurgicamente. Il tempo mediano di sopravvivenza è stato di 179 giorni, con la comparsa di grave tossicità in 8 soggetti (29,6%) (Marconato *et al.*, 2019).

1.5.5 Altri trattamenti

I trattamenti di supporto comprendono la terapia analgesica, il sostegno nutrizionale e il controllo delle infezioni. I farmaci più importanti per la prevenzione e il controllo del dolore in ambito oncologico sono i FANS e gli oppioidi. Nei gatti con FOSSC andrebbe evitata la somministrazione per via orale, poiché le lesioni orali possono essere dolorose o facilmente sanguinanti (Bilgic *et al.*, 2015). Per lo stesso motivo, questi pazienti dovrebbero ricevere un alimento di tipo umido, con adeguato apporto calorico, fin quando non siano in grado di assumerlo autonomamente. Secondo alcuni autori, l'alimentazione con sondino andrebbe limitata ai trattamenti con intento curativo, durante la fase di recupero. In caso di terapia palliativa infatti, il sondino non consentirebbe di valutare l'appetito, un importante indicatore della qualità di vita (Bilgic *et al.*, 2015).

In presenza di una lesione ulcerata, il controllo delle infezioni secondarie da parte di batteri opportunisti orali è un altro aspetto importante della terapia di supporto. Sono preferibili antibiotici ad ampio spettro, con modalità di somministrazione agevole (Bilgic *et al.*, 2015).

Nuove strategie terapeutiche sono in fase di studio e comprendono la terapia fototermica con nanoparticelle, la brachiterapia e l'elettrochemioterapia (Bilgic *et al.*, 2015; Van Nimwegen *et al.*, 2018; Spugnini e Baldi 2019).

1.6 Caratteri citologici ed istologici

1.6.1 Esame citologico

In presenza di lesioni proliferative, il campionamento del SCC con agoaspirazione o agofissione fornisce in genere campioni a elevata cellularità, con il vantaggio di oltrepassare la superficie della lesione che potrebbe essere ulcerata ed infiammata. Se l'animale è sveglio, l'introduzione di un ago in cavità orale può essere pericolosa. In tal caso il brushing rappresenta una valida alternativa, che fornisce comunque buona cellularità e consente di raccogliere cellule qualche millimetro sotto la superficie. Le lesioni erosivo-ulcerative possono essere campionate con brushing, raschiato o impronta (Bettini *et al.*, 2002, Jergens *et al.*, 2016; Bernreuter 2020).

La diagnosi citologica di SCC si basa sul riscontro di cellule epiteliali con differenziazione squamosa e criteri di malignità. Queste due caratteristiche possono manifestarsi in modo variabile a seconda del grado di differenziazione del tumore. Nei carcinomi ben differenziati le cellule squamose possono presentarsi sia isolate che in ammassi, hanno citoplasma tipicamente abbondante, blu-azzurro vitreo e limiti netti angolari. Mentre nei cheratinociti normali la maturazione del citoplasma si associa a picnosi e successiva scomparsa del nucleo, nei cheratinociti neoplastici il nucleo permane immaturo e voluminoso. Questa asincronia di maturazione fra nucleo e citoplasma è un importante criterio di malignità del SCC, soprattutto in alcuni carcinomi ben differenziati in cui le altre atipie non sono particolarmente marcate, o comunque sono evidenti solo in poche cellule. Possono essere presenti variazioni del rapporto nucleo-citoplasmatico, anisocitosi, anisocariosi e nucleoli prominenti. Aspetti caratteristici del SCC sono la presenza di piccoli vacuoli otticamente vuoti perinucleari e cellule cheratinizzate con

prolungamenti citoplasmatici affusolati, dette cellule a girino. Nei SCC poco differenziati, la differenziazione squamosa può essere visibile in una percentuale inferiore di cellule, mentre i criteri di malignità sono in genere molto marcati. La popolazione cellulare prevalente consiste in cellule epiteliali pleomorfe con scarsa coesione intercellulare, anche di forma rotonda, con elevato rapporto nucleo-citoplasmatico, citoplasma bluastro granulare, gravi atipie nucleari e multinucleazioni (Bettini *et al.*, 2002, Jergens *et al.*, 2016; Bernreuter 2020). A causa della cheratina intralesionale e della presenza di necrosi, ulcerazioni e infezioni batteriche, può coesistere abbondante infiammazione neutrofilica. In questo caso l'interpretazione delle atipie cellulari come neoplastiche piuttosto che displastiche e secondarie alla flogosi potrebbe essere problematica (Camus 2017; **Figura 1.1**).

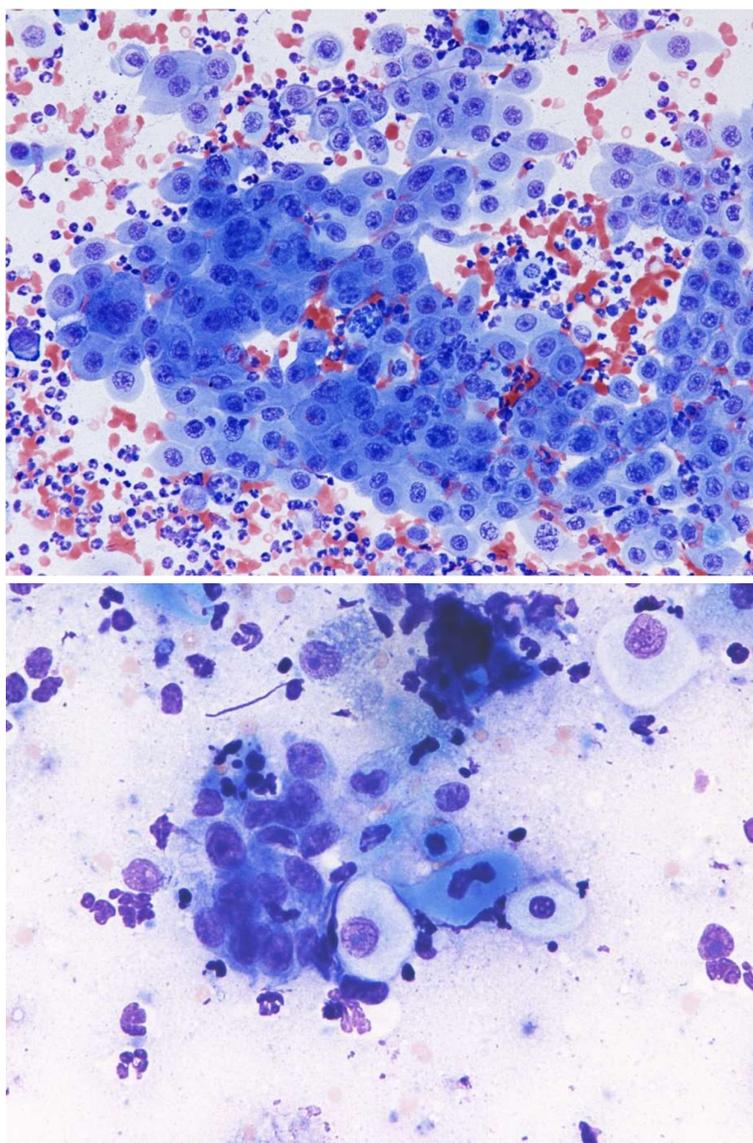


Figura 1.1

Gatto, immagini rappresentative di preparati citologici di carcinoma squamocellulare orale, May Grunwald Giemsa.

In alto: foglietti di cheratinociti neoplastici con limiti cellulari netti e angolari, citoplasma blu-azzurro vitreo e moderati caratteri di anisocitosi e anisocariosi. Coesiste infiammazione neutrofilica. Ingrandimento 200x.

In basso: cellule neoplastiche con rapporto nucleo-citoplasmatico variabile e nucleoli prominenti. Ingrandimento 400x.

1.6.2 Esame istologico

Istologicamente il FOSSC consiste in una proliferazione disorganizzata di cellule epiteliali a vario grado di cheratinizzazione, che oltrepassa la membrana basale ed invade i tessuti sottostanti. Le forme ben differenziate sono composte da isole e cordoni di cellule squamose pleomorfe, con ponti intercellulari ben evidenti ed eventuali aggregati concentrici di cheratina lamellare compatta (perle cornee). Nei carcinomi meno differenziati invece, la cheratinizzazione del citoplasma può essere evidente solo in alcune aree multifocali. I nuclei sono tipicamente voluminosi, con cromatina vescicolare e nucleolo prominente. Sono spesso presenti aree di necrosi, ulcerazioni ed infiltrati infiammatori composti da neutrofilo, linfociti e plasmacellule in quantità variabili (Stebbins *et al.*, 1989; Bilgic *et al.*, 2015; Kiehl e Brown Calderwood Mays, 2016). In caso di coinvolgimento osseo possono evidenziarsi osteolisi, riassorbimento osseo e proliferazione di osso reattivo (Martin *et al.*, 2011).

In base all'aspetto morfologico, sono stati descritti diversi sottotipi di SCC, alcuni dei quali potrebbero presentare difficoltà diagnostiche e richiedere un'indagine immunoistochimica. Nell'uomo è stato dimostrato che i vari sottotipi di SCC sono associati ad un diverso comportamento biologico e quindi a una diversa prognosi (Barnes *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2007). Negli animali domestici invece tale ruolo prognostico non è mai stato indagato, e nel gatto la frequenza dei diversi sottotipi è ancora poco conosciuta (Munday 2017; Sparger *et al.*, 2018).

SCC convenzionale

Il SCC convenzionale è l'istotipo più comune in tutti gli animali domestici; può essere a sua volta classificato in base all'entità della differenziazione. Il SCC *ben differenziato* è formato da isole e trabecole con una progressione ordinata da piccole cellule basali non cheratinizzate alla periferia, a voluminose cellule cheratinizzate verso il centro, e talvolta perle cornee centrali. Le cellule cheratinizzate hanno ampio citoplasma eosinofilo e ponti spinosi intercellulari in gran parte mantenuti. Pleomorfismo nucleare e attività mitotica sono minimi. Nel SCC *moderatamente differenziato* le strutture epiteliali tendono ad essere più piccole e invasive, con perdita della polarizzazione. Le cellule hanno citoplasma meno intensamente eosinofilo e i ponti intercellulari sono difficilmente visibili. I nuclei sono ipercromatici e pleomorfi, le mitosi frequenti,

talvolta atipiche. Le perle cornee sono rare o assenti. Nel SCC *scarsamente differenziato* le cellule hanno citoplasma scarso, con rari aspetti di cheratinizzazione; le atipie nucleari e l'attività mitotica sono marcate. Le cellule possono infiltrare lo stroma desmoplastico in piccoli gruppi o anche singolarmente, e in queste aree la connessione della neoplasia con l'epitelio della mucosa potrebbe non essere identificata (Munday 2017) (**Figura 1.2**).

SCC papillare

Il sottotipo papillare è stato descritto a livello orale sia nel cane che nel gatto. Macroscopicamente si presenta come una neoformazione esofitica, di consistenza friabile. Istologicamente l'epitelio è espanso da numerose formazioni papillari sostenute da assi fibrovascolari. Le cellule neoplastiche variano da basaloidi a cheratinizzate, con occasionale formazione di perle cornee. La caratteristica chiave per differenziare questo sottotipo dal papilloma squamoso è l'invasione della lamina propria da parte delle cellule neoplastiche, non sempre facile da individuare a causa del pattern di crescita papillare (Stelow e Mills 2005; Munday 2017; Sparger *et al.*, 2018).

SCC verrucoso

Anche questo sottotipo è caratterizzato da crescita esofitica, con aspetto a cavolfiore. Istologicamente si evidenziano ampie trabecole di cheratinociti neoplastici, intercalate ad abbondante tessuto fibroso. Le strutture epiteliali apparentemente sembrano comprimere, piuttosto che infiltrare, i tessuti sottostanti. Nell'uomo il sottotipo verrucoso è associato ad una prognosi migliore rispetto ad altri sottotipi. Nel cane invece sono riportati casi di recidiva locale con prognosi infausta (Van Rensburg 1982; Munday 2017).

SCC basaloide

Neoplasia prevalentemente composta da cellule epiteliali di aspetto basale, di piccole e medie dimensioni, organizzate in lobuli solidi che infiltrano la mucosa. Le cellule alla periferia dei lobuli sono talvolta disposte in palizzate, mentre nelle aree centrali possono formarsi piccoli spazi cistici (Nemec *et al.*, 2012; Munday 2017).

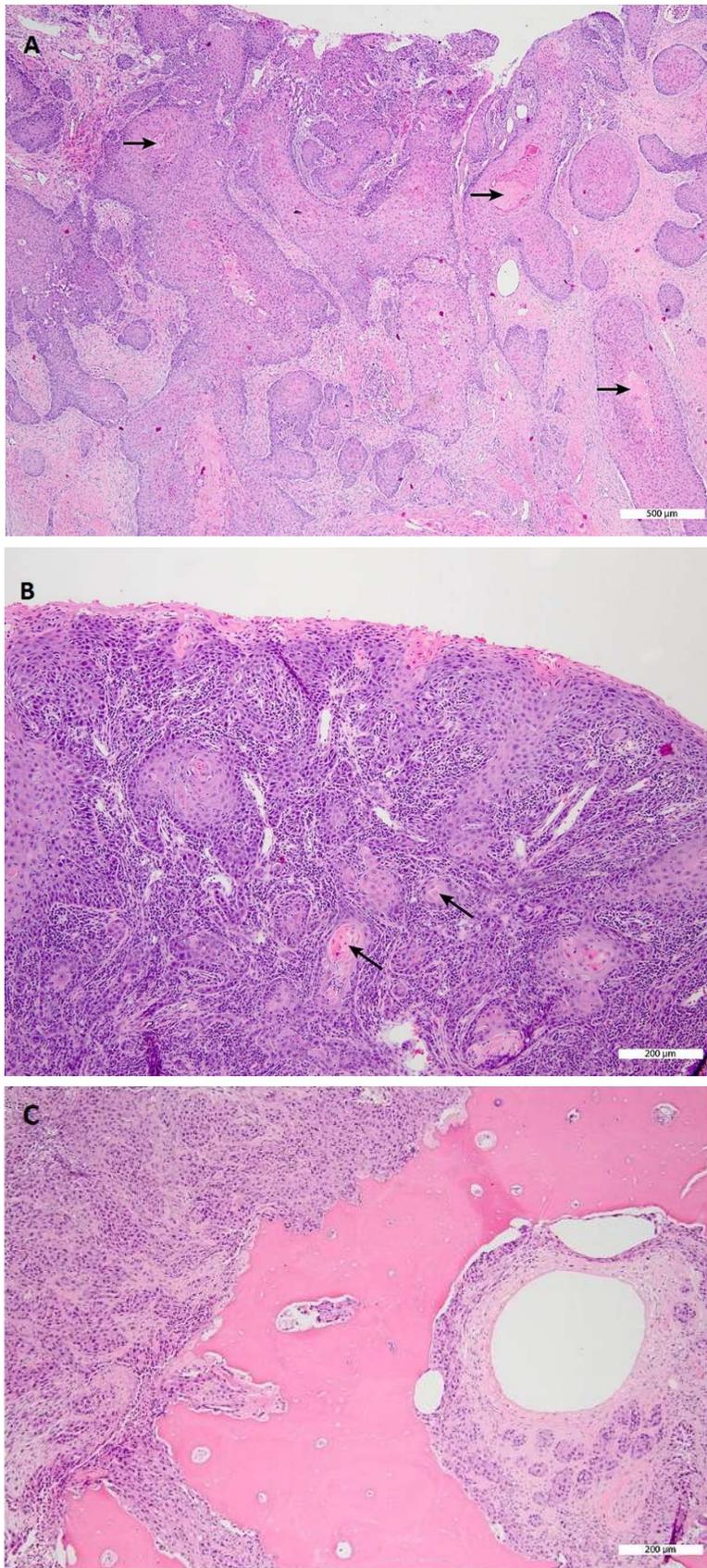


Figura 2.2. Immagini rappresentative di SCC convenzionale, Ematossilina Eosina.

A. SCC convenzionale ben differenziato. Trabecole di cellule neoplastiche con progressiva differenziazione dallo strato basale periferico verso il centro e multifocali perle cornee centrali (freccie);

B. SCC convenzionale mediamente differenziato. Le perle cornee (freccie) sono meno frequenti e accentuate.

C. SCC convenzionale scarsamente differenziato. Isole e cordoni di cellule neoplastiche con rari aspetti di cheratinizzazione infiltrano il tessuto osseo adiacente (da Nemeć *et al.*, 2012).

SCC a cellule fusate

Si tratta di una proliferazione di cellule fusate, voluminose, con citoplasma pallido e anfofilo che tendono a disporsi in vortici o fasci. La differenziazione istologica da un sarcoma o un melanoma a cellule fusate può essere difficile, ma esaminando attentamente il fronte invasivo della neoplasia, nella maggioranza dei casi si possono rilevare alcune cellule con differenziazione squamosa (Nemec *et al.*, 2012; Munday 2017).

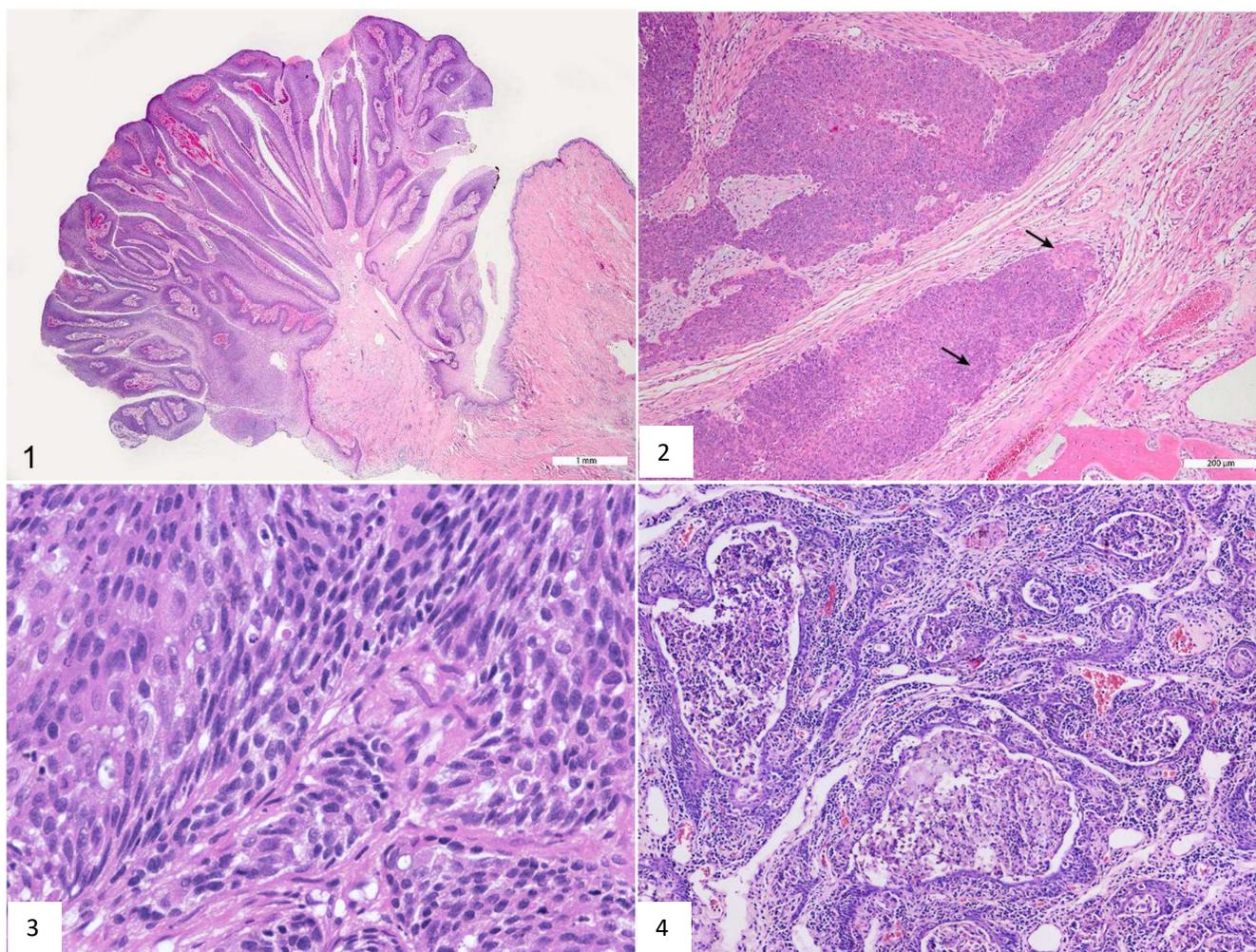


Figura 1.3 Immagini istologiche rappresentative di SCC non convenzionale, Ematossilina eosina.

- 1 - SCC papillare. L'epitelio neoplastico è sollevato in papille supportate da sottili assi di stroma fibrovascolare.
- 2 - SCC basaloide. Lobuli di cellule epiteliali di piccole-medie dimensioni sono frammisti a cellule cheratinizzate singole o in piccoli gruppi (freccie) (da Nemec *et al.*, 2012).
- 3 - SCC a cellule fusate. Coesistono cheratinociti di forma poligonale e di forma fusata, con nuclei ipercromatici e scarso citoplasma eosinofilo, ingrandimento 400x.
- 4 - SCC acantolitico. Multifocalmente i cheratinociti neoplastici perdono coesione tra loro (acantolisi) dando origine a strutture pseudoghiandolari, ingrandimento 40x.

Questi due sottotipi sono considerati varianti del SCC convenzionale. Entrambi sono prevalentemente costituiti da trabecole di cellule cheratinizzate pleomorfe che infiltrano i tessuti adiacenti. Nel tipo adenosquamoso le trabecole sono frammiste a strutture epiteliali con differenziazione ghiandolare. Il SCC acantolitico invece (detto anche adenoide) è caratterizzato da pseudolumi ghiandolari delimitati da cheratinociti neoplastici e contenenti cellule acantolitiche. Entrambi i sottotipi potrebbero essere confusi con un adenocarcinoma delle ghiandole salivari. Nei casi dubbi può essere utile la colorazione con Alcian Blu, per evidenziare la mucina presente negli adenocarcinomi (Munday *et al.*, 2017; **Figura 1.3**).

1.6.3 *Grading* istologico

Schema di Broders

Lo schema di Broders è un sistema di *grading* per il SCC derivante dalla medicina umana ma applicato anche in oncologia veterinaria. In questo sistema i carcinomi vengono classificati in 4 gruppi sulla base della differenziazione e del numero di mitosi. I carcinomi ben differenziati corrispondono al grado I, quelli moderatamente differenziate ai gradi II-III e quelli scarsamente differenziate al grado IV (Marconato *et al.*, 2012; **Tabella 1.2**). Tuttavia lo schema di Broders ha evidenziato alcuni limiti, a causa dei quali non è risultato affidabile nel predire la prognosi del SCC umano. Questi limiti sono legati all'eterogeneità intratumorale del grado di differenziazione, importante soprattutto quando si hanno a disposizione piccole biopsie, e alla soggettività della valutazione (Munday 2017).

Classificazione di Anneroth

Questo sistema di *grading*, ideato per il SCC orale dell'uomo, prende in considerazione il fronte invasivo del tumore. Rispetto allo schema di Broders ha dimostrato di fornire informazioni prognostiche più accurate (Bryne *et al.*, 1989). La classificazione di Anneroth è formata da sei parametri istologici, tutti con lo stesso valore per l'assegnazione del grado di malignità: tre parametri riguardanti le cellule neoplastiche (cheratinizzazione, pleomorfismo e mitosi) e altri tre sull'interazione neoplasia-organismo (pattern e stadio di invasione, risposta infiammatoria) (Akhter *et al.*, 2011). Un adattamento di questo *grading* è stato proposto per il SCC cutaneo ed

orale del cane, mentre nel gatto non sono ancora stati svolti studi al riguardo (Nagamine *et al.*, 2017; **Tabella 1.3**)

Tabella 1.2 - Schema di Broders (da Marconato *et al.*, 2012).

Grado	Percentuale di cheratinizzazione	Ponti inter-cellulari	Presenza di perle cornee	Cheratinizzazione individuale	Indice mitotico	Profondità della lesione
I	75-100%	+++	+++	scarsa o assente	basso	superficiale
II	50-75%	+	++	scarsa	basso	sottocutanea superficiale
III	25-50%	+/-	+	abbondante	moderato	sottocutanea profonda
IV	<25%	-	+/-	abbondante	elevato	profonda

Tabella 1.3 - Sistema di classificazione del SCC cutaneo ed orale. I punteggi di ciascun parametro vengono sommati, per un totale massimo di 20 punti. Il grado del tumore si basa sul punteggio totale come segue: grado 1 (6-10), grado 2 (11-15), grado 3 (16-20) (Nagamine *et al.*, 2017). HPF: *high-power field*.

Punteggio	Percentuale di cheratinizzazione	Pattern di invasione	Risposta dell'ospite	Pleomorfismo nucleare	Mitosi/HPF
1	>50%	Compressivo, margini infiltranti ben delineati	Marcata	Lieve (>75% di cellule mature)	0-1
2	20-50%	Cordoni solidi e bande di cellule infiltranti	Moderata	Moderato (50-75% di cellule mature)	2-3
3	5-20%	Cordoni o piccoli gruppi di cellule infiltranti (n > 15)	Lieve	Marcato (25-50% di cellule mature)	4-5
4	0-5%	Dissociazione cellulare diffusa in piccoli gruppi e/o in singole cellule (n < 15)	Nessuna	Estremo (0-25% di cellule mature)	>5

1.7 Immunoistochimica

1.7.1 Marker di utilità diagnostica

Le citocheratine (CK) sono una famiglia di polipeptidi che caratterizzano i filamenti intermedi delle cellule epiteliali, e ne rappresentano i principali marker di differenziazione. Sono classificate in cheratine acide (tipo I) e cheratine basiche (tipo II). Possono inoltre essere classificate in base al peso molecolare. Le cheratine a basso peso molecolare (LMW, *low molecular weight*) sono presenti nella maggior parte degli epitelii ma non in quello squamoso, dove invece sono presenti cheratine ad alto peso molecolare (HMW, *high molecular weight*), come le citocheratine 5 e 6 (Ramos-Vara e Borst, 2017).

Il cocktail di anticorpi monoclonali anti-pancitcheratina (AE1/AE3) identifica la maggior parte delle cheratine, ed è la scelta di elezione per confermare una neoplasia epiteliale in caso di dubbio. Ad esempio, potrebbe essere utile per confermare un SCC a cellule fusate in diagnosi differenziale con un melanoma, un fibrosarcoma o uno schwannoma. Oppure, in una biopsia orale di piccole dimensioni in cui non si evidenzia una neoformazione ma solo piccoli gruppi di cellule infiltranti, la positività immunoistochimica potrebbe confermarne l'origine epiteliale. Altri markers diagnostici potenzialmente utili per le cellule epiteliali sono l'E-caderina e la claudina-1, due proteine appartenenti ai complessi di giunzione intercellulare (Ramos-Vara e Borst, 2017).

In caso di diagnosi differenziale tra un SCC e un adenocarcinoma, possono essere utili la CK 5, (come marker dell'epitelio squamoso), e la CK 7, a basso peso molecolare, espressa intensamente dalle strutture ghiandolari. In seconda battuta si possono indagare la proteina p63, espressa nel SCC, e la CK18 per l'epitelio ghiandolare (Ramos-Vara e Borst, 2017).

Va inoltre ricordato che, come conseguenza della transizione fenotipica epitelio-mesenchimale, alcuni carcinomi potrebbero mostrare positività immunoistochimica alla vimentina (Harris 2019).

1.7.2 Marker di utilità prognostica

EGFR

EGFR (*epidermal growth factor receptor*) è un recettore transmembrana composto da un dominio tirosinchinasico che regola molte attività cellulari, fra cui il ciclo cellulare, l'apoptosi e la differenziazione (Herbst 2004). Nel HNSCC, la sovraespressione di EGFR rappresenta un

importante fattore prognostico indipendente, negativamente associato al tempo libero da malattia e alla sopravvivenza (Ang *et al.*, 2004). Anche nel SCC cutaneo del gatto, l'espressione di EGFR è stata associata ad una prognosi peggiore (Sabattini *et al.*, 2010). Nel FOSSC l'espressione di EGFR è stata riportata da vari studi, ma il suo ruolo prognostico non è ancora stato chiarito. Tuttavia, l'elevata percentuale di tumori con positività immunohistochimica, suggerisce che EGFR sia coinvolto nella progressione neoplastica del FOSSC e che potrebbe essere sfruttato come bersaglio terapeutico (Bergkvist *et al.*, 2011b; Yoshikawa *et al.*, 2012; Bilgic *et al.* 2015).

COX-2

La ciclossigenasi (COX) è il principale enzima responsabile della sintesi delle prostaglandine. COX-1 è l'isoforma costitutiva, normalmente attiva nell'organismo, che catalizza la sintesi di prostaglandine con funzioni omeostatiche, come la citoprotezione della mucosa gastrica, il mantenimento del flusso sanguigno renale e la sintesi di trombossano, un potente aggregante piastrinico. L'isoforma inducibile COX-2 condivide circa il 60% di omologia con COX-1 e viene espressa principalmente nei tessuti infiammati. Numerose citochine infiammatorie, sostanze carcinogene e mitogene possono indurre l'attivazione di COX-2 in svariati tipi cellulari, fra cui cellule endoteliali, leiomiociti, condrociti, fibroblasti, monociti, macrofagi e sinoviociti. Le prostaglandine E₂ (PGE₂) prodotte da queste cellule mediano la risposta infiammatoria, e in alcuni casi possono favorire la carcinogenesi (Flory e LeBlanc 2005). L'utilità prognostica di COX-2 è controversa, con studi discordanti sia in oncologia umana che veterinaria. Secondo alcuni di questi, l'espressione di COX-2 potrebbe essere associata a una minor sopravvivenza nell'osteosarcoma del cane e nel carcinoma mammario felino (Dorè 2011). Diversi studi hanno riportato l'espressione di COX-2 nelle cellule del FOSSC, con notevole variabilità in termini di frequenza (9-82% dei casi), percentuale di cellule neoplastiche positive e intensità della positività immunohistochimica. L'espressione di COX-2 nella mucosa orale non neoplastica era significativamente inferiore o assente (Beam *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2006; DiBernardi *et al.*, 2007; Nasry *et al.*, 2018). Anche se l'effettivo ruolo patogenetico e prognostico della COX-2 nel FOSSC è ancora da definire, questi dati pongono le basi per studi clinici sull'efficacia degli inibitori della COX-2 in questa neoplasia.

CD147

CD147 è una glicoproteina transmembrana chiamata anche matrice extracellulare metalloproteinasi induttore (EMMPRIN) o Basigin. Nel SCC orale dell'uomo CD147 viene sovraespressa, è associata negativamente alla prognosi ed è ritenuta un potenziale target terapeutico. Questa proteina promuove l'invasione tumorale e l'infiammazione tramite numerose vie molecolari, fra cui l'attivazione di metalloproteinasi (Monteiro *et al.*, 2014; Landras *et al.*, 2019). Uno studio su 43 FOSCC ha valutato l'espressione immunoistochimica di CD147, parallelamente a COX2, evidenziandone l'espressione nelle cellule neoplastiche rispettivamente nel 51% e 49% dei casi. L'espressione di entrambe le proteine nello stroma e nell'epitelio orale adiacente era significativamente meno frequente. Lo stesso studio, analizzando linee cellulari di FOSCC, non ha riscontrato alcuna correlazione fra l'espressione delle due proteine, né fra CD147 e le prostaglandine PGE2, suggerendo quindi che CD147 e COX-2 sono regolate in modo indipendente (Nasry *et al.*, 2018).

Ki67

Ki67 è una proteina nucleare espressa dalle cellule solo se in attiva replicazione, in tutte le fasi del ciclo cellulare. Viene comunemente impiegata per misurare la frazione di crescita di una popolazione cellulare ed è associata al comportamento biologico di molte neoplasie (Scholzen e Gerdes, 2000). Nel carcinoma squamocellulare umano laringeo e ipofaringeo, i tumori con elevata percentuale di cellule positive a Ki67 hanno evidenziato una maggiore probabilità di recidiva post-chirurgica rispetto ai tumori con basso indice Ki67 (Liu *et al.*, 2003). Altri studi sul HNSCC invece non hanno evidenziato alcuna associazione al comportamento biologico (Quon *et al.*, 2001). Nel gatto, la relazione fra Ki67 e comportamento biologico del FOSCC non è univoca, anche se la percentuale di cellule positive nella neoplasia è tendenzialmente elevata e in alcuni casi sembra essere inversamente associata alla sopravvivenza (Bergkvist *et al.*, 2011b; Yoshikawa *et al.*, 2012). Inoltre, casi di HNSCC con elevata espressione di Ki67 e senza espressione della proteina p53, hanno mostrato eccellente risposta alla radioterapia, anche in stadio avanzato (Raybaud-Diogène *et al.*, 1997). Un comportamento simile è stato riportato da uno

studio sul SCC cutaneo felino, nel quale i tumori con maggiore espressione di Ki67 hanno risposto meglio alla radioterapia (Melzer *et al.*, 2006).

STAT3

STAT (*signal transducer and activator of transcription*) è una famiglia di 7 isoforme proteiche che agiscono come fattori di trascrizione intracellulari, mediando i segnali provenienti da citochine e fattori di crescita e regolando così la normale fisiologia cellulare e lo sviluppo. A causa della loro influenza sulla sopravvivenza cellulare, la proliferazione e l'angiogenesi, le proteine STAT, in particolare STAT3 e STAT5, sono state implicate anche nello sviluppo delle neoplasie (Bowman *et al.*, 2000). L'attivazione di STAT3 contribuisce all'insorgenza di metastasi e alla chemioresistenza tramite numerosi target trascrizionali, come il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), la survinina e le famiglie proteiche BCL2 (Brown *et al.*, 2015). Di conseguenza, l'espressione di STAT3 ha un impatto negativo sulla prognosi di molte neoplasie umane, fra cui anche il HNSCC (Macha *et al.*, 2011). L'esposizione *in vitro* di linee cellulari di HNSCC ad alcuni inibitori della proteina STAT3 ha provocato una sottoregolazione dei suoi target trascrizionali e una riduzione della proliferazione cellulare (Grandis *et al.*, 1998). Uno studio sul FOSCC ha rilevato l'espressione immunohistochimica di STAT3 nel 48% dei campioni esaminati, ma il suo ruolo prognostico non è stato indagato. Inoltre la somministrazione di una piccola molecola inibitrice di STAT3 (LLL12), ha determinato su una linea cellulare di FOSCC effetti parzialmente simili a quelli riscontrati nell'uomo. Pertanto, STAT3 è stata suggerita come potenziale bersaglio terapeutico nel FOSCC, anche se i meccanismi di interazione con i suoi target trascrizionali sono complessi e richiedono ulteriori approfondimenti (Brown *et al.*, 2015).

CD3 (infiltrato linfocitario)

Numerose evidenze in medicina umana indicano che disfunzioni del sistema immunitario e meccanismi su base infiammatoria sono implicati nell'insorgenza e nella progressione del HNSCC (Feller *et al.*, 2013). Influenzando il microambiente tumorale, le cellule neoplastiche interagiscono con le cellule immunitarie dell'ospite e sono in grado di indurre immunosoppressione ed evasione della risposta immunitaria. Queste interazioni possono favorire la crescita del tumore, l'angiogenesi e lo sviluppo di metastasi (Ferris *et al.*, 2015). Diversi studi hanno

riportato nell'uomo un ruolo prognostico degli infiltrati intratumorali di linfociti T, con effetti diversi a seconda dei sottotipi linfocitari coinvolti (Ferris *et al.*, 2015, Lei *et al.*, 2016). La molecola CD3 è uno degli antigeni più precoci che caratterizzano i linfociti della linea T, ed è composto da quattro glicoproteine di membrana, con domini extracellulari, transmembrana ed intracellulari (Ramos-Vara e Borst, 2017). I linfociti T regolatori (Treg) sono un sottotipo di linfociti T CD4 positivi con attività immunosoppressiva, e sono presenti in numero aumentato sia a livello tumorale che nel sangue periferico di pazienti con HNSCC (Allen *et al.*, 2015; Ferris *et al.*, 2015). L'aumento di linfociti Treg sembra avere un significato prognostico nel HNSCC, anche se gli studi in merito sono discordanti (Shang *et al.*, 2015; Wallis *et al.*, 2015; De Meulenaere *et al.*, 2017). Uno studio preliminare ha cercato di caratterizzare, con immunohistochimica, l'infiltrato linfocitario presente in 12 casi di FOSCC. Un infiltrato di linfociti T (CD3 positivi) era presente in 11 casi (92%), distribuito sia nello stroma che nell'epitelio tumorale, oppure prevalentemente a livello stromale. In 7 casi (58%) erano presenti anche linfociti identificati come Treg, in base alla positività per il fattore di trascrizione FoxP3, caratteristico di questo sottotipo. In tutti i casi erano presenti anche linfociti B (CD20 e CD79 positivi). Nello stesso studio è stata svolta un'analisi citofluorimetrica del sangue circolante di 9 gatti con FOSSC, evidenziando un numero significativamente maggiore di cellule CD4 e Foxp3 positive rispetto a 7 controlli sani. Saranno necessari ulteriori studi per definire l'eventuale significato patogenetico e prognostico di questi reperti (Sparger *et al.*, 2018).

p16

La proteina p16 inibisce la replicazione cellulare regolando la funzione della proteina del retinoblastoma (pRb) (Foulkes *et al.*, 1995). La perdita di pRb promuove una replicazione cellulare incontrollata e si associa ad accumulo non funzionale di p16 all'interno delle cellule (Parry *et al.*, 1995). Nell'uomo, i HNSCC causati da Papillomavirus sono tipicamente caratterizzati da accumulo intracellulare di p16, secondario alla degradazione di pRb per azione del virus. Al contrario, nei HNSCC associati ad altre cause, principalmente il consumo di tabacco e alcool, si verifica in genere perdita di p16, suggerendo che i meccanismi molecolari di carcinogenesi dei due sottogruppi tumorali sono differenti (Smeets *et al.*, 2007). Anche il comportamento

biologico delle due categorie è diverso, con una prognosi peggiore per i carcinomi causati da alcool e tabacco rispetto a quelli di origine virale (Psyrris *et al.*, 2009). Inoltre, la p16 si è rivelata essere un fattore prognostico indipendente per il HNSCC, in quanto anche i carcinomi orali non associati a HPV, ma che esprimono p16, hanno una prognosi più favorevole (Lewis *et al.*, 2010).

Nel gatto, un'associazione fra sovraespressione di p16 e presenza di Papillomavirus è stata riscontrata per i SCC cutanei che si sviluppano in aree protette dai raggi UV e per quelli del *planum* nasale (Munday *et al.*, 2011a; Munday *et al.*, 2013). Nei SCC del *planum* nasale inoltre, la sovraespressione di p16 è stata associata a migliori tempi di sopravvivenza (Munday *et al.*, 2013). Nel FOSSC, anche se la maggior parte degli studi immunoistochimici e molecolari non supporta un ruolo eziologico del Papillomavirus, la p16 potrebbe rappresentare un indicatore prognostico. Un'analisi immunoistochimica su 48 FOSSC ha rilevato tre pattern di espressione di p16: sovraespressione diffusa nucleare e citoplasmatica nel 19% dei casi, debole positività citoplasmatica alla periferia delle trabecole di cellule neoplastiche (70% dei casi) ed espressione negativa nel restante 12%. La sopravvivenza dei gatti con sovraespressione di p16 era significativamente maggiore (84 giorni) rispetto ai gatti con positività debole periferica (37 giorni), ma non c'era differenza significativa rispetto ai casi senza espressione di p16 (51 giorni) (Munday *et al.*, 2019). Al di là del significato prognostico, è quindi probabile che l'aumento di p16 nel FOSSC sia causato da meccanismi molecolari differenti rispetto all'uomo (Munday *et al.*, 2011b; Munday *et al.*, 2019).

Podoplanina

La podoplanina (PDPN) è una glicoproteina transmembrana altamente glicosilata, presente normalmente in molte cellule e tessuti, fra cui podociti, pneumociti di tipo I, cellule endoteliali linfatiche, miofibroblasti, cellule mesoteliali, cuore e sistema nervoso centrale (Martin-Villar *et al.*, 2005; Astarita *et al.*, 2012; Chang *et al.*, 2018). Le funzioni della PDPN riguardano lo sviluppo embrionale del cuore, la circolazione linfatica e l'integrità delle venule ad endotelio alto (Astarita *et al.*, 2012; Herzog *et al.*, 2013). La PDPN viene sovraespressa in molte neoplasie umane, e in alcune di queste è associata ad una prognosi infausta, in particolare nelle neoplasie

polmonari, mammarie e nel SCC orale (Yuan *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2018). La PDPN inoltre facilita l'invasione metastatica dei vasi sanguigni, stimolando l'aggregazione piastrinica tramite l'interazione con il recettore CLEC-2 (C-type lectin-like receptor 2). Per questo motivo rappresenta un potenziale bersaglio di terapie molecolari con anticorpi monoclonali o inibitori specifici (Chang *et al.*, 2015; Chang *et al.*, 2018). Nel melanoma e nel SCC del cane, l'espressione immunohistochimica di PDPN è stata riscontrata con l'anticorpo anti-podoplanina Pmab-38, specifico per questa specie. Per il gatto invece è stato sviluppato l'anticorpo anti-podoplanina Pmab-52 (Yamada *et al.*, 2017). In uno studio successivo, l'espressione di PDPN è stata investigata in 40 SCC felini (18 orali e 22 cutanei), rilevando positività nel 95% dei casi e supportando quindi ulteriori studi su questo marker (Itai *et al.*, 2017).

Transizione epitelio-mesenchimale

La transizione epitelio-mesenchimale (EMT) è un processo mediante il quale le cellule epiteliali acquisiscono caratteristiche fenotipiche proprie delle cellule mesenchimali, modificando la loro morfologia, l'adesione intercellulare e la capacità migratoria. Si tratta di un processo fisiologico che avviene durante lo sviluppo embrionale, l'ovulazione e la guarigione delle ferite. (Lamouille *et al.*, 2014; Nieto *et al.*, 2016). Tuttavia nelle neoplasie epiteliali maligne, disregolazioni geniche innescano i meccanismi dell'EMT, favorendo perdita della polarità, riduzione della coesione intercellulare, invasione dei tessuti adiacenti e sviluppo di metastasi (Christiansen e Rajasekaran 2006). Le modificazioni cellulari in corso di EMT sono variabili per tipologia ed entità, sia all'interno della stessa neoplasia che fra neoplasie diverse, e costituiscono uno spettro di pattern fenotipici in cui possono coesistere caratteristiche epiteliali e mesenchimali (Klymkowsky e Savagner 2009; Ribeiro e Paredes 2015). Alcune caratteristiche dell'EMT sono un'aumentata espressione di N-caderina e P-caderina, una ridotta espressione di E-caderina (*cadherin switching*), sovraespressione della vimentina e attivazione dei fattori di trascrizione Snail e Twist (Scheel e Weinberg 2012).

Nelle cellule epiteliali normali l'adesione intercellulare viene garantita da complessi proteici E-caderina-catenina, che rappresentano quindi un ostacolo alla mobilità delle cellule, e la loro perdita facilita la metastatizzazione. La P-caderina invece riduce l'adesione intercellulare,

favorendo la motilità cellulare e la comparsa di un fenotipo proliferativo (Sanders *et al.*, 2000; Klymkowsky e Savagner 2009). Il SCC orale dell'uomo è caratterizzato da sovraespressione della P-caderina, con E-caderina sottoespressa o normalmente espressa. L'N-caderina invece non mostra particolari disregolazioni in questa neoplasia (Pyo *et al.*, 2007; Klymkowsky e Savagner 2009).

Nel FOSSC è stato evidenziato un pattern immunistochemico indicativo di EMT, che presenta alcune somiglianze con la controparte umana, fra cui la sovraespressione di P-caderina, la coespressione di E-caderina e l'assenza di N-caderina (Harris *et al.*, 2019). L'aumento di P-caderina è considerato un fattore prognostico negativo nel carcinoma mammario felino e umano, ma il suo significato prognostico nel FOSSC è ancora da chiarire (Figueira *et al.*, 2014; Sousa *et al.*, 2014; Harris *et al.*, 2019).

2.1 Ruolo di p53 nell'oncogenesi

La proteina p53 è stata scoperta nel 1979 come una molecola con peso molecolare di 53 kD, associata al grande antigene virale T, in cellule trasformate dal Simian virus 40 (Lane e Crawford, 1979; Linzer e Levine, 1979). Il gene *TP53*, localizzato sul cromosoma umano 17 e codificante per la proteina p53 *wild-type*, era stato inizialmente classificato come oncogene, ma è stato poi correttamente identificato come oncosoppressore, in virtù delle sue funzioni regolatorie del ciclo cellulare, dei meccanismi riparativi del DNA e dell'apoptosi. È il gene più frequentemente mutato nelle neoplasie umane. Virtualmente, mutazioni con perdita di funzione di *TP53* possono verificarsi in qualunque tipo di tumore maligno (Finlay *et al.*, 1989; Kumar *et al.*, 2020). In molte neoplasie inoltre, queste mutazioni sono associate ad una prognosi sfavorevole del paziente (Olivier *et al.*, 2010).

Nella maggior parte dei casi, le mutazioni di *TP53* sono acquisite e si verificano in entrambi gli alleli delle cellule somatiche. Meno comunemente alcuni individui possono ereditare un allele mutato del gene. Tale condizione, nota come sindrome di Li-Fraumeni, comporta per i soggetti colpiti un rischio 25 volte maggiore di sviluppare neoplasie maligne, rispetto al resto della popolazione. Questa predisposizione è dovuta al fatto che è necessario il solo evento mutazionale dell'allele normale per compromettere la funzionalità di *TP53* (Malkin *et al.*, 1990; Kumar *et al.*, 2020).

In modo analogo nei modelli sperimentali, i topi *knockout* (topi geneticamente modificati, nei quali l'espressione di un determinato gene viene soppressa), per *TP53* sono suscettibili allo sviluppo di tumori, con trasmissione ad alta penetranza (Donehower *et al.*, 1992).

La p53 agisce legandosi a specifiche sequenze del DNA e regolandone la trascrizione (Laptenko e Prives, 2006). È composta da due domini di transattivazione N-terminali, seguiti da una regione ricca di prolina, un dominio centrale legante il DNA, e un'estremità C-terminale, che

comprende il segnale di localizzazione nucleare e un dominio di oligomerizzazione, necessari per l'attività trascrizionale.

A conferma dell'importanza della trascrizione p53-mediata per le attività oncosoppressive, la maggior parte delle mutazioni di *TP53* nei tumori avviene nella regione che codifica per il dominio legante il DNA (Kasthuber e Lowe, 2017). In condizioni normali, i livelli intracellulari di p53 sono mantenuti bassi da vari regolatori, fra cui la proteina MDM2, un'ubiquitina ligasi di p53 che ne stimola la degradazione da parte del proteasoma (Haupt *et al.*, 1997; Kubbutat *et al.*, 1997). Tuttavia, la p53 può stabilizzarsi ed accumularsi in risposta a numerosi stress cellulari: primariamente danni al DNA, ma anche ipossia, accorciamento dei telomeri e stimoli replicativi in eccesso derivanti da oncogeni (ad esempio i geni *MYC* e *RAS* mutati) (Kumar *et al.*, 2020). In queste situazioni, la p53 viene svincolata dall'effetto inibente di MDM2, con meccanismi differenti a seconda del tipo di stress cellulare.

- *Danni al DNA e ipossia.* In seguito a un danno al DNA e ad uno stress ipossico, si innesca un meccanismo che prevede l'attivazione delle proteine chinasi *ataxia-telangiectasia mutated* (ATM) e *ataxia-telangiectasia and related* (ATR). Queste due proteine sono sensibili a tipi di danno diversi, ma una volta attivate, entrambe promuovono la fosforilazione di p53, determinandone il distacco da MDM2 e la possibilità di accumularsi (Shieh *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2020)
- *Stress "oncogeno".* L'attivazione di oncoproteine come le RAS porta alla stimolazione intensa e continua tramite vie molecolari che favoriscono la crescita (ad esempio MAPK e PI3K/AKT). Questi segnali aberranti provocano, con meccanismi ancora sconosciuti, una sovraespressione della proteina p14 / ARF, codificata dal gene oncosoppressore *CDKN2A*. La proteina p14 / ARF si lega a MDM2, interrompendo così la degradazione di p53 (Zhang *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 2020).

Una volta stabilizzata, la p53 attiva la trascrizione di centinaia di geni target, regolando numerose funzioni cellulari finalizzate a contrastare la trasformazione neoplastica. La p53 può indurre 3 diversi risultati, progressivamente più drastici per il destino della cellula colpita:

L'arresto temporaneo del ciclo cellulare, la senescenza (arresto permanente del ciclo cellulare) o la morte cellulare programmata (apoptosi).

- *Arresto temporaneo del ciclo cellulare.* È la prima risposta a un danno al DNA e si instaura rapidamente, verso la fine della fase G₁ del ciclo. Questo arresto è in parte provocato dalla trascrizione mediata da p53 del gene *CDKN1A*, che codifica per la proteina p21, un inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti (CDK). La p21 inibisce i complessi CDK4-ciclina D, mantenendo così il gene *RB* in uno stato ipofosforilato attivo e bloccando il passaggio della cellula dalla fase G₁ alla fase S del ciclo. Questa pausa del ciclo cellulare è utile per consentire alle cellule di riparare il danno al DNA. La p53 agisce inducendo anche altre proteine che favoriscono la riparazione del DNA, come la GADD45 (arresto della crescita e danno al DNA). Se il danno al DNA viene riparato con successo, i segnali attivanti la p53 scompaiono, la p53 diminuisce e la cellula riprende il ciclo normalmente fino a dividersi (Kumar *et al.*, 2020).
- *Senescenza.* A differenza del meccanismo precedente, la senescenza è uno stato di arresto permanente del ciclo cellulare, caratterizzato da specifici cambiamenti dell'espressione genica e della morfologia. Tuttavia, i meccanismi con cui si instaura la senescenza cellulare sono ancora poco chiari. Si ipotizza che la senescenza sia causata da modificazioni epigenetiche che portano alla formazione di eterocromatina a livello di geni chiave, necessari per il passaggio delle cellule dalla fase G₁ alla fase S. Come le altre risposte indotte da p53, la senescenza può essere innescata da varie cause di stress, come la segnalazione di un oncogene attivato, l'ipossia o un accorciamento dei telomeri. Anche se anormali, le cellule senescenti non possono trasformarsi in senso neoplastico (Serrano *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2020).
- *Apoptosi.* L'apoptosi di cellule con danni irreversibili al DNA è il meccanismo protettivo estremo contro la trasformazione neoplastica. La p53 regola la trascrizione di vari geni proapoptotici della famiglia di proteine BCL2, come BAX e PUMA, che favoriscono l'attivazione delle caspasi e la morte cellulare attraverso la via intrinseca dell'apoptosi (Miyashita *et al.*, 1994; Kumar *et al.*, 2020).

I motivi per cui, a seconda dei casi, la p53 sia in grado di indurre la riparazione del DNA, la senescenza o l'apoptosi non sono del tutto chiari, ma sia la durata che il livello di attivazione della proteina sembrano essere fattori determinanti. È stato ipotizzato infatti che l'affinità di legame di p53 per i promotori e gli enhancer dei geni responsabili della riparazione del DNA, sia maggiore rispetto all'affinità per i geni proapoptotici. Pertanto secondo questa teoria, all'aumentare della p53, la prima risposta che si innesca è la riparazione del DNA. Se però la p53 resta ad alti livelli perché il DNA non può essere riparato o perché permangono alcuni stimoli stressanti cronici, allora si attivano meccanismi epigenetici che portano alla senescenza. In alternativa, se la p53 si accumula in quantità tale da attivare la trascrizione dei geni proapoptotici, la cellula muore. Questo schema generale non è però sufficiente a spiegare tutte le sfumature delle funzioni di p53, che a seconda del tipo cellulare e del contesto fisiopatologico può indurre preferenzialmente un certo tipo di risposta (Kumar *et al.*, 2020).

Diverse teorie hanno cercato di spiegare perché la p53 sia un oncosoppressore così potente. Da un lato, la capacità di arrestare o eliminare le cellule dopo un danno al DNA, e prima della divisione mitotica, suggerisce che la p53 possa prevenire l'insorgenza di tumori evitando l'accumulo progressivo di mutazioni oncogeniche (Livingstone *et al.*, 1992; Yin *et al.*, 1992). In questo modello, la perdita di funzione di p53 favorisce indirettamente la trasformazione neoplastica, a causa del continuo accumulo di mutazioni nelle cellule che sopravvivono e si moltiplicano (Kasthuber e Lowe, 2017). Dall'altro lato, la capacità di p53 di arrestare la proliferazione cellulare, come risposta all'espressione aberrante di oncogeni, indica un ruolo anche nel limitare le conseguenze di mutazioni oncogeniche. In quest'ottica la perdita di p53 favorisce direttamente lo sviluppo neoplastico, permettendo alle cellule con oncogeni attivati di moltiplicarsi senza sosta; ciò spiega perché le mutazioni di *TP53* agiscano in sinergia con gli oncogeni durante la trasformazione maligna (Serrano *et al.*, 1997). In entrambi i modelli, la p53 si comporta come un "guardiano del genoma" per limitare le conseguenze deleterie delle mutazioni (Lane, 1992; **Figura 2.1**).

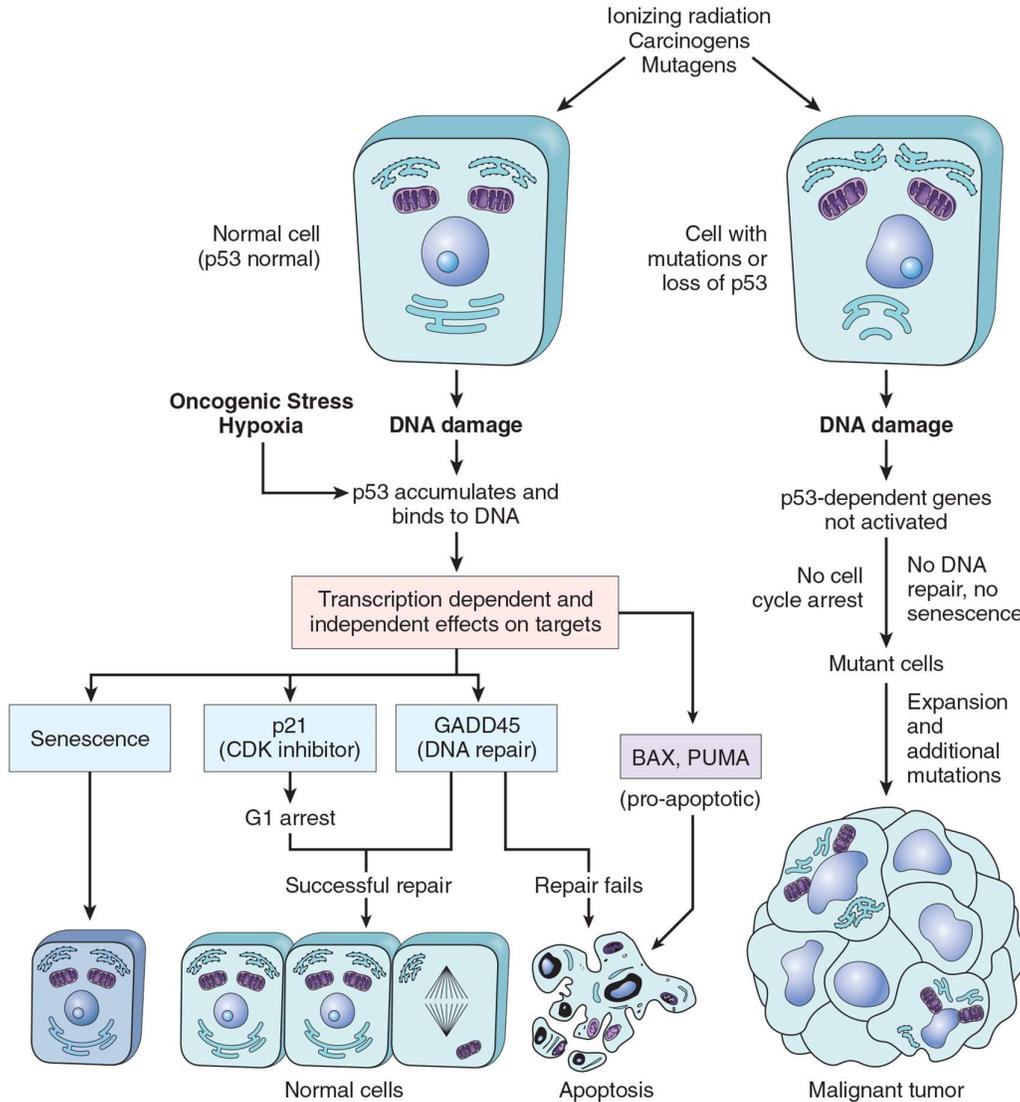


Figura 2.1. Ruolo di p53 nel mantenimento dell'integrità del genoma. In condizioni normali, la p53 attivata induce la trascrizione dei geni bersaglio, fra cui *CDKN1A* (codificante per p21, che interrompe il ciclo cellulare in G₁) e *GADD45*. Se il danno è riparabile, la cellula riprende il ciclo. Se la riparazione del DNA fallisce, p53 induce la senescenza o l'apoptosi. Quando invece il gene *TP53* è mutato, le cellule geneticamente alterate continuano a moltiplicarsi, con accumulo di mutazioni e rischio di trasformazione maligna (da Kumar *et al.*, 2020).

Oltre alle funzioni canoniche di mantenimento dell'integrità genomica, arresto del ciclo cellulare e apoptosi, la p53 è coinvolta in molti altri processi biologici, come ad esempio il metabolismo cellulare, determinando un effetto antiossidante, stimolando l'ossidazione degli acidi grassi e la gluconeogenesi (Kruiswijk *et al.*, 2015). In linea generale, la p53 tende a favorire il metabolismo catabolico rispetto a quello anabolico, con una riduzione della sintesi di

macromolecole come lipidi e proteine, necessarie in minor misura a causa dell'arresto del ciclo cellulare (Kumar *et al.*, 2020). Altri processi regolati da p53 sono l'autofagia, la differenziazione cellulare e una forma di morte cellulare ferro-dipendente, nota come ferroptosi (Olivos e Mayo, 2016; Kasthuber e Lowe, 2017).

Gli effetti biologici finali dipendenti da p53 sono molto complessi e possono variare sia dal punto di vista quantitativo che qualitativo, in funzione di numerosi fattori: la natura dello stimolo iniziale, il tipo di cellule coinvolte, le condizioni di stress microambientale, lo stato epigenetico, i set di geni trascritti e le interazioni fra le diverse vie molecolari (**Figura 2.2**). I meccanismi esatti attraverso i quali questi fattori influenzano l'attività della p53 non sono ancora del tutto conosciuti e necessitano di ulteriori ricerche (Kasthuber e Lowe, 2017).

Secondo i dati in letteratura, circa la metà delle neoplasie dell'uomo presenta una mutazione del gene *TP53*, sebbene sia la frequenza che la distribuzione delle mutazioni lungo la sequenza possano variare notevolmente a seconda del tipo di neoplasia (**Figura 2.3**). Anche se di solito la proteina p53 viene classificata genericamente come *wild type* o mutata, le mutazioni di *TP53* possono essere di svariate tipologie e verificarsi in differenti combinazioni, dando origine ad uno spettro di alterazioni fenotipiche e funzionali con diverso impatto biologico (Kasthuber e Lowe, 2017).

Le mutazioni di *TP53* più comuni e meglio caratterizzate sono di tipo missenso (mutazione puntiforme di un singolo nucleotide, che provoca il cambiamento di un aminoacido nella proteina), e interessano il dominio legante il DNA di p53. Da ciò si evince l'importanza cruciale di questo dominio proteico per svolgere l'azione oncosoppressiva (Kasthuber e Lowe, 2017). Le mutazioni missenso non sono uniformemente distribuite lungo la sequenza genica, ma si localizzano con maggior frequenza a livello di specifici codoni, definiti punti di *hotspot* (R175, G245, R248, R249, R273 e R282) (Petitjean *et al.*, 2007; Brosh e Rotter, 2009).

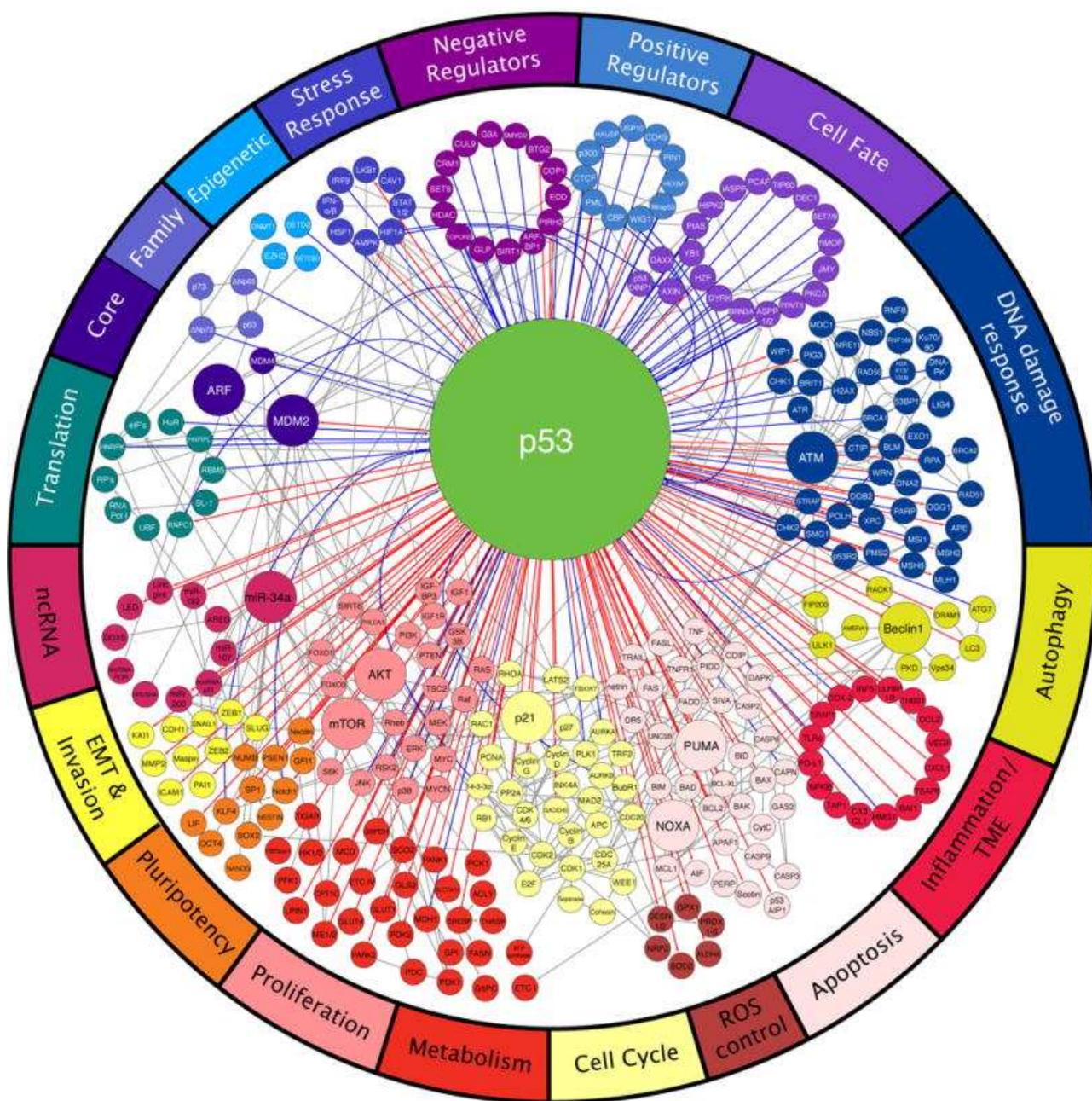


Figura 2.2 Sistemi regolatori a monte di p53 (in alto), che a sua volta controlla processi biologici distinti (in basso). Ogni cerchio rappresenta un gene ed ogni linea un'interazione (blu per i segnali diretti verso p53, rossa per i segnali in partenza da p53). Le vie effettrici dei processi biologici sono altamente interconnesse (linee grigie) (da Kasthuber e Lowe, 2017).

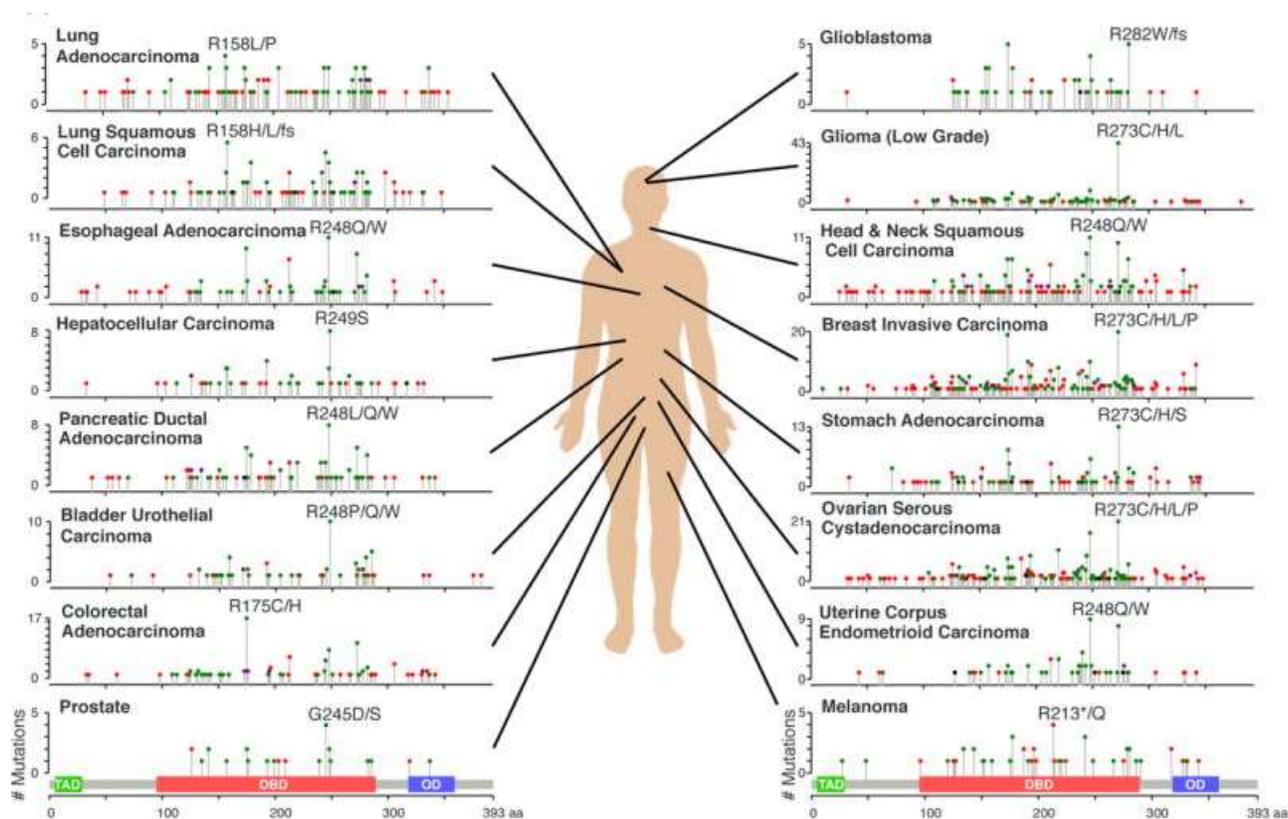


Figura 2.3 – Distribuzione delle mutazioni di *TP53* in 16 neoplasie maligne dell'uomo. Ciascun istogramma rappresenta il numero di mutazioni rilevate in ciascuna posizione della sequenza codificante per la proteina, comprendente il dominio di transattivazione (TAD), il dominio legante il DNA (DBD), e il dominio di oligomerizzazione (OD) illustrati in basso. I tipi di mutazioni comprendono missenso (verde), nonsense (rosso), *in frame indels* (nero) o mutazioni multiple (viola) (Kasthuber e Lowe, 2017).

Un altro 25% circa delle mutazioni è costituito da alterazioni di tipo nonsense e *frameshift*, che portano alla sintesi di proteine troncate, mentre le rimanenti sono SNV (*single-nucleotide variant*) del sito di splicing e mutazioni *indels in-frame*, con significato biologico incerto (Shirole *et al.*, 2016). Secondo l'ipotesi dei due colpi (*two-hit hypothesis*), per disabilitare la funzione di un oncosoppressore è necessaria la mutazione di entrambi gli alleli (Kumar *et al.*, 2020). Nel gene *TP53* umano, l'evenienza più frequente (25% delle neoplasie) è una mutazione puntiforme del primo allele, seguita da una delezione segmentale di ampiezza variabile del secondo allele, ma sono state identificate quasi tutte le combinazioni alleliche possibili (Liu *et*

al., 2016). Esistono tuttavia alcune eccezioni alla *two-hit hypothesis*, in quanto alcune mutazioni di *TP53* possono indurre un fenotipo dominante negativo, cioè una proteina in grado di impedire il funzionamento della p53 corretta, derivante dall'allele non mutato (Kasthuber e Lowe, 2017).

La presenza di diversi pattern mutazionali potrebbe in parte dipendere dagli agenti mutageni implicati nella cancerogenesi. Ad esempio, nel melanoma umano la mutazione puntiforme R213* è associata all'azione delle radiazioni ultraviolette, mentre nel carcinoma epatocellulare la mutazione R249S è legata all'esposizione alle aflatoossine (Kasthuber e Lowe, 2017).

In altri casi, la presenza di determinate mutazioni potrebbe essere il risultato di una selezione funzionale: le mutazioni correlate a un fenotipo vantaggioso per la sopravvivenza cellulare (e quindi a specifiche funzioni biologiche) sono quelle rilevate con maggior frequenza (Alexandrov *et al.*, 2016). Infatti, numerosi studi hanno descritto l'esistenza di specifiche varianti mutate di p53, caratterizzate non solo da una perdita delle funzioni normali (*loss of function*) ma anche dall'acquisizione di nuove proprietà fenotipiche (*gain of function*), in grado di favorire l'invasività tumorale, l'angiogenesi, la formazione di metastasi, la chemioresistenza e la riprogrammazione epigenetica (Aschauer e Muller, 2016). Inoltre, quando si verifica la delezione di una regione cromosomica più ampia del solo locus di *TP53*, possono essere inattivati anche altri geni oncosoppressori vicini, influenzando quindi il risultato biologico del danno genomico (Kasthuber e Lowe, 2017).

Le mutazioni di *TP53* vengono classificate, in base all'effetto sulla struttura proteica, in mutazioni di "contatto", che perturbano il legame con il DNA, e mutazioni di "conformazione", che determinano invece un ripiegamento anomalo della proteina. Tuttavia, attualmente non è possibile predire con certezza l'impatto funzionale delle due categorie (Kasthuber e Lowe, 2017).

Nel carcinoma squamocellulare del distretto cervico-facciale dell'uomo (HNSCC, *head and neck squamous cell carcinoma*), le mutazioni di *TP53* sono riportate con una frequenza variabile dal 30 al 70%. Questa variabilità può dipendere dalla tecnica di analisi impiegata, dal numero di esoni indagati, dalla regione geografica dei pazienti e dall'eziologia associata (Partridge *et al.*, 2007; Acha-Sagredo *et al.*, 2009). La maggior parte delle mutazioni riguarda il

dominio legante il DNA (esoni 4-9), in particolare due aree di *hotspot*: a livello di codoni 238-248 nell'esone 7 e di codoni 278-281 nell'esone 8. Inoltre, la maggioranza delle mutazioni colpisce il nucleotide guanina ed è associata ai carcinogeni presenti nel tabacco (Monteiro e Warnakulasuriya 2017). In queste neoplasie, la presenza di mutazioni di *TP53* è associata a una riduzione del tempo di sopravvivenza post-chirurgico e rappresenta un fattore prognostico indipendente per la risposta alla chemioterapia (Cabelguenne *et al.*, 2000; Poeta *et al.*, 2007).

Nei HNSCC negativi al Papillomavirus umano (HPV), caratterizzati da prognosi peggiore, *TP53* è spesso mutata, mentre nei tumori positivi a HPV i tempi di sopravvivenza sono più lunghi e *TP53* è in genere normale (*wild type*) (Rautava e Syrjanen, 2012).

Anche se le mutazioni di *TP53* rappresentano la causa più frequente della disregolazione di p53, la funzionalità di questa proteina può essere alterata anche con meccanismi non mutazionali: la formazione di complessi con proteine di origine virale (la proteina E6 nel caso dei Papillomavirus oncogeni), il sequestro anomalo nel citoplasma e la sovraespressione di MDM2 (Moll *et al.*, 1992; Oliner *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 2001).

La proteina p53 *wild type* non viene solitamente rilevata tramite colorazione immunohistochimica, a causa del breve tempo di emivita (15-20 minuti). Mutazioni di *TP53* possono invece indurre modificazioni conformazionali che stabilizzano la proteina, con conseguente accumulo nucleare di p53 rilevabile con immunohistochimica (Iggo *et al.*, 1990; Nambiar *et al.*, 2001). Inoltre, la p53 mutata perde la capacità di attivare l'espressione della proteina MDM2, che normalmente, in assenza di danni al DNA esercita un feedback negativo su p53. In questo modo viene favorito ulteriormente l'accumulo di p53 (Midgeley e Lane, 1997). L'espressione di p53 rappresenta pertanto un marker immunohistochimico indiretto della mutazione (Harris *et al.*, 1993; Ueda *et al.*, 1993).

Sebbene la correlazione fra la presenza mutazioni e l'espressione immunohistochimica sia in genere elevata, la presenza di ampie delezioni o di mutazioni con *stop* prematuro, che impediscono la sintesi della proteina, potrebbero causare una negatività immunohistochimica (Miller *et al.*, 1990; Nasir *et al.*, 2000). Inoltre, le mutazioni che determinano un'alterazione conformazionale non riconosciuta dall'anticorpo primario, generano falsi negativi. D'altro canto, le analisi mutazionali sono spesso limitate agli esoni 5-8 di *TP53*, il che può determinare

una sottostima della frequenza mutazionale (Nasir *et al.*, 2000). Nel carcinoma squamocellulare (SCC) orale umano l'espressione immunoistochimica di p53 è rilevabile nel 50-60% dei casi e mostra un buon livello di correlazione con la mutazione del gene, anche se la concordanza non è completa (Taylor *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2008; van Houten *et al.*, 2002; Monteiro *et al.*, 2012). Inoltre, la sovraespressione di p53 in questa neoplasia è associata a tempi di sopravvivenza peggiori (Oliveira *et al.*, 2008; Monteiro *et al.*, 2012).

Il ruolo chiave nei meccanismi di oncosoppressione e l'elevata frequenza di mutazioni nelle neoplasie rendono la p53, unitamente alla sua rete di interazioni intracellulari, un potenziale bersaglio di terapie antitumorali. È stato infatti dimostrato che i tumori portatori del gene *TP53 wild type* hanno maggiori probabilità di rispondere alla chemioterapia citotossica convenzionale, che danneggia il DNA inducendo l'apoptosi, rispetto ai tumori con mutazioni del gene (Kasthuber e Lowe, 2017; Kumar *et al.*, 2020). Una delle strategie terapeutiche ha come obiettivo quello di attivare, ed eventualmente potenziare, le normali funzioni oncosoppressive di p53. Il principale limite di questa modalità è che gli alleli mutati di *TP53* generano una proteina disfunzionante, che non può rispondere alla stimolazione farmacologica (Kasthuber e Lowe, 2017). Ad esempio, le nutline sono molecole in grado di inibire il legame fra la proteina MDM2 e p53. In questo modo la p53 non viene degradata e può accumularsi, inducendo l'apoptosi nelle cellule tumorali con il gene normale, ma non nelle cellule mutate (Vassilev *et al.*, 2004). Inoltre, alcuni *trial* clinici di fase I su pazienti con leucemia e liposarcoma hanno messo in evidenza effetti indesiderati importanti quali neutropenia e trombocitopenia (Andreeff *et al.*, 2016). Altre terapie in fase di studio sono invece focalizzate sulla proteina p53 mutata, con l'obiettivo di ripristinarne il funzionamento o di sopprimere le varianti con *gain of function*, che possono favorire l'invasività ed il potenziale metastatico (Aschauer e Muller, 2016). Le *metallochaperonine* sono molecole che potrebbero correggere il ripiegamento proteico della p53 mutata tramite il legame con ioni zinco, ripristinando così la capacità della proteina di legare il DNA (Blanden *et al.*, 2015). Per inibire la p53 mutata invece sono state proposte numerose molecole specifiche, ed anche l'immunoterapia, sfruttando le proprietà antigeniche della proteina (Crawford *et al.*, 1982; Parrales e Iwakuma 2015).

Nonostante i continui progressi nella comprensione della biologia molecolare di p53 nelle neoplasie, le conoscenze attuali sono ancora insufficienti per ottenere buoni risultati terapeutici nella pratica clinica. Le principali cause di insuccesso nella sperimentazione di nuove terapie comprendono tossicità e scarsa efficacia, spesso non previste nei modelli preclinici. Ciò mette in risalto la potenziale utilità dei modelli animali spontanei del cane e del gatto nella ricerca traslazionale in ambito oncologico (Supsavhad *et al.*, 2016a; Kastenhuber e Lowe, 2017; Rossa e Silva, 2019).

2.2 Disregolazioni di p53 in oncologia veterinaria

Diversi studi hanno effettuato analisi genetiche di *TP53* nelle neoplasie del cane, evidenziando mutazioni prevalentemente localizzate nel dominio legante il DNA.

Benché una mutazione di *TP53* nelle cellule della linea germinale sia stata descritta in un Bullmastiff, la maggior parte delle mutazioni nel cane avviene in cellule somatiche, durante l'oncogenesi o le terapie antineoplastiche (Veldohen *et al.*, 1998; Koshino *et al.*, 2016).

Le neoplasie in cui è stata riscontrata una maggior frequenza di mutazioni comprendono emangiosarcoma (59.6%), tumore maligno della guaina dei nervi (50%), osteosarcoma (59,1%) e sarcoma istiocitario (46%) (Nasir *et al.*, 2001; Asada *et al.*, 2017; Sakthikumar *et al.*, 2018; Megquier *et al.*, 2019). Nell'osteosarcoma è stata inoltre evidenziata un'associazione statisticamente significativa fra mutazione del gene e prognosi (Kirpensteijn *et al.*, 2008). In un recente lavoro è stato sequenziato l'intero esoma di 66 osteosarcomi del cane, evidenziando che *TP53* era il gene più frequentemente alterato (83% dei casi), per la presenza di mutazioni, delezioni o amplificazioni (Sakthikumar *et al.*, 2018).

Nel sarcoma istiocitario è stata riscontrata una mutazione ricorrente (un'inserzione delle due basi AT nell'esone 5), presente nel 41% dei casi totali esaminati. La frequenza dell'inserzione era significativamente più elevata nei cani con lesioni metastatiche rispetto ai pazienti senza metastasi. Tuttavia, la presenza di questa mutazione non era associata né alla sopravvivenza né alla risposta alla chemioterapia (Asada *et al.*, 2017; Asada *et al.*, 2019).

Altre neoplasie in cui sono state rilevate mutazioni di *TP53*, con minor frequenza, sono melanoma (19%), mastocitoma cutaneo (14,6%), linfoma (16%), tumori mammari (15%) e

tumori cerebrali 3,4% (Van Leeuwen *et al.*, 1996; York *et al.*, 2012; Koshino *et al.*, 2016; Vozdova *et al.*, 2019; Wong *et al.*, 2019). Nello studio sul linfoma, i cani con mutazione del gene hanno mostrato una percentuale di risposta alla chemioterapia inferiore (33%) rispetto ai cani privi di mutazioni (88%), ed anche la sopravvivenza era significativamente inferiore (Koshino *et al.*, 2016). Tuttavia, senza prima approfondire gli effetti funzionali delle specifiche mutazioni, non è ancora possibile attribuire alla p53 la causa della chemioresistenza nel linfoma canino, come invece è ritenuto probabile in medicina umana (Koshino *et al.*, 2016).

Anche l'espressione immunoistochimica di p53 nelle neoplasie del cane è stata valutata in diversi studi, la maggior parte dei quali non ha però indagato la correlazione fra espressione della proteina e corrispondente mutazione. Una concordanza del 50-83% fra sovraespressione di p53 e mutazione è stata comunque descritta da alcuni studi sui sarcomi ed i tumori mammari. (Lee *et al.*, 2004; Zacchetti *et al.*, 2007). Per i tumori mammari è stata anche riportata un'associazione fra disregolazioni di p53 e prognosi (Lee *et al.*, 2004). Tuttavia, uno studio più recente su una casistica più ampia di tumori mammari maligni, non ha evidenziato alcuna correlazione fra il comportamento biologico e la sovraespressione di p53, presente nel 20% dei casi (Munday *et al.*, 2019b). Un altro studio sul melanoma canino ha riportato pattern anormali di espressione di p53, in assenza di mutazioni nel dominio legante il DNA, ipotizzando che tali alterazioni potrebbero dipendere da interazioni con altre proteine o da mutazioni di altri domini di p53 (Koenig *et al.*, 2002).

L'eventuale ruolo prognostico di p53 è stato indagato anche nel mastocitoma cutaneo del cane. In uno studio la sovraespressione immunoistochimica della proteina era presente nel 44,6% dei casi, senza però alcun legame con la prognosi (Ginn *et al.*, 2000). L'espressione di p53 viene riportata in molte altre neoplasie del cane, fra cui carcinoma squamocellulare (68,8%), adenocarcinoma nasale (57,9%), emangiosarcoma (92,6%), osteosarcoma (43,8%) e linfoma (40%) (Gamblin *et al.*, 1997; Loukopoulos *et al.*, 2003; García-Iglesias *et al.*, 2020). Nel liposarcoma canino l'espressione di p53 sembra essere correlata ad una maggiore attività proliferativa e all'istotipo mixoide (Avallone *et al.*, 2020).

Per quanto riguarda le neoplasie del gatto, le mutazioni di *TP53* sono state identificate complessivamente nel 10-15% dei casi analizzati in vari studi (Okuda *et al.*, 1994; Mayr *et al.*,

1998a; Mayr *et al.*, 2000). Si tratta di una frequenza inferiore rispetto al cane e all'uomo, nonostante l'elevata somiglianza fra la proteina p53 umana e felina sia dal punto di vista strutturale che della capacità di transattivare i geni bersaglio. Questa differenza non è facilmente spiegabile, ma potrebbe dipendere dal numero relativamente basso di casi analizzati, da una diversa suscettibilità di p53 a mutazioni disfunzionali durante la cancerogenesi o da diversi agenti eziologici coinvolti nelle varie specie (Cardellino *et al.*, 2007). Un'altra ipotesi è che il gene *TP53* possa essere disregolato anche in altri modi. Uno studio sul sarcoma iniettivo felino ha infatti riportato la perdita somatica di eterozigosi (che corrisponde alla delezione di un allele) di *TP53* in 12 casi su 20 (60%), mentre mutazioni puntiformi erano presenti solo in 3 casi (15%). La perdita di un allele di *TP53* era associata alla comparsa di recidiva locale e ad una minore sopravvivenza (Banerji e Kanjilal, 2006). Un altro studio sul sarcoma iniettivo felino ha individuato mutazioni missenso in 5 casi su 21 (23,8%), con una buona correlazione con l'espressione immunohistochimica della proteina (Nambiar *et al.*, 2000). Le altre neoplasie feline in cui sono state individuate mutazioni comprendono linfoma (12,5%), carcinoma mammario (10-14,3%), fibrosarcoma (3,4-20%) e un caso di osteosarcoma (Mayr *et al.*, 1995; Okuda *et al.*, 1994; Mayr *et al.*, 1998b; Mayr *et al.*, 2000).

L'elevata prevalenza di *p53 wild type* nelle neoplasie feline potrebbe essere vantaggiosa per l'applicazione di terapie molecolari che favoriscono l'attività fisiologica di questa proteina. Secondo uno studio preliminare su linee cellulari di linfoma felino, la nutlina-3 potrebbe essere utile per stabilizzare la p53 normale e favorirne l'azione oncosoppressiva (Mochizuki *et al.*, 2012).

La sovraespressione di p53 è stata dimostrata in varie neoplasie del gatto. Uno studio su 40 sarcomi iniettivi felini ha evidenziato marcata positività nucleare nel 42,5% dei casi, suggestiva di mutazione del gene anche se questo aspetto non è stato indagato. In un altro 20% di casi era presente debole positività nucleare, di dubbia interpretazione anche perché occasionalmente presente nei cheratinociti non neoplastici adiacenti al tumore e nell'epidermide dei controlli negativi (Nambiar *et al.*, 2001). Una debole positività immunohistochimica potrebbe rappresentare un lieve accumulo di p53 mutata, oppure la presenza di p53 *wild type*. È stato infatti descritto che la p53 può essere talvolta rilevabile anche in cellule normali, a causa

dell'interazione con proteine cellulari e virali, per anomalie della degradazione, sequestro della proteina o aumento dell'espressione in risposta a stress o insulti di vario tipo (Moll *et al.*, 1992; Maltzman e Czyzyk, 1984; Nambiar *et al.*, 2001). Un altro studio sul sarcoma iniettivo ha evidenziato una positività immunohistochimica per p53 rispettivamente del 55% e 81%, utilizzando due differenti anticorpi. Nel 44% dei casi è stata rilevata positività citoplasmatica, che secondo gli autori potrebbe essere dovuta ad un sequestro della p53 mutata nel citoplasma, ma non è possibile escludere una colorazione artefattuale. Questa positività citoplasmatica era associata ad un minor tempo di recidiva locale, ma non alla sopravvivenza (Hershey *et al.*, 2005). Sempre nel gatto, l'espressione di p53 è stata dimostrata nel carcinoma mammario (14-33%), nel carcinoma polmonare (25%), in altri adenocarcinomi (16%), nell'osteosarcoma (50%) e nell'emangiosarcoma (14%). Sono invece risultati negativi 11 linfomi e 3 fibrosarcomi esaminati in vari studi (Nasir *et al.*, 2000; Rasotto *et al.*, 2011; D'Costa *et al.*, 2012).

2.3 Disregolazioni di p53 nel carcinoma squamocellulare felino

Le informazioni in letteratura relative al gene *TP53* nel SCC felino sono scarse. Solo uno studio finora ha effettuato un'analisi mutazionale degli esoni 4-8 su 5 SCC felini a diversa localizzazione, evidenziando in un solo caso di SCC orale una mutazione nell'esone 4. La correlazione con l'espressione immunohistochimica della proteina non è stata indagata. (Mayr *et al.*, 2000).

L'espressione aberrante di p53 è comunque ampiamente documentata anche nel carcinoma squamocellulare orale felino. Teifke e Löhr nel 1996 hanno descritto per la prima volta in questa neoplasia una positività immunohistochimica nucleare per p53, rilevata in 3 casi su 6 (60%). Successivamente, altri studi hanno evidenziato una positività immunohistochimica nel 24-65% dei casi (Snyder *et al.*, 2004; Tannehill-Gregg *et al.*, 2006; Supsavhad *et al.*, 2016b).

In molte neoplasie umane associate al fumo, fra cui anche il SCC orale, è riconosciuta una relazione causale fra l'esposizione ai carcinogeni del tabacco e le disregolazioni di *TP53* (Curigliano *et al.*, 1996; Pfeifer *et al.*, 2002). Una relazione simile è stata ipotizzata nel FOSSC da alcuni autori, i quali hanno valutato se fosse presente un'associazione fra l'espressione immunohistochimica di p53 e l'esposizione dei gatti al fumo passivo. Pur non avendo raggiunto

la significatività statistica, i risultati erano fortemente suggestivi della presenza di tale associazione. La sovraespressione immunohistochimica di p53 era presente in 15 casi su 23 (65%). Le neoplasie dei gatti esposti a fumo passivo avevano una probabilità 4,5 volte superiore di sovraesprimere p53, rispetto ai gatti non esposti ($P = 0,19$). Inoltre fra i soggetti esposti, quelli con un tempo di esposizione di almeno 5 anni mostravano una probabilità di sovraespressione 7 volte maggiore ($P = 0,38$). Si tratta di supposizioni che per essere verificate o smentite necessitano di studi epidemiologici su casistiche più numerose (Snyder *et al.*, 2004).

La sovraespressione di p53 è stata rilevata anche nel SCC cutaneo felino, con una frequenza variabile del 40-65% a seconda degli studi (Teifke e Löhr 1996; Murakami *et al.*, 2000; Munday e Aberdein, 2012).

Nei SCC umani causati dai Papillomavirus oncogeni, il pattern immunohistochimico è tipicamente caratterizzato da sovraespressione della proteina p16 e assenza della positività per le proteine p53 e pRb, a causa della degradazione favorita rispettivamente dalle proteine virali E6 ed E7. Al contrario, i SCC cutanei umani causati dai raggi UV esprimono in genere pRb e p53, con negatività per p16. (Munday e Aberdein, 2012; Thompson *et al.*, 2016). In uno studio su SCC cutanei felini, carcinomi bowenoidi (ritenuti essere causati da Papillomavirus) e placche virali è stato osservato un comportamento simile all'uomo per p16 e pRb, in relazione alla presenza del Papillomavirus felino Munday e Aberdein, 2012. L'espressione di p53 invece non ha mostrato alcuna associazione alla presenza virale o all'esposizione ai raggi ultravioletti. È stato quindi ipotizzato che nel gatto il meccanismo d'azione del Papillomavirus sia parzialmente diverso dall'uomo e non determini la degradazione di p53 (Munday e Aberdein, 2012). Tuttavia, uno studio più recente ha dimostrato *in vitro* la capacità della proteina E6 del Papillomavirus felino di indurre la degradazione di p53, tramite la formazione di un complesso ternario con p53 e l'ubiquitina ligasi E6AP (Altamura *et al.*, 2018). Un altro studio sui SCC *in situ* del gatto ha evidenziato l'espressione di p53 in un'elevata percentuale di cheratosi attiniche (79%), mentre nei carcinomi bowenoidi era del 18% (Favrot *et al.*, 2009). È quindi possibile che le disregolazioni di p53 nel SCC felino siano il risultato di più meccanismi concomitanti (**Tabella 2.1**).

Tabella 2.1 – Espressione immunohistochimica (IHC) di p53 e mutazioni di *TP53* riscontrate in SCC felini e lesioni epiteliali preneoplastiche.

Studio	Lesione	N. casi	Clone IHC p53	Espressione IHC	Analisi mutazionale	Casi con mutazioni
Favrot <i>et al.</i> , 2009	Cheratosi attinica	14	CM-1	79% (11)		
Favrot <i>et al.</i> , 2009	Carcinomi bowenoidi <i>in situ</i>	22	CM-1	18% (4)		
Munday e Aberdeen, 2012	Carcinomi bowenoidi <i>in situ</i>	10	PAb240	50% (5)		
Teifke e Löhr, 1996	SCC orali	5	PAb240	60% (3)		
Teifke e Löhr, 1996	SCC cutanei	20	PAb240	65% (13)		
Sironi <i>et al.</i> , 1999	SCC congiuntivale	1	Pab240	100% (1)		
Mayr <i>et al.</i> , 2000	SCC a varie localizzazioni	5			Esoni 4-8	20% (1)
Nasir <i>et al.</i> , 2000	SCC a varie localizzazioni	24	CM-1 ^a	46% (11)		
Murakami <i>et al.</i> , 2000	SCC cutanei	20		40% (8)		
Snyder <i>et al.</i> , 2004	SCC orali	23	CM-1	65%(15)		
Tannehill-gregg <i>et al.</i> , 2006	SCC orali	60	Ab-3	30%(18)		
Munday e Aberdeen, 2012	SCC cutanei in aree esposte ai raggi UV	19	PAb240	53% (10)		
Munday e Aberdeen, 2012	SCC cutanei in aree non esposte ai raggi UV	11	PAb240	36% (4)		
Supsavhad <i>et al.</i> , 2016b	SCC orali	41	PAb240	24% (10)		

^astudio immunocitochimico

Capitolo 3

Metilazione del DNA

3.1 Cenni di epigenetica

L'epigenetica viene definita come lo studio delle modificazioni, reversibili ed ereditabili dell'espressione genica (e quindi del fenotipo) che non comportano alterazioni della sequenza primaria di DNA. I profili epigenetici dei geni giocano un ruolo importante nella regolazione di vari processi biologici, fra cui lo sviluppo embrionale, l'imprinting genetico, il rinnovamento cellulare e l'inattivazione del cromosoma X (Tsai e Baylin 2011). I principali meccanismi di regolazione epigenetica sono tre: la metilazione del DNA, le modifiche della cromatina (modificazioni covalenti degli istoni) e l'espressione di RNA non codificanti (**Figura 3.1**). Un altro fattore epigenetico importante è il posizionamento dei nucleosomi. La disregolazione di questi meccanismi può alterare l'espressione e la funzione dei geni, portando allo sviluppo di patologie metaboliche, autoimmuni, neurologiche e anche tumori (Kanwal *et al.*, 2010; Sharma *et al.*, 2010).

Le alterazioni epigenetiche infatti, concorrono insieme a quelle genetiche al processo *multistep* di trasformazione neoplastica maligna. Le alterazioni epigenetiche avvengono in genere precocemente durante lo sviluppo delle neoplasie e possono precedere quelle genetiche (Kanwal *et al.*, 2015; Kumar *et al.*, 2020).

La metilazione del DNA è il meccanismo epigenetico meglio studiato in oncologia. Le principali alterazioni della metilazione che possono influenzare l'espressione genica sono l'ipometilazione, l'ipermetilazione e la perdita di *imprinting* (Tsai e Baylin 2011; Kanwal *et al.*, 2015).

Le modificazioni degli istoni regolano la struttura della cromatina, influenzando anche in questo caso la funzione genica e la carcinogenesi. Gli istoni sono strutture proteiche attorno alle quali sono avvolte le basi nucleotidiche del DNA, formando le subunità denominate nucleosomi. L'insieme degli istoni e del DNA costituisce la cromatina. Il rafforzamento o

l'indebolimento del legame tra il filamento del DNA e le proteine istoniche influenzano il grado di compattazione della cromatina, e quindi l'accesso al DNA da parte dei fattori di trascrizione. Questo meccanismo avviene in genere tramite modifiche post-traduzionali degli istoni, ad esempio l'acetilazione, che determina un'apertura della struttura cromatinica e una maggiore attività trascrizionale dei geni (Lo e Sukumar 2008; Kanwal *et al.*, 2015)

Infine, anche gli RNA non codificanti (ncRNA) possono regolare le funzioni della cromatina e l'espressione genica. Sono classificati in *small* ncRNA (meno di 200 nucleotidi) e *large* ncRNA (>200 nucleotidi). Gli *small* ncRNA comprendono *small nucleolar RNA* (snoRNA), PIWI-*interacting* RNA (piRNA), *small interfering* RNA (siRNA), e microRNA (miRNA). Molte di queste famiglie mostrano un elevato grado di conservazione fra le specie e sono coinvolte nel silenziamento genico trascrizionale o post-trascrizionale, tramite l'appaiamento alle loro sequenze target complementari. Fra questi ncRNA, i miRNA sono i maggiormente studiati, e sono stati associati a numerose malattie oltre che alle neoplasie (Mitra *et al.*, 2012; Kanwal *et al.*, 2015). I miRNA sono piccole molecole di RNA non codificante della lunghezza di circa 22 nucleotidi, in grado di regolare numerose funzioni biologiche come il ciclo cellulare, la proliferazione, l'apoptosi e l'angiogenesi. Di conseguenza, anomalie dell'attività dei miRNA possono favorire la carcinogenesi (Greenberg *et al.*, 2014).

3.2 Le basi molecolari della metilazione

La metilazione del DNA consiste nell'aggiunta covalente di un gruppo metile (-CH₃) in posizione 5 dell'anello di citosina (**Figura 3.2A**). Nei mammiferi, questa modificazione avviene prevalentemente in corrispondenza dei siti CpG, cioè dinucleotidi della sequenza lineare di basi dove una citosina è seguita da una guanina; i corrispondenti nucleosidi deossicitidina e deossiguanosina sono quindi unicamente separati da un gruppo fosfato (Kulis ed Esteller, 2010). Il contenuto complessivo di CpG nel genoma è relativamente basso. Tipicamente, le CpG non sono casualmente distribuite ma si concentrano in *cluster* denominati isole CpG (CGI), in prevalenza localizzate nella regione promoter o nel primo esone dei geni. È stato calcolato che circa il 60% dei promoter umani è caratterizzato da un alto contenuto di CpG (Saxonov *et al.*, 2006).

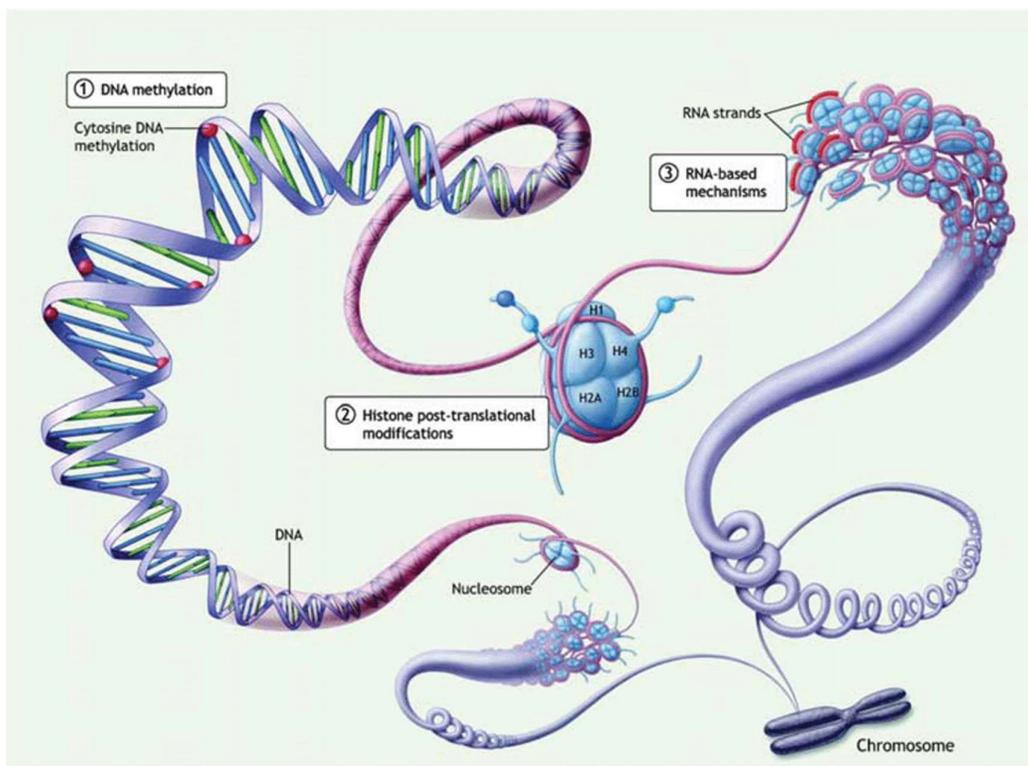


Figura 3.1 I tre principali meccanismi epigenetici. (1) La metilazione del DNA. (2) Le modificazioni post-traduzionali degli istoni. (3) I meccanismi basati sugli RNA non codificanti (da Lee *et al.*, 2014).

Tuttavia, di per sé la densità di CpG non influenza l'espressione genica: l'effetto sui geni dipende esclusivamente dallo stato di metilazione. Normalmente, le CGI sono non metilate nei geni trascrizionalmente attivi, mentre i geni silenziati sono caratterizzati da metilazione nelle regioni promoter (ad esempio, geni tessuto-specifici o geni legati all'embriogenesi) (Kulis ed Esteller, 2010; **Figura 3.2B**)

I pattern di metilazione del DNA vengono attuati e mantenuti dalla famiglia di enzimi DNA metiltransferasi (DNMT, *DNA cytosine-5 methyltransferase*), che trasferiscono il gruppo metile da una S-adenosil-metionina alla citosina. Le tre principali DNMT sono DNMT1, DNMT3A e DNMT3B (Kulis ed Esteller, 2010; Pfeifer, 2018). Queste proteine enzimatiche sono codificate in maniera indipendente e grazie alla loro attività coordinata viene instaurato il pattern globale di metilazione della citosina. DNMT1 è un enzima di mantenimento, che ristabilisce nei filamenti di DNA neosintetizzati il pattern di metilazione del filamento stampo, preservando così lo stato di metilazione delle CGI nelle nuove generazioni cellulari. DNMT3A

e DNMT3B sono enzimi *de novo*, che metilano CpG in precedenza non metilate; sono altamente espressi durante lo sviluppo embrionale e minimamente espressi nei tessuti adulti (Kulis ed Esteller 2010; Kanwal *et al.*, 2015).

Nelle cellule normali, la metilazione è localizzata prevalentemente nelle sequenze ripetitive di DNA, come i DNA satellite e gli elementi interspersi brevi (*short interspersed nuclear elements*, SINE) e lunghi (*long interspersed nuclear elements*, LINE). La metilazione di queste regioni contribuisce al mantenimento dell'integrità genomica (Kanwal *et al.*, 2015).

Il livello di metilazione delle singole CpG, così come la distribuzione di CpG metilate e non metilate lungo il genoma, sono relazionati alla fase di sviluppo dell'organismo ed ai processi di differenziazione cellulare. Nell'embriogenesi precoce e nelle cellule germinali primordiali avvengono due ampi rimodellamenti del genoma, rappresentati da un'onda di demetilazione seguita da una fase di rimetilazione. Successivamente si verificano modificazioni più fini del pattern di metilazione, legate allo sviluppo di specifiche linee cellulari ed alla formazione dei tessuti (Pfeifer, 2018).

I meccanismi attraverso i quali la metilazione del DNA contribuisce ad inibire l'espressione genica non sono ancora completamente chiari, e diverse ipotesi sono state proposte. Ad esempio, la metilazione del DNA potrebbe creare una barriera fisica, bloccando l'accesso dei fattori di trascrizione ai siti di legame nelle regioni promoter. Secondo un altro modello, è determinante il legame del gruppo metile con le proteine MBD (*methyl CpG-binding domain*). Queste proteine a loro volta inducono il reclutamento di alcuni enzimi istone-deacetilasi che portano a chiusura della struttura cromatinica e silenziamento genico (Kulis ed Esteller 2010; **Figura 3.3**). Nei mammiferi sono state finora identificate sei proteine MBD: MECP2 (*methylcytosine-binding protein 2*), MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 e Kaiso (Kanwal *et al.*, 2015).

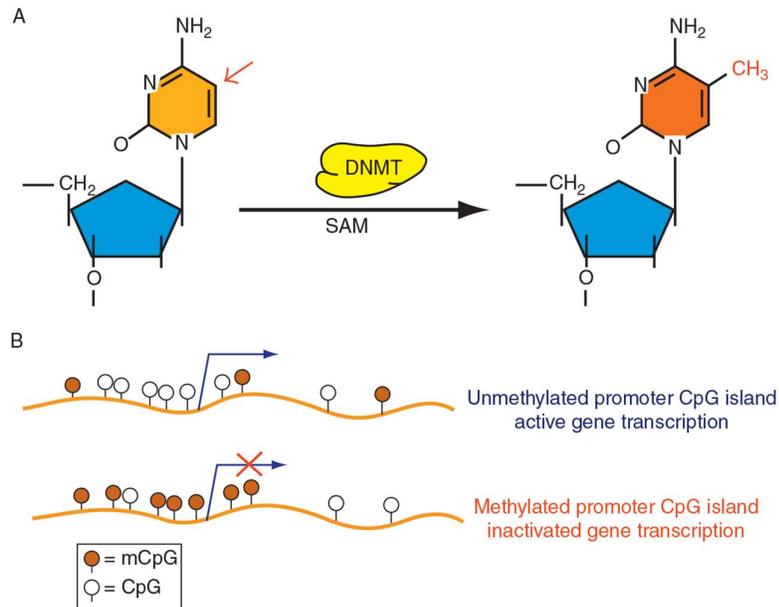


Figura 3.2 Metilazione della citosina. (A) Metilazione in posizione 5 della citosina, catalizzata da DNMT in presenza di una S-adenosil-metionina (SAM). (B) In alto: le CpG non metilate (di colore bianco) nella regione promoter non bloccano la trascrizione, il gene viene espresso. In basso: Quando invece le CpG sono metilate (mCpG), il gene viene silenziato (da Kulis ed Esteller, 2010).

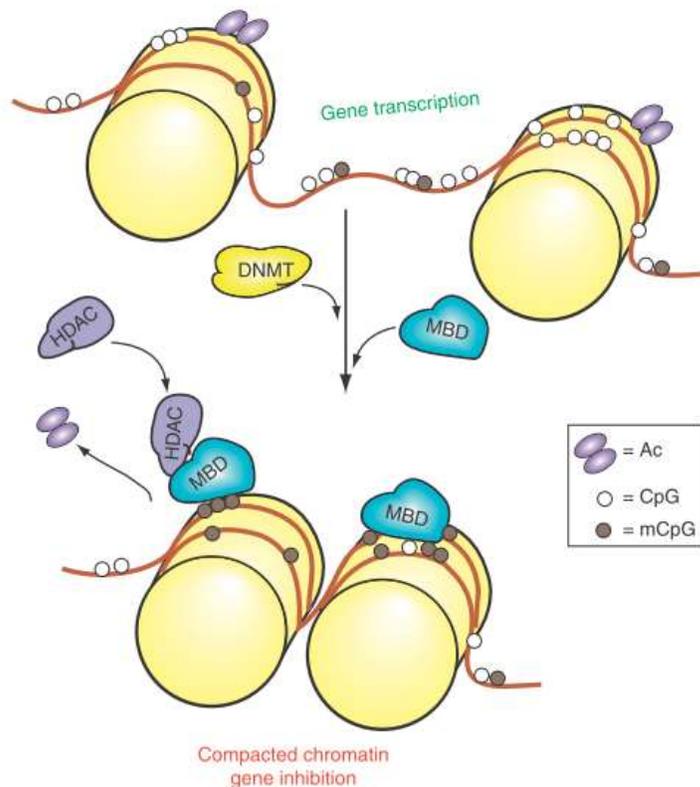


Figura 3.3 Meccanismo di silenziamento genico mediato dalla metilazione del DNA. La metilazione è seguita dall'associazione alle proteine MBD, che a sua volta recluta gli enzimi istone-deacetilasi (HDAC). Ciò determina compattazione della cromatina ed inibizione dell'espressione genica (da Kulis ed Esteller, 2010).

3.3 La metilazione aberrante del DNA in oncologia

La prima osservazione di metilazione aberrante del DNA in tessuti neoplastici risale ad oltre 40 anni fa, quando l'analisi globale della metilazione con tecniche cromatografiche ha evidenziato una riduzione dei livelli di metilazione in vari tumori maligni rispetto ai corrispondenti tessuti normali. Queste alterazioni sono state successivamente confermate sia a livello di specifici geni che di sequenze ripetitive del DNA, tramite *Southern blotting* (Feinberg e Vogelstein 1983; Pfeifer, 2018).

Oltre alla riduzione globale di 5-metilcitosina (5mC), l'altro fenomeno comunemente riscontrato nei tumori maligni è l'ipermetilazione delle isole CpG. Si ipotizza che in condizioni normali, specifici meccanismi di protezione impediscano la metilazione delle CGI o la rimuovano, grazie all'enzima *Ten-Eleven-Translocation* (TET), nel caso in cui la metilazione sia avvenuta erroneamente per azione delle DNMT. Nella maggior parte delle neoplasie maligne umane, se non in tutte, questi sistemi protettivi risultano insufficienti, con conseguente ipermetilazione delle CGI (Pfeifer, 2018).

I meccanismi attraverso cui queste alterazioni insorgono nei tumori sono ancora poco chiari. Secondo una teoria, poiché l'ipo- e l'ipermetilazione sono tipiche di diverse regioni genomiche, potrebbero essere favorite da diverse configurazioni strutturali della cromatina. Un'altra ipotesi, riguardante l'ipermetilazione delle CGI, è che questa anomalia possa essere favorita da mutazioni di geni coinvolti nella regolazione della cromatina, come il gene dell'enzima TET (Wu e Zhang 2017; Pfeifer, 2018).

Inoltre, nonostante le moderne tecniche di biologia molecolare consentano una mappatura pressoché completa della metilazione sull'intero genoma, è ancora difficile distinguere con esattezza le alterazioni epigenetiche con un ruolo funzionale nella carcinogenesi da quelle che sono probabilmente soltanto una conseguenza della condizione maligna. Si tratta di una situazione simile a quella ben studiata per le mutazioni, che vengono distinte in mutazioni *driver*, considerate cruciali per la trasformazione maligna, e mutazioni innocue definite *passenger*. Va inoltre considerato che alcune alterazioni della metilazione potrebbero essere secondarie ad altri eventi a livello di cromatina; ad esempio, una modifica nell'espressione di

un gene potrebbe essere causato dall'acquisizione o dalla perdita di un certo fattore di trascrizione, e questo cambio di occupazione dello spazio potrebbe indurre variazioni della metilazione. Sulla base di queste considerazioni, una modifica dello stato di metilazione può essere definita *driver* se provoca l'inattivazione uno specifico gene, e questa inattivazione determina conseguenze fenotipiche che promuovono la trasformazione maligna o ne favoriscono la progressione (Kalari e Pfeifer 2010; Pfeifer, 2018).

3.3.1 Ipometilazione del DNA nell'oncogenesi

Nella maggior parte dei tessuti dei mammiferi, circa il 3-5% delle citosine totali è metilato. Durante il processo di ipometilazione globale del genoma tumorale, il numero di citosine metilate si riduce del 5-20%. Poiché questo fenomeno avviene in modo generalizzato, è stato difficile associarlo a specifiche vie molecolari o a geni influenzati da questa perdita di 5mC (**Figura 3.4**).

Una possibile interpretazione è che la perdita di metilazione renda la struttura cromatinica meno compatta, causando instabilità genomica. Le regioni ripetitive del DNA, che rappresentano circa il 55% del genoma umano, sono particolarmente suscettibili alla perdita di 5mC. Queste regioni comprendono le sequenze intersperse (LINE e SINE), sequenze retrovirali endogene e sequenze centromeriche di DNA satellite (Pfeifer, 2018). Fra queste, le sequenze intersperse sono particolarmente abbondanti, pertanto il loro stato di metilazione viene utilizzato come marker surrogato del livello di metilazione globale (Lisanti *et al.*, 2013). Poiché la metilazione del DNA coopera con un meccanismo repressivo dell'istone H3 (metilazione della lisina 9) per silenziare le sequenze genomiche ripetitive, l'ipometilazione del DNA rappresenta una modalità per attivare l'espressione di queste regioni. In particolare, l'attivazione della sequenza LINE-1 è stata associata alla carcinogenesi (Pfeifer, 2018).

Un altro fenomeno associato all'ipometilazione globale è il riarrangiamento su larga scala dell'architettura tridimensionale della cromatina, che può portare a rotture cromosomiali inappropriate e riarrangiamento dei cromosomi stessi. È tuttavia difficile determinare se l'ipometilazione sia effettivamente la causa di queste perturbazioni strutturali o il contrario (Pfeifer, 2018).

Anche l'ipometilazione del DNA relativo a geni specifici può contribuire allo sviluppo delle neoplasie. Esiste infatti una categoria di geni che può attivarsi nei tumori, a causa dell'ipometilazione nelle regioni promoter. Si tratta di geni specifici delle linee germinali, denominati “*cancer testis genes*” o “*cancer germ line genes*” in quanto molti di essi risultano attivi solo durante la spermatogenesi, mentre nei tessuti somatici sono normalmente silenziati grazie alla metilazione. Poiché questi geni sono stati descritti per la prima volta nel melanoma come antigeni riconosciuti da linfociti T, una loro famiglia è stata denominata MAGE (*melanoma antigen gene*). L'espressione di questi geni è stata poi rilevata in molti altri tipi di tumori, ma non nei tessuti normali, suggerendo la loro potenziale utilità come marker diagnostici, ed anche come target terapeutici, per via del loro peculiare pattern di espressione tumore-specifico (Van Tongelen *et al.*, 2017; Pfeifer *et al.*, 2018). Per alcune proteine MAGE è stata inoltre dimostrata la capacità di legare e inattivare importanti oncosoppressori come la proteina p53 e la pRb (Ladelfa *et al.*, 2012). Si pensa che l'attivazione combinata di questi geni abbia un impatto maggiore sull'oncogenesi rispetto all'azione dei singoli geni (Pfeifer, 2018).

L'ipometilazione globale può inoltre influenzare il pattern di trascrizione dei geni, in particolare in base allo stato di metilazione delle regioni trascrizionali (*gene bodies*). Anche se questo meccanismo non è del tutto chiarito, sembra che la perdita di metilazione in queste regioni possa portare alla trascrizione di sequenze intrageniche non previste, che interferiscono con l'attività genica. Questa perturbazione globale della fedeltà di trascrizione potrebbe favorire l'oncogenesi (Pfeifer, 2018).

Inoltre, nelle regioni trascrizionali dei geni possono essere presenti promoter alternativi, anch'essi regolati dalla metilazione. In tal caso, l'ipometilazione potrebbe attivare trascritti alternativi, altrimenti soppressi dalla metilazione intragenica (Maunakea *et al.*, 2010; Pfeifer, 2018).

3.3.2 Ipermetilazione del DNA nell'oncogenesi

L'ipermetilazione su scala genomica delle isole CpG è stata evidenziata non solo nella maggior parte dei tumori primari e metastatici dell'uomo, ma anche in lesioni pre-neoplastiche, come le cripte aberranti del colon e la cheratosi attinica della cute (Hanley *et al.*, 2017; Rodriguez-

Paredes *et al.*, 2018). Il ruolo dell'ipermetilazione di un particolare gene nell'oncogenesi risulta ben evidente quando l'evento si verifica in sequenze regolatrici come il promoter o l'enhancer. In questi casi, l'ipermetilazione si associa in genere a silenziamento del gene. Quando invece l'ipermetilazione riguarda aree ricche di CpG nella regione di trascrizione, può esitare in almeno due possibili condizioni. La prima consiste nel silenziamento di uno o più promoter alternativi, con una modifica dell'espressione di specifiche isoforme proteiche (Maunakea *et al.*, 2010). Nella seconda condizione, l'ipermetilazione del *gene body* si associa a sovraespressione genica, almeno su scala genomica globale. Quando questo fenomeno coinvolge geni con proprietà oncogeniche, può favorire la carcinogenesi (Liang e Weisenberger 2017).

Ad ogni modo, l'ipermetilazione delle CGI avviene più comunemente nelle regioni promoter determinando un silenziamento genico. In tal caso può essere ipotizzato un effetto favorente la carcinogenesi se il gene colpito riguarda una delle funzioni biologiche cruciali per la trasformazione maligna, quali il controllo della proliferazione cellulare, l'induzione di apoptosi e senescenza, la riparazione del DNA e la stabilità genomica, l'angiogenesi, l'adesione cellulare, l'invasività, la formazione di metastasi e la modulazione dell'infiammazione. Il ruolo dell'ipermetilazione dei promoter nella trasformazione maligna può essere avvalorato quando gli stessi geni si ritrovano frequentemente mutati nei tumori (Pfeifer, 2018).

Molti geni comunemente ipermetilati codificano per fattori di trascrizione, e la loro inattivazione può impedire alle cellule di mantenere la loro linea di differenziazione, inducendo caratteristiche affini a quelle delle cellule staminali; ciò rappresenta un ulteriore stimolo alla trasformazione cellulare in senso neoplastico (Pfeifer, 2018).

Evidenze crescenti in medicina umana indicano la potenziale utilità delle metilazioni aberranti del DNA come biomarcatori tumorali. Le possibili applicazioni cliniche di questi marker comprendono la valutazione del rischio di trasformazione maligna, la diagnosi precoce con test non invasivi, la determinazione dell'origine del tumore, il *follow-up*, la previsione della risposta ai trattamenti e la prognosi. Queste informazioni possono risultare cruciali per impostare protocolli terapeutici personalizzati, per esempio evitando trattamenti più aggressivi quando non necessari (Heyn e Esteller 2012; Locke *et al.*, 2019).

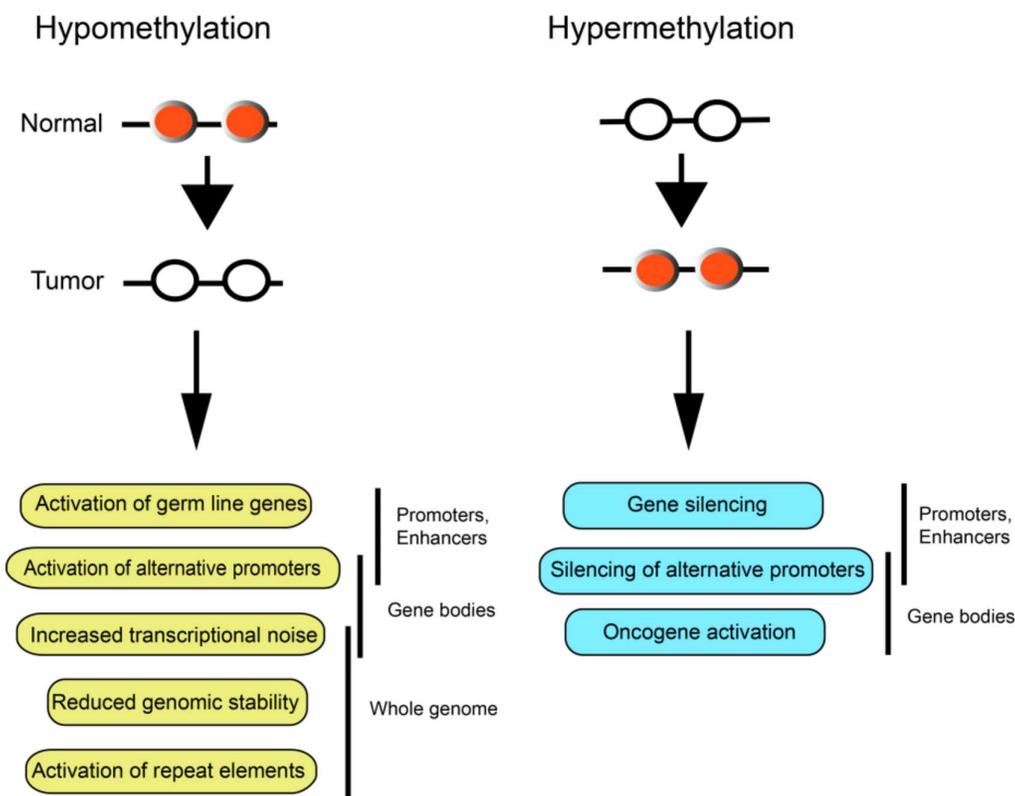


Figura 3.4 Effetti dell'ipometilazione e dell'ipermetilazione del DNA nei tumori maligni. L'ipometilazione può portare a perturbazione dell'espressione genica o instabilità genomica. Similmente, l'ipermetilazione del DNA può favorire alterazioni dei pattern di espressione genica con differenti meccanismi. I cerchi bianchi indicano siti CpG non metilati, i cerchi rossi siti CpG metilati (da Pfeifer, 2018).

3.3.3 Stato di metilazione nel carcinoma squamocellulare dell'uomo

Il carcinoma squamocellulare umano di testa e collo (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC), è il sesto tumore più frequente a livello mondiale, e comprende differenti entità sia per localizzazione (cavità nasali, bocca, seni paranasali, faringe e laringe) che per le caratteristiche clinico-patologiche. La sede di insorgenza più comune è comunque la cavità orale, con un'incidenza di circa 389 mila casi all'anno (Mascolo *et al.*, 2012; Rivera, 2015). Il carcinoma squamocellulare orale umano (*human oral squamous cell carcinoma*, HOSCC) è una neoplasia aggressiva, e nonostante i progressi degli ultimi decenni nella prevenzione e nello sviluppo di terapie multimodali, il tasso di sopravvivenza è rimasto invariato (50% a 5 anni dalla diagnosi). La prognosi sfavorevole è principalmente legata alla scarsa risposta ai trattamenti,

specialmente se la diagnosi avviene in fase avanzata. Questo sottogruppo di pazienti con prognosi peggiore è caratterizzato da spiccata invasività tumorale, sviluppo di metastasi e rischio di insorgenza di nuovi carcinomi orali, per effetto della cancerizzazione di campo (Mascolo *et al.*, 2012; Castilho *et al.*, 2017).

La carcinogenesi orale è un processo *multistep* influenzato sia da fattori endogeni che ambientali; fra questi ultimi, i principali sono il consumo abituale di alcool, il consumo di tabacco (sia sotto forma di fumo che di prodotti masticabili) e le infezioni da Papillomavirus umani oncogeni (HPV). Questi fattori predisponenti provocano nelle cellule epiteliali un'ampia gamma di alterazioni sia epigenetiche che genetiche. La combinazione di queste alterazioni con gli stessi fattori di rischio favorisce l'instabilità genomica, portando al graduale sviluppo di lesioni pre-maligne e successivamente carcinomi (Mascolo *et al.*, 2012; Irimie *et al.*, 2018).

I meccanismi epigenetici disregolati nel HOSCC comprendono la metilazione del DNA, le modificazioni degli istoni e le alterazioni dei microRNA (Mascolo *et al.*, 2012). La metilazione aberrante del DNA è stata associata a vari fattori di rischio per questo tumore, in particolare il fumo, il consumo di alcool ed anche l'infiammazione cronica (Irimie *et al.*, 2018). Ad esempio, è stata riportata un'associazione fra ipometilazione globale e fumo, mentre il consumo di alcool è stato correlato all'ipermetilazione dei promotori di vari geni implicati nell'oncogenesi (Baba *et al.*, 2009; Supic *et al.*, 2011).

Complessivamente, oltre 40 geni con funzioni oncosoppressive sono stati individuati ipermetilati, e conseguentemente silenziati nel HOSCC, anche se la correlazione fra disregolazione epigenetica e carcinogenesi orale non è stata dimostrata per tutti. Questi geni rivestono diverse funzioni, fra cui il controllo del ciclo cellulare (p16/*CDKN2A*, p15/*CDKN2B*), l'apoptosi (p14/*CDKN2A*, *DAPK*, *TP73* e *RASSF1A*), le vie di segnalazione Wnt (*APC*, *WIF1*, *RUNX3*), l'adesione intercellulare (E-caderina) e la riparazione del DNA (*MGMT* e *hMLH1*) (Mascolo *et al.*, 2012; **Tabella 3.1**).

Inoltre, diversi studi hanno rilevato geni con metilazione aberrante in lesioni orali displastiche e nei tessuti istologicamente normali adiacenti al HOSCC, supportando l'ipotesi che tali alterazioni siano eventi precoci durante carcinogenesi orale e che possano rappresentare marker di progressione maligna. Ad esempio, in questi contesti è stata evidenziata l'ipermetilazione dei

geni p14/*CDKN2A*, p16/*CDKN2A*, p15/*CDKN2B*, *MGMT*, *DAPK*, *GSTP1*, *RARB* e *TP53* (Mascolo *et al.*, 2012).

Ad alcune disregolazioni è stato attribuito un ruolo prognostico. Ad esempio, l'ipermetilazione del promoter di *DAPK* nei margini di escissione chirurgica del HOSCC sembra essere un fattore prognostico negativo indipendente per la sopravvivenza (Supic *et al.*, 2011). Tuttavia, non sempre è stata evidenziata una chiara correlazione fra l'ipermetilazione di questi geni e la progressione delle lesioni orali displastiche o la recidiva post-chirurgica. Serviranno pertanto ulteriori approfondimenti, possibilmente su casistiche più numerose (Mascolo *et al.*, 2012). Diversi studi hanno inoltre dimostrato che le alterazioni della metilazione sono facilmente rilevabili in campioni di saliva e brushing orali, con buona sensibilità e specificità (Morandi *et al.*, 2017a; Cristaldi *et al.*, 2019).

Dai dati in letteratura emergono quindi notevoli potenzialità per i test non invasivi basati sulla metilazione, non solo per la diagnosi precoce del HOSCC ma anche per ottenere informazioni prognostiche, impostare terapie personalizzate e monitorare il decorso (Morandi *et al.*, 2017a; Cristaldi *et al.*, 2019). Per validare l'efficacia di questi test nella pratica clinica saranno necessari ulteriori studi, volti a definire protocolli standardizzati per l'analisi dei biomarcatori e l'interpretazione dei risultati (Cristaldi *et al.*, 2019).

Un altro filone di ricerca riguarda lo sviluppo di farmaci in grado di ripristinare i meccanismi epigenetici disregolati durante la cancerogenesi, che a differenza delle mutazioni sono di natura reversibile. Questi farmaci sono attualmente suddivisi in due gruppi principali: inibitori delle istone-deacetilasi (HDACi) e inibitori delle DNA metiltransferasi (DNMTi), fra cui la 5-azacitidina. I primi studi su queste molecole hanno mostrato risultati incoraggianti, come ad esempio la capacità di ridurre gli effetti di carcinogeni chimici e il miglioramento della risposta alla chemioterapia e radioterapia (Castilho *et al.*, 2017).

Tabella 3.1 – Geni comunemente silenziati dalla metilazione del promoter nel HOSCC (da Mascolo *et al.*, 2012).

Gene	Locus	Funzione	Alterazioni
<i>ABO</i>	9q34	Antigeni dei gruppi sanguigni	Ipermetilazione
<i>APC</i>	5q21	Trasduzione del segnale	Ipermetilazione
<i>ATM</i>	11q22-q23	Oncosoppressore	Ipermetilazione
<i>C/EBPa</i>	19q13	Oncosoppressore	Ipermetilazione
<i>CDKN2A</i>	9p21	Ciclo cellulare	LOH, Ipermetilazione
<i>CRABP2</i>	1q21	Regolatore trascrizionale nucleare	Ipermetilazione
<i>DAPK</i>	9q	Apoptosi	Ipermetilazione
<i>DCC</i>	18q21	Oncosoppressore	Ipermetilazione
<i>DKK3</i>	11p	Regolatore trascrizionale	Ipermetilazione
<i>E-cadherin</i>	16q22	Trasduzione del segnale	Ipermetilazione
<i>EDNRB</i>	13q22	Trasduzione del segnale	Ipermetilazione
<i>GSTP1</i>	11q13	Detossificazione da agenti cancerogeni	Ipermetilazione
<i>H3K4</i>	1q21.2	Istone	Ipermetilazione
<i>HIN1</i>	12p13	Oncosoppressore	Ipermetilazione
<i>Hmlh1</i>	3p21	Riparazione del DNA	Ipermetilazione
<i>LHX6</i>	9q33	Regolatore trascrizionale	Ipermetilazione
<i>MGMT</i>	10q26	Riparazione del DNA	Ipermetilazione
<i>MINT family</i>	/	/	Ipermetilazione
<i>miR137</i>	1p21.3	Oncosoppressore	Ipermetilazione
<i>miR193a</i>	17q11.2	Oncosoppressore	Ipermetilazione
<i>MX1</i>	21q22	/	Ipermetilazione
<i>p14</i>	9p21	Apoptosi	LOH, ipermetilazione
<i>p15</i>	9p21	Ciclo cellulare	LOH, delezione, mutazione, ipermetilazione
<i>p16</i>	9p21	Ciclo cellulare	LOH, mutazione, delezione, ipermetilazione
<i>p53</i>	17p13	Oncosoppressore	Mutazione, ipermetilazione
<i>p73</i>	1p36	Apoptosi	Ipermetilazione
<i>PTEN</i>	10q23	Oncosoppressore	Ipermetilazione
<i>RARB2</i>	17q21	Regolatore trascrizionale nucleare	Ipermetilazione
<i>RASSF-1</i>	3p21	Apoptosi	Ipermetilazione
<i>Rb</i>	13q14	Oncosoppressore	Ipermetilazione, mutation
<i>RUNX3</i>	1p36	Regolatore trascrizionale	Ipermetilazione
<i>SFRP1</i>	8p11.21	Regolatore trascrizionale	Ipermetilazione
<i>SFRP1-2-4-5</i>	8p11.21, 4q31.3, 7p14.1 e 10q24.1	Regolatore trascrizionale	Ipermetilazione
<i>TCF21</i>	6q23-q24	Interazioni epiteliali-mesenchimali	Ipermetilazione
<i>THBS1</i>	15q15	Interazioni intercellulari e cellula-matrice	Ipermetilazione
<i>TIMP3</i>	22q12	Interazione epitelio-mesenchimale	Ipermetilazione
<i>WIF1</i>	12q14	Regolatore trascrizionale	Ipermetilazione
<i>σ-14-3-3</i>	1p36	Trasduzione del segnale	Ipermetilazione

LOH: *Loss of heterozygosity* (perdita di eterozigosi)

3.4 Analisi della metilazione in oncologia veterinaria

Negli ultimi anni l'interesse scientifico per le metilazioni del DNA sta crescendo anche in oncologia veterinaria, sia per le potenziali applicazioni cliniche negli animali da compagnia che per studi comparativi sulle neoplasie proposte da tempo come modelli spontanei di patologia umana. Una di queste è senza dubbio il linfoma del cane, in particolare il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL, *diffuse large B-cell lymphoma*), che rappresenta il sottotipo più comune in questa specie e condivide con il linfoma non-Hodgkin umano numerose caratteristiche fenotipiche e genotipiche (Marconato *et al.*, 2013a; Mudaliar *et al.*, 2013). Uno studio ha analizzato l'intero metiloma del DLBCL canino, identificando 1194 isole CpG con diverso livello di metilazione rispetto a campioni di linfonodi normali. In particolare, 1011 sequenze erano ipermetilate e prevalentemente localizzate nei promoter, in altre regioni a monte o negli esoni; le restanti 183 sequenze, ipometilate, erano prevalentemente a livello intragenico o nelle regioni a valle. Complessivamente erano coinvolti da queste alterazioni 823 geni, fra i quali erano presenti molti geni della famiglia PcG (*Polycomb group protein*), che regolano il bilanciamento tra proliferazione e differenziazione cellulare durante lo sviluppo e contribuiscono al mantenimento delle cellule staminali. È stato quindi ipotizzato che le cellule del DLBCL possedano un pattern epigenetico caratteristico delle cellule staminali, che si potrebbe instaurare già all'origine della trasformazione neoplastica (in linea con la teoria delle *cancer stem cells*), o secondariamente durante la progressione. Fra i DLBCL sono stati inoltre identificati alcuni sottotipi epigenetici correlati al decorso clinico, suggerendo che l'accumulo di queste alterazioni possa influenzare l'aggressività biologica (Ferraresso *et al.*, 2017).

Altri studi sul linfoma del cane si sono focalizzati su singoli geni, come l'oncosoppressore *TFPI2*, il cui promoter è risultato essere ipermetilato nel DLBCL rispetto ai linfonodi di cani sani. L'espressione del gene inoltre, indagata con *real time* RT-PCR, era significativamente inferiore nei linfomi, suggerendo che l'ipermetilazione di *TFPI2* ne influenzi negativamente la trascrizione (Ferraresso *et al.*, 2014). Un altro lavoro ha investigato il gene *DAPK*, che agisce da oncosoppressore sensibilizzando le cellule a vari segnali apoptotici, ed è stato riportato che l'ipermetilazione delle isole CpG di questo gene era un fattore prognostico negativo

indipendente nel DLBCL canino, similmente a quanto descritto nel DLBCL umano (Sato *et al.*, 2018). L'ipermetilazione di p16/*CDKN2A* è stata associata alla ridotta espressione di mRNA in linee cellulari di linfoma canino, indicando quindi che l'ipermetilazione rappresenta un possibile meccanismo di inattivazione anche per questo gene oncosoppressore (Fujiwara-Igarashi *et al.*, 2014).

Nell'ottica dell'utilizzo di queste alterazioni epigenetiche come biomarcatori, uno studio ha indagato la metilazione globale del genoma nei leucociti del sangue periferico di cani con linfoma multicentrico, confrontandola con controlli sani. Complessivamente, nei cani con linfoma è stata evidenziata ipometilazione globale del DNA, nonché un pattern di metilazione anomalo in oltre 500 geni (Epiphany *et al.*, 2019). Anche nel linfoma gastrointestinale di cane sono stati evidenziati pattern di metilazione aberrante tramite un'analisi del genoma su larga scala. In particolare sono state rilevate CpG ipermetilate nelle regioni promoter di 61 geni (Ohta *et al.*, 2020).

Meno informazioni sono disponibili riguardo al linfoma del gatto. Uno studio del 2017 ha testato *in vitro* l'effetto della 5-azacitidina, un inibitore delle metiltransferasi (DNMT). La 5-azacitidina si lega in modo irreversibile alla DNMT durante la replicazione del DNA, impedendo il distacco dell'enzima dal DNA e bloccando quindi la sua funzione di mantenimento della metilazione nei nuovi filamenti sintetizzati. L'applicazione di questo inibitore ha determinato una riduzione dose-dipendente della proliferazione cellulare in tutte e tre le linee cellulari testate di linfoma felino (Fujita e Kaneda, 2017).

Lo stesso trattamento è stato sperimentato su linee cellulari di melanoma umano e canino, ottenendo una sovraespressione di miR-203, un microRNA ad azione oncosoppressiva, noto per essere sottoregolato in queste due neoplasie. Inoltre, nelle cellule di melanoma è stata evidenziata la metilazione delle isole CpG a monte della sequenza codificante per miR-203, ma non nei melanociti normali (Noguchi *et al.*, 2015).

Ulteriori neoplasie del cane in cui è stata analizzata la metilazione del DNA sono la leucemia mieloide acuta (AML, *acute myeloid leukemia*), il carcinoma mammario, il mastocitoma e l'osteosarcoma. Nella AML sono stati riscontrati pattern eterogenei di metilazione aberrante, sia ipermetilati che ipometilati. È stato inoltre indagato lo stato mutazionale dei geni relativi

alla famiglia delle DNA metiltransferasi DNMT3, che nella AML dell'uomo presentano mutazioni determinanti per la disregolazione epigenetica. Nel gene (*DNMT3A*), il cui ortologo è tipicamente mutato nella leucemia mieloide acuta dell'uomo, non sono state riscontrate mutazioni, mentre era presente una mutazione deleteria omozigote nel gene *DNMT3L*, con maggiore frequenza rispetto ai controlli sani. Tuttavia, l'assenza di una correlazione fra lo stato mutazionale di *DNMT3L* e la metilazione globale, e l'occasionale presenza della stessa mutazione anche nei controlli, suggeriscono che nel cane potrebbero esistere meccanismi epigenetici compensatori non ancora scoperti (Bronzini *et al.*, 2017).

Nel carcinoma mammario è stato valutato lo stato di metilazione del gene per il recettore estrogenico (ESR α). Sia nel cane che nell'uomo, i tumori mammari biologicamente più aggressivi mostrano perdita di espressione di ESR α , che nell'uomo è stata attribuita alla metilazione di isole CpG nel promoter del corrispondente gene (*ESR1*). Nel gene *ESR1* canino invece, sono state individuate CpG intrageniche, non associate a promoter né differenzialmente metilate fra i gruppi esaminati (carcinomi, tumori benigni e mammella normale). Questi reperti suggeriscono che nel cane la sottoregolazione di ESR α dipenda da meccanismi diversi rispetto all'uomo (Brandão *et al.*, 2018).

Nel mastocitoma cutaneo del cane, è stato investigato lo stato di metilazione globale tramite immunocitochimica, impiegando un anticorpo monoclonale per la 5-metilcitosina. Nei mastocitomi ad alto grado, la positività nucleare per l'anticorpo era più debole rispetto ai tumori di basso grado, indicando quindi ipometilazione globale nelle forme meno differenziate e più aggressive (Morimoto *et al.*, 2017). Uno studio più recente su mastocitomi cutanei e sottocutanei del cane, ha valutato lo stato di metilazione del gene *KIT*, già notoriamente affetto da mutazioni di vari esoni, e del gene *TP53*. Nelle regioni regolatorie di questi geni sono state individuate diverse CpG metilate, anche se con frequenza sporadica (Vozdova *et al.*, 2019).

Infine, un lavoro sull'osteosarcoma canino ha investigato il pattern di metilazione del promoter di *PDGFR β* , codificante un recettore per il fattore di crescita derivato dalle piastrine. PDGFR β è un importante recettore tirosinchinasico che può essere sovraespresso e favorire la proliferazione delle cellule neoplastiche. Negli osteosarcomi esaminati il promoter di *PDGFR β* era totalmente demetilato, ma la demetilazione non era correlata al livello di espressione del

recettore, variabile da lieve a marcata. È stato quindi ipotizzato che nella regolazione dell'espressione di PDGFR β siano coinvolti anche meccanismi post-trascrizionali, come ad esempio i microRNA (Gentilini *et al.*, 2020).

Contributo Sperimentale

Capitolo 4

Analisi delle disregolazioni di p53 nel carcinoma squamocellulare orale felino

4.1 Introduzione

Il carcinoma squamocellulare è il tumore maligno della cavità orale più frequente nel gatto, costituendo circa il 60-70% delle neoplasie maligne in questa sede. (Stebbins *et al.*, 1989; Bilgic *et al.*, 2015; Liptak, 2019).

Il carcinoma squamocellulare orale felino (FOSCC, *feline oral squamous cell carcinoma*) è localizzato più frequentemente a livello di lingua/regione sublinguale e gengiva. Clinicamente può presentarsi in modo variabile, da una lesione necrotico-ulcerativa a una neoformazione nodulare di consistenza dura o compatta, in genere associata a spiccata invasività locale e lisi ossea precoce (Bilgic *et al.*, 2015; Liptak, 2019). Nonostante sia riportata la possibilità di metastasi ai linfonodi regionali e più raramente ai polmoni, la morte dei pazienti avviene più comunemente per complicazioni legate alla malattia locale, prima che le metastasi diventino clinicamente rilevanti (Postorino-Reeves *et al.*, 1993; Hayes *et al.*, 2007; Bilgic *et al.*, 2015). A causa della localizzazione e della rapida progressione locale del tumore, la diagnosi è spesso tardiva, in una fase in cui tutte le opzioni terapeutiche quali chirurgia, radioterapia e chemioterapia, risultano poco efficaci. Nella maggior parte dei casi la prognosi è infausta, ed anche con un approccio terapeutico multimodale, il tempo di sopravvivenza mediano supera raramente i 12 mesi (Marconato *et al.*, 2013b; Piegols *et al.*, 2018; Liptak, 2019).

La proteina p53, codificata dal gene oncosoppressore *TP53*, contrasta la trasformazione e la crescita neoplastica prevenendo la replicazione di cellule geneticamente danneggiate (Finlay *et al.*, 1989; Kumar *et al.*, 2020). In condizioni fisiologiche prive di stimoli stressanti, la proteina p53 ha un'emivita di 5-20 minuti nella maggior parte dei tipi cellulari e viene mantenuta a bassi livelli, pertanto non è in genere rilevabile con metodiche immunoistochimiche (IHC) (Giaccia e Kastan, 1998). Mutazioni di *TP53* possono indurre cambiamenti conformazionali che

stabilizzano la proteina, determinano un accumulo nucleare di p53 rilevabile con IHC (Iggo *et al.*, 1990; Baas *et al.*, 1994; Nambiar *et al.*, 2001).

Le mutazioni somatiche di TP53 sono le alterazioni genetiche più comunemente riscontrate nel carcinoma squamocellulare umano di testa e collo (HNSCC, *head and neck squamous cell carcinoma*), con una prevalenza che può raggiungere l'85% dei casi, e sono state associate ai carcinogeni presenti nel tabacco (Brennan *et al.*, 1995; Partridge *et al.*, 2007; Zhou *et al.*, 2016). Anche l'espressione IHC di p53 è un riscontro frequente nel HNSCC, ed è storicamente considerata un'evidenza indiretta delle mutazioni, anche se la discordanza fra queste due alterazioni può raggiungere il 40% dei casi (Taylor *et al.*, 1999; Gasco e Crook, 2003).

Nel carcinoma squamocellulare orale felino, l'espressione IHC di p53 è stata rilevata nel 24-65% dei casi (Teifke e Löhr, 1996; Snyder *et al.*, 2004; Supsavhad *et al.*, 2016). In uno studio è stata inoltre ipotizzata un'associazione fra espressione di p53 nel FO SCC ed esposizione passiva al fumo di tabacco (Snyder *et al.*, 2004). Escludendo una segnalazione aneddotta di una mutazione di *TP53* nel FO SCC, nessuno studio ha analizzato sistematicamente la presenza di mutazioni di *TP53* in questa neoplasia, né la loro correlazione con l'espressione proteica (Mayr *et al.*, 2000). La caratterizzazione del panorama mutazionale di p53 nel FO SCC potrebbe aiutare a comprendere la patogenesi molecolare di questo tumore, anche nell'ambito di studi comparativi con la controparte umana.

I principali obiettivi di questo studio sono stati (1) valutare se l'espressione IHC di p53 riflette accuratamente lo stato mutazionale di *TP53* nel FO SCC e (2) investigare la relazione fra disregolazioni di p53 ed esposizione ambientale al fumo di tabacco nei gatti. Inoltre, la prevalenza dell'espressione di p53 e delle mutazioni di *TP53* nel FO SCC è stata confrontata con lesioni infiammatorie orali e mucosa orale normale, per valutare l'importanza delle disregolazioni di p53 nello sviluppo di questa neoplasia.

4.2 Materiali e metodi

4.2.1 Criteri d'inclusione e informazioni anamnestiche

Lo studio è parte integrante del progetto Salice, finanziato grazie al bando Alma Idea Junior dell'Università di Bologna.

È stata effettuata una ricerca retrospettiva relativa agli anni 2010-2018 nell'archivio del Servizio di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) dell'Università di Bologna, al fine di identificare campioni istologici di FOSSC o infiammazione cronica orale. Per confermare la diagnosi tutte le sezioni istologiche sono state riesaminate. Sono stati inclusi nello studio tutti i casi consecutivi di FOSSC, nonché 10 casi selezionati di granuloma eosinofilo e 10 di gengivostomatite cronica. In aggiunta a questi, sono stati collezionati in modo prospettico, in sede autoptica, 10 campioni istologici di mucosa orale con aspetto microscopico normale, da gatti con almeno 7 anni deceduti per cause non collegate a patologie orali. Questi campioni sono stati prelevati a livello di gengiva premolare mascellare. Dalle cartelle cliniche dei pazienti sono state raccolte le informazioni relative a segnalamento e localizzazione dei tumori. I proprietari dei pazienti sono stati intervistati telefonicamente o via mail per recuperare informazioni sull'esposizione al fumo passivo. Le informazioni sono state classificate nel modo seguente: nessuna esposizione (i proprietari non fumano in casa, o i gatti vivono solo all'aperto); esposizione lieve (1-5 sigarette/giorno fumate in casa); esposizione moderata (6-10 sigarette/giorno fumate in casa); esposizione intensa (più di 10 sigarette/giorno fumate in casa). La disponibilità di queste informazioni non è stata considerata criterio d'inclusione.

4.2.2 Parametri istologici

Tutti i campioni istologici esaminati erano stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina, sezionati a 4 μm di spessore e colorati con ematossilina-eosina (EE). Per i casi di FOSSC è stato valutato l'istotipo secondo i criteri pubblicati in precedenza (Nemec *et al.*, 2012; Munday *et al.*, 2017), il grado istologico (solo per l'istotipo convenzionale) secondo la classificazione di Broders (Goldschmidt e Goldschmidt, 2017) e la conta mitotica (MC, *mitotic count*). Per la MC è stato valutato il numero totale di figure mitotiche in un'area pari a 2,37 mm quadrati (corrispondente a 10 campi microscopici consecutivi con obiettivo 40x ed oculare 10x con numero di campo 22 mm), secondo i criteri proposti da Meuten *et al.*, 2016. La conta è stata effettuata evitando le zone di necrosi o flogosi e selezionando a medio ingrandimento le aree con maggiore attività proliferativa; in queste aree sono state addizionate le mitosi presenti in

dieci campi microscopici a forte ingrandimento (HPF, *high power field*), consecutivi e non sovrapposti.

4.2.3 Analisi immunostochimica

Per indagare l'espressione di p53, ulteriori sezioni dei casi di FOSSC, granuloma eosinofilo, gengivostomatite cronica e mucosa orale normale sono state sottoposte a colorazione IHC con un anticorpo commerciale ad uso umano (clone Pab240, BD Biosciences, San Jose, CA, USA), la cui reattività nei tessuti del gatto è stata validata in precedenza (Teifke e Löhr 2004, Snyder *et al.*, 2004; Supsavhad *et al.*, 2016b). Il blocco delle perossidasi endogene è stato eseguito con incubazione per 10 minuti in una soluzione di perossido di idrogeno allo 0,9% in tampone fosfato salino (PBS) (0,01 M; pH 7,2). Per lo smascheramento antigenico le sezioni sono state immerse in tampone citrato a pH 6 e sottoposte a 4 cicli di 5 minuti ciascuno in forno microonde a 750 W. Dopo 4 lavaggi da 5 minuti ciascuno in PBS contenente Tween-20 0,01% (p9416, Sigma Aldrich-Merck, Darmstadt, Germania) e latte magro 0,01%, le sezioni sono state pre-incubate con siero di capra al 20% diluito in PBS contenente albumina di siero bovino (BSA) 1% per 20 minuti. Successivamente, le sezioni sono state incubate in camera umida, a temperatura ambiente, con l'anticorpo primario diluito 1:100 in PBS con BSA 1% per 80 minuti. Dopo altri 4 lavaggi di 5 minuti in PBS contenente Tween-20 0,01% e latte magro 0,01%, i siti di legame dell'anticorpo primario sono stati identificati incubando le sezioni per 30 minuti in camera umida, a temperatura ambiente, con un anticorpo secondario biotinilato di capra anti-topo (Dako, Glostrup, Danimarca), diluito 1:100 in PBS con BSA 1%. Per il rilevamento della reazione immunostochimica è stato applicato il kit commerciale streptavidina-biotina-perossidasi (Vectastain Elite ABC kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), incubando a temperatura ambiente per 30 minuti; come cromogeno è stata impiegata la 3,3-diaminobenzidina (DAB tablets, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA). Infine i preparati sono stati risciacquati in PBS e quindi in acqua corrente, sottoposti a colorazione di contrasto (*ematossilina di Papanicolaou*), disidratati e montati con DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Un FOSSC positivo per p53 è stato usato come controllo positivo per l'anticorpo primario, mentre per il controllo negativo è stato ommesso l'anticorpo primario. Sono

stati considerati positivi i casi con almeno il 20% di cellule epiteliali immunoreattive per p53, in linea con studi precedenti (Munday e Aberdein 2012 Supsavhad *et al.*, 2016b). Solo l'immunoreattività nucleare è stata considerata positività specifica, e l'interpretazione della colorazione IHC è stata effettuata senza conoscere lo stato mutazionale di *TP53*.

4.2.4 Analisi mutazionale

L'analisi mutazionale di *TP53* è stata effettuata presso l'unità di Neurologia, IRCCS Istituto di Scienze Neurologiche di Bologna, Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie dell'Università di Bologna, Ospedale "Bellaria". Per tutti i casi di FOSSC, granuloma eosinofilo, gengivostomatite cronica e mucosa orale normale, sono stati analizzati tramite *Next Generation Sequencing* (NGS) gli esoni 5-8 del gene *TP53*, codificanti per il dominio proteico legante il DNA. I primer utilizzati e le coordinate cromosomiche sono indicati nella **Tabella 4.1**. Per ciascun caso, a partire dai tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina, sono state allestite in una provetta eppendorf 5 sezioni da 10 µm. L'estrazione del DNA dai campioni è stata effettuata tramite il kit commerciale MasterPure Complete DNA extraction (Epicentre, Madison, WI, USA). I casi con mancata estrazione del DNA sono stati esclusi dallo studio. È stata poi allestita una PCR *Multiplex* con applicazione di primer marcati, al fine di generare una libreria di ampliconi *locus*-specifici. La preparazione della libreria comprendeva due fasi: una prima sessione di PCR per amplificare il DNA target (arricchimento), e una seconda PCR più breve (8 cicli) per consentire il *barcoding* del DNA, necessario per l'identificazione univoca dei casi. Il *barcoding* è stato effettuato mediante il kit Index Nextera (Illumina, San Diego, California, USA), come descritto in precedenza (Morandi *et al.*, 2017b). Dopo ciascuna sessione di PCR, il materiale amplificato è stato purificato tramite biglie magnetiche (MagSi-NGSPREP, MagnaMedics, Geleen, Olanda) e quantificato con il fluorimetro Quantus (Promega, Milano, Italia). Il sequenziamento profondo del DNA è avvenuto con il sistema MiSEQ (Illumina, San Diego, California, USA), secondo il protocollo del produttore. Sono stati considerati mutati i casi con una o più alterazioni della sequenza nucleotidica negli esoni amplificati del gene *TP53* felino, risultanti in una modificazione aminoacidica con impatto funzionale negativo sulla proteina, sulla base del *software PolyPhen-2*, e con una VAF (*Variant Allele Frequency*) > 0,1 che corrisponde a una percentuale di cellule mutate nel campione > 10% (Adzhubei *et al.*, 2010).

Tabella 4.1 Primer e coordinate degli esoni indagati del gene *TP53* felino

Esoni	Primer <i>forward</i>	Primer <i>reverse</i>	Coordinate genomiche
<i>TP53</i> esone 5	AGTACTCCCCTCCCCTCAAC	GCTCACCATCGCTACTGTCA	Chrom E1, strand -: 2451253-2451447 Lunghezza amplicone: 194 bp
<i>TP53</i> esone 6	ATTCTCCCCGATTGCTCT	CTCCCAGAGACCCCAGATG	Chrom E1, strand -: 2451035-2451199 Lunghezza amplicone: 164 bp
<i>TP53</i> esone 7	ACTCGGCCGGATCTTCTCT	CGGTAGCACGGGAGAGAGT	Chrom E1, strand -: 2450673- 2450857 Lunghezza amplicone: 184 bp
<i>TP53</i> esone 8	TGCCTCCAGCTTCTGTCTTC	CTCCCTGCCTCYTCTCGTC	Chrom E1, strand -: 2450289- 2450488 Lunghezza amplicone: 199 bp

4.2.5 Analisi statistica

La distribuzione delle variabili continue è stata verificata tramite il *D'Agostino-Pearson omnibus normality test*. Le variabili con distribuzione normale sono state espresse come media \pm deviazione standard, quelle con distribuzione non normale come mediana e *range*. La concordanza fra l'espressione IHC di p53 e l'analisi mutazionale di *TP53* è stata valutata con il coefficiente *kappa di Cohen* (κ) (Landis e Koch 1977). In aggiunta, è stata indagata la relazione fra disregolazioni di p53 (mutazioni o espressione IHC) ed i seguenti parametri: esposizione a fumo passivo (sì/no), diagnosi (FOSCC, lesione infiammatoria cronica, mucosa orale normale), localizzazione del FOSCC (mucosa gengivale, mucosa non gengivale, lingua), istotipo del FOSCC (convenzionale *vs.* non convenzionale, grado di differenziazione del FOSCC convenzionale (ben differenziato *vs.* moderatamente o scarsamente differenziato) e MC nei tumori. La distribuzione delle variabili categoriche fra i gruppi è stata valutata mediante *test esatto di Fisher* o *test del Chi-quadrato*, mentre la distribuzione delle variabili quantitative è stata analizzata mediante *two-sample t-test* o *Mann-Whitney U test*, a seconda della dimensione dei campioni e della distribuzione dei dati. I test sono stati effettuati con il *software* commerciale *SPSS Statistics v. 19.0* (IBM, Armonk, NY, USA); il limite di significatività (*P*) è stato posto uguale o inferiore a 0.05.

4.3 Risultati

I dati completi relativi segnalamento, esposizione a fumo passivo, istologia, espressione immunoistochimica e stato mutazionale sono riportati nelle **Tabelle 4.2 e 4.3**.

4.3.1 FOSCC

Sono state incluse nello studio 26 biopsie incisionali di FOSCC, appartenenti a 22 gatti di razza europea, 2 Certosini, un Siamese ed un Persiano. Dodici soggetti erano maschi castrati mentre 14 erano femmine sterilizzate. L'età mediana era di 14,5 anni (*range*, 8-19). Le informazioni sull'esposizione al fumo passivo erano disponibili per 24 gatti, 6 dei quali (25%) erano stati esposti (esposizione lieve, $n = 2$; esposizione moderata, $n = 2$; esposizione intensa, $n = 2$).

I carcinomi erano localizzati a livello di gengiva mandibolare ($n = 12$), gengiva mascellare ($n = 6$), lingua ($n = 6$), mucosa vestibolare ($n = 1$) e palato duro ($n = 1$; **Figura 4.1**).

Ventidue FOSCC (84%) erano ascrivibili all'istotipo convenzionale, di cui 11 (50%) ben differenziati (grado 1 secondo lo schema di Broders) e i rimanenti 11 moderatamente differenziati (gradi 2 e 3). I FOSCC ben differenziati erano composti da trabecole con progressione ordinata da cellule basali periferiche, poliedriche e non cheratinizzate, a cellule poligonali voluminose, con citoplasma cheratinizzato e ponti intercellulari evidenti al centro delle trabecole. In queste aree centrali erano talvolta presenti accumuli di cheratina amorfa o lamellare. I FOSCC moderatamente differenziati erano caratterizzati da maturazione disordinata, cellule con aspetti di cheratinizzazione meno evidenti e ponti intercellulari raramente visibili. Erano apprezzabili multifocali aggregati di cellule parzialmente cheratinizzate, mentre gli accumuli di cheratina erano quasi sempre assenti.

I restanti 4 FOSCC appartenevano agli istotipi acantolitico ($n = 2$; 8%) ed a cellule fusate ($n = 2$; 8%). Nell'istotipo acantolitico predominavano strutture pseudoghiandolari, con all'interno cellule parzialmente cheratinizzate, isolate o ancora adese allo strato periferico di cellule tramite ponti intercellulari allungati. Nei FOSCC a cellule fusate le cellule neoplastiche erano prevalentemente di forma allungata e disposte in fasci, con citoplasma occasionalmente cheratinizzato (**Figura 4.2**).

La MC mediana era di 13 in 10 HPF (*range*, 0-85).

Diciotto casi di FOSSC sono risultati positivi per p53 all'IHC. L'immunoreattività era intensa, localizzata a livello nucleare ed era visibile nella totalità delle cellule neoplastiche ($n = 9$; 34.6%) o confinata alla periferia delle trabecole ($n = 9$; 34.6%) (**Figura 4.4**).

In totale sono state rilevate 19 mutazioni in 18 casi (69%), rappresentate da sedici mutazioni di tipo missenso, 1 mutazione nonsense e due delezioni *in-frame*. Le mutazioni erano distribuite in tutti e 4 gli esoni sequenziati (esone 5, $n = 6$; esone 6, $n = 3$; esone 7, $n = 6$; esone 8, $n = 4$).

Dei 18 carcinomi con espressione IHC di p53, 3 casi con positività focale non presentavano mutazioni di *TP53*. Dei tumori con *TP53* mutato invece, 3 erano p53-negativi; fra questi, il caso AP6142 ha evidenziato un *Polyphen-2 score* di 0,756, equivalente ad un possibile danno funzionale; il caso AP9641 presentava due mutazioni, entrambe con *Polyphen2 score* pari a 1, indicativo di danno effettivo della funzione proteica, e una VAF del 60% e 27% per le rispettive mutazioni p.Y155* e p.R206Q. Infine, il caso AP4131 presentava una singola mutazione missenso nel codone 207 (p.H207P) con VAF del 13% e *score Polyphen-2* di 1 (**Tabella 4.2**).

Complessivamente, per i FOSSC la concordanza era del 77%. Il coefficiente κ era pari a 0.46 ($P = 0.010$), indicativo di una concordanza moderata fra l'espressione immunohistochimica di p53 e l'analisi mutazionale di *TP53*.

4.3.2 Lesioni infiammatorie croniche

I casi di granuloma eosinofilo orale appartenevano a 10 gatti Europei, 5 maschi castrati (50%) e 5 femmine sterilizzate (50%). L'età mediana era di 9 anni (*range*, 1–14). Tutte le lesioni erano localizzate alla lingua (faccia dorsale, $n = 5$; faccia ventrale/frenulo, $n = 4$; margine laterale, $n = 1$).

I casi di gengivostomatite cronica appartenevano a 9 gatti Europei ed un Maine Coon. Sette soggetti (70%) erano maschi castrati e 3 soggetti (30%) erano femmine sterilizzate. L'età mediana era di 11,5 anni (*range*, 1–15). Tutte le lesioni erano localizzate a livello gengivale (gengiva mascellare, $n = 5$; gengiva mandibolare, $n = 5$; **Figura 4.1**).

Le informazioni sull'esposizione al fumo passivo erano disponibili per 16 gatti su 20, 4 dei quali (25%; granuloma eosinofilo, $n = 2$; gengivostomatite cronica, $n = 2$) erano stati esposti (esposizione lieve, $n = 1$; esposizione moderata, $n = 1$; esposizione intensa, $n = 2$).

Istologicamente, nei granulomi eosinofili la lamina propria della mucosa era infiltrata da numerosi eosinofili e una quantità variabile di linfociti, plasmacellule e macrofagi, con multifocali “figure a fiamma”, rappresentate da depositi di materiale amorfo eosinofilo circondato da macrofagi e cellule giganti multinucleate. Nelle gengivostomatiti croniche la lamina propria era espansa da quantità variabili di linfociti e plasmacellule, con l’epitelio sovrastante da ulcerato a iperplastico (**Figura 4.3**).

Tutte le lesioni infiammatorie sono risultate negative all’IHC per p53, sebbene in alcune fosse presente una debole immunoreattività in meno del 20% delle cellule epiteliali, prevalentemente a livello di strato basale delle aree iperplastiche. Una debole positività citoplasmatica era inoltre presente nelle cellule stromali subepiteliali, nelle cellule endoteliali ed infiammatorie (**Figura 4.4**).

Mutazioni missenso di *TP53* sono state riscontrate solamente in un granuloma eosinofilo (10%) e in una gengivostomatite cronica (10%), ed erano localizzate negli esoni 5 ($n = 1$), 6 ($n = 1$) e 7 ($n = 2$; **Tabella 4.3**).

4.3.3 Mucosa orale normale

I 10 campioni di mucosa orale normale appartenevano a 9 gatti Europei ed un Certosino, 7 maschi (70%; 6 castrati) e 3 femmine sterilizzate (30%). L’età mediana era di 11 anni (*range*, 7–17). Le cause del decesso comprendevano cardiomiopatia ($n = 3$), malattia renale cronica ($n = 2$), linfoma intestinale ($n = 2$), cistite emorragica ($n = 1$), carcinoma polmonare ($n = 1$) e meningioma ($n = 1$). Tre soggetti erano stati esposti a fumo passivo (esposizione lieve, $n = 2$; esposizione moderata, $n = 1$). Nessun campione è risultato positivo per l’espressione IHC di p53 né per la presenza di mutazioni di *TP53* (**Tabella 4.3**; **Figura 4.4**).

4.3.4 Analisi statistica delle disregolazioni di p53

Complessivamente, la concordanza fra IHC per p53 e l’analisi mutazionale è stata dell’86%. Il coefficiente κ è stato pari a 0.68, riferibile ad una concordanza sostanziale fra le due disregolazioni. Sia l’espressione di p53 che le mutazioni di *TP53* erano significativamente più frequenti nei casi di FO SCC, ed i casi mutati avevano una CM significativamente inferiore (**Table 4.4 e 4.5**). Non era presente nessuna relazione statisticamente significativa fra le disregolazioni di p53 e gli altri parametri valutati, compresa l’esposizione al fumo passivo (**Table 4.4 e 4.5**).

Tabella 4.2 Gatti con carcinoma squamocellulare orale: segnalamento, dati clinico-anamnestici, caratteristiche istologiche e disregolazioni di p53

ID	Razza	Sesso	Età (anni)	Esposizione a fumo passivo	Sede della lesione	Istotipo	Grado di differenziazione	MC	Espressione IHC di p53	Stato mutazionale di TP53
AP768	Europeo	Fs	15	Non esposto	Gengiva mandibolare	Convenzionale	BD	6	Pos Foc	p.R275W
AP1324	Europeo	Mc	11	Intensa	Gengiva mandibolare	Convenzionale	MD	12	Negativa	<i>Wild type</i>
AP2123	Europeo	Mc	15	Moderata	Gengiva mandibolare	Convenzionale	BD	12	Pos Foc	p.V165M
AP2389	Europeo	Fs	14	Non esposto	Gengiva mascellare	Convenzionale	MD	41	Positiva	p.N232D
AP3911	Europeo	Fs	16	Non esposto	Gengiva mandibolare	Convenzionale	BD	79	Pos Foc	V210del in frame
AP4031	Europeo	Mc	13	Non esposto	Gengiva mandibolare	Convenzionale	BD	17	Negativa	p.H207P
AP4148	Europeo	Fs	10	ND	Lingua, faccia ventrale	Convenzionale	BD	16	Positiva	p.M230I
AP4685	Europeo	Mc	16	Non esposto	Gengiva mandibolare	Convenzionale	MD	3	Positiva	p.C168F
AP4925	Europeo	Fs	19	Non esposto	Gengiva mandibolare	Convenzionale	BD	14	Pos Foc	p.G259E
AP6142	Europeo	Fs	16	Non esposto	Gengiva mandibolare	Acantolitico		6	Negativa	p.R241Q
AP8964	Europeo	Fs	12	Non esposto	Gengiva mascellare	Convenzionale	MD	79	Positiva	p.T249I
AP8965	Certosino	Fs	17	Non esposto	Lingua, faccia ventrale	Convenzionale	BD	0	Pos Foc	p.R167H
AP9641	Europeo	Mc	16	Non esposto	Gengiva mandibolare	Convenzionale	BD	7	Negativa	p.Y155*; p.R206Q
AP9960	Persian	Mc	11	ND	Gengiva mandibolare	Convenzionale	MD	8	Positiva	I247_T249del in frame
AP10806	Europeo	Fs	14	Non esposto	Gengiva mascellare	Convenzionale	MD	7	Pos Foc	p.R266Q
AP11306	Europeo	Fs	12	Non esposto	Lingua, faccia ventrale	A cellule fusate		85	Negativa	<i>Wild type</i>
AP11999	Europeo	Mc	16	Intensa	Vestibolo	Convenzionale	MD	16	Negativa	<i>Wild type</i>
AP12817	Europeo	Fs	12	Lieve	Gengiva mandibolare	Convenzionale	MD	7	Positiva	p.V165M
AP13028	Europeo	Mc	16	Moderata	Gengiva mandibolare	Convenzionale	MD	30	Negativa	<i>Wild type</i>
AP13806	Europeo	Mc	15	Non esposto	Palato duro	Convenzionale	BD	4	Positiva	p.V265E
AP13972	Certosino	Mc	9	Non esposto	Frenulo linguale	Acantolitico		3	Positiva	p.C133F
AP14878	Europeo	Mc	13	Non esposto	Gengiva mascellare	Convenzionale	MD	16	Negativa	<i>Wild type</i>
AP16763	Europeo	SF	18	Non esposto	Gengiva mascellare	Convenzionale	BD	17	Pos Foc	<i>Wild type</i>
AP16912	Siamese	SF	8	Lieve	Gengiva mascellare	Convenzionale	MD	27	Positiva	p.Y227C
AP17062	Europeo	Mc	13	Non esposto	Frenulo linguale	A cellule fusate		81	Pos Foc	<i>Wild type</i>
AP17083	Europeo	Fs	15	Non esposto	Frenulo linguale	Convenzionale	BD	10	Pos Foc	<i>Wild type</i>

Fs: femmina sterilizzata; Mc: maschio castrato; BD: ben differenziato; MD: moderatamente differenziato; Pos Foc: positività focale; ND: non disponibile; IHC: immunistochemica; MC: *mitotic count*.

Tabella 4.3 Gatti con mucosa orale normale e lesioni infiammatorie orali: segnalamento, dati clinico-anamnestici, caratteristiche istologiche e disregolazioni di p53

ID	Diagnosi	Razza	Sesso	Età (anni)	Esposizione a fumo passivo	Sede della lesione	Espressione IHC di p53	Stato mutazionale di TP53
AP13580	N	Certosino	Fs	8	Non esposto	Gengiva premolare superiore sinistra	Negativa	<i>Wild type</i>
AP13583	N	Europeo	Fs	10	Lieve	Gengiva premolare superiore sinistra	Negativa	<i>Wild type</i>
AP14419	N	Europeo	Mc	7	Non esposto	Gengiva premolare superiore sinistra	Negativa	<i>Wild type</i>
AP14463	N	Europeo	Mc	14	Non esposto	Gengiva premolare superiore sinistra	Negativa	<i>Wild type</i>
AP14530	N	Europeo	Fs	12	Non esposto	Gengiva premolare superiore sinistra	Negativa	<i>Wild type</i>
AP14668	N	Europeo	Mc	8	Non esposto	Gengiva premolare superiore sinistra	Negativa	<i>Wild type</i>
AP14693	N	Europeo	Mc	12	Non esposto	Gengiva premolare superiore sinistra	Negativa	<i>Wild type</i>
AP14930	N	Europeo	Mc	7	Non esposto	Gengiva premolare superiore sinistra	Negativa	<i>Wild type</i>
AP15073	N	Europeo	Mc	15	Moderata	Gengiva premolare superiore sinistra	Negativa	<i>Wild type</i>
AP16204	N	Europeo	M	17	Lieve	Gengiva premolare superiore sinistra	Negativa	<i>Wild type</i>
AP498	GE	Europeo	Mc	1	Non esposto	Lingua, faccia ventrale	Negativa	<i>Wild type</i>
AP2115	GE	Europeo	Fs	12	Non esposto	Lingua, faccia dorsale	Negativa	<i>Wild type</i>
AP2633	GE	Europeo	Fs	10	ND	Lingua, margine laterale	Negativa	<i>Wild type</i>
AP5978	GE	Europeo	Fs	7	Lieve	Lingua, faccia dorsale	Negativa	p.M230I
AP7065	GE	Europeo	Fs	8	Non esposto	Lingua, faccia dorsale	Negativa	<i>Wild type</i>
AP10302	GE	Europeo	Mc	7	ND	Lingua, faccia ventrale	Negativa	<i>Wild type</i>
AP10728	GE	Europeo	Mc	9	ND	Lingua, faccia ventrale e margini	Negativa	<i>Wild type</i>
AP15612	GE	Europeo	Mc	11	Intensa	Lingua, faccia dorsale	Negativa	<i>Wild type</i>
AP16622	GE	Europeo	Fs	14	Non esposto	Lingua, faccia dorsale	Negativa	<i>Wild type</i>
AP16946	GE	Europeo	Mc	9	Non esposto	Lingua, base e margine sinistro	Negativa	<i>Wild type</i>
AP847	SLP	Europeo	Fs	12	Moderata	Gengiva mascellare	Negativa	<i>Wild type</i>
AP2901	SLP	Europeo	Mc	12	ND	Gengiva mandibolare	Negativa	p.P175L; p.A196T; p.G238D
AP2924	SLP	Maine Coon	Mc	1	Non esposto	Gengiva mascellare	Negativa	<i>Wild type</i>
AP7692	SLP	Europeo	Fs	13	Non esposto	Gengiva mandibolare	Negativa	<i>Wild type</i>
AP9309	SLP	Europeo	Fs	5	Non esposto	Gengiva mandibolare	Negativa	<i>Wild type</i>
AP10714	SLP	Europeo	Mc	13	Intensa	Gengiva mascellare	Negativa	<i>Wild type</i>
AP11852	SLP	Europeo	Mc	11	Non esposto	Gengiva mandibolare	Negativa	<i>Wild type</i>
AP12832	SLP	Europeo	Mc	6	Non esposto	Gengiva mascellare	Negativa	<i>Wild type</i>
AP16397	SLP	Europeo	Mc	15	Non esposto	Gengiva mascellare	Negativa	<i>Wild type</i>
AP16492	SLP	Europeo	Mc	7	Non esposto	Gengiva mandibolare	Negativa	<i>Wild type</i>

N: mucosa orale normale; GE: granuloma eosinofilo; SLP: stomatite linfoplasmocitaria; Fs: femmina sterilizzata; Mc: maschio castrato; ND: non disponibile; IHC: immunistochemica.

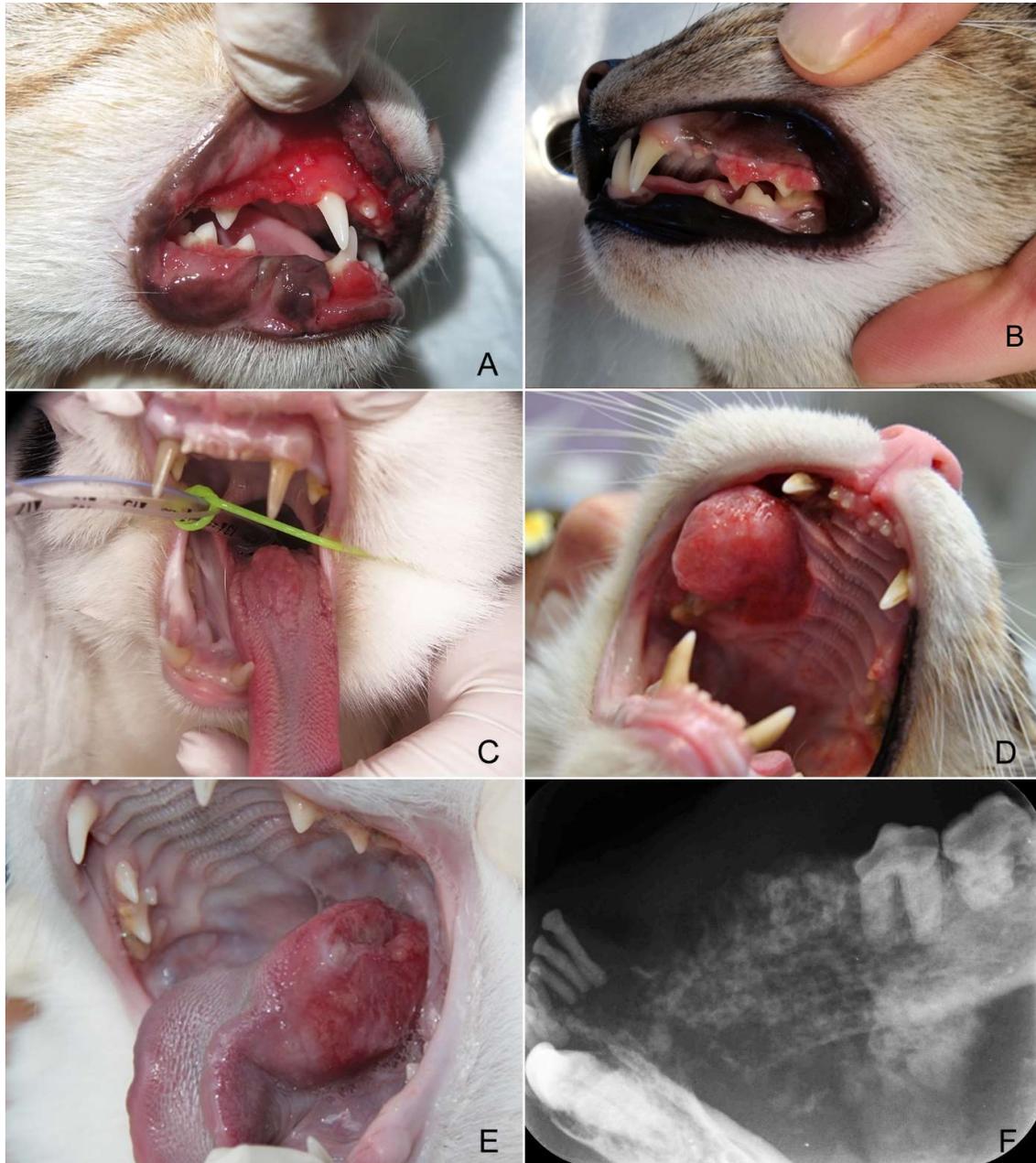


Figura 4.1 Gatto, cavità orale. **(A)** Gengivostomatite di grado moderato (caso AP10714). **(B)** Gengivite multifocale-coalescente di grado moderato (caso AP16397). **(C)** Granuloma eosinofilo alla base della lingua (caso AP15612). **(D)** Carcinoma squamocellulare a livello di emimascella destra (caso AP8694). La lesione, focale, si presenta nodulare ed esofitica con multifocali ulcerazioni. **(E)** Carcinoma squamocellulare che comprende la base della lingua ed il frenulo (caso AP4148). **(F)** Esame radiografico di un gatto affetto da carcinoma squamocellulare. La radiopacità dell'osso mandibolare è fortemente ridotta per via dei fenomeni osteolitici associati al comportamento infiltrante della neoplasia (caso AP4031).

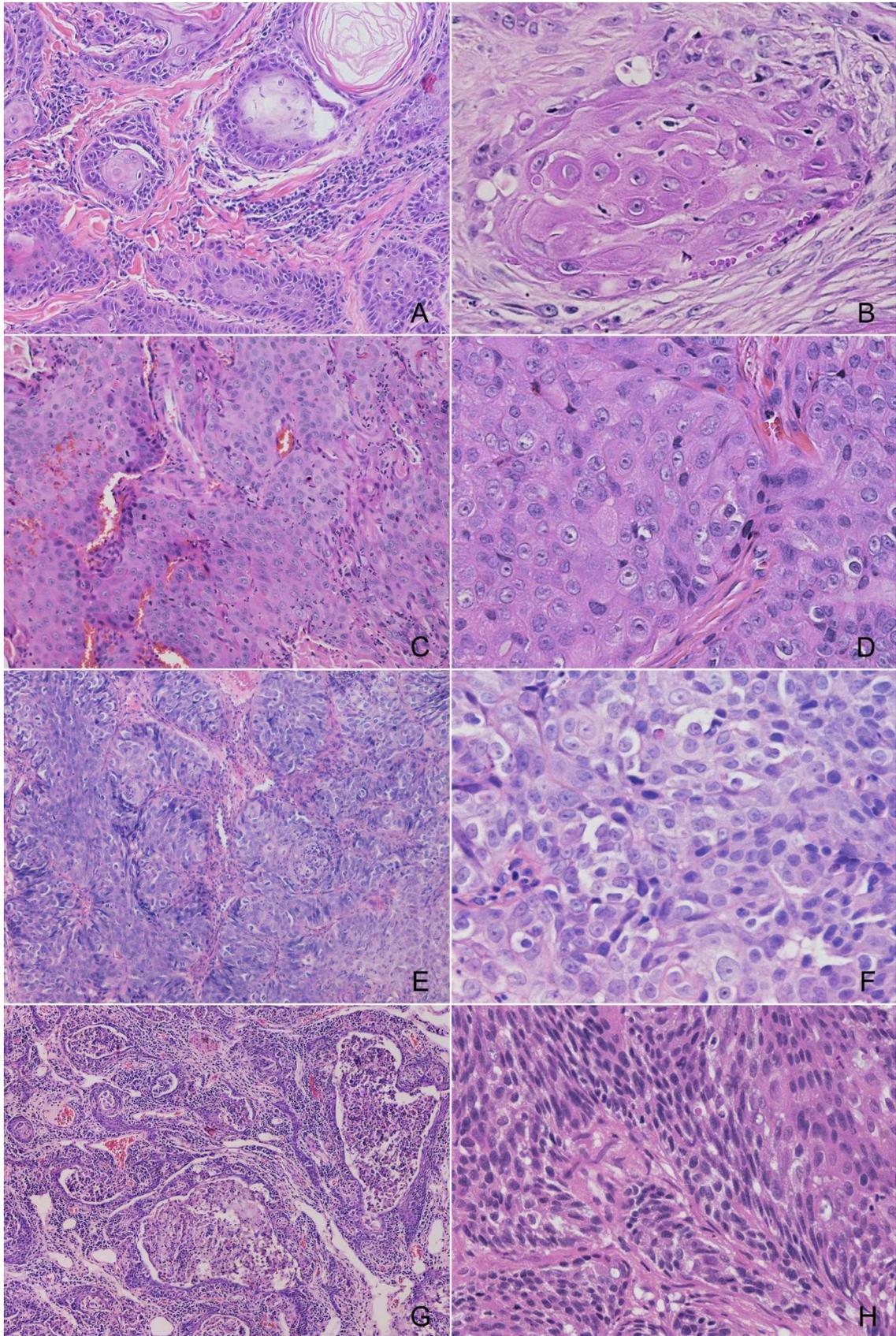


Figura 4.2 Gatto, cavità orale. **(A e B)** Carcinoma squamocellulare ben differenziato. Le cellule basali non cheratinizzate progrediscono a differenziarsi in grandi cellule poligonali e cheratinizzate, con citoplasma eosinofilo omogeneo, tendente al diafano; i nuclei sono rotondi, centrali e scarsamente basofili, con cromatina marginata e nucleoli visibili. Si possono notare le cosiddette perle cornee, accumuli concentrici di cheratina (A), ingrandimento 100x. I ponti intercellulari (desmosomi) sono evidenti (B), ingrandimento 400x (caso AP768). **(C e D)** Carcinoma squamocellulare moderatamente differenziato. Le cellule neoplastiche sono disposte in cordoni e trabecole sostenute da un'esile trama connettivale. Cheratinizzazione meno evidente (caso AP2123), ingrandimenti 200x e 400x. **(E e F)** Carcinoma squamocellulare scarsamente differenziato. La cheratinizzazione delle cellule è minima, e non si riscontrano perle cornee o ponti intercellulari. Notare la presenza di cellule immature con nucleo intensamente basofilo e citoplasma in quantità scarsa (caso AP9960), ingrandimenti 100x e 400x. **(G)** Carcinoma squamocellulare acantolitico. Le cellule cheratinizzate neoplastiche perdono coesione tra loro (acantolisi), dando origine a strutture pseudoghiandolari (AP6142). Ingrandimento 100x. **(H)** Carcinoma squamocellulare a cellule fusate. Coesistono cheratinociti di forma poligonale e di forma fusata, con nuclei ipercromatici e scarso citoplasma eosinofilo (caso AP11306), ingrandimento 400x. Ematossilina eosina.

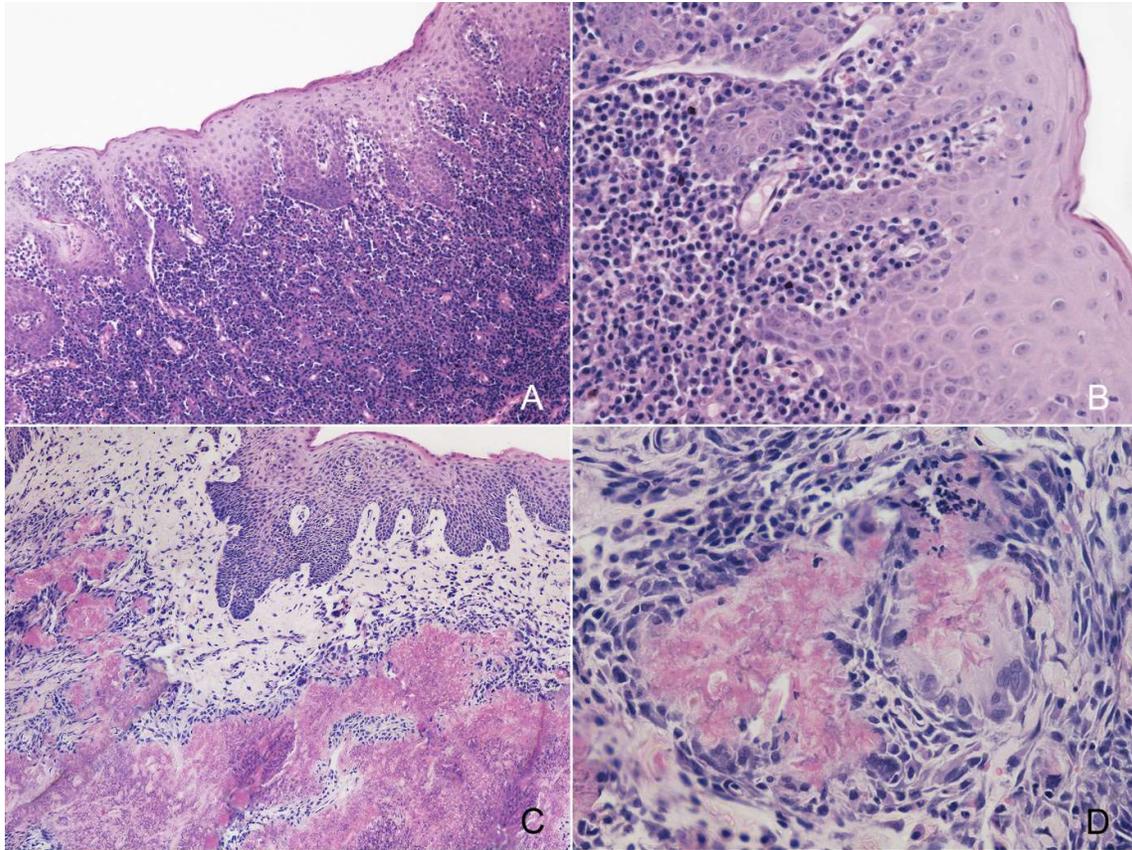


Foto 4.3 – Gatto, preparati istologici di lesioni infiammatorie croniche della cavità orale. **(A e B)** Stomatite linfoplasmocitaria. L'epitelio della mucosa è irregolarmente iperplastico; la lamina propria è infiltrata da un'abbondante quantità di cellule infiammatorie. Ingrandimento 200x. A più forte ingrandimento **(B, 400x)** sono riconoscibili linfociti e plasmacellule (caso AP7692). **(C e D)** Granuloma eosinofilo. Iperplasia irregolare dell'epitelio ed infiltrato infiammatorio diffuso nella lamina propria, composto prevalentemente da granulociti eosinofili e macrofagi. Sono presenti numerosi accumuli di materiale eosinofilo amorfo frammisto a eosinofili degenerati e detriti cellulari (figure a fiamma), circondati da cellule giganti multinucleate (caso AP498). Ingrandimenti 100x e 400x. Ematossilina eosina.

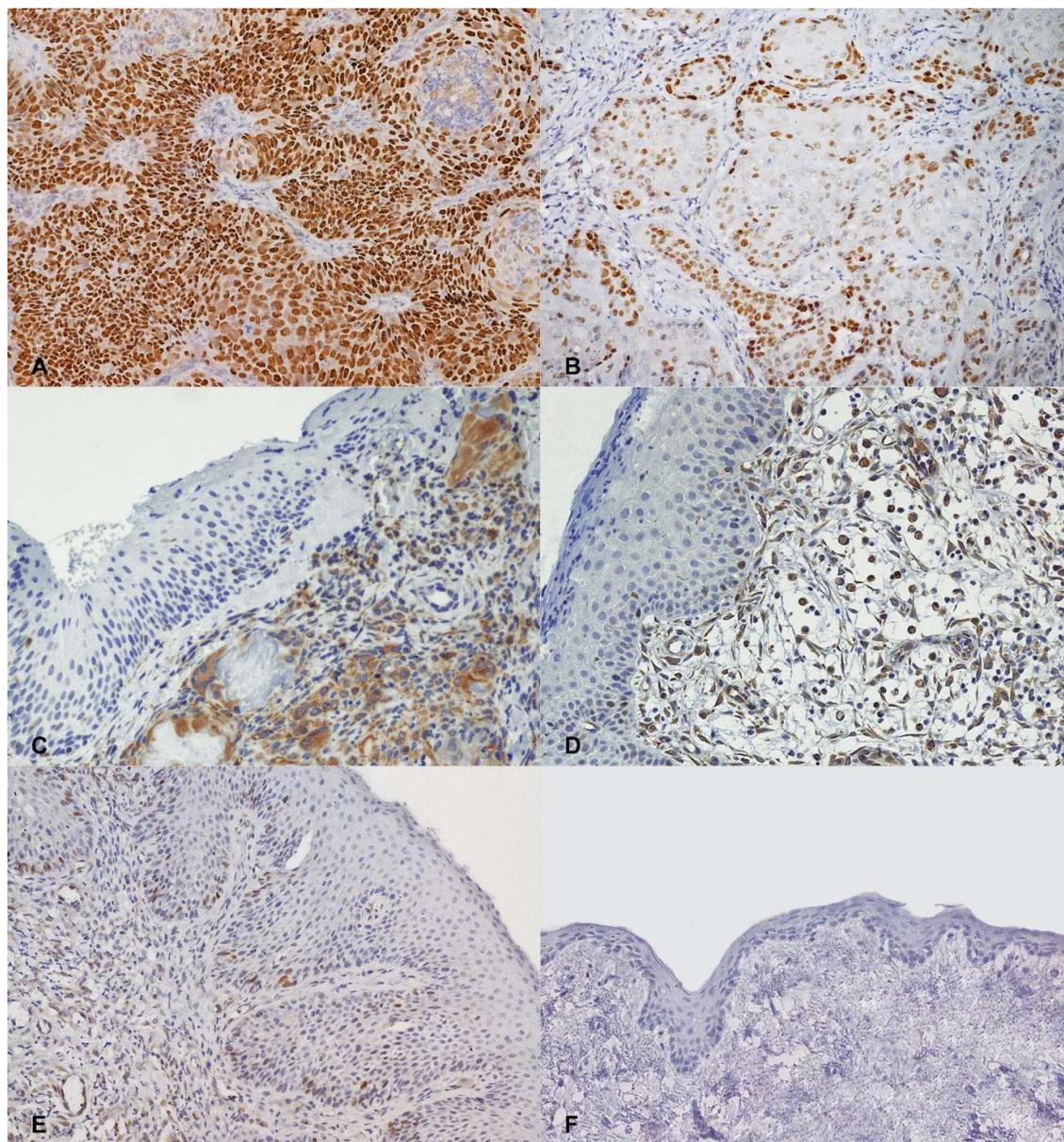


Figura 4.4 Gatto, mucosa orale. Immagini rappresentative dell'esame immunohistochimico per p53 con cromogeno DAB (marrone-rossastro) e colorazione di contrasto con ematossilina di Papanicolau. **(A)** Carcinoma squamocellulare. Intensa positività nucleare diffusa a tutte le cellule neoplastiche (caso AP2123). **(B)** Intensa positività nucleare delle cellule neoplastiche alla periferia delle trabecole (positività focale) (caso AP3911). **(C)** Granuloma eosinofilo e **(D)** gengivostomatite cronica. Moderata immunoreattività citoplasmatica delle cellule infiammatorie (casi AP16622 e AP11852). **(E)** Gengivostomatite cronica. Debole immunoreattività nucleare in meno del 20% delle cellule epiteliali, a livello di strato basale e soprabasale. L'epitelio si presenta moderatamente iperplastico (caso AP10714). **(F)** Mucosa orale normale. Assenza di segnale immunohistochimico (caso AP13580). Ingrandimento 200x.

Tabella 4.4 Relazione tra espressione immunohistochimica di p53 e parametri clinico-anamnestici e istopatologici in 56 campioni di mucosa orale felina.

Parametro	p53 non espressa	p53 espressa	<i>P</i>
Fumo passivo (<i>n</i> = 50)	(4 mancanti)	(2 mancanti)	0.508
esposti	10 (29%)	3 (19%)	
non esposti	24 (71%)	13 (81%)	
Diagnosi (<i>n</i> = 56)			<0.001
FOSCC	8 (21%)	18 (100%)	
lesioni infiammatorie croniche	20 (53%)	0 (0%)	
mucosa orale normale	10 (26%)	0 (0%)	
Localizzazione (FOSCC, <i>n</i> = 26)			0.657
gingiva	6 (75%)	12 (67%)	
mucosa non gengivale	1 (13%)	1 (6%)	
lingua	1 (13%)	5 (28%)	
Istotipo (FOSCC, <i>n</i> = 26)			0.563
convenzionale	6 (75%)	16 (89%)	
non convenzionale	2 (25%)	2 (11%)	
Grado di differenziazione (FOSCC convenzionali, <i>n</i> = 22)			0.635
ben differenziato	2 (33%)	9 (56%)	
moderatamente / scarsamente differenziato	4 (67%)	7 (44%)	
Conta mitotica (FOSCC, <i>n</i> = 26) (mediana, <i>range</i>)	16 [6-85]	11 [0-81]	0.388

FOSCC: carcinoma squamocellulare orale felino.

Tabella 4.5 Relazione tra mutazioni di *TP53* e parametri clinico-anamnestici e istopatologici in 56 campioni di mucosa orale felina.

Parametro	<i>TP53 wild-type</i>	<i>TP53 mutato</i>	<i>P</i>
Fumo passivo (<i>n</i> = 50)	(3 mancanti)	(3 mancanti)	>0.999
esposti	9 (27%)	4 (24%)	
non esposti	24 (73%)	13 (76%)	
Diagnosi (<i>n</i> = 56)			<0.001
FOSCC	8 (22%)	18 (90%)	
lesioni infiammatorie croniche	18 (50%)	2 (10%)	
mucosa orale normale	10 (28%)	0 (0%)	
Localizzazione (FOSCC, n = 26)			0.283
gingiva	4 (50%)	14 (78%)	
mucosa non gengivale	1 (13%)	1 (6%)	
lingua	3 (38%)	3 (17%)	
Istotipo (FOSCC, n = 26)			0.563
convenzionale	6 (75%)	16 (89%)	
non convenzionale	2 (25%)	2 (11%)	
Grado di differenziazione (FOSCC convenzionali, n = 22)			0.635
ben differenziato	2 (33%)	9 (56%)	
moderatamente / scarsamente differenziato	4 (67%)	7 (44%)	
Conta mitotica (FOSCC, n = 26) (mediana, range)	16.5 [10-85]	7.5 [0-79]	0.034

FOSCC: carcinoma squamocellulare orale felino.

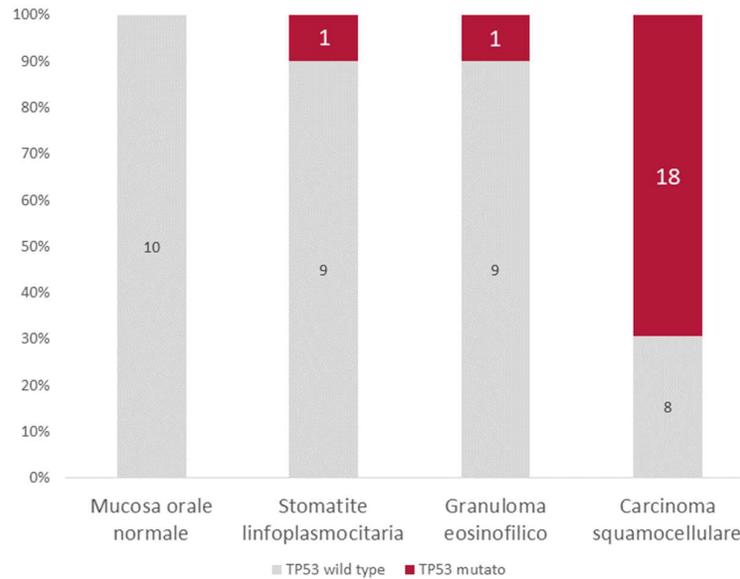


Figura 4.7 Frequenza delle mutazioni del gene *TP53* riscontrate in 56 campioni di mucosa orale di gatto normale e patologica.

4.4 Discussione

Il carcinoma squamocellulare di testa e collo dell'uomo (HNSCC, *head and neck squamous cell carcinoma*) e il FOSSC possiedono numerosi aspetti in comune sia dal punto di vista clinico che molecolare, che hanno supportato l'ipotesi dell'utilizzo del FOSSC come modello spontaneo per la neoplasia umana (Tannehill-Gregg *et al.*, 2006; Wypij 2013; Supsavhad *et al.*, 2016a). I risultati di questo studio forniscono un'ulteriore evidenza di tale ipotesi, in particolare l'elevata prevalenza (69%) nel FOSSC di mutazioni a carico del dominio legante il DNA di *TP53*. Questa regione genica rappresenta infatti la sede più frequente di alterazioni somatiche nel HNSCC, e codifica per un dominio fondamentale per il ripiegamento e la stabilizzazione della struttura terziaria della proteina. Da ciò si evince l'importanza della disfunzione delle vie molecolari p53-dipendenti nell'insorgenza e nella progressione del carcinoma squamocellulare orale in entrambe le specie (Gasco e Crook 2003; Kasthuber e Lowe 2017). Mentre le cellule con p53 funzionante rispondono ad un danno al DNA inducendo l'arresto del ciclo cellulare, la riparazione del DNA o l'apoptosi, le cellule con p53 alterata continuano a dividersi accumulando

danni genetici che possono portare alla trasformazione maligna. Nonostante le mutazioni di *TP53* possano essere classificate in base al loro effetto sulla struttura proteica, attualmente non è possibile prevedere con esattezza come una particolare mutazione alteri la funzione (Kasthuber e Lowe 2017).

Nella maggior parte dei FOSSC, le mutazioni erano associate all'espressione IHC di p53, come confermato dalla concordanza del 77%. Come prevedibile, erano presenti casi discordanti, comprendenti 3 casi positivi all'IHC in assenza di mutazioni e 3 casi negativi all'IHC con mutazioni di *TP53*. Storicamente nell'uomo, la positività IHC per p53 è stata considerata un segno indiretto dell'inattivazione funzionale di *TP53*, basandosi sul fatto che la proteina *wild type* ha un'emivita troppo breve per essere rilevata, mentre la proteina mutata acquisisce maggiore stabilità. Tuttavia, il ruolo dell'espressione IHC di p53 come marker surrogato delle alterazioni genetiche di *TP53* è stato declassato col tempo (Gasco e Crook 2003; Peltonen *et al.*, 2010). Nonostante la tecnica IHC sia rapida, relativamente economica e largamente diffusa nei laboratori diagnostici, molteplici fattori biologici e tecnici ne limitano la correlazione con l'analisi genetica. L'espressione di p53 in assenza di mutazioni rilevabili può essere legata al numero di esoni indagati, e quindi alla presenza di mutazioni al di fuori del domino legante il DNA. D'altra parte, l'accumulo post-trascrizionale della proteina potrebbe derivare da una degradazione anomala o da insulti genotossici; in aggiunta, la stabilizzazione della stessa può dipendere dall'interazione con proteine cellulari o di origine virale (Taylor *et al.*, 1999; Gasco e Crook 2003; Lavin e Guevan 2006). I tipi oncogeni di Papillomavirus umano possono causare un effetto simile e stabilizzare la p53 nelle cellule epiteliali infette (Eichten *et al.*, 2002). Tuttavia, anche se il DNA di Papillomavirus è stato amplificato da una certa quota di FOSSC, l'ipotesi sul suo ruolo cancerogeno nel FOSSC è controversa e non è ancora stata confermata (Munday *et al.*, 2019c; Altamura *et al.*, 2020a).

L'assenza di positività IHC nei FOSSC mutati potrebbe essere dovuta a mutazioni che non esitano nella stabilizzazione proteica, proteine tronche non rilevabili o delezioni che impediscono totalmente la trascrizione. Inoltre, mutazioni che provocano una modificazione conformazionale non riconosciuta dall'anticorpo primario possono generare falsi negativi. Questi fenomeni potrebbero spiegare i tre casi mutati di questo studio negativi all'IHC. Nel caso AP9641, la

simultanea presenza di una mutazione di *stop* e una missenso (p.Y155*; p.R206Q) con VAF e *Polyphen-2 score* elevati potrebbe spiegare l'assenza di immunocolorazione. Stessa situazione all'IHC per il caso AP4031, portatore della mutazione p.H207P, localizzata in prossimità di p.R206Q; in questo caso le cause della negatività IHC potrebbero essere la VAF relativamente bassa (13%) e la posizione aminoacidica. Infine, il caso AP6142 presentava 0,756 di *Polyphen-2 score*, compatibile con un possibile danno proteico, probabilmente insufficiente per consentirne il rilevamento tramite il clone anticorpale anti-p53 Pab240.

Oltre a questi meccanismi biologici, anche limitazioni di tipo tecnico possono contribuire a discrepanze fra analisi IHC e analisi mutazionale, fra cui la scelta dell'anticorpo ed i valori soglia di positività stabiliti per l'espressione di p53 e la *variant allele frequency* (Taylor *et al.*, 1999). In commercio sono disponibili diversi anticorpi monoclonali per l'analisi IHC della proteina p53 umana, e la sensibilità della metodica può essere affinata impiegando più cloni anticorpali simultaneamente. Attualmente, gli anticorpi anti-p53 con reattività nota nei tessuti felini sono PAb240 e CM1.

Uno studio condotto su neoplasie del cane di varia origine ha ottenuto il maggior livello di concordanza (73%) tra IHC e mutazioni impiegando l'anticorpo policlonale CM1 (Zacchetti *et al.*, 2007). Nel presente studio tuttavia è stato preferito Pab240, in quanto lavori precedenti hanno riportato che questo anticorpo genera minore positività di fondo rispetto a CM1, e che riconosce in modo più specifico gli epitopi della variante mutata di p53 (Teifke e Löhr, 1996; Albaric *et al.*, 2001; Zacchetti *et al.*, 2007; Munday e Aberdein 2012; Supsavhad *et al.*, 2016b).

Un'ulteriore possibile limitazione tecnica riguarda il processo di fissazione in formalina, che da un lato potrebbe ridurre l'immunoreattività dei campioni, dall'altro potrebbe causare un'eccessiva frammentazione del DNA.

Questo studio riporta un'elevata prevalenza di disregolazioni di p53 nel FOSCC rispetto a lesioni orali non neoplastiche, supportando ulteriormente il ruolo di p53 nella tumorigenesi a livello orale.

L'apparente specificità delle analisi effettuate suggerisce inoltre una potenziale utilità di p53 come marker diagnostico. In medicina umana, le mutazioni di p53 rappresentano un importante indicatore biologico del potenziale maligno di lesioni orali preneoplastiche, e sono state

rilevate nella saliva e nel sangue periferico di pazienti affetti da HNSCC (Boyle *et al.*, 1994; Cruz *et al.*, 1998; Gasco e Crook, 2003).

Nel gatto, non è stata finora identificata nessuna lesione con presunto o confermato significato preneoplastico, e macroscopicamente le forme neoplastiche precoci sono difficilmente differenziabili da altre lesioni orali a carattere infiammatorio cronico o proliferativo. Malattie parodontali di gravità variabile e iperplasie gengivali sono reperti comuni nei gatti anziani, e lesioni ulcerative idiopatiche ascrivibili al complesso del granuloma eosinofilo felino possono mimare clinicamente un FOSSC, in particolare a livello di lingua e frenulo (Bilgic *et al.*, 2015). Anche all'esame istologico, la distinzione precoce tra forme neoplastiche e infiammatorie può essere ardua, specie se si hanno a disposizione biopsie di piccole dimensioni. Il carcinoma squamocellulare è spesso associato a reazione infiammatoria, dovuta all'ulcerazione dell'epitelio e alla produzione di cheratina. D'altro canto, le stomatiti croniche possono indurre alterazioni iperplastiche e displastiche dell'epitelio difficili da differenziare da una trasformazione neoplastica in fase iniziale.

Poiché ad oggi il riconoscimento precoce del FOSSC è l'unica arma efficace per combattere questa malattia, il potenziale diagnostico di p53, anche in associazione ad altri marker molecolari, merita ulteriori studi. In questo contesto è interessante domandarsi se le mutazioni rilevate in due casi di stomatite, senza concomitante espressione IHC, possano essere interpretate come reperti aspecifici e rappresentino una carcinogenesi favorita dall'infiammazione. Considerata la frequenza delle stomatiti croniche nei gatti geriatrici, la stima del rischio di trasformazione neoplastica per queste lesioni è complicata e richiederebbe studi epidemiologici di ampia portata. La patogenesi del FOSSC è ancora da delucidare, anche se diversi fattori di rischio sono stati ipotizzati, fra cui l'esposizione al fumo passivo, che potrebbe portare all'accumulo di carcinogeni in cavità orale a causa dell'abitudine felina del *grooming* (Bertone *et al.*, 2003). In uno studio inoltre, i FOSSC di gatti esposti a fumo passivo avevano una probabilità di sovraesprimere p53 4,5 volte maggiore rispetto ai carcinomi di gatti non esposti, anche se questa associazione non ha raggiunto la significatività statistica (Snyder *et al.*, 2004). Nel nostro studio, l'esposizione al fumo di sigaretta è risultata infrequente nei gatti con FOSSC (6 casi su 24), e non ha mostrato associazione né con l'espressione di p53 né con le mutazioni del gene. Pur non

potendo escludere il potenziale cancerogeno del fumo passivo nel FOSSC, i nostri risultati suggeriscono che altri fattori potrebbero aver indotto le disregolazioni di p53 in questi soggetti.

I principali limiti di questo studio sono il ridotto numero di casi e la sua natura retrospettiva, con la conseguente mancanza di protocolli terapeutici standardizzati. Ciò impedisce qualsiasi considerazione sul comportamento biologico dei carcinomi mutati e, in ultima analisi, sul significato prognostico di p53.

In conclusione, i nostri risultati suggeriscono un importante ruolo di p53 nella tumorigenesi del FOSSC, come supportato dalla prevalenza delle disregolazioni di p53, significativamente più elevata nel FOSSC rispetto alla mucosa orale normale e alle lesioni infiammatorie. Inoltre, l'espressione IHC di p53 sembra riflettere la presenza di mutazioni di *TP53* nella maggioranza dei casi. Saranno necessari ulteriori studi per verificare se lo *screening* delle disregolazioni di p53, singolarmente o in associazione ad altri marker, possa contribuire ad una diagnosi precoce di questa neoplasia distruttiva.

Capitolo 5

Analisi preliminare di metilazione del DNA e stato mutazionale di TP53 nella diagnosi del carcinoma squamocellulare orale felino

5.1 Introduzione

Le numerose similitudini sia clinicopatologiche che molecolari riscontrate fra il carcinoma squamocellulare umano di testa e collo (HNSCC, *head and neck squamous cell carcinoma*) e il carcinoma squamocellulare orale del gatto (FO SCC, *feline oral squamous cell carcinoma*), suggeriscono la potenziale utilità di questa neoplasia felina come modello spontaneo di studio per la controparte umana (Wypij, 2013; Rossa e D'Silva, 2019). Come nell'uomo, il FO SCC è in genere associato ad elevata invasività locale e lisi ossea precoce (Bilgic *et al.*, 2015; Qiao *et al.*, 2018). A causa della localizzazione e della rapida progressione neoplastica, la diagnosi avviene spesso tardivamente. Ciò limita fortemente l'efficacia di tutte le strategie terapeutiche, comprendenti chirurgia, terapia radiante e chemioterapia, ed incrementa la morbilità associata al trattamento. La prognosi è infausta per la maggior parte dei gatti, ed anche applicando un protocollo terapeutico multimodale la sopravvivenza difficilmente supera i 12 mesi (Bilgic *et al.*, 2015; Marconato *et al.*, 2019).

Nel nostro lavoro precedente, è stata evidenziata un'elevata prevalenza di mutazioni a carico del gene *TP53* nel FO SCC, rispetto a mucosa orale normale e patologie infiammatorie. Tali riscontri rappresentano un ulteriore elemento di analogia fra la neoplasia felina e quella umana, e al tempo stesso suggeriscono una possibile utilità diagnostica di p53 per la diagnosi del FO SCC (Renzi *et al.*, 2019).

Nell'ultimo ventennio, in oncologia umana si è diffuso un crescente interesse verso le alterazioni epigenetiche a causa della loro capacità di favorire l'insorgenza e la progressione delle neoplasie, con una frequenza addirittura superiore all'inattivazione dei geni tramite mutazioni o delezioni (Feinberg *et al.*, 2006; Choi e Lee, 2013; Nebbioso *et al.*, 2018). La metilazione del DNA è un meccanismo epigenetico che regola le funzioni delle proteine, l'espressione genica e la processazione dell'RNA

senza modificare la sequenza di DNA (Portela e Esteller, 2010; Baylin e Jones, 2011; Spruijt e Vermeulen, 2014). In particolare, la metilazione aberrante del DNA nelle regioni promoter, in corrispondenza delle zone ricche di dinucleotidi citosina-fosfato-guanina (isole CpG), è stata correlata al silenziamento di geni oncosoppressori o all'attivazione di oncogeni nella maggior parte delle neoplasie umane (Jones e Baylin, 2002; Ehrlich, 2009; Qureshi *et al.*, 2010; Vrba e Futscher, 2018).

Diversi studi hanno identificato un pannello di geni con alterazioni della metilazione nel carcinoma squamocellulare orale umano (HOSCC) a partire da campioni di saliva o brushing orali, mettendo in risalto la potenziale utilità diagnostica dei marker epigenetici mediante tecniche non invasive (Demokan *et al.*, 2010; Langevin *et al.*, 2010; Pattani *et al.*, 2010; Schussel *et al.*, 2013; Morandi *et al.*, 2017a). Questa ipotesi è avvalorata dall'evidenza che le modificazioni epigenetiche sono verosimilmente eventi precoci nella carcinogenesi orale, dal momento che il tessuto istologicamente normale adiacente ai tumori e le lesioni orali pre-maligne mostrano spesso un pattern di metilazione aberrante sovrapponibile a quello dei carcinomi (Kulkarni e Saranath, 2004; Mishra, 2012; Morandi *et al.*, 2015). In oncologia veterinaria, pochi studi hanno investigato il pattern di metilazione del DNA, e al momento non sono disponibili informazioni sullo stato di metilazione del FOSSC (Bronzini *et al.*, 2017; Morimoto *et al.*, 2017; Brandão *et al.*, 2018; Sato *et al.*, 2018).

Questo studio esplorativo ha lo scopo di analizzare il pattern di metilazione di 10 geni noti per essere epigeneticamente alterati nel HOSCC, insieme allo stato mutazionale di TP53, in campioni istologici di FOSSC. I risultati sono stati messi a confronto con campioni di mucosa orale normale e lesioni orali infiammatorie del gatto, al fine di identificare un pannello di geni utile per differenziare i FOSSC dalla mucosa orale non neoplastica. Per 10 di questi gatti, le stesse analisi molecolari sono state svolte in parallelo su campioni di cellule prelevate mediante brushing orale, in modo da sondare l'utilità di queste metodiche come test di screening.

5.2 Materiali e metodi

5.2.1 Criteri d'inclusione e informazioni anamnestiche

Questo studio è parte integrante del progetto Salice, finanziato grazie al bando Alma Idea Junior dell'Università di Bologna.

È stata svolta un'indagine retrospettivo-prospettica sui casi afferiti al Servizio di Anatomia Patologica del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) dell'Università di Bologna, dal 2010 al 2019, per individuare tutti i campioni istologici di gatti con FOSSC e stomatite cronica. In aggiunta sono stati collezionati in modo prospettico campioni di mucosa orale istologicamente normali, prelevati *post-mortem* da gatti di almeno 7 anni di età, deceduti per cause non legate a patologie orali. Questi campioni di controllo sono stati prelevati dalla gengiva premolare mascellare. Le cartelle cliniche dei pazienti sono state revisionate per raccogliere i dati su segnalamento e localizzazione dei tumori. Per tutti i casi reclutati sono state riesaminate le sezioni istologiche colorate con ematossilina-eosina dei tessuti fissati in formalina e inclusi in paraffina (FFPE), al fine di confermare la diagnosi. Per i FOSSC è stato inoltre definito l'istotipo secondo i criteri riportati in letteratura (Nemec *et al.*, 2012; Munday *et al.*, 2017).

Ulteriori sezioni istologiche consecutive di 10 µm (almeno 5 per caso) sono state sottoposte all'analisi genetica per valutare il profilo di metilazione del DNA e lo stato mutazionale di *TP53* tramite *Next Generation Sequencing* (NGS).

In aggiunta alle biopsie istologiche, per 5 gatti con FOSSC e 5 gatti con stomatite reclutati in modo prospettico, è stato ottenuto anche un campione di cellule tramite brushing (*cytobrush*), conservato in DNA/RNA shield (Zymo Research, Europe, Freiberg, Germania) per essere poi sottoposto alle analisi genetiche.

Le analisi genetiche sono state effettuate presso l'unità di Neurologia, IRCCS Istituto di Scienze Neurologiche di Bologna, Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie dell'Università di Bologna, Ospedale "Bellaria".

5.2.2 Analisi della metilazione del DNA

L'estrazione del DNA dalle sezioni dei tessuti FFPE e dai *cytobrush* è stata effettuata mediante il kit Master-Pure Complete DNA extraction (Epicentre, Madison, WI, USA). Il DNA estratto (200-500 ng) è stato poi trattato con bisolfito tramite il kit EZ DNA Methylation-Lightning (Zymo Research Europe, Freiberg, Germania), secondo il protocollo del produttore. Il pannello era composto da 10 geni target (*TERT*, *ZAP70*, *GP1BB*, *LRRTM1*, *FLII*, *MIR124-1*, *MIR296*,

KIF1A, *PARP15*, *MAGEC2*), selezionati poiché i loro ortologhi umani hanno mostrato un profilo di metilazione alterato in corso di HNSCC (Marsit *et al.*, 2009; Demokan *et al.*, 2010; Roh *et al.*, 2012; Guerrero-Preston *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015, Morandi *et al.*, 2015; Morandi *et al.*, 2017a; Lian *et al.*, 2018).

Per identificare le isole CpG di potenziale interesse nelle regioni promoter e nella parte iniziale delle regione codificante dei geni, sono state investigate le sequenze genomiche depositate sul browser *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>), considerando le regioni con la migliore omologia fra il gene felino e l'ortologo umano. È stato quindi impiegato il programma *MethPrimer* per identificare le CpG e disegnare i primer ottimali (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>; Li e Dahiya, 2002). L'elenco dei geni e dei primer utilizzati, le coordinate delle regioni indagate e la loro percentuale di omologia con gli ortologhi umani sono riportati nella **Tabella 5.1**. Le CpG analizzate per ciascun gene sono state numerate consecutivamente, e le corrispondenti coordinate sono indicate nella **Tabella 5.2**.

È stata generata una libreria di ampliconi *locus*-specifici utilizzando i primer marcati e la DNA polimerasi Phusion U (ThermoFisher, cod. F555L, Waltham, MA, USA), che consente un'amplificazione accurata del DNA trattato con bisolfito. La libreria è stata allestita con una PCR *Multiplex* suddivisa in due fasi: una prima fase per l'arricchimento delle sequenze target, e una seconda fase di amplificazione a basso numero di cicli, finalizzata al *barcoding* delle sequenze target. Il *barcoding* è stato effettuato tramite il kit Index Nextera (Illumina, San Diego, California, USA) come descritto in studi precedenti (Morandi *et al.*, 2017a; Morandi *et al.*, 2017b). Dopo ciascuna fase di PCR, il DNA amplificato è stato purificato tramite biglie magnetiche (MagSi-NGSPREP, MagnaMedics, Geleen, Olanda) e quantificato con il fluorimetro Quantus (Promega, Milano, Italia). Il sequenziamento del DNA è stato condotto con il sistema MiSEQ (Illumina, San Diego, California, USA), seguendo il protocollo del produttore. La procedura di NGS è stata allestita in modo da ottenere almeno 1k *reads*/regione, per garantire una profondità di copertura (*depth of coverage*) pari a 1000x.

I file FASTQ già tagliati per l'identificatore *multiplex* sono stati processati per il controllo qualità (>Q30), per la lunghezza delle *reads* (>80 bp) e successivamente uniti con il programma *PEAR* sulla piattaforma *Galaxy* (Afgan *et al.*, 2016).

Per valutare il livello di metilazione di ciascuna CpG, è stata impiegata la funzione *grep* in ambiente *Perl*, creando singoli file specifici per ciascun sito d'interesse. Per ogni CpG indagata nelle regioni selezionate, la quota di ampliconi metilati (valore β) è stata calcolata tramite Kismeth <http://katahdin.mssm.edu/kismeth/> (Gruntman *et al.*, 2008).

5.2.3 Analisi mutazionale di *TP53*

Per tutti i casi è stato effettuato un sequenziamento profondo degli esoni 5-8 del gene *TP53* felino come descritto nel nostro lavoro precedente (Renzi *et al.*, 2019). I casi sono stati classificati come mutati quando negli esoni indagati erano presenti una o più alterazioni della sequenza nucleotidica, che implicavano un cambio aminoacidico dannoso per la funzione della proteina secondo il software *PolyPhen-2*, e con una VAF (*variation allele frequency*) >10% (Adzhubei *et al.*, 2010).

5.2.4 Analisi statistica

Le variabili continue sono state espresse come media \pm deviazione standard, quelle categoriche come frequenze e percentuali.

I dati sulla metilazione sono stati elaborati in modo preliminare con tre strumenti web: *Methylation Plotter*, *easyROC* e *ClustVis* (Mallona *et al.*, 2014; Metsalu e Vilo, 2015; Goksuluk *et al.*, 2016).

Per i campioni biotici è stata effettuata un'analisi tramite *volcano plot* per identificare le posizioni CpG differenzialmente metilate, sulla base della differenza fra le medie in combinazione ai *P-value*, corretti con il metodo di Simes per il controllo del *false discovery rate* (FDR, *Q-values*; Simes, 1986). I *P-value* non corretti sono stati calcolati con i test-*t* di permutazione per confrontare i FOSCC con la mucosa orale non neoplastica, mentre è stato applicato il test di *Wilcoxon* della somma dei ranghi per confrontare i FOSCC linguali con quelli in sede extralinguale, e le stomatiti con i campioni di mucosa orale normale. La relazione fra mutazioni di *TP53* e diagnosi è stata analizzata mediante il *test esatto di Fisher*.

È stata poi applicata ai dati di metilazione la regressione logistica regolarizzata *lasso* (ℓ_1), comparando i FOSCC con la mucosa non neoplastica, per selezionare un sottogruppo

significativo di siti CpG fra quelli identificati tramite *volcano plot* (Hastie *et al.*, 2015). Anche lo stato mutazionale di *TP53* è stato incluso nel modello. La convalida incrociata *three-fold* è stata utilizzata per stabilire il valore ottimale di λ corrispondente alla devianza minima. A causa del limitato numero di campioni, le predizioni sul modello di regressione *lasso* selezionate tramite la convalida incrociata sono state basate sull'intero *dataset*.

Inoltre, il pattern di metilazione dei 10 brushing è stato confrontato con i corrispondenti campioni FFPE tramite il *exact Wilcoxon signed-rank test*, seguito dal controllo del FDR con il metodo di Simes.

Le analisi sono state effettuate tramite un *software* commerciale (*Stata software, v15*, StataCorp LLC, College Station, TX, USA) e l'analisi di regressione *lasso* è stata svolta applicando il comando 'lassologit'. Il livello di significatività (P) è stato posto a 0.05.

Tabella 5.1 Lista dei geni indagati con i relativi primer e coordinate genomiche.

Gene	Descrizione	Primer Forward	Primer Reverse	Coordinate genomiche*	Distanza dal sito di inizio della trascrizione	Numero di CpG indagate	Percentuale di omologia con il gene umano
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>	GGTTTGGGATTTGGGA TTAG	AAACCAAACAAA ACCCTACTCTAAC T	Chrom A1, strand +: 241334283-241334444; span 162 bp	+12203 (introni 9-10)	6	66%
ZAP70	<i>Zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70</i>	GATTTYGAYGGGTTGT TTTG	CTCTCACCTCCAA CTTCCAC	Chrom A3, strand -: 64661492-64661633; span: 142 bp	+268 (esone 2)	19	94%
GP1BB	<i>Glycoprotein 1b platelet beta subunit</i>	GTTGTTGTTGTTGTTG TTGTTGT	AAACTCCTTAAAA CAAAATCCTATC	Chrom D3, strand -: 28618590-28618778; span: 189 bp	+494 (esone 2)	26	89%
LRRTM1	<i>Leucine-rich repeat transmembrane neuronal 1</i>	TATAGTTTTGGYGGAGG GAAG	CCACTAACCRATA CCACCTTTT	Chrom A3, strand -: 98233218-98233375; span: 158 bp	- 887 (promoter)	20	77%
FLI1	<i>Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor</i>	AGGGTTTAGGGYGTTA GGG	CCACTACCCAATC RCTTACC	Chrom D1, strand +: 25655859-25656009; span: 151 bp	+7543 (introni 1-2)	10	95%
MiR124-1 (<i>ENSFCAG0000016467.6</i>)	<i>MicroRNA 124-1</i>	GGATTAAGATTAGATT TTGTTTTT	AAATTTATTCTAC TACCCCTCAAACC	Chrom F2, strand +: 17157280-17157470; span: 191 bp	- 14 (promoter)	7	100%
MiR296	<i>MicroRNA 296/KMT2C</i>	TGATTTTTGGTTATTT TAGTTTTG	CACTCTAAAAATT TACTACTAAACACC	Chrom A2, strand -: 166048735-166048911; span: 177 bp	- 73 (promoter) all'interno del gene KMT2C, esone 44	8	87%
KIF1A	<i>Kinesin family member 1A</i>	GGGTAGGGTTGTAGG AGTTTAG	AACTCCAACCTCT TCAAAACAAAT	Chrom C1, strand -: 221895775-221895934; span: 160 bp	+8921 (introni 3-4)	10	97%
PARP15	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase family member 15</i>	AATTTTAAGATTATAA GGAAGGTAGAAGTG	CCACAAATTACTA TACAAATTCTTC	Chrom C2, strand +: 68346817-68346991; span: 175 bp	- 863 (promoter)	10	70%
MAGEC2	<i>Melanoma-associate Antigen C2</i>	AGTAGTTTGGGGAAGT TTGTTTTTT	CAATTTAACTACC ATCTTATCTAAAA CATC	Chrom X, strand +: 116246756-116246922; span: 167 bp	- 65 (promoter)	10	37%

*genoma di riferimento: *Felis_catus_9.0/felCat9*

Tabella 5.2 Coordinate delle CpG indagate.

<i>Gene</i>	CpG	Coordinate	<i>Gene</i>	CpG	Coordinate
<i>TERT</i>	1	chrA1.241334306	<i>GP1BB</i>	19	chrD3.28618667
<i>TERT</i>	2	chrA1.241334321	<i>GP1BB</i>	20	chrD3.28618658
<i>TERT</i>	3	chrA1.241334352	<i>GP1BB</i>	21	chrD3.28618641
<i>TERT</i>	4	chrA1.241334375	<i>GP1BB</i>	22	chrD3.28618634
<i>TERT</i>	5	chrA1.241334384	<i>GP1BB</i>	23	chrD3.28618631
<i>TERT</i>	6	chrA1.241334408	<i>GP1BB</i>	24	chrD3.28618629
<i>ZAP70</i>	1	chrA3.64661628	<i>GP1BB</i>	25	chrD3.28618625
<i>ZAP70</i>	2	chrA3.64661625	<i>GP1BB</i>	26	chrD3.28618615
<i>ZAP70</i>	3	chrA3.64661606	<i>LRRTM1</i>	1	chrA3.98233365
<i>ZAP70</i>	4	chrA3.64661599	<i>LRRTM1</i>	2	chrA3.98233350
<i>ZAP70</i>	5	chrA3.64661591	<i>LRRTM1</i>	3	chrA3.98233346
<i>ZAP70</i>	6	chrA3.64661587	<i>LRRTM1</i>	4	chrA3.98233343
<i>ZAP70</i>	7	chrA3.64661583	<i>LRRTM1</i>	5	chrA3.98233336
<i>ZAP70</i>	8	chrA3.64661577	<i>LRRTM1</i>	6	chrA3.98233329
<i>ZAP70</i>	9	chrA3.64661572	<i>LRRTM1</i>	7	chrA3.98233325
<i>ZAP70</i>	10	chrA3.64661565	<i>LRRTM1</i>	8	chrA3.98233315
<i>ZAP70</i>	11	chrA3.64661556	<i>LRRTM1</i>	9	chrA3.98233312
<i>ZAP70</i>	12	chrA3.64661546	<i>LRRTM1</i>	10	chrA3.98233308
<i>ZAP70</i>	13	chrA3.64661544	<i>LRRTM1</i>	11	chrA3.98233295
<i>ZAP70</i>	14	chrA3.64661541	<i>LRRTM1</i>	12	chrA3.98233289
<i>ZAP70</i>	15	chrA3.64661531	<i>LRRTM1</i>	13	chrA3.98233276
<i>ZAP70</i>	16	chrA3.64661529	<i>LRRTM1</i>	14	chrA3.98233271
<i>ZAP70</i>	17	chrA3.64661523	<i>LRRTM1</i>	15	chrA3.98233267
<i>ZAP70</i>	18	chrA3.64661519	<i>LRRTM1</i>	16	chrA3.98233265
<i>ZAP70</i>	19	chrA3.64661512	<i>LRRTM1</i>	17	chrA3.98233254
<i>GP1BB</i>	1	chrD3.28618753	<i>LRRTM1</i>	18	chrA3.98233247
<i>GP1BB</i>	2	chrD3.28618747	<i>LRRTM1</i>	19	chrA3.98233245
<i>GP1BB</i>	3	chrD3.28618744	<i>LRRTM1</i>	20	chrA3.98233227
<i>GP1BB</i>	4	chrD3.28618738	<i>FLI1</i>	1	chrD1.25655870
<i>GP1BB</i>	5	chrD3.28618736	<i>FLI1</i>	2	chrD1.25655882
<i>GP1BB</i>	6	chrD3.28618732	<i>FLI1</i>	3	chrD1.25655884
<i>GP1BB</i>	7	chrD3.28618730	<i>FLI1</i>	4	chrD1.25655887
<i>GP1BB</i>	8	chrD3.28618726	<i>FLI1</i>	5	chrD1.25655897
<i>GP1BB</i>	9	chrD3.28618724	<i>FLI1</i>	6	chrD1.25655908
<i>GP1BB</i>	10	chrD3.28618721	<i>FLI1</i>	7	chrD1.25655925
<i>GP1BB</i>	11	chrD3.28618719	<i>FLI1</i>	8	chrD1.25655954
<i>GP1BB</i>	12	chrD3.28618713	<i>FLI1</i>	9	chrD1.25655978
<i>GP1BB</i>	13	chrD3.28618707	<i>FLI1</i>	10	chrD1.25655996
<i>GP1BB</i>	14	chrD3.28618700	<i>MiR124-1</i>	1	chrF2.17157304
<i>GP1BB</i>	15	chrD3.28618695	<i>MiR124-1</i>	2	chrF2.17157315
<i>GP1BB</i>	16	chrD3.28618686	<i>MiR124-1</i>	3	chrF2.17157348
<i>GP1BB</i>	17	chrD3.28618680	<i>MiR124-1</i>	4	chrF2.17157350
<i>GP1BB</i>	18	chrD3.28618676	<i>MiR124-1</i>	5	chrF2.17157366

<i>Gene</i>	CpG	Coordinate
<i>MiR124-1</i>	6	chrF2.17157400
<i>MiR124-1</i>	7	chrF2.17157410
<i>MiR296</i>	1	chrA2.166048887
<i>MiR296</i>	2	chrA2.166048869
<i>MiR296</i>	3	chrA2.166048866
<i>MiR296</i>	4	chrA2.166048805
<i>MiR296</i>	5	chrA2.166048776
<i>MiR296</i>	6	chrA2.166048773
<i>MiR296</i>	7	chrA2.166048770
<i>MiR296</i>	8	chrA2.166048761
<i>KIF1</i>	1	chrC1.221895912
<i>KIF1</i>	2	chrC1.221895901
<i>KIF1</i>	3	chrC1.221895892
<i>KIF1</i>	4	chrC1.221895873
<i>KIF1</i>	5	chrC1.221895841
<i>KIF1</i>	6	chrC1.221895839
<i>KIF1</i>	7	chrC1.221895834
<i>KIF1</i>	8	chrC1.221895812
<i>KIF1</i>	9	chrC1.221895809
<i>KIF1</i>	10	chrC1.221895802

<i>Gene</i>	CpG	Coordinate
<i>PARP15</i>	1	chrC2.68346885
<i>PARP15</i>	2	chrC2.68346899
<i>PARP15</i>	3	chrC2.68346904
<i>PARP15</i>	4	chrC2.68346918
<i>PARP15</i>	5	chrC2.68346921
<i>PARP15</i>	6	chrC2.68346939
<i>PARP15</i>	7	chrC2.68346942
<i>PARP15</i>	8	chrC2.68346958
<i>PARP15</i>	9	chrC2.68346964
<i>PARP15</i>	10	chrC2.68346966
<i>MAGEC2</i>	1	chrX.116246787
<i>MAGEC2</i>	2	chrX.116246790
<i>MAGEC2</i>	3	chrX.116246793
<i>MAGEC2</i>	4	chrX.116246807
<i>MAGEC2</i>	5	chrX.116246829
<i>MAGEC2</i>	6	chrX.116246833
<i>MAGEC2</i>	7	chrX.116246842
<i>MAGEC2</i>	8	chrX.116246876
<i>MAGEC2</i>	9	chrX.116246879
<i>MAGEC2</i>	10	chrX.116246892

5.3 Risultati

5.3.1 FOSCC

Sono stati inclusi 31 casi di FOSCC, appartenenti a 27 gatti Europei, un Siamese, un Persiano, un Certosino e un gatto Thai. Erano presenti 14 maschi castrati (45%) e 17 femmine sterilizzate (55%). L'età media era di $13 \pm 2,7$ anni. La sede delle lesioni comprendeva gengiva mandibolare ($n = 13$; 42%), gengiva mascellare ($n = 7$; 22,6%), lingua ($n = 8$; 25,8%), mucosa vestibolare ($n = 1$; 3,2%) e palato duro ($n = 2$; 6,4%). L'istotipo tumorale era convenzionale in 27 casi (87%; ben differenziati, $n = 8$; mediamente differenziati, $n = 15$; scarsamente differenziati, $n = 4$). I restanti FOSCC erano di tipo acantolitico ($n = 2$; 6,5%) e a cellule fusate ($n = 2$; 6,5%; **Tabella 5.3**).

Mutazioni del dominio legante il DNA sono state rilevate in 21 tumori (68%), e comprendevano 18 mutazioni missenso, 2 nonsense e due delezioni *in-frame*, distribuite in tutti e 4 gli esoni analizzati (esone 5, $n = 7$; esone 6, $n = 5$; esone 7, $n = 8$; esone 8, $n = 2$; **Tabella 5.3**).

5.3.2 Lesioni infiammatorie croniche

Sono stati incluse 25 biopsie istologiche di lesioni infiammatorie croniche orali, appartenenti a 24 soggetti Europei ed un Maine Coon, di cui 14 maschi (56%; 13 castrati) e 11 femmine sterilizzate (44%). L'età media era di $8,4 \pm 4,7$ anni. La diagnosi istologica era di stomatite linfoplasmocitaria in 17 casi (68%), di cui 13 (76%) in sede gengivale e 4 (24%) in sede extra-gengivale. Nei rimanenti 4 casi la diagnosi era di granuloma eosinofilo, tutti localizzati alla lingua (**Tabella 5.4**).

Solo in un caso (4%) è stata rilevata una mutazione missenso nell'esone 7 di *TP53* (**Tabella 5.4**).

5.3.3 Mucosa orale normale

Sono stati inclusi nello studio 12 campioni di mucosa orale normale, provenienti da 10 gatti Europei, un Certosino ed un Persiano. Erano presenti 7 maschi castrati (58%) e 5 femmine sterilizzate (42%), con età media di $10 \pm 2,6$ anni. Le cause di morte in questi soggetti comprendevano malattia renale cronica ($n = 3$), linfoma intestinale ($n = 2$), cardiomiopatia ($n = 2$), cistite emorragica ($n = 1$), trauma ($n = 1$), peritonite infettiva felina ($n = 1$), carcinoma polmonare ($n = 1$) ed insufficienza epatica ($n = 1$). In nessun caso sono state riscontrate mutazioni del dominio legante il DNA di *TP53* (**Tabella 5.4**).

Tabella 5.3 Gatti con carcinoma squamocellulare orale: segnalamento, istotipo ed analisi mutazionale di *TP53*.

ID	Razza	Sesso	Età (anni)	Sede della lesione	Istotipo	Stato mutazionale di <i>TP53</i>
732/10	Europeo	Fs	14	Gengiva mandibolare	Acantolitico	p.V165M
AP768	Europeo	Fs	15	Gengiva mandibolare	Convenzionale MD	p.R275W
AP1324	Europeo	Mc	11	Gengiva mandibolare	Convenzionale SD	Wild type
AP2389	Europeo	Fs	14	Gengiva mascellare	Convenzionale MD	p.N232D
AP3911	Europeo	Fs	16	Gengiva mandibolare	Convenzionale MD	V210 del in frame
AP4031	Europeo	Mc	13	Gengiva mandibolare	Convenzionale MD	p.H207P
AP4148	Europeo	Fs	10	Lingua, faccia ventrale	Convenzionale MD	p.M230I
AP4685	Europeo	Mc	16	Gengiva mandibolare	Convenzionale MD	p.C168F
AP4925	Europeo	Fs	19	Gengiva mandibolare	Convenzionale MD	p.G259E
AP6142	Europeo	Fs	16	Gengiva mandibolare	Acantolitico	p.R241Q
AP8694	Europeo	Fs	12	Gengiva mascellare	Convenzionale SD	p.T249I
AP8695	Certosino	Fs	17	Lingua, faccia ventrale	Convenzionale BD	p.R167H
AP9641	Europeo	Mc	16	Gengiva mandibolare	Convenzionale BD	p.Y155* ; p.R206Q
AP9960	Persiano	Mc	11	Gengiva mandibolare	Convenzionale SD	I247_T249del in frame
AP11306	Europeo	Fs	12	Lingua faccia ventrale	A cellule fusate	<i>Wild type</i>
AP11999	Europeo	Mc	16	Vestibolo buccale	Convenzionale MD	<i>Wild type</i>
AP12817	Europeo	Fs	12	Gengiva mandibolare	Convenzionale SD	p.V165M
AP13028	Europeo	Mc	16	Gengiva mandibolare	Convenzionale MD	<i>Wild type</i>
AP13806	Europeo	Mc	15	Palato duro	Convenzionale BD	p.V265E
AP14878	Europeo	Mc	13	Gengiva mascellare	Convenzionale MD	<i>Wild type</i>
AP16763	Europeo	Fs	18	Gengiva mascellare	Convenzionale BD	<i>Wild type</i>
AP16912	Siamese	Fs	8	Gengiva mascellare	Convenzionale MD	p.Y227C
AP17062	Europeo	Mc	13	Lingua, frenulo	A cellule fusate	<i>Wild type</i>
AP17083	Europeo	Fs	15	Lingua, frenulo	Convenzionale MD	<i>Wild type</i>
AP17595	Thai	Fs	12	Gengiva mascellare	Convenzionale WD	<i>Wild type</i>
AP17714	Europeo	Mc	9	Lingua, base	Convenzionale WD	<i>Wild type</i>
AP17845	Europeo	Mc	11	Gengiva mascellare	Convenzionale MD	p.R150H
AP17919	Europeo	Fs	10	Lingua faccia ventrale	Convenzionale MD	p.R167H
AP18102	Europeo	Mc	12	Lingua, base	Convenzionale BD	P.R206*
AP18329	Europeo	Mc	11	Gengiva	Convenzionale BD	P.V209A
AP18369	Europeo	Fs	13	Orale caudale	Convenzionale MD	P.V209A

Fs: femmina sterilizzata; Mc: maschio castrato; BD: ben differenziato; MD: moderatamente differenziato; SD: scarsamente differenziato.

Tabella 5.4 Gatti con lesioni orali istologicamente riferibili a stomatiti linfoplasmocitarie o al complesso del granuloma eosinofilo: segnalamento, diagnosi, sede della lesione clinici e stato mutazionale di *TP53*.

ID	Razza	Sesso	Età (anni)	Diagnosi	Sede della lesione	Stato mutazionale diTP53
AP498	Europeo	Mc	1	Granuloma eosinofilo	Linguale	<i>Wild type</i>
AP847	Europeo	Fs	12	Stomatite linfoplasmocitaria	Gengivale	<i>Wild type</i>
AP2115	Europeo	Fs	12	Granuloma eosinofilo	Linguale	<i>Wild type</i>
AP2633	Europeo	Fs	10	Granuloma eosinofilo	Linguale	<i>Wild type</i>
AP2924	Maine Coon	Mc	1	Stomatite linfoplasmocitaria	Gengivale	<i>Wild type</i>
AP5978	Europeo	Fs	7	Granuloma eosinofilo	Linguale	p.M230I
AP7692	Europeo	Fs	13	Stomatite linfoplasmocitaria	Gengivale	<i>Wild type</i>
AP9309	Europeo	Fs	5	Stomatite linfoplasmocitaria	Gengivale	<i>Wild type</i>
AP10728	Europeo	Mc	9	Granuloma eosinofilo	Linguale	<i>Wild type</i>
AP11852	Europeo	Mc	11	Stomatite linfoplasmocitaria	Gengivale	<i>Wild type</i>
AP16397	Europeo	Mc	15	Stomatite linfoplasmocitaria	Gengivale	<i>Wild type</i>
AP16622	Europeo	Fs	14	Granuloma eosinofilo	Linguale	<i>Wild type</i>
AP16946	Europeo	Mc	9	Granuloma eosinofilo	Linguale	<i>Wild type</i>
AP15612	Europeo	Mc	11	Granuloma eosinofilo	Linguale	<i>Wild type</i>
AP16102	Europeo	Mc	17	Stomatite linfoplasmocitaria	Extragengivale	<i>Wild type</i>
AP16876	Europeo	Mc	3	Stomatite linfoplasmocitaria	Extragengivale	<i>Wild type</i>
AP17076	Europeo	Mc	10	Stomatite linfoplasmocitaria	Gengivale	<i>Wild type</i>
AP17386	Europeo	Fs	14	Stomatite linfoplasmocitaria	Gengivale	<i>Wild type</i>
AP17936	Europeo	Fs	4	Stomatite linfoplasmocitaria	Gengivale	<i>Wild type</i>
AP17407	Europeo	Fs	1	Stomatite linfoplasmocitaria	Gengivale	<i>Wild type</i>
AP17790	Europeo	M	1	Stomatite linfoplasmocitaria	Gengivale	<i>Wild type</i>
AP17827	Europeo	Mc	9	Stomatite linfoplasmocitaria	Gengivale	<i>Wild type</i>
AP18136	Europeo	Mc	5	Stomatite linfoplasmocitaria	Gengivale	<i>Wild type</i>
AP18349	Europeo	Mc	8	Stomatite linfoplasmocitaria	Extragengivale	<i>Wild type</i>
AP18404	Europeo	Fs	8	Stomatite linfoplasmocitaria	Extragengivale	<i>Wild type</i>

Fs: femmina sterilizzata; Mc: maschio castrato.

Tabella 5.5 Gatti con mucosa orale priva di lesioni campionata in sede autoptica: segnalamento, causa del decesso e stato mutazionale di *TP53*.

ID	Razza	Sesso	Età (anni)	Causa del decesso	Stato mutazionale di TP53
AP13580	Certosino	Fs	8	Malattia renale cronica	<i>Wild type</i>
AP14463	Europeo	Mc	14	Cardiomiopatia ipertrofica	<i>Wild type</i>
AP13583	Europeo	Fs	10	Linfoma intestinale	<i>Wild type</i>
AP14419	Europeo	Mc	7	Cistite emorragica	<i>Wild type</i>
AP14668	Europeo	Mc	8	Cardiomiopatia ipertrofica	<i>Wild type</i>
AP14930	Europeo	Mc	7	Linfoma intestinale	<i>Wild type</i>
AP15073	Europeo	Mc	15	Carcinoma polmonare	<i>Wild type</i>
AP17663	Europeo	Fs	9	Trauma	<i>Wild type</i>
AP17664	Europeo	Mc	10	Malattia renale cronica	<i>Wild type</i>
AP17951	Europeo	Fs	9	FIP	<i>Wild type</i>
AP17967	Persiano	Fs	11	Malattia renale cronica	<i>Wild type</i>
AP17979	Europeo	Mc	12	Insufficienza epatica	<i>Wild type</i>

Fs: femmina sterilizzata; Mc: maschio castrato; FIP: peritonite infettiva felina

5.3.4 Analisi della metilazione e algoritmo diagnostico

Complessivamente sono state analizzate tramite bisolfito-NGS 126 CpG, appartenenti ai geni *TERT*, *ZAP70*, *GP1BB*, *LRRTM1*, *FLII*, *MiR124-1*, *MiR296*, *KIF1A*, *PARP15* e *MAGEC2*. È stata ottenuta una *depth of coverage* media di 1241.

Nei FOSCC, l'analisi tramite *Methylation Plotter* ha rilevato ipermetilazione del DNA statisticamente significativa per *ZAP70* (3/9 CpG), *FLII* (8/10 CpG) e *MiR124-1* (7/7 CpG) rispetto alla mucosa orale non neoplastica, mentre i geni *TERT* (3/6 CpG), *KIF1A* (10/10 CpG), *PARP15* (10/10 CpG) e *MAGEC2* (4/10 CpG) erano significativamente ipometilati nei FOSCC rispetto alla mucosa non neoplastica (**Figura 5.1**).

Poiché *MAGEC2* è posizionato nel cromosoma X, è stato analizzato confrontando i FOSCC con le mucose orali non neoplastiche separatamente per i soggetti maschi e femmine. È stato riscontrato lo stesso profilo di metilazione nei due sessi, con il gene totalmente metilato nella mucosa normale ed ipometilato nei FOSCC, indipendentemente quindi dal numero di alleli.

Con l'analisi delle curve ROC (*Receiver Operating Characteristic*), le migliori performance sono state ottenute per le CpG *FLII* 5 (AUC: 0,91; sensibilità 0,77; specificità 1,00), *MiR124-1*

6 (AUC: 0,85; sensibilità: 0,70; specificità: 0,97), *KIF1A* 7 (AUC: 0,88; sensibilità: 0,85; specificità: 0,80) e *MAGEC2* 10 (AUC: 0,89; sensibilità: 0,86; specificità: 0,83).

Tramite *ClustVis* è stata generata una *heatmap* conimposta da due *cluster*: un cluster comprendente 27 FOSCC e una stomatite, ed un cluster con tutte le mucose orali normali, 24 stomatiti e 4 FOSCC (**Figura 5.2**).

L'analisi tramite *volcano plot* ha permesso di identificare 47 siti CpG differenzialmente metilati tra FOSCC e mucosa non neoplastica (mucose orali normali e stomatiti), caratterizzati sia da elevata significatività statistica che da differenze di ampia magnitudo (**Figura 5.3**). In particolare, *ZAP70*, *FLI1* e *MiR124-1* erano ipermetilati nei carcinomi, mentre *LRRTM1*, *KIF1A* and *MAGEC2* risultavano ipometilati (**Tabella 5.6**). Non erano invece presenti differenze significative del profilo di metilazione fra FOSCC linguali ed extra-linguali. Considerando i campioni non neoplastici, due geni (*LRRTM* e *MiR124-1*) erano ipermetilati nelle stomatiti rispetto alla mucosa normale.

Le mutazioni di *TP53* erano significativamente più frequenti nei FOSCC (68%) rispetto ai campioni di mucosa non neoplastica (3%; $P < 0,001$). Non erano presenti differenze significative nella frequenza mutazionale di *TP53* fra carcinomi linguali ed extralinguali ($P = 0,134$), né fra stomatiti e mucosa orale non neoplastica ($P > 0,99$).

Applicando l'analisi di regressione *lasso* allo stato mutazionale di *TP53* insieme ai 47 siti CpG con differenze di ampia magnitudo ($\Delta > |0,1|$) ed elevata significatività statistica ($Q < 0,05$), è stato impostato un algoritmo *stepwise* che includeva *TP53*, *FLI1*, *MiR124-1*, *KIF1A* e *MAGEC2* (**Tabella 5.7**; **Figura 5.4**). In base a questo algoritmo, i casi venivano classificati come positivi (cioè neoplastici) in presenza di una delle seguenti condizioni: (a) ipermetilazione di *MiR124-1* 6 ($\beta > 0,3$), ipometilazione di *MAGEC2* 10 ($\beta < 0,7$) e *TP53* mutato; (b) nei casi in cui venivano soddisfatti solo uno o due criteri del punto (a), ipometilazione di *KIF1A* 1/7/8 ($\beta < 0,8$) ed ipermetilazione di *FLI1* 5/6/7 ($\beta > 0,1$). I casi rimanenti erano considerati negativi (non neoplastici). L'algoritmo proposto ha consentito di differenziare i casi di FOSCC dalle mucose non neoplastiche con sensibilità del 93.5% e specificità del 100% (accuratezza complessiva 97.1%; **Tabella 5.8**).

5.3.4 Analisi dei cytobrush

Le analisi molecolari sono state effettuate per 5 brushing orali di FOSCC e 5 brushing di stomatiti. In tutti i casi è stata riscontrata perfetta concordanza dello stato mutazionale di *TP53* fra biopsia istologica e corrispondente *cytobrush* (1 caso mutato e 9 wild type). Confrontando la metilazione del DNA, 8 CpG sulle 126 analizzate (6%) hanno evidenziato sia differenze di ampia magnitudo nelle medie che elevata significatività statistica (*TERT1*, *TERT6*, *MiR124-1 2*, *KIF1A 2*, *KIFA 3*, *KIF1A 4*, *KIF1A 6* e *KIF1A 7*); una di queste CpG (*KIF1A*) faceva parte dell'algoritmo proposto. Applicando l'algoritmo ai brushing, 2 carcinomi non sono stati correttamente identificati come positivi, mentre tutti i casi non neoplastici sono stati riconosciuti come negativi (sensibilità: 60%; specificità: 100%; accuratezza: 80%).

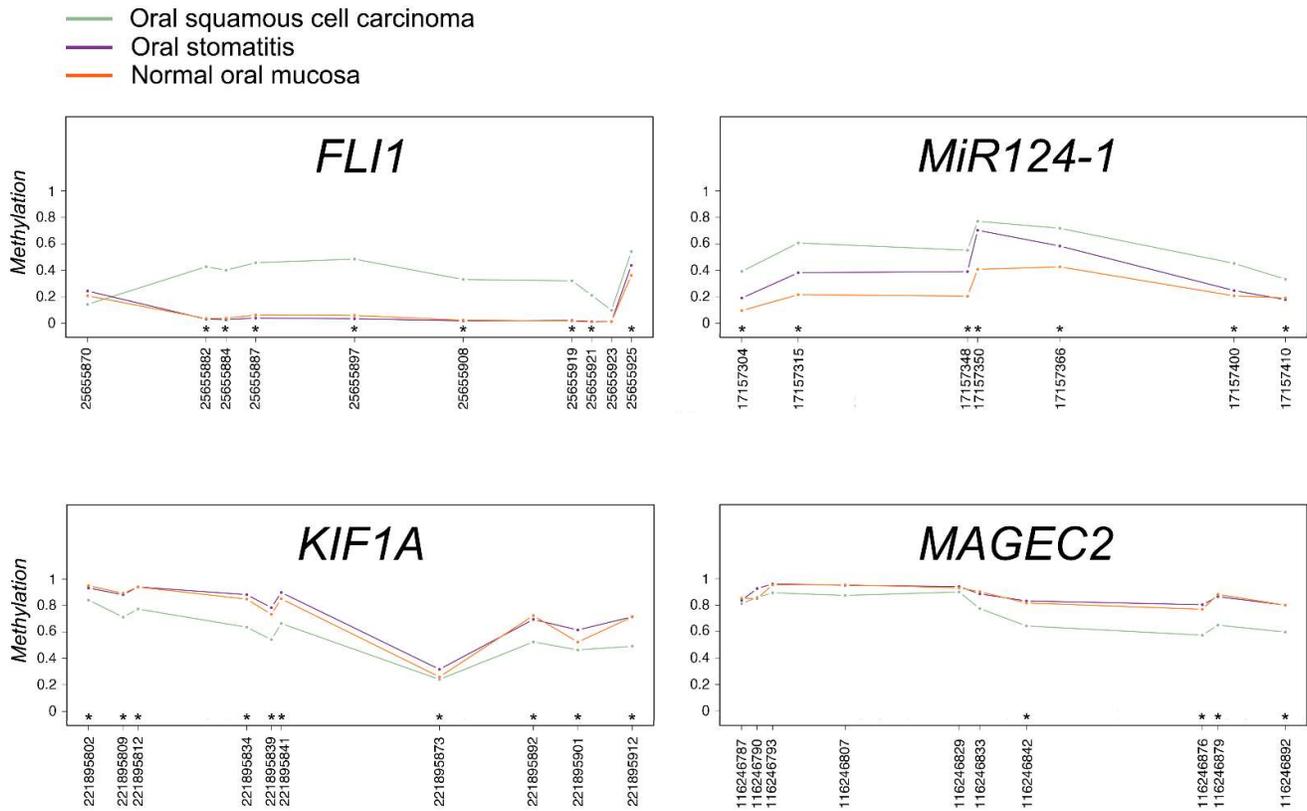


Figura 5.1 Profilo di 4 geni differenzialmente metilati in 31 carcinomi squamocellulari orali di gatto rispetto a campioni di mucosa orale non neoplastica (stomatiti croniche e mucosa orale normale). Per ciascun gruppo di campioni, ogni punto rappresenta il livello medio metilazione per la CpG corrispondente. Gli asterischi indicano una significatività statistica ($P < 0.05$) calcolata mediante il test di *Kruskal-Wallis*.

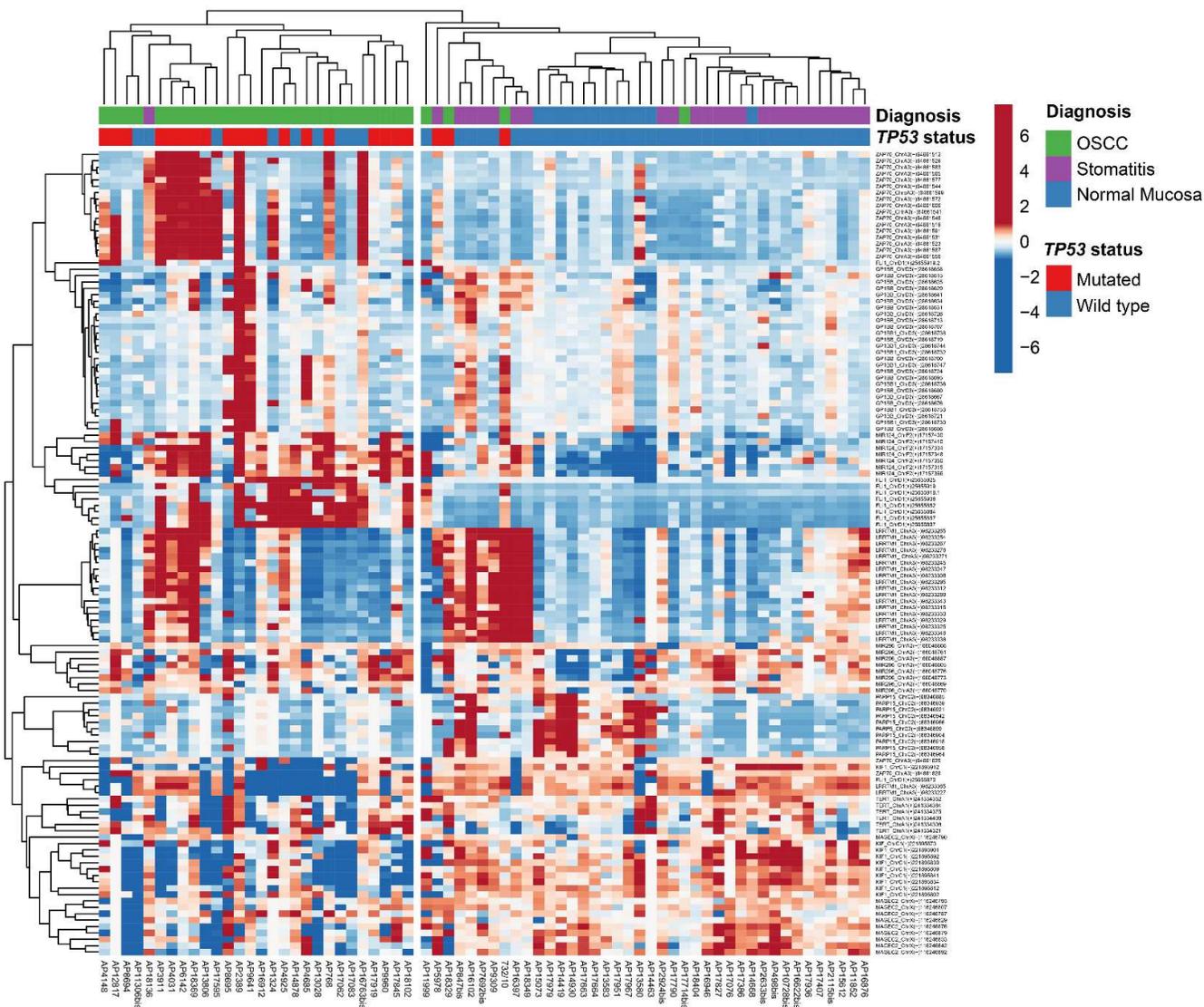


Figura 5.2 Mappa di calore basata sulle CpG dei 10 geni valutati in 68 campioni biotipici di mucosa orale felina. I valori contenuti nella matrice sono rappresentati da un colore in funzione del livello di metilazione del DNA (rosso: alto, blu: basso). Le righe indicano le CpG, le colonne indicano i campioni. I *cluster* gerarchici sono stati generati utilizzando la distanza di correlazione e l'*average linkage*. Sono inoltre rappresentate le mutazioni di *TP53* e la diagnosi (OSCC: carcinoma squamocellulare orale). Sono stati identificati due *cluster*: quello di sinistra è composto da 27 carcinomi squamocellulari ed una stomatite; il *cluster* di destra comprende tutti i casi di mucosa normale, 24 stomatiti e 4 carcinomi.

Tabella 5.6 Quarantasette siti CpG differenzialmente metilati tra FOSCC e mucosa non neoplastica di alta rilevanza statistica, individuati mediante *volcano plot*.

CpG	Differenza delle	Q-value
ZAP703	0.151	0.003706
ZAP704	0.150	0.002520
ZAP705	0.148	0.002250
ZAP706	0.139	0.007800
ZAP707	0.138	0.005305
ZAP708	0.117	0.008205
ZAP709	0.139	0.006300
ZAP7010	0.127	0.006138
ZAP7011	0.152	0.003850
ZAP7012	0.149	0.002520
ZAP7013	0.136	0.003706
ZAP7014	0.164	0.001454
ZAP7015	0.153	0.002250
ZAP7016	0.144	0.003850
ZAP7017	0.152	0.004768
ZAP7018	0.146	0.002845
ZAP7019	0.137	0.008400
LRRTM11	-0.135	0.010683
LRRTM1	-0.188	0.003706
FLII 2	0.379	<0.000001
FLII 3	0.376	<0.000001
FLII 4	0.397	<0.000001
FLII 5	0.407	<0.000001
FLII 6	0.300	0.000003
FLII 7	0.293	0.000005
FLII 8	0.202	0.000139
FLII 10	0.147	0.008400
MiR124-11	0.257	0.000008
MiR124-12	0.236	0.000030
MiR124-13	0.184	0.000957
MiR124-14	0.125	0.012332
MiR124-15	0.129	0.014963
MiR124-16	0.196	0.000005
MiR124-17	0.126	0.000794
KIF1A 1	-0.225	0.000078
KIF1A 2	-0.151	0.000139
KIF1A 3	-0.209	0.000008
KIF1A 5	-0.231	0.000004
KIF1A 6	-0.209	0.000006
KIF1A 7	-0.234	0.000001
KIF1A 8	-0.155	0.000073
KIF1A 9	-0.166	0.000063
KIF1A 10	-0.111	0.000548
MAGEC27	-0.159	0.000394
MAGEC28	-0.203	0.000035
MAGEC29	-0.191	0.000075
MAGEC2	-0.194	0.000004

Tabella 5.7 Risultati dell'analisi di metilazione e stato mutazionale di *TP53* in 31 casi di carcinoma squamocellulare orale felino rispetto a 37 casi di mucosa non neoplastica: coefficienti *lasso* diversi da zero in scala originale (*b*) e unità standard (*beta*), e *odds ratio* (e^{beta}) determinati tramite convalida incrociata *three-fold* ($\lambda = 1,403$, devianza = 0,403).

Variabili	<i>Lasso b</i>	<i>Lasso beta</i>	<i>Odds ratio</i>
<i>FLI1</i> 5	1.525	0.423	1.527
<i>FLI1</i> 6	1.790	0.419	1.521
<i>FLI1</i> 7	1.864	0.439	1.551
<i>MiR124-1</i> 6	7.266	1.148	3.153
<i>KIF1A</i> 1	-0.513	-0.105	0.901
<i>KIF1A</i> 7	-2.113	-0.373	0.689
<i>KIF1A</i> 8	-3.356	-0.468	0.627
<i>MAGEC2</i> 10	-5.755	-0.889	0.411
<i>TP53</i>	1.807	0.840	2.317

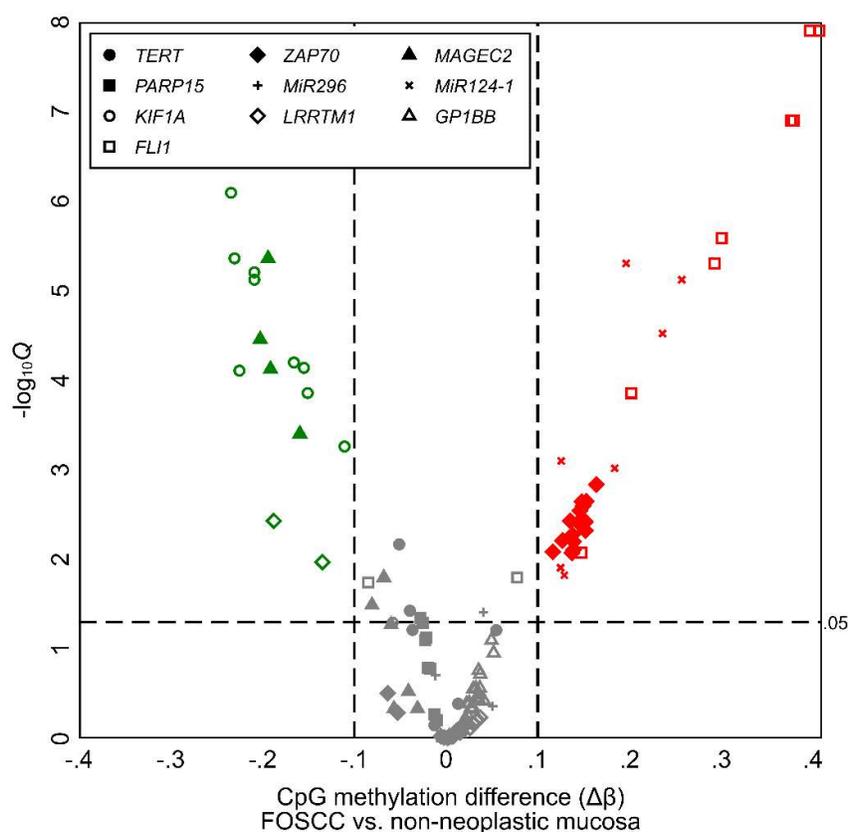


Figura 5.3 – *Volcano plot* sui dati di metilazione dei 31 casi di carcinoma squamocellulare orale felino vs. 37 casi di mucosa orale non neoplastica. I simboli verdi e rossi indicano 47 siti CpG con differenze delle medie di ampia magnitudo ($\Delta > |0.1|$) ed elevata significatività ($Q < .05$ or $-\log_{10}Q > 1.30$). I *P-values* sono stati calcolati mediante test-*t* di permutazione e sono stati corretti (*Q-values*) usando il metodo di Simes per il controllo del *false discovery rate*.

Tabella 5.8 Matrice di confusione derivante dall'analisi di regressione *lasso* dei dati su metilazione e stato mutazione di *TP53* in 31 casi di carcinoma squamocellulare orale felino vs. 37 casi di mucosa non neoplastica. La sensibilità è del 93.5% (29/31), la specificità 100% (37/37) e l'accuratezza 97.1% (66/68). Anche se il valore λ è stato scelto tramite convalida incrociata, le predizioni sul modello sono state basate sull'intero *dataset* e sono pertanto ottimistiche.

Categoria	Carcinomi squamocellulari orali	Mucosa non neoplastica	Totale
Positivi	29	0	29
Negativi	2	37	39
Totale	31	37	68

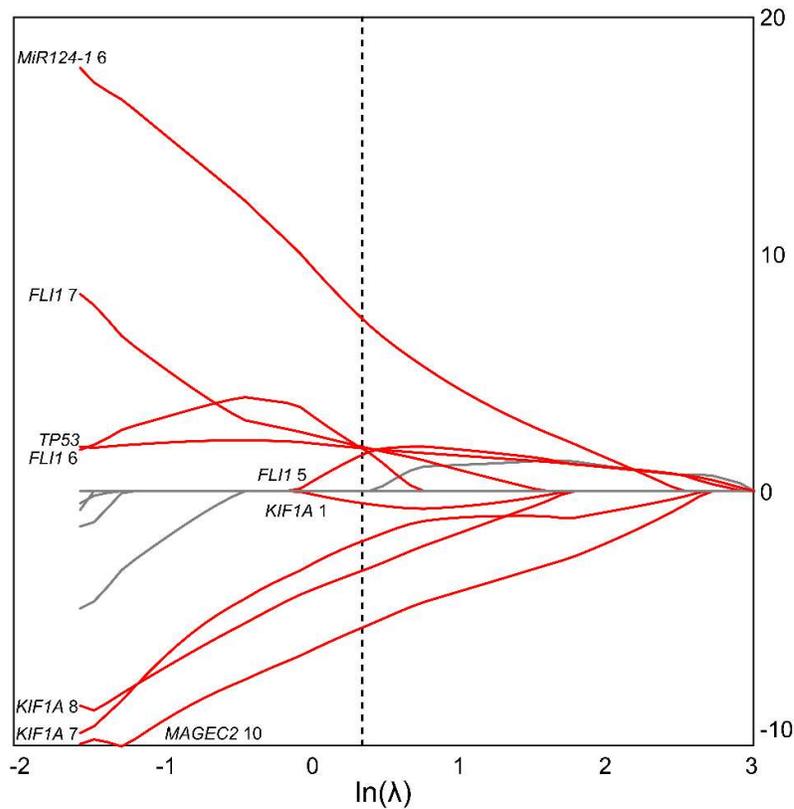


Figura 5.4 Coefficienti per la regressione logistica regolarizzata *lasso* (ℓ_1) applicata ai dati su metilazione e stato mutazionale di *TP53* in 31 casi di carcinoma squamocellulare orale vs. 37 casi di mucosa orale non neoplastica. Le linee rosse indicano i coefficienti diversi da zero nel modello con il valore λ ottimale, in base alla validazione incrociata *3-fold*. La linea verticale tratteggiata corrisponde al valore λ con devianza minima e al modello scelto ($\lambda = 1.403$, devianza = 0.403).

5.4 Discussione

Nel presente studio, sono stati analizzati 10 geni felini ortologhi dell'uomo, già noti per essere epigeneticamente alterati nel HOSCC, in biopsie istologiche di mucosa orale felina neoplastica e non neoplastica (Marsit *et al.*, 2009; Demokan *et al.*, 2010; Roh *et al.*, 2012; Guerrero-Preston *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Morandi *et al.*, 2015; Morandi *et al.*, 2017a; Lian *et al.*, 2018).

Due terzi dei campioni non neoplastici erano rappresentati da stomatiti croniche, fra cui forme ulcerative-iperplastiche e granulomi eosinofili. L'inclusione di questi casi era giustificata dal fatto che le forme gravi di stomatiti possono mimare un FOSCC sia macroscopicamente che clinicamente. L'utilità di questo confronto è stata avvalorata osservando che il profilo di metilazione era più frequentemente alterato nelle stomatiti rispetto alla mucosa orale normale. Ciò non deve sorprendere, poichè l'espressione di citochine proinfiammatorie ed altri geni collegati alla flogosi possono essere modulati grazie a meccanismi epigenetici (Ishida *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013; Asa'ad *et al.*, 2017). Inoltre, l'infiammazione cronica provocata da diversi fattori può indurre metilazione aberrante del DNA, che in alcuni casi può innescare nelle cellule epiteliali alterazioni epigenetiche specifiche della cancerogenesi (Issa *et al.*, 2001; Nishida *et al.*, 2008; Niwa *et al.*, 2010). Nell'uomo è stata riportata una sovrapposizione significativa tra il profilo di metilazione della periodontite cronica e quello del SCC orale (Planello *et al.*, 2016). Per questo ed altri motivi, la periodontite cronica è considerata un possibile fattore di rischio per il HOSCC, e diverse altre patologie orali su base infiammatoria con potenziale maligno sono ben caratterizzate in medicina umana (Müller, 2017; Dikova *et al.*, 2019; Shin *et al.*, 2019).

Nessuna lesione con effettivo significato preneoplastico è stata finora identificata nel gatto. Considerando l'elevata incidenza di stomatiti croniche nei soggetti anziani, la stima del rischio di trasformazione neoplastica per queste patologie può essere difficile, nonostante ciò sia stato ipotizzato in precedenza (Studer e Stapley, 1973).

In questo studio, l'analisi quantitativa della metilazione del DNA nei geni selezionati, insieme all'analisi mutazionale di *TP53*, ha consentito di differenziare i FOSCC dalla mucosa orale non neoplastica con sensibilità del 94% e specificità del 100%. Non tutti i geni testati sono stati ugualmente determinanti nel discriminare i casi neoplastici dai non neoplastici, e all'interno

dei singoli geni, non tutte le CpG indagate hanno mostrato differenze statisticamente significative del livello di metilazione. È noto infatti che la specifica posizione della metilazione può influenzare l'effetto biologico che ne consegue (Van Vlodrop *et al.*, 2011); per questo, come indicato nell'uomo, ogni sito CpG dovrebbe essere considerato singolarmente, calcolando uno specifico valore soglia (Morandi *et al.*, 2017a).

Tramite *MethPrimer* sono state identificate isole CpG, nelle regioni ortologhe di tutti i geni candidati, con diverse localizzazioni. Per *ZAP70*, *GP1BB*, *LRRTM1*, *MIR124-1*, *MIR296*, *PARP15* e *MAGEC2*, le CpG di interesse sono state identificate in prossimità del promoter o nei primi due esoni. In questo caso l'ipermetilazione potrebbe sotto-regolare l'espressione o modificare la trascrizione di specifiche isoforme proteiche, a causa del silenziamento di promoter alternativi, portando ad un'alterazione di funzioni oncosoppressive. L'ipometilazione di queste regioni potrebbe invece promuovere vie molecolari oncogeniche normalmente represses. Per i rimanenti geni *TERT*, *FLII* e *KIF1A*, le isole CpG target erano piuttosto distanti dal sito di inizio della trascrizione, come indicato nella **Tabella 5.1**. La metilazione aberrante di queste regioni potrebbe non essere associata alla sotto-regolazione del gene ma piuttosto a fenomeni di *splicing* alternativo o ad altri meccanismi epigenetici legati ai tumori, come avviene nell'uomo.

È importante sottolineare che la maggior parte delle CpG risultate essere ipermetilate nei FOCCC esaminati presentava bassi livelli di metilazione nei casi di mucosa normale, che nel caso di un promoter implica la capacità di legarsi ai fattori di trascrizione ed esprimere un determinato gene nel tessuto normale. Al contrario, la presenza di elevati livelli di metilazione di altre CpG nei casi mucosa normale suggerisce la necessità di silenziare determinate sequenze affinché si possa svolgere la fisiologica attività trascrizionale. Tutte queste ipotesi possono in definitiva essere confermate solo dimostrando un'associazione biologica fra la metilazione e l'espressione genica.

Nel nostro studio è stata applicata al pannello di geni selezionati una regressione logistica regolarizzata *lasso*, in modo da restringere le analisi alle CpG più informative, con l'obiettivo di sviluppare un ipotetico test economico senza penalizzare l'accuratezza. In particolare, i geni con

la migliore capacità discriminatoria erano *FLII* and *MiR124-1* (ipermetilati), *KIF1A* e *MAGEC2* (ipometilati).

Il gene *FLII* (*Friend Leukemia Integration 1*) codifica un fattore di trascrizione della famiglia E26 *transformation specific* (ETS), la quale regola la proliferazione e la differenziazione cellulare e svolge funzioni legate all'ematopoiesi, allo sviluppo embrionale ed alla vasculogenesi (Spyropoulos *et al.*, 2000; Truong e Ben-David, 2000). *FLII* è stato riportato essere ipermetilato e sotto-regolato in molti tumori maligni dell'uomo, fra cui adenocarcinoma coloretale e gastrico, supportando il suo ruolo di oncosoppressore (Øster *et al.*, 2011; Del Portillo *et al.*, 2019). In questo studio *FLII* era significativamente ipermetilato nel FOSCC, similmente a quanto riportato nel HOSCC (Guerrero-Preston *et al.*, 2014; Morandi *et al.*, 2017a). Inoltre la regione genica indagata nel nostro studio presentava un'omologia del 95% circa con la sequenza umana.

MiR124 codifica una molecola di microRNA altamente conservata (100% di omologia fra gatto e uomo) che funge da oncosoppressore regolando geni target, e può essere sotto-regolato in diverse neoplasie umane, compreso il HOSCC (Peng *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2017). In questo studio, *MiR124-1*, uno dei precursori del *MiR124* maturo, era significativamente ipermetilato nel FOSCC, in modo analogo alla controparte umana (Guerrero-Preston *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2017; Morandi *et al.*, 2017a).

MAGEC2, un membro della famiglia di geni *melanoma-associated antigen*, è espresso in diverse neoplasie maligne ma non nelle cellule somatiche normali, e viene inquadrato nei cosiddetti "*cancer-germline genes*" (Van Tongelen *et al.*, 2017). È stato mappato sul cromosoma X e sembra essere associato a TRIM28, un'ubiquitina-ligasi che può indurre la degradazione proteolitica di p53 (Doyle *et al.*, 2010). La demetilazione di *MAGEC2* è stata correlata alla resistenza alla morte cellulare (Van Tongelen *et al.*, 2017). Nella nostra casistica, 4 CpG su 10 erano significativamente ipometilate nei FOSCC rispetto alla mucosa non neoplastica.

KIF1A (*Kinesin Family Member 1A*) codifica una proteina associata ai microtubuli, coinvolta nel trasporto intracellulare di organelli e nella mitosi (Okada *et al.*, 1995). Per questo gene è stata ipotizzata un'attività oncosoppressiva in molte neoplasie umane, e la sua ipermetilazione è stata riportata nel HOSCC (Hoque *et al.*, 2008; Demokan *et al.*, 2010; Roh *et al.*, 2012; Morandi

et al., 2015; Morandi *et al.*, 2017a). Nonostante l'elevata percentuale di omologia fra uomo e gatto, nei FOSCC di questo studio tutte le CpG di *KIF1A* analizzate erano ipometilate.

Altri geni hanno mostrato un comportamento epigenetico simile a quello riportato nel HOSCC, anche se di minore rilevanza statistica: *ZAP70* (ipermetilato) e *TERT* (ipometilato).

Come nel nostro studio precedente, l'importante ruolo della disregolazione di *TP53* nel FOSCC è stato corroborato dall'elevata percentuale di tumori con mutazioni (68%) (Renzi *et al.*, 2019).

In questo studio *TP53* è stato proposto come potenziale marker diagnostico, in quanto ha permesso da solo di differenziare i FOSCC dai campioni non neoplastici con accuratezza dell'84%, e rappresenta pertanto un elemento cardine dell'algoritmo impostato. Analizzando i 10 campioni ottenuti tramite brushing orale, la sensibilità dell'algoritmo si è ridotta al 60%, probabilmente inadeguata, mentre la specificità era mantenuta. In particolare, due casi di FOSCC sono stati erroneamente classificati come negativi. Tuttavia uno di questi era stato classificato come falso negativo anche nell'analisi delle biopsie istologiche, lasciando ipotizzare che questi valori potrebbero migliorare analizzando una casistica più ampia. Un'altra ragione di questa differenza potrebbe essere la maggiore variabilità di tipi cellulari prelevati tramite brushing rispetto alla biopsia istologica, e l'impossibilità di evitare il tessuto necrotico con il *cytobrush*. Tuttavia, considerando la minima invasività e la maggiore quantità di cellule integre che potenzialmente si possono collezionare con il *cytobrush* rispetto ai campioni FFPE, il brushing merita ulteriori approfondimenti, anche nell'ottica di un possibile impiego dell'algoritmo come test di screening.

In linea generale, testare un algoritmo sullo stesso *set* di casi mediante i quali l'algoritmo è stato sviluppato implica il ben noto rischio di sovradattamento del modello (*overfitting*), che si traduce in una sovrastima dell'accuratezza. Saranno quindi necessarie ripetute applicazioni dell'algoritmo su nuovi *set* di casi per testarne l'efficacia.

In modo simile, per ottenere un quadro esaustivo dei meccanismi epigenetici implicati nel FOSCC e per meglio confrontarli con l'uomo, sarebbe auspicabile un'analisi globale del genoma felino in questa neoplasia. Nell'uomo è stato riportato che il pattern complessivo di metilazione del DNA consentirebbe di distinguere i HNSCC dai tessuti più accuratamente rispetto a singoli

eventi epigenetici (Marsit *et al.*, 2009). Nell'impossibilità di svolgere un'analisi di tale portata, potrebbero essere presi in considerazione altri geni con un ruolo ipotetico o dimostrato nella patogenesi del FOSCC, insieme alle rispettive vie molecolari, ad esempio EGFR, p16 e podoplanina.

Concludendo, i nostri risultati indicano che nel FOSCC sono presenti alterazioni della metilazione del DNA di specifici geni (*FLII*, *MIR124-1*, *MAGEC2* and *KIF1A*), insieme ad una elevata prevalenza di mutazioni di *TP53*. Tali alterazioni sono infrequenti nella mucosa normale e nelle stomatiti croniche del gatto, suggerendo un loro possibile coinvolgimento nella carcinogenesi orale felina, e soprattutto una loro utilità come marker diagnostici. Saranno necessari ulteriori studi su un maggior numero di brushing per sondare l'utilità di un test di screening per il rilevamento precoce di queste alterazioni genetiche ed epigenetiche nel FOSCC.

Capitolo 6

Validazione del brushing orale come tecnica non invasiva per l'identificazione del FOSCC tramite analisi genetiche ed epigenetiche

6.1 Introduzione

Il carcinoma squamocellulare orale felino (FOSCC, *feline oral squamous cell carcinoma*) è una neoplasia frequente, caratterizzata da elevata invasività locale. Il campionamento biotico per l'esame istologico rappresenta attualmente la tecnica diagnostica *gold standard*, tuttavia le lesioni tumorali in fase precoce tendono a passare inosservate, anche a causa della sovrapposizione con patologie parodontali, peraltro molto comuni nei gatti anziani. Pertanto, nella maggior parte dei casi, queste neoplasie non vengono riconosciute fino ad una fase di sviluppo avanzato, associata a dolore, anoressia ed alitosi per via delle infezioni batteriche secondarie. In questa fase, a prescindere dalle scelte terapeutiche, che includono chirurgia, radioterapia e chemioterapia, la prognosi è in genere infausta. La diagnosi precoce rappresenta quindi un punto cardine per migliorare le possibilità di cura del FOSCC (Bilgic *et al.*, 2015; Liptak, 2019).

La metilazione aberrante del DNA è una modificazione epigenetica precoce durante la cancerogenesi ed ha un ruolo determinante nello sviluppo del carcinoma squamocellulare orale umano (HOSCC, *human oral squamous cell carcinoma*) (Kanwal *et al.*, 2015; Irimie *et al.*, 2018). Diversi studi hanno evidenziato la possibilità di rilevare anomalie della metilazione in cellule prelevate tramite brushing non invasivo della mucosa orale, permettendo l'identificazione di HOSCC in fase iniziale o lesioni preneoplastiche (Shaw *et al.*, 2013, Schussel *et al.*, 2013, Morandi *et al.*, 2015).

Nel nostro precedente lavoro, un algoritmo *stepwise* basato sul profilo di metilazione di 4 geni (*FLII*, *MiR124-1*, *KIF1A* and *MAGEC2*) e sullo stato mutazionale di *TP53*, ha permesso di

differenziare biopsie istologiche di FOSCC da campioni non neoplastici con sensibilità del 94% e specificità del 100% (Renzi *et al.*, 2020).

Nel presente studio è stato analizzato il profilo di metilazione di un pannello di geni più ampio, comprendente i 10 geni valutati nello studio precedente e 7 geni aggiuntivi, unitamente allo stato mutazionale di *TP53*. La presenza di alterazioni geniche è stata indagata in questo studio a partire da campioni citologici di FOSCC prelevati mediante brushing orale, e confrontata con un gruppo di controllo rappresentato da brushing di lesioni infiammatorie orali e mucosa orale normale, al fine di sondare la validità diagnostica di questa tecnica non invasiva per l'identificazione del FOSCC.

6.2 Materiali e metodi

6.2.1 Criteri d'inclusione e informazioni demografiche

Lo studio è parte integrante del progetto Salice, finanziato grazie al bando Alma Idea Junior dell'Università di Bologna.

È stata svolta un'indagine prospettica sui casi di FOSCC pervenuti presso l'Ospedale Veterinario Universitario del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie (DIMEVET) dell'Università di Bologna e diverse cliniche veterinarie private. Per il gruppo di controllo, sono stati arruolati gatti di almeno 5 anni di età con altre neoplasie orali, parodontopatie o altre lesioni infiammatorie sottoposti a visita odontoiatrica specialista presso un unico centro (Ospedale Veterinario "I Portoni Rossi", Zola Predosa, Bologna), mentre i controlli sani sono stati reclutati campionando gatti di almeno 5 anni di età esenti da patologie orali, su base volontaria. Per tutti i gatti inclusi nello studio, il reclutamento è avvenuto previo consenso informato del proprietario.

Le cartelle cliniche dei pazienti sono state revisionate per raccogliere i dati su segnalamento e localizzazione dei tumori. Tutti i casi di FOSCC sono stati inclusi nello studio solo se confermati dalla diagnosi istologica o citologica. Nei casi di lesioni infiammatorie, la diagnosi è stata effettuata istologicamente o clinicamente da un unico specialista. Le mucose orali normali sono state giudicate tali previa visione di fotografie della cavità orale da parte dello stesso specialista. I sarcomi orali inclusi nella popolazione di controllo sono stati confermati istologicamente.

I prelievi di cellule dalla mucosa orale sono stati effettuati con apposito spazzolino (*cytobrush*). Nei pazienti per i quali le procedure cliniche richiedevano l'anestesia generale, il brushing orale è stato effettuato durante l'anestesia. Nei casi di FOSSC e lesioni infiammatorie, il prelievo è stato effettuato strofinando delicatamente e ripetutamente per almeno 5 secondi il cytobrush sulla lesione. Quando possibile, per i FOSSC è stato ottenuto un secondo brushing dalla lesione e un terzo dalla mucosa orale clinicamente normale distante dal tumore. Per i controlli sani, i prelievi sono stati effettuati spazzolando delicatamente tutta la mucosa orale, comprendendo gengiva, vestibolo, lingua e palato. Una volta effettuato il prelievo, lo spazzolino è stato immediatamente posto in una provetta da 1,8 mL, contenente DNA/RNA Shield (Zymo Research Europe, Freiberg, Germania) per la preservazione del materiale genetico. Nei FOSSC, le analisi genetiche sono state effettuate in parallelo sui corrispondenti campioni istologici fissati in paraffina e inclusi in formalina (FFPE), quando questi erano disponibili.

6.2.2 Analisi genetiche ed epigenetiche

Le analisi genetiche sono state svolte presso l'unità di Neurologia, IRCCS Istituto di Scienze Neurologiche di Bologna, Dipartimento di Scienze Biomediche e Neuromotorie dell'Università di Bologna, Ospedale "Bellaria".

Per l'analisi della metilazione, la purificazione del DNA dei *cytobrush* è stata effettuata con il kit MasterPure Complete DNA extraction (Lucigen, Middleton, WI, USA, cod. MC85200). Il DNA dei campioni istologici FFPE (almeno 5 sezioni consecutive di 10 µm per caso) è stato purificato con il kit QuickExtract FFPE DNA Extraction Kit (Lucigen, Middleton, WI, USA, cod. QEF81050). Il DNA estratto (200-500 ng) è stato poi trattato con bisolfito mediante il kit EZDNA Methylation-Lightning (ZymoResearch, Irvine, CA, USA, cod. D5031), secondo il protocollo del produttore.

Il pannello comprendeva 17 geni target (*RBI*, *TERT*, *MiR296*, *CELSR3*, *EGFR*, *ZAP70*, *LRRTM1*, *KIF1A*, *PDPN*, *PARP15*, *FLI1*, *GP1BB*, *CDKN2A*, *CDH1*, *MiR124*, *MiR363*, *MAGEC2*), selezionati in quanto i loro ortologi umani hanno evidenziato un profilo di metilazione alterato nel carcinoma squamocellulare di testa e collo (HNSCC), o perché un'alterazione delle corrispondenti proteine è stata riportata nel FOSSC (Marsit *et al.*, 2009;

Demokan *et al.*, 2010; Bergkvist *et al.*, 2011b; Mascolo *et al.*, 2012; Roh *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2013; Guerrero-Preston *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2015; Morandi *et al.*, 2015; Supshavad *et al.*, 2016b; Itai *et al.*, 2017; Morandi *et al.*, 2017a; Lian *et al.*, 2018; Fan *et al.*, 2019; Renzi *et al.*, 2020).

Per identificare le isole di CpG di potenziale interesse, preferibilmente nelle regioni promoter e nella parte iniziale delle regioni trascrizionali, sono state investigate le sequenze depositate sul browser *Ensembl* (<http://www.ensembl.org/index.html>), considerando le sequenze con la migliore omologia fra uomo e gatto. È stato quindi impiegato il programma *MethPrimer* per identificare le CpG e disegnare i primer più idonei (<http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>; Li *et al.*, 2002).

L'elenco dei geni e dei primer impiegati, le coordinate delle regioni indagate e la loro percentuale di omologia con gli ortologi umani sono riportati nella **Tabella 6.1**. Le CpG analizzate per ogni gene sono state numerate consecutivamente, e le corrispondenti coordinate sono indicate nella **Tabella 6.2**.

La generazione della libreria di ampliconi con PCR *Multiplex* e l'analisi quantitativa della metilazione tramite *Next Generation Sequencing* (NGS), sono avvenute come precedentemente descritto (Renzi *et al.*, 2020). Il sequenziamento è stato impostato per ottenere almeno 1k *reads*/regione e garantire una *depth of coverage* di 1000x. I file FASTQ ottenuti sono stati processati sulla piattaforma *Galaxy Europe* con le applicazioni *Filter by Quality* per il controllo qualità (>Q 30) e *Filter FASTQ* per la lunghezza delle *reads* (>80bp); per eseguire la mappatura delle *reads* i file FASTQ sono stati poi processati con l'applicazione *BWAMeth*, generando un file bam che a sua volta è stato elaborato con *MethylDackel*, usando come genoma di riferimento *Felis_catus_9.0*. In questo modo è stato generato, per ogni caso, un file con il livello di metilazione di ciascuna CpG indagata (Afgan *et al.*, 2018).

L'analisi mutazionale degli esoni 5-8 di *TP53* è stata effettuata come descritto in precedenza (Renzi *et al.*, 2019). Sono stati considerati mutati i casi con una o più alterazioni della sequenza nucleotidica negli esoni indagati di *TP53*, risultanti in una modificazione aminoacidica deleteria per la funzione della proteina secondo il *software Polyphen-2* (mutazioni missenso) o

PROVEAN (mutazioni *indels*) e con una VAF (*Variant Allele Frequency*) > 5% (Adzhubei *et al.*, 2010; Choi e Chan 2015).

6.2.3 Analisi statistica

Le variabili continue sono state espresse come media \pm deviazione standard, mentre quelle categoriche come frequenze e percentuali.

Per l'analisi della metilazione, il numero totale di *reads* dei brushing ottenuti in condizioni di anestesia generale è stato comparato con quelli ottenuti dai gatti svegli e il numero di reads dei brushing è stato confrontato con quello delle corrispondenti biopsie mediante il test *U di Mann Whitney*. La VAF delle mutazioni di *TP53* nei brushing è stata confrontata con quella delle corrispondenti biopsie tramite il *signed rank sum test di Wilcoxon* per dati appaiati. La frequenza di mutazioni di *TP53* e di alterazioni del profilo di metilazione nei FOSSC è stata comparata con quella riscontrata nei controlli mediante test del χ^2 .

Al fine di differenziare i FOSSC dai casi controllo, per i *cytobrush* è stato implementato un algoritmo sulla base dei criteri riportati nello studio precedente, integrandolo con i risultati della presente analisi epigenetica quando opportuno. Sono state poi calcolate sensibilità, specificità e accuratezza dell'algoritmo nel differenziare i FOSSC dai controlli.

Nei casi in cui era disponibile un brushing aggiuntivo della lesione, è stata calcolata la concordanza fra i due campioni. Nei casi di FOSSC per i quali era stato effettuato anche un *cytobrush* della mucosa orale clinicamente sana, è stato confrontato il profilo di metilazione tra mucosa neoplastica e normale. Mediante test esatto di *Fisher*, la percentuale di FOSSC positivi all'algoritmo è stata confrontata fra i gatti in cui il prelievo era stato effettuato in anestesia generale e i gatti vigili. Infine, lo stesso algoritmo è stato applicato ai campioni biotici.

Le analisi sono state svolte tramite un *software* commerciale (*SPSS Statistics v19*, IBM, Armonk, NY, USA). Il livello di significatività (*P*) è stato posto a 0.05.

Tabella 6.1 Lista dei geni indagati con i relativi primer e coordinate genomiche.

Gene	Descrizione	Primer Forward	Primer Reverse	Coordinate genomiche*	Distanza dal sito di inizio della trascrizione	Numero di CpG indagate	Percentuale di omologia con il gene umano
RB1	<i>Retinoblastoma</i>	GGGGGAGTTATGTYG TTTAAAAT	CRCTCRCTCACC TAAACAA	Chrom A1, strand -: 23038050- 23038215; span: 166 bp	-250 (promoter)	21	85%
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>	GGTTTGGGATTTGGG ATTAG	AAACCAAACAAA ACCCTACTCTAA CT	Chrom A1, strand +: 241334283- 241334444; span 162 bp	+12203 (introni 9-10)	6	66%
MiR296	<i>MicroRNA 296/KMT2C</i>	TGATTTTTGGTTATTT TAGTTTTG	CACTCTAAAAAT TTACTACTAAACA CC	Chrom A2, strand -: 166048735- 166048911; span: 177 bp	- 73 (promoter) all'interno del gene KMT2C, esone 44	8	87%
CELSR3	<i>Cadherin EGF LAG seven-pass G-type receptor 3</i>	ATTTGTAAATAGAAG AAAGAGTAAGAGATG	CATAACAAATCT AACTACTAAAAC C	Chrom A2, strand -: 17856865- 17857067; span: 203 bp	-200 (promoter)	9	90%
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>	GGTTAGTTTTTGATT TTTATTAGGGTTT	AATTTATACCAA AATTCCTATTTTC C	Chrom A2, strand +: 70929908- 70930102; span: 195 bb	-779 (ex 1)	8	91%
ZAP70	<i>Zeta chain of T cell receptor associated protein kinase 70</i>	GATTTYGAYGGGTTG TTTTG	CTCTCACCTCCA ACTTCCAC	Chrom A3, strand -: 64661492-64661633; span: 142 bp	+268 (esone 2)	19	94%
LRRTM1	<i>Leucine-rich repeat transmembrane neuronal 1</i>	TATAGTTTGGYGGAG GGAAG	CCACTAACCRAT ACCACCTTTT	Chrom A3, strand -: 98233218-98233375; span: 158 bp	- 887 (promoter)	20	77%
KIF1A	<i>Kinesin family member 1A</i>	GGGTAGGGTTGTAGG AGTTTAG	AACTCCAACCTC TTCAAAACAAAT	Chrom C1, strand -: 221895775- 221895934; span: 160 bp	+8921 (introni 3-4)	10	97%

Gene	Descrizione	Primer Forward	Primer Reverse	Coordinate genomiche*	Distanza dal sito di inizio della trascrizione	Numero di CpG indagate	Percentuale di omologia con il gene umano
PDPN	<i>Podoplanin</i>	TTTTTAATTGTAAAG TTTGTTTTTT	AATTAACTAATC CTCTTTAAAACC C	Chrom C1, strand +; 9607073- 9607271; span: 199 bp	-205 (promoter)	7	64%
PARP15	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase family member 15</i>	AATTTTAAGATTATA AGGAAGGTAGAAGTG	CCACAAATTACT ATACAAATTCTT C	Chrom C2, strand +: 68346817-68346991; span: 175 bp	- 863 (promoter)	10	70%
FLI1	<i>Fli-1 proto-oncogene, ETS transcription factor</i>	AGGGTTTAGGGYGTT AGGG	CCACTACCCAAT CRCTTACC	Chrom D1, strand +: 25655859-25656009; span: 151 bp	+7543 (introni 1-2)	10	95%
GP1BB	<i>Glycoprotein 1b platelet beta subunit</i>	GTTGTTGTTGTTGTT GTTGTTGT	AAACTCCTTAAA ACAAAATCCTAT C	Chrom D3, strand -: 28618590-28618778; span: 189 bp	+494 (esone 2)	26	89%
p16/CDKN2A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>	GAGYGAGTAGGATTG GAAG	CTTCCCCACRA CTTCTTTC	Chrom D4, strand -; 48210994- 48211172; span: 179 bp	-375 (promoter)	19	80%
CDH1	<i>Cadherin 1</i>	GGAGGGAATTTGGTG GAAAT	AACCRC AACCAA TAAACRAC	ChromE2, strand +: 46274112- 46274294; span: 183 bp	-375 (promoter)	15	82%
MIR124-1 (<i>ENSFCAG000</i> <i>00016467.6</i>)	<i>MicroRNA 124-1</i>	GGATTAAGATTAGAT TTTGTTTTTT	AAATTTATTCTA CTACCCCTCAAA CC	Chrom F2, strand +: 17157280-17157470; span: 191 bp	- 14 (promoter)	7	100%
MIR363	<i>Micro-RNA 363</i>	TTTGGTTTTATTTTAT TG TAGTGTGGGTAT	AAAACATATATA AAATCCCAAAC C	Chrom X, strand -; 113001759- 113001972; span: 214	-391 (prmoter)	4	97%
MAGEC2	<i>Melanoma-associate Antigen C2</i>	AGTAGTTTGGGGAAG TTTGTTTTTT	CAATTTAACTAC CATCTTATCTAA AACATC	Chrom X, strand +: 116246756- 116246922; span: 167 bp	- 65 (promoter)	10	37%

*genoma di riferimento: *Felis_catus_9.0/felCat*

Tabella 6.2 Coordinate delle CpG investigate.

<i>Gene</i>	CpG	Coordinate
<i>RB1</i>	1	chrA1.23038202
<i>RB1</i>	2	chrA1.23038188
<i>RB1</i>	3	chrA1.23038174
<i>RB1</i>	4	chrA1.23038168
<i>RB1</i>	5	chrA1.23038165
<i>RB1</i>	6	chrA1.23038159
<i>RB1</i>	7	chrA1.23038156
<i>RB1</i>	8	chrA1.23038153
<i>RB1</i>	9	chrA1.23038150
<i>RB1</i>	10	chrA1.23038147
<i>RB1</i>	11	chrA1.23038136
<i>RB1</i>	12	chrA1.23038133
<i>RB1</i>	13	chrA1.23038130
<i>RB1</i>	14	chrA1.23038127
<i>RB1</i>	15	chrA1.23038124
<i>RB1</i>	16	chrA1.23038121
<i>RB1</i>	17	chrA1.23038099
<i>RB1</i>	18	chrA1.23038087
<i>RB1</i>	19	chrA1.23038081
<i>RB1</i>	20	chrA1.23038055
<i>TERT</i>	1	chrA1.241334306
<i>TERT</i>	2	chrA1.241334321
<i>TERT</i>	3	chrA1.241334352
<i>TERT</i>	4	chrA1.241334375
<i>TERT</i>	5	chrA1.241334384
<i>TERT</i>	6	chrA1.241334408
<i>MiR296</i>	1	chrA2.166048887
<i>MiR296</i>	2	chrA2.166048869
<i>MiR296</i>	3	chrA2.166048866
<i>MiR296</i>	4	chrA2.166048805
<i>MiR296</i>	5	chrA2.166048776
<i>MiR296</i>	6	chrA2.166048773
<i>MiR296</i>	7	chrA2.166048770
<i>MiR296</i>	8	chrA2.166048761
<i>CELSR3</i>	1	chrA2.17857027
<i>CELSR3</i>	2	chrA2.17857025
<i>CELSR3</i>	3	chrA2.17857007
<i>CELSR3</i>	4	chrA2.17856963
<i>CELSR3</i>	5	chrA2.17856960
<i>CELSR3</i>	6	chrA2.17856934
<i>CELSR3</i>	7	chrA2.17856932
<i>CELSR3</i>	8	chrA2.17856896
<i>CELSR3</i>	9	chrA2.17856890
<i>EGFR</i>	1	chrA2.70929936
<i>EGFR</i>	2	chrA2.70929992
<i>EGFR</i>	3	chrA2.70929999
<i>EGFR</i>	4	chrA2.70930018
<i>EGFR</i>	5	chrA2.70930032
<i>EGFR</i>	6	chrA2.70930054
<i>EGFR</i>	7	chrA2.70930069
<i>EGFR</i>	8	chrA2.70930076
<i>ZAP70</i>	1	chrA3.64661628
<i>ZAP70</i>	2	chrA3.64661625
<i>ZAP70</i>	3	chrA3.64661606
<i>ZAP70</i>	4	chrA3.64661599
<i>ZAP70</i>	5	chrA3.64661591
<i>ZAP70</i>	6	chrA3.64661587
<i>ZAP70</i>	7	chrA3.64661583
<i>ZAP70</i>	8	chrA3.64661577
<i>ZAP70</i>	9	chrA3.64661572
<i>ZAP70</i>	10	chrA3.64661565
<i>ZAP70</i>	11	chrA3.64661556
<i>ZAP70</i>	12	chrA3.64661546
<i>ZAP70</i>	13	chrA3.64661544
<i>ZAP70</i>	14	chrA3.64661541
<i>ZAP70</i>	15	chrA3.64661531
<i>ZAP70</i>	16	chrA3.64661529
<i>ZAP70</i>	17	chrA3.64661523
<i>ZAP70</i>	18	chrA3.64661519
<i>ZAP70</i>	19	chrA3.64661512
<i>LRRTM1</i>	1	chrA3.98233365
<i>LRRTM1</i>	2	chrA3.98233350
<i>LRRTM1</i>	3	chrA3.98233346
<i>LRRTM1</i>	4	chrA3.98233343
<i>LRRTM1</i>	5	chrA3.98233336
<i>LRRTM1</i>	6	chrA3.98233329
<i>LRRTM1</i>	7	chrA3.98233325
<i>LRRTM1</i>	8	chrA3.98233315
<i>LRRTM1</i>	9	chrA3.98233312
<i>LRRTM1</i>	10	chrA3.98233308
<i>LRRTM1</i>	11	chrA3.98233295
<i>LRRTM1</i>	12	chrA3.98233289
<i>LRRTM1</i>	13	chrA3.98233276
<i>LRRTM1</i>	14	chrA3.98233271
<i>LRRTM1</i>	15	chrA3.98233267
<i>LRRTM1</i>	16	chrA3.98233265
<i>LRRTM1</i>	17	chrA3.98233254
<i>LRRTM1</i>	18	chrA3.98233247
<i>LRRTM1</i>	19	chrA3.98233245
<i>LRRTM1</i>	20	chrA3.98233227
<i>KIF1</i>	1	chrC1.221895912

<i>KIF1</i>	2	chrC1.221895901
<i>KIF1</i>	3	chrC1.221895892
<i>KIF1</i>	4	chrC1.221895873
<i>KIF1</i>	5	chrC1.221895841
<i>KIF1</i>	6	chrC1.221895839
<i>KIF1</i>	7	chrC1.221895834
<i>KIF1</i>	8	chrC1.221895812
<i>KIF1</i>	9	chrC1.221895809
<i>KIF1</i>	10	chrC1.221895802
<i>PDPN</i>	1	chrC1.9607098
<i>PDPN</i>	2	chrC1.9607121
<i>PDPN</i>	3	chrC1.9607134
<i>PDPN</i>	4	chrC1.9607136
<i>PDPN</i>	5	chrC1.9607155
<i>PDPN</i>	6	chrC1.9607189
<i>PDPN</i>	7	chrC1.9607246
<i>PARP15</i>	1	chrC2.68346885
<i>PARP15</i>	2	chrC2.68346899
<i>PARP15</i>	3	chrC2.68346904
<i>PARP15</i>	4	chrC2.68346918
<i>PARP15</i>	5	chrC2.68346921
<i>PARP15</i>	6	chrC2.68346939
<i>PARP15</i>	7	chrC2.68346942
<i>PARP15</i>	8	chrC2.68346958
<i>PARP15</i>	9	chrC2.68346964
<i>PARP15</i>	10	chrC2.68346966
<i>FLII</i>	1	chrD1.25655870
<i>FLII</i>	2	chrD1.25655882
<i>FLII</i>	3	chrD1.25655884
<i>FLII</i>	4	chrD1.25655887
<i>FLII</i>	5	chrD1.25655897
<i>FLII</i>	6	chrD1.25655908
<i>FLII</i>	7	chrD1.25655925
<i>FLII</i>	8	chrD1.25655954
<i>FLII</i>	9	chrD1.25655978
<i>FLII</i>	10	chrD1.25655996
<i>GP1BB</i>	1	chrD3.28618753
<i>GP1BB</i>	2	chrD3.28618747
<i>GP1BB</i>	3	chrD3.28618744
<i>GP1BB</i>	4	chrD3.28618738
<i>GP1BB</i>	5	chrD3.28618736
<i>GP1BB</i>	6	chrD3.28618732
<i>GP1BB</i>	7	chrD3.28618730
<i>GP1BB</i>	8	chrD3.28618726
<i>GP1BB</i>	9	chrD3.28618724
<i>GP1BB</i>	10	chrD3.28618721
<i>GP1BB</i>	11	chrD3.28618719
<i>GP1BB</i>	12	chrD3.28618713

<i>GP1BB</i>	13	chrD3.28618707
<i>GP1BB</i>	14	chrD3.28618700
<i>GP1BB</i>	15	chrD3.28618695
<i>GP1BB</i>	16	chrD3.28618686
<i>GP1BB</i>	17	chrD3.28618680
<i>GP1BB</i>	18	chrD3.28618676
<i>GP1BB</i>	19	chrD3.28618667
<i>GP1BB</i>	20	chrD3.28618658
<i>GP1BB</i>	21	chrD3.28618641
<i>GP1BB</i>	22	chrD3.28618634
<i>GP1BB</i>	23	chrD3.28618631
<i>GP1BB</i>	24	chrD3.28618629
<i>GP1BB</i>	25	chrD3.28618625
<i>GP1BB</i>	26	chrD3.28618615
<i>CDKN2A</i>	1	chrD4.48211169
<i>CDKN2A</i>	2	chrD4.48211149
<i>CDKN2A</i>	3	chrD4.48211139
<i>CDKN2A</i>	4	chrD4.48211137
<i>CDKN2A</i>	5	chrD4.48211134
<i>CDKN2A</i>	6	chrD4.48211121
<i>CDKN2A</i>	7	chrD4.48211117
<i>CDKN2A</i>	8	chrD4.48211096
<i>CDKN2A</i>	9	chrD4.48211088
<i>CDKN2A</i>	10	chrD4.48211072
<i>CDKN2A</i>	11	chrD4.48211064
<i>CDKN2A</i>	12	chrD4.48211040
<i>CDKN2A</i>	13	chrD4.48211033
<i>CDKN2A</i>	14	chrD4.48211029
<i>CDKN2A</i>	15	chrD4.48211027
<i>CDKN2A</i>	16	chrD4.48211025
<i>CDKN2A</i>	17	chrD4.48211020
<i>CDKN2A</i>	18	chrD4.48211016
<i>CDKN2A</i>	19	chrD4.48211004
<i>CDHI</i>	1	chrE2.46274160
<i>CDHI</i>	2	chrE2.46274176
<i>CDHI</i>	3	chrE2.46274187
<i>CDHI</i>	4	chrE2.46274195
<i>CDHI</i>	5	chrE2.46274212
<i>CDHI</i>	6	chrE2.46274217
<i>CDHI</i>	7	chrE2.46274229
<i>CDHI</i>	8	chrE2.46274238
<i>CDHI</i>	9	chrE2.46274249
<i>CDHI</i>	10	chrE2.46274251
<i>CDHI</i>	11	chrE2.46274261
<i>CDHI</i>	12	chrE2.46274272
<i>CDHI</i>	13	chrE2.46274274
<i>CDHI</i>	14	chrE2.46274277
<i>CDHI</i>	15	chrE2.46274290

<i>MiR124-1</i>	1	chrF2.17157304
<i>MiR124-1</i>	2	chrF2.17157315
<i>MiR124-1</i>	3	chrF2.17157348
<i>MiR124-1</i>	4	chrF2.17157350
<i>MiR124-1</i>	5	chrF2.17157366
<i>MiR124-1</i>	6	chrF2.17157400
<i>MiR124-1</i>	7	chrF2.17157410
<i>MiR363</i>	1	chrX.113001914
<i>MiR363</i>	2	chrX.113001877
<i>MiR363</i>	3	chrX.113001849
<i>MiR363</i>	4	chrX.113001784
<i>MAGEC2</i>	1	chrX.116246787
<i>MAGEC2</i>	2	chrX.116246790
<i>MAGEC2</i>	3	chrX.116246793
<i>MAGEC2</i>	4	chrX.116246807
<i>MAGEC2</i>	5	chrX.116246829
<i>MAGEC2</i>	6	chrX.116246833
<i>MAGEC2</i>	7	chrX.116246842
<i>MAGEC2</i>	8	chrX.116246876
<i>MAGEC2</i>	9	chrX.116246879
<i>MAGEC2</i>	10	chrX.116246892

6.3 Risultati

6.3.1 FOSSC

Sono stati inclusi 35 casi di FOSSC, appartenenti a 29 gatti Europei, due gatti meticci a pelo lungo, un Siamese, un Maine Coon, un Certosino e un gatto Thai. Erano presenti 15 maschi castrati (43%) e 20 femmine sterilizzate (57%). L'età mediana era di 12 anni (*range*, 5-19) (Tabella 6.3).

I tumori erano localizzati a livello di gengiva mandibolare ($n = 11$; 31%), gengiva mascellare ($n = 10$; 29%), lingua ($n = 9$; 26%), mucosa vestibolare ($n = 1$; 3%) e mucosa orale caudale ($n = 4$; 11%).

I brushing sono stati effettuati in anestesia generale in 26 casi (74%), mentre nei restanti 9 (26%) i gatti erano vigili (Tabella 6.3).

6.3.2 Controlli

I gatti appartenenti alla popolazione di controllo erano di razza Europea ($n = 51$), Persiana ($n = 3$), Siamese ($n = 1$), Norvegese delle Foreste ($n = 1$) e Sphynx ($n = 1$); mentre 3 gatti erano

meticci a pelo lungo. Erano presenti 29 maschi castrati (48%), un maschio intero (2%), 29 femmine sterilizzate (48%) e una femmina intera (2%). L'età mediana era di 10 anni (range, 5-18) (**Tabella 6.4**).

Le lesioni infiammatorie sono state classificate secondo la diagnosi clinica in parodontopatie con mucosite ($n = 20$), gengivostomatiti croniche feline (FCGS, $n = 15$) e lesioni focali (granuloma piogenico, $n = 4$; granuloma eosinofilo, $n = 3$), comprendenti anche i sarcomi orali ($n = 3$). I campioni di mucosa orale normale erano 15. I brushing sono stati effettuati in anestesia generale in 42 casi (70%), mentre nei restanti 18 (30%) i gatti erano vigili (**Tabella 6.4**).

6.3.3 Stato mutazionale di *TP53*

Complessivamente, 17 brushing di FOSSC (48%) presentavano mutazioni di *TP53*. Le mutazioni erano rappresentate da 12 mutazioni missenso, una mutazione nonsense, una delezione *in frame*, 2 delezioni *frameshift* ed una inserzione *frameshift* (**Tabella 6.5**).

In tutti gli 11 casi di brushing mutati in cui le analisi sono state svolte in parallelo sul corrispondente campione biotico è stata rilevata la stessa mutazione, ma con VAF significativamente maggiore ($P = 0,05$). In tutti gli 8 FOSSC con brushing *wild type* per i quali era disponibile il corrispondente campione biotico, anche in quest'ultimo non sono state rilevate mutazioni di *TP53*, evidenziando una concordanza del 100% tra brushing e biopsie.

Nessuno dei brushing ottenuto dal gruppo di controllo presentava mutazioni di *TP53* ($P < 0.001$; **Tabella 6.6**).

6.3.4 *Methylation score* e algoritmo diagnostico

Integrando i dati del presente studio con quelli del precedente, è stato implementato un algoritmo diagnostico in base al quale una diagnosi di FOSSC è maggiormente probabile in caso di:

- mutazioni di *TP53*
- *methylation score* ≥ 3

Il *methylation score* deriva dalla somma dei punteggi attribuiti ad alterazioni epigenetiche di specifiche CpG che hanno evidenziato differenze statisticamente significative fra i campioni istologici di FOSSC e i controlli, che comprendono ipermetilazione di *ZAP70*, *FLII* e *MIR124* e ipometilazione di *KIF1A*, *MIR363* e *MAGEC2*, come dettagliato in **Tabella 6.7**.

Diciassette brushing di FOSSC (48%) hanno mostrato un *methylation score* ≥ 3 , contro 2 brushing del gruppo di controllo (3%, entrambi con diagnosi di parodontite; $P < 0.001$).

La presenza di un profilo di metilazione alterato nei FOSSC non era associata a mutazioni di *TP53* ($P = 0.238$).

Degli 11 casi di FOSSC in cui era stato effettuato un secondo brushing della lesione, solo 2 gatti (18%) hanno ottenuto uno score positivo in entrambi i casi. Dei 19 casi di FOSSC in cui era stato effettuato un brushing dalla mucosa orale clinicamente normale distante dal tumore, 7 (37%) mostravano un profilo di metilazione alterato e simile a quello del tumore.

Dei 19 casi di FOSSC in cui le analisi sono state svolte in parallelo sul corrispondente campione bioptico, tutte e 19 le biopsie (100%) avevano un *methylation score* ≥ 3 , contro 11 brushing (58%). Il numero complessivo di *reads* non era, tuttavia, significativamente superiore rispetto ai brushing ($P = 0,851$).

Analogamente, il numero totale di *reads* dei brushing ottenuti in condizioni di anestesia generale non era significativamente diverso rispetto ai gatti vigili ($P = 0,393$).

Complessivamente, considerando i campioni di brushing orale, 24 gatti con FOSSC (69%) sono risultati positivi all'algoritmo, contro 2 (3%) dei controlli (sensibilità: 69%; specificità: 97%; accuratezza: 86%).

La proporzione di FOSSC positivi all'algoritmo era significativamente superiore nei gatti in cui il prelievo era stato effettuato in anestesia generale (21 su 26; 81%) rispetto ai gatti vigili (3 su 9; 33%; $P = 0.014$).

Tabella 6.3 Gatti con carcinoma squamocellulare orale: segnalamento, localizzazione del tumore e utilizzo di anestesia al momento del brushing.

ID	Razza	Età (anni)	Sesso	Localizzazione	Anestesia generale
BR006	Europeo	15	Fs	Gengiva mandibolare	Si
BR009a	Siamese	8	Fs	Gengiva mascellare	Si
BR010	Europeo	12	Mc	Gengiva mascellare	Si
BR011	Europeo	19	Mc	Lingua	Si
BR013a	Europeo	15	Fs	Lingua	Si
BR014a	Europeo	11	Mc	Gengiva mascellare	No
BR015	Europeo	12	Fs	Lingua	No
BR018	Thai	12	Fs	Gengiva mascellare	Si
BR020a	Meticcio pelo lungo	9	Mc	Lingua	Si
BR023	Europeo	11	Mc	Gengiva mascellare	Si
BR025	Europeo	10	Fs	Lingua	Si
BR033	Europeo	12	Mc	Gengiva mandibolare	Si
BR038a	Europeo	12	Mc	Lingua	Si
BR046	Europeo	11	Mc	Gengiva mandibolare	Si
BR048a	Europeo	13	Fs	Mucosa orale caudale	Si
BR059a	Europeo	8	Mc	Lingua	No
BR061	Europeo	15	Fs	Gengiva mandibolare	Si
BR062	Europeo	5	Fs	Lingua	Si
BR063	Europeo	14	Fs	Gengiva mascellare	Si
BR067a	Certosino	13	Fs	Gengiva mandibolare	No
BR080a	Europeo	9	Mc	Mucosa orale caudale	No
BR086b	Europeo	6	Mc	Mucosa orale caudale	Si
BR090a	Europeo	10	Mc	Gengiva mascellare	Si
BR098a	Europeo	17	Fs	Mucosa vestibolare	Si
BR101b	Europeo	10	Mc	Gengiva mandibolare	Si
BR102a	Europeo	8	Fs	Gengiva mascellare	Si
BR104a	Europeo	16	Fs	Gengiva mascellare	Si
BR107a	Europeo	13	Fs	Gengiva mandibolare	No
BR110a	Europeo	16	Fs	Gengiva mandibolare	No
BR130a	Europeo	13	Fs	Gengiva mandibolare	No
BR132a	Maine Coon	17	Fs	Lingua	Si
BR136a	Meticcio pelo lungo	13	Mc	Gengiva mandibolare	Si
BR137a	Europeo	17	Mc	Gengiva mascellare	No
BR139a	Europeo	13	Fs	Mucosa orale caudale	Si
BR140a	Europeo	11	Fs	Gengiva mandibolare	Si

Fs: femmina sterilizzata; Mc: maschio castrato

Tabella 6.4 Gatti con gengivostomatite cronica, parodontopatie, sarcomi e controlli sani: segnalamento e utilizzo di anestesia generale al momento del brushing.

Diagnosi clinica e/o istologica	ID	Razza	Età	Sesso	Anestesia generale
Parodontite	BR004	Persiano	15	Fs	Si
Parodontite	BR008a	Europeo	7	Mc	Si
Parodontite	BR022	Meticcio a pelo lungo	9	Mc	Si
Parodontite	BR027	Europeo	5	Fs	Si
Parodontite	BR030a	Europeo	6	Mc	Si
Parodontite	BR051	Europeo	13	Mc	Si
Parodontite	BR060a	Europeo	15	Fs	No
Parodontite	BR065	Europeo	14	Mc	No
Parodontite	BR66a	Europeo	5	Mc	No
Parodontite	BR75a	Sphynx	7	F	No
Parodontite	BR092a	Europeo	17	Mc	Si
Parodontite	BR096a	Europeo	17	Mc	No
Parodontite	BR100	Europeo	8	M	Si
Parodontite	BR114	Europeo	14	Mc	Si
Parodontite	BR116	Persiano	9	Fs	Si
Parodontite	BR118	Europeo	11	Mc	Si
Parodontite	BR126	Meticcio a pelo lungo	11	Mc	Si
Parodontite	BR129	Siamese	15	Fs	Si
Parodontite	BR133	Europeo	10	Fs	Si
Parodontite	BR135	Europeo	5	Mc	Si
FCGS	BR007a	Europeo	15	Mc	Si
FCGS	BR026	Europeo	5	Fs	Si
FCGS	BR039b	Europeo	10	Mc	Si
FCGS	BR040	Meticcio a pelo lungo	5	Mc	Si
FCGS	BR047a	Europeo	8	Mc	Si
FCGS	BR049a	Europeo	6	Fs	Si
FCGS	BR088b	Europeo	5	Fs	Si
FCGS	BR093a	Norvegese delle foreste	9	Fs	Si
FCGS	BR094a	Europeo	7	Fs	Si
FCGS	BR095a	Europeo	11	Fs	No
FCGS	BR099	Europeo	10	Fs	Si

Diagnosi clinica e/o istologica	ID	Razza	Età	Sesso	Anestesia generale
FCGS	BR103b	Europeo	5	Fs	Si
FCGS	BR127	Europeo	10	Mc	Si
FCGS	BR128	Europeo	14	Mc	Si
FCGS	BR134	Europeo	6	Mc	Si
Granuloma piogenico	BR074	Europeo	6	Fs	Si
Granuloma piogenico	BR089a	Persiano	13	Fs	Si
Granuloma piogenico	BR115	Europeo	7	Fs	Si
Granuloma piogenico	BR120a	Europeo	11	Mc	Si
Granuloma eosinofilico	BR012	Europeo	9	Mc	No
Granuloma eosinofilico	BR021	Europeo	13	Mc	Si
Granuloma eosinofilico	BR085	Europeo	5	Mc	Si
Sarcoma	BR016	Europeo	10	Fs	Si
Sarcoma	BR064	Europeo	14	Mc	Si
Sarcoma	BR073a	Europeo	10	Mc	Si
Mucosa orale normale	BR032	Europeo	13	Fs	Si
Mucosa orale normale	BR034	Europeo	5	Fs	No
Mucosa orale normale	BR036	Europeo	5	Mc	No
Mucosa orale normale	BR070	Europeo	15	Fs	No
Mucosa orale normale	BR071	Europeo	16	Fs	No
Mucosa orale normale	BR082a	Europeo	5	Fs	Si
Mucosa orale normale	BR105	Europeo	7	Fs	No
Mucosa orale normale	BR106	Europeo	7	Mc	No
Mucosa orale normale	BR112	Europeo	7	Mc	No
Mucosa orale normale	BR113	Europeo	10	Fs	Si
Mucosa orale normale	BR119	Europeo	18	Fs	Si
Mucosa orale normale	BR122	Europeo	10	Fs	No
Mucosa orale normale	BR123	Europeo	14	Mc	No
Mucosa orale normale	BR124	Europeo	14	Fs	No
Mucosa orale normale	BR125	Europeo	5	Fs	No

FCGS = *Feline chronic gingivostomatitis* (gengivostomatite cronica felina). Fs: femmina sterilizzata; Mc: maschio castrato

Tabella 6.5 Gatti con carcinoma squamocellulare orale: analisi mutazionale di TP53, *methylation score* e applicazione dell'algoritmo sui brushing (tumore e mucosa normale distante) e sui corrispettivi campioni istologici del tumore.

ID	TP53	VAF	MS	Algoritmo	Brushing aggiuntivo	Mucosa normale	Istologia/ID	Analisi su campione istologico			
								TP53	VAF	MS	Algoritmo
BR006	WT	-	0	Neg	No	NV	Si ^a	-	-	-	-
BR009a	p.Y227C	0,46	5	Pos	No	NV	Si (AP16912)	p.Y227C	0,25	5	Pos
BR010	p.S234F	0,06	1	Pos	No	NV	Si ^a	-	-	-	-
BR011	C231_N232 del <i>in frame</i>	0,13	5	Pos	No	NV	Si ^a	-	-	-	-
BR013a	WT	-	5	Pos	No	Pos	Si (AP17083)	WT	-	5	Pos
BR014a	WT	-	2	Neg	No	NV	Si (AP17062)	WT	-	5	Pos
BR015	WT	-	0	Neg	No	NV	Si ^a	-	-	-	-
BR018	WT	-	4	Pos	No	NV	Si (AP17595)	WT	-	7	Pos
BR020a	WT	-	0	Neg	Neg	Neg	Si (AP17714)	WT	-	3	Pos
BR023	p.R150H	0,18	3	Pos	No	NV	Si (AP17845)	p.R150H	0,35	6	Pos
BR025	p.R167H	0,13	3	Pos	No	NV	Si (AP17919)	p.R167H	0,17	5	Pos
BR033	WT	-	4	Pos	No	NV	Si (AP18022)	WT	-	4	Pos
BR038a	p.R206*	0,24	4	Pos	No	Pos	Si (AP18102)	p.R206*	0,73	6	Pos
BR046	p.V209A	0,07	0	Pos	No	NV	Si (AP18329)	p.V209A	0,13	4	Pos
BR048a	p.V209A	0,13	5	Pos	No	Pos	Si (AP18369)	p.V209A	0,52	8	Pos
BR059a	WT	-	0	Neg	No	NV	Si ^a	-	-	-	-
BR061	WT	-	0	Neg	No	NV	Si ^a	-	-	-	-
BR062	WT	-	0	Neg	No	NV	Si (AP19133)	-	-	-	-

ID	TP53	VAF	MS	Algoritmo	Brushing aggiuntivo	Mucosa normale	Istologia/ID	Analisi su campione istologico			
								TP53	VAF	MS	Algoritmo
BR063	p.G272E	0,26	5	Pos	No	NV	Si (AP19135)	-	-	-	-
BR067a	WT	-	0	Neg	No	Neg	Si ^a	-	-	-	-
BR080a	WT	-	4	Pos	Neg	Pos	Si ^a	-	-	-	-
BR086b	p.R242K	0,70	4	Pos	Neg	Pos	Si ^a	-	-	-	-
BR090a	p.E172K	0,38	4	Pos	No	Neg	Si (AP19235)	-	-	-	-
BR098a	p.R206Q	0,12	2	Pos	No	Neg	Si (AP20449)	p.R206Q	0,27	6	Pos
BR101b	p.E264K	0,12	1	Pos	Neg	Neg	Si (AP20587)	p.E264K	0,49	5	Pos
BR102a	WT	-	1	Neg	Neg	Neg	Si (AP20646)	WT	-	4	Pos
BR104a	T277del <i>frameshift</i>	0,16	2	Pos	No	Neg	Si (AP20857)	T277del <i>frameshift</i>	0,48	5	Pos
BR107a	WT	-	0	Neg	Neg	Neg	Si ^a	-	-	-	-
BR110a	WT	-	1	Neg	Neg	NV	Si ^a	-	-	-	-
BR130a	WT	-	3	Pos	Neg	Pos	Si ^a	-	-	-	-
BR132a	S253 ins <i>frameshift</i>	0,60	7	Pos	Pos	Pos	Si (AP21302)	S253ins <i>frameshift</i>	0,34	6	Pos
BR136a	P183_L187 del <i>frameshift</i>	0,08	2	Pos	Neg	Neg	Si (AP21334)	P183_L187 del <i>frameshift</i>	0,47	4	Pos
BR137a	p.R206Q	0,07	2	Pos	No	Neg	Si ^a	-	-	-	-
BR139a	WT	-	3	Pos	Pos	Neg	Si (AP21458)	WT	-	6	Pos
BR140a	WT	-	3	Pos	No	Neg	Si (AP21485)	WT	-	6	Pos

WT: *wild type*, VAF: *Variant allele frequency*, MS: *Methylation score*, NV: Non valutata; Pos: positivo; Neg: negativo; ^a presso laboratorio esterno.

Tabella 6.6 Gatti con gengivostomatiti, parodontopatie, sarcomi e controlli sani: analisi di *TP53*, *methylation score* e applicazione dell'algoritmo.

ID	<i>TP53</i>	MS	Algoritmo
BR004	WT	0	Negativo
BR008a	WT	2	Negativo
BR022	WT	1	Negativo
BR027	WT	1	Negativo
BR030a	WT	1	Negativo
BR051	WT	0	Negativo
BR060a	WT	1	Negativo
BR065	WT	1	Negativo
BR66a	WT	1	Negativo
BR75a	WT	0	Negativo
BR092a	WT	5	Positivo
BR096a	WT	0	Negativo
BR100	WT	0	Negativo
BR114	WT	0	Negativo
BR116	WT	1	Negativo
BR118	WT	2	Negativo
BR126	WT	0	Negativo
BR129	WT	4	Positivo
BR133	WT	0	Negativo
BR135	WT	0	Negativo
BR007a	WT	0	Negativo
BR026	WT	0	Negativo
BR039b	WT	1	Negativo
BR040	WT	0	Negativo
BR047a	WT	0	Negativo
BR049a	WT	0	Negativo
BR088b	WT	0	Negativo
BR093a	WT	0	Negativo
BR094a	WT	0	Negativo
BR095a	WT	0	Negativo

BR099	WT	1	Negativo
BR103b	WT	1	Negativo
BR127	WT	2	Negativo
BR128	WT	1	Negativo
BR134	WT	1	Negativo
BR074	WT	0	Negativo
BR089a	WT	0	Negativo
BR115	WT	0	Negativo
BR120a	WT	0	Negativo
BR012	WT	0	Negativo
BR021	WT	0	Negativo
BR085	WT	0	Negativo
BR016	WT	0	Negativo
BR064	WT	0	Negativo
BR073a	WT	0	Negativo
BR032	WT	2	Negativo
BR034	WT	1	Negativo
BR036	WT	0	Negativo
BR070	WT	0	Negativo
BR071	WT	1	Negativo
BR082a	WT	0	Negativo
BR105	WT	1	Negativo
BR106	WT	1	Negativo
BR112	WT	1	Negativo
BR113	WT	2	Negativo
BR119	WT	0	Negativo
BR122	WT	1	Negativo
BR123	WT	0	Negativo
BR124	WT	1	Negativo
BR125	WT	2	Negativo

WT: *Wild type*

Tabella 6.7 *Methylation score*: criteri per l'attribuzione del punteggio.

Gene	Criteri (% di metilazione)
<i>ZAP70</i>	>20% in almeno una CpG (3-19): 1 punto >40%: 2 punti
<i>KIF1A</i>	<70% in almeno una CpG (1, 2, 3, 5, 6, 7) o <30% nella CpG 4: 1 punto
<i>FLI1</i>	>20% in almeno una CpG (2-5): 1 punto >40%: 2 punti
<i>MiR124</i>	>40% in almeno una CpG (2, 3): 1 punto
<i>MiR363</i>	<70% nella CpG 1 o <80% in almeno una CpG (2, 3, 4): 1 punto
<i>MAGEC2</i>	<70% in una CpG (7, 8, 9, 10): 1 punto
<i>Methylation score</i>: punteggio totale	
positivo (suggestivo di carcinoma) ≥ 3 punti	

Discussione

Nello studio precedente, un algoritmo basato sull'analisi mutazionale di *TP53* e il pattern di metilazione di 4 geni aveva permesso di differenziare biopsie istologiche di FOSCC da controlli sani e infiammatori con un'accuratezza del 97% (Renzi *et al.*, 2019).

In questo studio si è valutata la possibilità di ricercare alterazioni genetiche ed epigenetiche a partire da campioni ottenuti mediante una tecnica non invasiva: il brushing orale. Questa metodica ha già prodotto risultati promettenti nella diagnosi precoce del HOSCC e, se applicabile nel gatto, potrebbe portare a un significativo vantaggio nell'identificazione di sospette lesioni neoplastiche prima che raggiungano un'estensione tale da non poter essere più gestite efficacemente dal punto di vista terapeutico.

L'identificazione di mutazioni a carico di *TP53* si è confermata anche in questo studio un marker affidabile, con un 100% di concordanza tra brushing e biopsie, pur con un valore di VAF inferiore nei brushing, a suggerire in questi ultimi una maggiore diluizione delle cellule neoplastiche, verosimilmente dovuta alla presenza di cellule normali di sfaldamento. Anche in questo studio tuttavia, così come nei due precedenti, le mutazioni di *TP53* sono state riscontrate solo in una parte dei casi, per cui esiste una percentuale di FOSCC variabile dal 30 al 50% che non presenta mutazioni negli esoni indagati. L'identificazione di questi casi è quindi vincolata al rilevamento di anomalie nel pattern di metilazione, che però in questo studio ha fornito risultati maggiormente variabili.

Oltre ai geni già indagati, abbiamo testato il potenziale diagnostico di altri 7 geni le cui vie molecolari hanno mostrato disregolazioni importanti in precedenti studi sul FOSCC e/o sulla controparte umana. In particolare, i geni inclusi nel nuovo pannello diagnostico sono stati:

- ***RBI*** (Retinoblastoma). La disregolazione della proteina codificata da questo importante oncosoppressore (pRb), è stata riportata nel FOSCC, e diversamente da quanto noto nel carcinoma squamocellulare cutaneo del gatto e nel HOSCC, non sembra essere associata all'infezione da Papillomavirus. Inoltre, il gene Retinoblastoma umano è risultato ipermetilato nel HOSCC (Mascolo *et al.*, 2012; Supsavhad *et al.*, 2016b)

- **CELSR3** (*Cadherin EGFLAG seven-pass G-type receptor 3*). Da un'analisi integrata dei dati depositati sul *Cancer Genome Atlas* (TCGA), questo gene è risultato essere un promettente *biomarker* nel HOSCC e in altri tumori umani, in quanto caratterizzato da una "tripla evidenza" di alterazioni (espressione proteica, mutazioni somatiche e metilazione del DNA) (Fan *et al.*, 2019).
- **EGFR**. La disregolazione del recettore tirosinchinasico EGFR può promuovere lo sviluppo neoplastico influenzando la proliferazione cellulare e l'angiogenesi, e la sua sovraespressione è stata riportata nel FOSCC (Bergkvist *et al.*, 2011).
- **PDPN**. La podoplanina è una glicoproteina transmembrana la cui sovraespressione può favorire l'invasione metastatica dei vasi linfatici e sanguigni da parte delle cellule neoplastiche (Chang *et al.*, 2015; Gissi *et al.*, 2018). Nella leucoplachia orale dell'uomo, l'espressione di podoplanina è stata associata al rischio di evoluzione in HOSCC (Gissi *et al.*, 2018). L'espressione di questa proteina è stata documentata anche nel FOSCC (Itai *et al.*, 2017).
- **p16/CDKN2A**. La proteina p16 inibisce la proliferazione cellulare regolando la funzione della proteina pRb (Foulkes *et al.*, 1995). Può essere sovraespressa nel FOSCC, con diversi pattern di immunoreattività e meccanismi molecolari probabilmente differenti dall'HOSCC, in cui è considerata un marker indiretto dell'infezione da Papillomavirus (Munday *et al.*, 2019a). Inoltre, l'ipermetilazione del promoter di questo gene, associata ad un suo silenziamento, può essere presente sia nell'HOSCC che in lesioni orali preneoplastiche dell'uomo, suggerendone una potenziale utilità come marker precoce di trasformazione maligna (Mascolo *et al.*, 2012).
- **CDH1**. Questo gene codifica la Caderina E, una glicoproteina transmembrana fondamentale per la preservazione dell'adesione intercellulare e della polarità delle cellule epiteliali. L'assenza o la sotto-espressione di Caderina E possono favorire l'invasività delle cellule dell'HOSCC. Molti studi hanno evidenziato ipermetilazione di *CDH1* in questa neoplasia umana (Foschini *et al.*, 2008; Mascolo *et al.*, 2012). Nel FOSCC l'espressione di Caderina E sembra essere mantenuta, anche se sono stati valutati pochi casi, ed anomalie della metilazione potrebbero comunque precedere

alterazioni proteiche o modulare l'espressione di isoforme differenti (Cheng *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2019).

- **MIR363**. Questo gene codifica per il microRNA MiR363, che ha come target il gene *PDPN* regolandone negativamente l'espressione. Uno studio ha riportato che in casi di HNSCC associati a metastasi linfonodali, MiR363 era sottoregolato tramite l'ipermetilazione del promoter, determinando sovraespressione di podoplanina e favorendo l'invasività e la formazione di metastasi (Sun *et al.*, 2013).

Di questi tuttavia, solo MiR363 è risultato differenzialmente metilato nei FOSCC rispetto ai controlli. Dei geni indagati nello studio precedente, soltanto i 4 già inclusi nell'algoritmo sviluppato in precedenza (*FLII*, *MiR124-1*, *KIF1A* and *MAGEC2*) hanno confermato la loro rilevanza diagnostica.

Rispetto alle biopsie, tuttavia, l'ampiezza della differenza di metilazione tra FOSCC e controlli è risultata significativamente inferiore nei brushing e non costante tra caso e caso. Questo potrebbe essere dovuto alla modalità di campionamento, che riesce ad essere meno selettivo sulla lesione ed, essendo superficiale, corre il rischio di andare a campionare soltanto detriti cellulari e materiale necrotico, mentre analizzando una biopsia istologica si ha la certezza di aver campionato una significativa quantità di cellule neoplastiche. Inoltre, durante l'esecuzione del brushing, la saliva e le cellule esfoliate in essa presenti potrebbero andare a diluire il campione, facendo sì che al DNA delle cellule neoplastiche si mescoli quello di cheratinociti normali e, potenzialmente, DNA microbico. Questa ipotesi è supportata dall'evidenza che il numero di *reads* dei geni esaminati nei campioni di brushing, non era significativamente inferiore a quella riscontrata nei corrispondenti campioni biotici, mentre la differenza nel pattern di metilazione osservato era significativamente inferiore; infatti in tutte le biopsie di FOSCC è stato riscontrato un pattern di metilazione alterato, mentre solo il 48% dei brushing di FOSCC ha avuto un *methylation score* ≥ 3 . Inoltre, la percentuale di casi con pattern di metilazione alterato era significativamente superiore nei gatti in cui il prelievo era stato effettuato in anestesia generale, a suggerire come un prelievo più mirato sulla lesione e verosimilmente più prolungato possano migliorare l'accuratezza diagnostica.

Un altro dato non trascurabile è che degli 11 casi in cui è stato effettuato un doppio campionamento della lesione, solo il 18% ha dato risultato positivo in entrambi. Questo potenzialmente perché il primo campionamento può raccogliere solo materiale necrotico e detriti cellulari, rimossi i quali il secondo campionamento può andare a campionare le cellule neoplastiche.

Infine, in ben il 37% dei casi in cui è stata campionata anche la mucosa orale normale lontano dal tumore era presente un pattern di metilazione alterato; questo potrebbe essere dovuto all'efoliazione di cellule neoplastiche nella saliva, ma il riscontro di tale fenomeno solo in una parte dei casi potrebbe anche essere spiegato con la teoria della cancerogenesi di campo. Secondo questa teoria, ampie superfici tissutali esposte allo stesso insulto per un periodo prolungato di tempo possono essere iniziate al processo di cancerogenesi; questo predispone all'insorgenza di tumori multipli indipendenti in seguito a un evento promotore (Curtius *et al.*, 2018)

In diversi studi effettuati in medicina umana è stato dimostrato come l'alterazione del pattern epigenetico sia un evento molto precoce nel processo di cancerogenesi, potenzialmente più precoce rispetto alle mutazioni di *TP53*, che infatti non sono state rilevate in nessun caso nei brushing di mucosa orale lontano dai tumori. Questo porta a dedurre che è proprio sulle metilazioni che bisogna puntare al fine di mettere a punto un test di screening precoce. Un'altra possibilità è che alterazioni della metilazione si verificano nelle cellule senescenti anche se non neoplastiche e che pertanto possano essere riconducibili ad un evento aspecifico legato all'età avanzata dei pazienti, ma il fatto che non siano state trovate in modo significativo nei gatti del gruppo di controllo (che non avevano un'età mediana di molto inferiore) ci porta a considerare questa ipotesi meno probabile.

Un ulteriore dato incoraggiante è che rarissimi casi del gruppo di controllo abbiano mostrato alterazioni, evidenziando una elevatissima specificità del test. Ciò permette di ipotizzare che nella maggior parte dei casi le infiammazioni croniche non vadano ad alterare in modo significativo il metiloma e questo ci fa ben sperare sulla possibilità di riuscire a identificare le lesioni neoplastiche in fase iniziale differenziandole in modo efficace da lesioni che morfologicamente potrebbero risultare del tutto simili, come un granuloma piogenico o una

lesione ulcerativo-iperplastica gengivale nel contesto di forme infiammatorie croniche. Neppure i sarcomi, secondo tumore orale più frequente nel gatto, hanno mostrato la presenza di alterazioni dei geni esaminati, confermando la selettività di queste alterazioni per il FOSCC. Alla luce di questi dati promettenti, la rilevazione del *methylation score* nei FOSCC resta tuttavia un punto critico, soprattutto nel sottogruppo di FOSCC che non presenta mutazioni di *TP53*, la cui identificazione da brushing risulta meno problematica. Il fatto che nelle corrispondenti biopsie il *methylation score* sia risultato efficace ci porta a ipotizzare che i limiti della metodica siano in gran parte legati all'esecuzione del prelievo. Da questo punto di vista, la collaborazione del paziente sembra essere critica ed è tanto più limitata quanto più la lesione è estesa e dolente. Una lesione più precoce può essere da un lato più difficile da campionare perché più piccola, ma il paziente potrebbe essere maggiormente collaborativo. Il fatto che la tecnica sia più efficace in anestesia può essere considerato un limite per una metodica di screening, ma tutto sommato è solo durante un'anestesia generale che la bocca di un gatto può essere ispezionata accuratamente, permettendo l'identificazione di lesioni potenzialmente neoplastiche. I prelievi potrebbero pertanto essere effettuati durante le sedute di detartrasi, a cui frequentemente vengono sottoposti i gatti anziani. Ulteriori accorgimenti per potenziare la sensibilità della metodica possono essere quelli di effettuare sempre un doppio prelievo o utilizzare *cytobrush* con un elevato numero di setole e, in assenza di anestesia, eseguire il prelievo previo efficace contenimento dell'animale.

Bibliografia

Acha-Sagredo A, Ruesga MT, Rodriguez C, Aguirregaviria JI, de Pancorbo MM, Califano JA, Aguirre JM. p53 mutation is rare in oral mucosa brushings from patients previously treated for a head and neck squamous cell carcinoma. *Oral oncology* 2009; 45(8): 661-664.

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature Methods* 2010; 7(4): 248–249.

Afgan E, Baker D, Van den Beek M, Blankenberg D, Bouvier D, Čech M, Chilton J, Clements D, Coraor N, Eberhard C, Grüning B, Guerler A, Hillman-Jackson J, Von Kuster G, Rasche E, Soranzo N, Turaga N, Taylor J, Nekrutenko A, Goecks J. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic acids research* 2016; 44(W1): W3-W10.

Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Cech M, Chilton J, Clements D, Coraor N, Grüning BA, Guerler A, Hillman-Jackson J, Hiltmann S, Jalili V, Rasche H, Soranzo N, Goecks J, Taylor J, Nekrutenko A, Blankenberg D. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research* 2018; 46(W1): W537–W544.

Akhter M, Hossain S, Rahman, QB, Molla MR. A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis." *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology: JOMFP* 2011; 15.2: 168.

Albaric O, Bret L, Amardeihl M, Delverdier M. Immunohistochemical expression of p53 in animal tumors: a methodological study using four anti-human p53 antibodies. *Histology and Histopathology* 2001; 16(1): 113-121.

Alexandrov LB, Ju YS, Haase K, Van Loo P, Martincorena I, Nik-Zainal S, Totoki Y, Fujimoto A, Nakagawa H, Shibata T, Campbell PJ, Vineis P, Phillips DH, Stratton MR. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science* 2016; 354(6312): 618–622.

Allen CT, Clavijo PE, Van Waes C, Chen Z. Anti-tumor immunity in head and neck cancer: understanding the evidence, how tumors escape and immunotherapeutic approaches. *Cancers* 2015; 7(4): 2397–2414.

Altamura G, Power K, Martano M, Degli Uberti B, Galiero G, De Luca G. Felis catus papillomavirus type-2 E6 binds to E6AP, promotes E6AP/p53 binding and enhances p53 proteasomal degradation. *Scientific Reports* 2018; 8:17529.

Altamura G, Cardeti G, Cersini A, Eleni C, Cocumelli C, Bartolomé del Pino LE, Razzuoli E, Martano M, Maiolino P, Borzacchiello G. Detection of Felis catus papillomavirus type-2 DNA and viral gene expression suggest active infection in feline oral squamous cell carcinoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 2020a; doi: 10.1111/vco.12569

Altamura G, Martano M, Licenziato L, Maiolino P, Borzacchiello G. Telomerase Reverse Transcriptase (TERT) expression, telomerase activity, and expression of Matrix Metalloproteinases (MMP)-1/-2/-9 in feline oral squamous cell carcinoma cell lines associated with Felis catus Papillomavirus Type-2 infection. *Frontiers in Veterinary Science* 2020b; 7: 148.

Andreeff M, Kelly KR, Yee K, Assouline S, Strair R, Popplewell L, Bowen D, Martinelli G, Drummond MW, Vyas P, Kirschbaum M, Iyer SP, Ruvolo V, González GMN, Huang X, Chen G, Graves B, Blotner S, Bridge P, Jukofsky

- L, Middleton S, Reckner M, Rueger R, Zhi J, Nichols G and Kojima K. Results of the Phase I Trial of RG7112, a Small-Molecule MDM2 Antagonist in Leukemia. *Clinical Cancer Research* 2016; 22(4): 868–876.
- Ang KK, Andratschke NH, Milas L. Epidermal growth factor receptor and response of head-and-neck carcinoma to therapy. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*; 2004; 58(3): 959–965.
- Asa'ad F, Bollati V, Pagni G. Evaluation of DNA methylation of inflammatory genes following treatment of chronic periodontitis: a pilot case-control study. *Journal of Clinical Periodontology* 2017; 44(9): 905–914.
- Asada H, Tomiyasu H, Okada K, Chambers JK, Goto-Koshino Y, Uchida K, Kagawa Y, Ohno K, Tsujimoto H. Clinical significance of the two-base insertion mutation in the TP53 gene in canine histiocytic sarcoma. *Research in Veterinary Science* 2019; 124: 57-60.
- Asada H, Tsuboi M, Chambers JK, Uchida K, Tomiyasu H, Goto-Koshino Y, Ohno K, Tsujimoto H. A 2-base insertion in exon 5 is a common mutation of the TP53 gene in dogs with histiocytic sarcoma. *Journal of Veterinary Medical Science* 2017; 17-0197.
- Aschauer L, Muller PA. Novel targets and interaction partners of mutant p53 Gain-Of-Function. *Biochemical Society Transactions* 2016; 44(2): 460–466.
- Astarita JL, Acton SE, Turley SJ. Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Frontiers in immunology*, 2012; 3: 283.
- Avallone G, Muscatello LV, Leoni A, Roccabianca P, Lepri E, Crippa L, Bacci B. p53 expression in canine liposarcoma correlates with myxoid variant and higher proliferative activity. *Veterinary Pathology* 2020; 57(5): 620-622.
- Baas IO, Mulder JW, Offerhaus GJ, Vogelstein B, Hamilton SR. An evaluation of six antibodies for immunohistochemistry of mutant p53 gene product in archival colorectal neoplasms. *The Journal of Pathology* 1994; 172(1): 5–12.
- Baba S, Yamada Y, Hatano Y, Miyazaki Y, Mori H, Shibata T, Hara A. Global DNA hypomethylation suppresses squamous carcinogenesis in the tongue and esophagus. *Cancer Science* 2009; 100(7): 1186-1191.
- Banerji N, Kanjilal S. Somatic alterations of the p53 tumor suppressor gene in vaccine-associated feline sarcoma. *American Journal of Veterinary Research* 2006; 67(10): 1766-1772.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours*. Lyon: IARC Press, 2005: 107-208.
- Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nature Reviews Cancer* 2011; 11(10): 726-734.
- Beam SL, Rassnick KM, Moore AS, McDonough SP. An immunohistochemical study of cyclooxygenase-2 expression in various feline neoplasms. *Veterinary Pathology* 2003; 40(5), 496-500.
- Bergkvist GT, Argyle DJ, Pang LY, Muirhead R, Yool DA. Studies on the inhibition of feline EGFR in squamous cell carcinoma: enhancement of radiosensitivity and rescue of resistance to small molecule inhibitors. *Cancer Biology and Therapy* 2011a; 11(11): 927-937.
- Bergkvist GT, Argyle DJ, Morrison L, MacIntyre N, Hayes A, Yool DA. Expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and Ki67 in feline oral squamous cell carcinomas (FOSCC). *Veterinary and Comparative Oncology* 2011b; 9(2): 106-117.

- Bernreuter DC. Oropharynx and Tonsils. In Valenciano AC, Cowell RL, *Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the dog and cat*, fifth edition. St. Louis, MI: Elsevier, 2020: 131-140.
- Bertone ER, Snyder LA, Moore AS. Environmental and lifestyle risk factors for oral squamous cell carcinoma in domestic cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2003; 17(4): 557-562.
- Bettini G. Diagnostica citopatologica. In: Marcato PS, *Patologia Sistemica Veterinaria*, I edizione Bologna: Edagricole, 2002: 1389-1445.
- Bilgic O, Duda L, Sánchez MD, Lewis JR. Feline Oral Squamous Cell Carcinoma: Clinical Manifestations and Literature Review. *Journal of veterinary dentistry* 2015; 32(1): 30-40.
- Blanden AR, Yu X, Loh SN, Levine AJ, Carpizo DR. Reactivating mutant p53 using small molecules as zinc metallochaperones: awakening a sleeping giant in cancer. *Drug Discovery Today* 2015; 20(11): 1391-1397.
- Bonfanti U, Bertazzolo W, Gracis M, Roccabianca P, Romanelli G, Palermo G, Zini E. Diagnostic value of cytological analysis of tumours and tumour-like lesions of the oral cavity in dogs and cats: A prospective study on 114 cases. *The Veterinary Journal* 2015; 205(2): 322-327.
- Boston SE, Van Stee LL, Bacon NJ, Szentimrey D, Kirby BM, Van Nimwegen S, Wavreille VA. Outcomes of eight cats with oral neoplasia treated with radical mandibulectomy. *Veterinary Surgery*, 2020; 49(1): 222-232.
- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 2000 19(21), 2474-2488.
- Boyle JO, Mao L, Brennan JA, Koch WM, Eisele DW, Saunders JR. Gene mutations in saliva as molecular markers for head and neck squamous cell carcinomas. *The American Journal of Surgery* 1994; 168(5): 429-432.
- Bradley RL, MacEwen EG, Loar AS. Mandibular resection for removal of oral tumors in 30 dogs and 6 cats. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1984; 184: 460-463.
- Brandão YDO, Toledo MB, Chequin A, de Cristo TG, Sousa RS, Souza Ramos EA, Klassen G. DNA Methylation Status of the Estrogen Receptor α Gene in Canine Mammary Tumors. *Veterinary pathology* 2018; 55(4): 510-516.
- Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch MJ, Forastiere AA, Sidransky D. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine* 1995; 332(11): 712-717.
- Bronzini I, Aresu L, Paganin M, Marchioretto L, Comazzi S, Cian F, Riondato F, Marconato L, Martini V, te Kronnie G. DNA methylation and targeted sequencing of methyltransferases family genes in canine acute myeloid leukaemia, modelling human myeloid leukaemia. *Veterinary and Comparative Oncology* 2017; 15(3): 910-918.
- Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature Reviews Cancer* 2009; 9(10): 701-713.
- Brown ME, Bear MD, Rosol TJ, Premanandan C, Kisseberth WC, London CA. Characterization of STAT3 expression, signaling and inhibition in feline oral squamous cell carcinoma. *BMC veterinary research* 2015; 11: 1-13.
- Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 1989; 18(8): 432-437.
- Cabelguenne A, Blons H, de Waziers I, Carnot F, Houllier AM, Soussi T, Laurent-Puig P. p53 alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series. *Journal of Clinical Oncology* 2000; 18(7): 1465-1473.

- Camus MS. Oral Cavity Cytology. In: Barger AM, MacNeill AL, *Small animal cytologic diagnosis*. Boca Raton, FL: Taylor & Francis group, 2017: 308-310.
- Cardellino U, Ciribilli Y, Andreotti V, Modesto P, Menichini P, Fronza G, Pellegrino C, Inga A. Transcriptional properties of feline p53 and its tumour-associated mutants: a yeast-based approach. *Mutagenesis* 2007; 22(7): 417–423.
- Castilho RM, Squarize CH, Almeida LO. Epigenetic modifications and head and neck cancer: implications for tumor progression and resistance to therapy. *International Journal of Molecular Sciences* 2017; 18(7): 1506.
- Chang YW, Hsieh PW, Chang YT, Lu MH, Huang TF, Chong KY, Liao HR, Cheng JC, Tseng CP. Identification of a novel platelet antagonist that binds to CLEC-2 and suppresses podoplanin-induced platelet aggregation and cancer metastasis. *Oncotarget* 2015; 6(40): 42733–42748.
- Chang YW, Kaneko MK, Yamada S, Kato Y. Epitope mapping of monoclonal antibody PMab-52 against cat podoplanin. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy* 2018; 37(2): 95-99.
- Chen Q, Lipkina G, Song Q, Kramer, RH. Promoter methylation regulates cadherin switching in squamous cell carcinoma. *Biochemical and biophysical research communications* 2004; 315(4): 850-856.
- Choi JD, Lee JS. Interplay between epigenetic and genetics in cancer. *Genomics and Informatics* 2013; 11(4): 164-173.
- Choi Y, Chan AP. PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics* 2015; 31(16): 2745-2747.
- Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Research* 2006; 66(17): 8319–8326.
- Chu S, Wylie TN, Wylie KM, Johnson GC, Skidmore ZL, Fleer M, Griffith OL, Bryan JN. A virome sequencing approach to feline oral squamous cell carcinoma to evaluate viral causative factors. *Veterinary Microbiology* 2020; 240:108491.
- Curtius K, Wright N, Graham T. An evolutionary perspective on field cancerization. *Nature Reviews Cancer* 2018; 18(1): 19–32.
- Crawford LV, Pim DC, Bulbrook RD. Detection of antibodies against the cellular protein p53 in sera from patients with breast cancer. *International Journal of Cancer*, 1982; 30(4): 403-408.
- Cristaldi M, Mauceri R, Di Fede O, Giuliana G, Campisi G, Panzarella V. Salivary biomarkers for oral squamous cell carcinoma diagnosis and follow-up: Current status and perspectives. *Frontiers in Physiology* 2019; 10: 1-12.
- Cruz IB, Snijders PJF, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow GB, Walboomers JM, van der Waal I. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *The Journal of Pathology* 1998; 184(4): 360–368.
- Curigliano G, Zhang YJ, Wang LY, Flamini G, Alcini A, Ratto C, Giustacchini M, Alcini E, Cittadini A, Santella RM. Immunohistochemical quantitation of 4-aminobiphenyl-DNA adducts and p53 nuclear overexpression in T1 bladder cancer of smokers and non-smokers. *Carcinogenesis* 1996; 17(5): 911–916.
- De Meulenaere A, Vermassen T, Aspeslagh S, Vandecasteele K, Rottey S, Ferdinande L. TILs in head and neck cancer: ready for clinical implementation and why (not)? *Head and neck pathology* 2017; 11: 354–363.
- Del Portillo A, Komissarova EV, Bokhari A, Hills C, de Gonzalez AK, Kongkarnka S, Remotti HE, Sepulveda JL, Sepulveda AR. Downregulation of friend leukemia integration 1 (FLI1) follows the stepwise progression to gastric adenocarcinoma. *Oncotarget* 2019; 10(39): 3852-3864.

- Demokan S, Chang X, Chuang A, Mydlarz WK, Kaur J, Huang P, Khan Z, Khan T, Ostrow KL, Brait M, Hoque MO, Liegeois NJ, Sidransky D, Koch W, Califano JA. KIF1A and EDNRB are differentially methylated in primary HNSCC and salivary rinses. *International journal of cancer* 2010; 127(10): 2351-2359.
- Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2001; 127(7): 411-417.
- DiBernardi L, Doré M, Davis JA, Owens JG, Mohammed SI, Guptill CF, Knapp DW. Study of feline oral squamous cell carcinoma: potential target for cyclooxygenase inhibitor treatment. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids* 2007; 76(4), 245-250.
- Dikova VR, Principe S, Bagan JV. Salivary inflammatory proteins in patients with oral potentially malignant disorders. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry* 2019; 11(7): 659-664.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA Jr, Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature*. 1992; 356(6366): 215-221.
- Doré M. Cyclooxygenase-2 expression in animal cancers. *Veterinary pathology* 2011; 48: 254-265.
- Dotto GP, Rustgi AK. Squamous cell cancers: a unified perspective on biology and genetics. *Cancer cell* 2016; 29(5): 622-637.
- Doyle JM, Gao J, Wang J, Yang M, Potts PR. MAGE-RING protein complexes comprise a family of E3 ubiquitin ligases. *Molecular Cell* 2010; 39(6): 963-974.
- Ehrhart NP. Principles of tumor biopsy. *Clinical techniques in small animal practice* 1998; 13(1): 10-16.
- Ehrlich M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* 2009; 1(2): 239-259.
- Eichten A, Westfall M, Pietenpol JA, Münger K. Stabilization and functional impairment of the tumor suppressor p53 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Virology* 2002; 295(1): 74-85.
- Epiphanio TMF, de Azevedo Fernandes NCC, de Oliveira TF, Lopes PA, Réssio RA, Gonçalves S, Scattone NV, Vannucci Tedardi M, Kulikowski LD, Damasceno J, de Melo Loureiro AP, Dagli MLZ. Global DNA methylation of peripheral blood leukocytes from dogs bearing multicentric non-Hodgkin lymphomas and healthy dogs: A comparative study *PloS One* 2019; 14(3): e0211898.
- Evans SM, Lacreata F, Helfand S, Vanwinkle T, Curran Jr WJ, Brown DQ, Hanks G. Technique, pharmacokinetics, toxicity, and efficacy of intratumoral etanidazole and radiotherapy for treatment spontaneous feline oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 1991; 20(4), 703-708.
- Fan S, Tang J, Li N, Zhao Y, Ai R, Zhang K, Wang W, Du W, Wang W. Integrative analysis with expanded DNA methylation data reveals common key regulators and pathways in cancers. *NPJ Genomic Medicine* 2019; 4(1), 1-11
- Favrot C, Welle M, Heimann M, Godson DL, Guscetti F. Clinical, histologic, and immunohistochemical analyses of feline squamous cell carcinoma in situ. *Veterinary Pathology* 2009; 46(1): 25-33.
- Feinberg AP, Vogelstein B. Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 1983; 301(5895): 89-92.
- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nature Reviews Genetics* 2006; 7(1): 21-33.
- Feller L, Altini M, Lemmer J. Inflammation in the context of oral cancer. *Oral oncology* 2013; 49(9): 887-892.

- Ferraresso S, Bresolin S, Aricò A, Comazzi S, Gelain ME, Riondato F, Bargelloni L, Marconato L, te Kronnie G, Aresu L. Epigenetic silencing of TFPI-2 in canine diffuse large B-cell lymphoma. *PLoS One* 2014; 9(4): e92707.
- Ferraresso S, Aricò A, Sanavia T, Da Ros S, Milan M, Cascione L, Comazzi S, Martini V, Giantin M, Di Camillo B, Mazzariol S, Giannuzzi D, Marconato L, Aresu L. DNA methylation profiling reveals common signatures of tumorigenesis and defines epigenetic prognostic subtypes of canine Diffuse Large B-cell Lymphoma. *Scientific Reports* 2017; 7(1): 11591.
- Ferris RL. Immunology and immunotherapy of head and neck cancer. *Journal of clinical oncology* 2015; 33(29): 3293.
- Fidel J, Lyons J, Tripp C, Houston L, Wheeler B, Ruiz A. Treatment of oral squamous cell carcinoma with accelerated radiation therapy and concomitant carboplatin in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2011; 25(3): 504–510.
- Fidel JL, Sellon RK, Houston RK, Wheeler BA. A nine-day accelerated radiation protocol for feline squamous cell carcinoma. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 2007; 48(5): 482–485.
- Figueira AC, Gomes C, De Oliveira JT, Vilhena H, Carvalheira J, De Matos AJF, Pereira PD, Gartner F. Aberrant P-cadherin expression is associated to aggressive feline mammary carcinomas. *BMC Veterinary Research* 2014; 10: 270.
- Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* 1989; 57: 1083–1093.
- Flickinger I, Gasymova E, Dietiker-Moretti S, Tichy A, Rohrer Bley C. Evaluation of long-term outcome and prognostic factors of feline squamous cell carcinomas treated with photodynamic therapy using liposomal phosphorylated meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorine. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2018; 20(12): 1100–1104.
- Flory AB, LeBlanc AK. The role of cyclooxygenase in carcinogenesis and anticancer therapy. *Compendium on continuing education for the practicing veterinarian* 2005; 27(8): 616–626.
- Foschini MP, Cocchi R, Morandi L, Marucci G, Pennesi MG, Righi A, Tosi AL, de Biase D, Pession A, Montebugnoli L. E-cadherin loss and Delta Np73L expression in oral squamous cell carcinomas showing aggressive behavior. *Head & Neck* 2008; 30(11): 1475–82.
- Foulkes WD, Flanders TY, Pollock PM, Hayward NK. The CDKN2A (p16) gene and human cancer. *Molecular medicine* 1997; 3(1): 5–20.
- Fournier Q, Cazzini P, Bavcar S, Pecceu E, Ballber C, Elders R. Investigation of the utility of lymph node fine-needle aspiration cytology for the staging of malignant solid tumors in dogs. *Veterinary clinical pathology* 2018; 47(3): 489–500.
- Fox LE, Rosenthal RC, King RR, Levine PB, Vail DM, Helfand SC, MacEwen EG, Perez-Soler R, Calderwood-Mays M, Kurzman ID. Use of cis-bis-neodecanoato-trans-R,R-1,2-diaminocyclohexane platinum (II), a liposomal cisplatin analogue, in cats with oral squamous cell carcinoma. *American Journal of Veterinary Research* 2000; 61(7): 791–795.
- Fujita M, Kaneda M. DNA methylation inhibitor causes cell growth retardation and gene expression changes in feline lymphoma cells. *Journal of Veterinary Medical Science* 2017; 79(8): 1352–1358.

- Fujiwara-Igarashi A, Goto-Koshino Y, Mochizuki H, Sato M, Fujino, Y, Ohno K, Tsujimoto H. Inhibition of p16 tumor suppressor gene expression via promoter hypermethylation in canine lymphoid tumor cells. *Research in Veterinary Science* 2014; 97(1): 60-63.
- Gamblin RM, Sagartz JE, Couto CG. Overexpression of p53 tumor suppressor protein in spontaneously arising neoplasms of dogs. *American Journal of Veterinary Research* 1997; 58: 857-863.
- García-Iglesias, MJ, Cuevas-Higuera JL, Bastida-Sáenz A, de Garnica-García MG, Polledo L, Perero P, González-Fernández J, Beatriz Fernández-Martínez B, Pérez-Martínez C. Immunohistochemical detection of p53 and pp53 Ser 392 in canine hemangiomas and hemangiosarcomas located in the skin. *BMC Veterinary Research* 2020; 16(1): 1-13.
- Gasco M, Crook T. The p53 network in head and neck cancer. *Oral Oncology* 2003; 39(3): 222–231.
- Gasymova E, Meier V, Guscetti F, Cancedda S, Roos M, Bley CR. Retrospective clinical study on outcome in cats with nasal planum squamous cell carcinoma treated with an accelerated radiation protocol. *BMC veterinary research* 2017; 13(1): 86.
- Gendler A, Lewis JR, Reetz JA, Schwarz T. Computed tomographic features of oral squamous cell carcinoma in cats: 18 cases (2002-2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2010; 236(3): 319-325.
- Gentilini F, Capitani O, Tinto D, Rigillo A, Sabattini S, Bettini G, Turba ME. Assessment of PDGFR β promoter methylation in canine osteosarcoma using methylation-sensitive high-resolution melting analysis. *Veterinary and Comparative Oncology* 2020; doi: 10.1111/vco.12567
- Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes & Development* 1998; 12(19): 2973–2983.
- Gillison ML. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head & Neck* 2007; 29(8): 779-79.
- Ginn PE, Fox LE, Brower JC, Gaskin A, Kurzman ID, Kubilis PS. Immunohistochemical detection of p53 tumor-suppressor protein is a poor indicator of prognosis for canine cutaneous mast cell tumors. *Veterinary Pathology* 2000; 37(1): 33-39.
- Gissi DB, Gabusi A, Tarsitano A, Luccarini L, Morandi, L, Montebugnoli L. Podoplanin expression as a predictive marker of dysplasia in oral leukoplakia. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2018; 46(5): 759-764.
- Goksuluk D, Korkmaz S, Zararsiz G, Karaağaoğlu AE. easyROC: An Interactive Web-tool for ROC Curve Analysis Using R Language Environment. *The R Journal* 2016; 8(2): 213-230.
- Goldschmidt MH, Goldschmidt KH. Epithelial and Melanocytic Tumors of the Skin. In: Meuten DJ, ed. *Tumors in domestic animals*. Ames, Iowa: John Wiley & Sons Inc. 2017. Meuten DJ, ed. *Tumors in Domestic Animals*. Ames, Iowa, John Wiley & Sons, Inc: 2017; 97-99.
- Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Zeng Q, Pitt AS, Tweardy DJ. Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth in vitro. *The Journal of clinical investigation* 1998; 102(7): 1385-1392.
- Greenberg ES, Chong KK, Huynh KT, Tanaka R, Hoon DSB. Epigenetic biomarkers in skin cancer. *Cancer Letters* 2014; 342(2) 170-177.
- Gruntman E, Qi Y, Slotkin RK, Roeder T, Martienssen RA, Sachidanandam R. Kismeth: analyzer of plant methylation states through bisulfite sequencing. *BMC Bioinformatics* 2008; 9(1): 371.

- Guerrero-Preston R, Michailidi C, Marchionni L, Pickering CR, Frederick MJ, Myers JN, Yegnasubramanian S, Hadar T, Noordhuis MG, Zizkova V, Fertig E, Agrawal N, Westra W, Koch W, Califano J, Velculescu VE, David Sidransky D. Key tumor suppressor genes inactivated by “greater promoter” methylation and somatic mutations in head and neck cancer. *Epigenetics* 2014; 9(7): 1031-1046.
- Hammerman PS, Hayes DN, Grandis JR. Therapeutic insights from genomic studies of head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Discovery* 2015; 5(3): 239–244.
- Hanley MP, Hahn MA, Li AX, Wu X, Lin J, Wang J, Choi AH, Ouyang Z, Fong Y, Pfeifer GP, Devers TJ, Rosenberg DW. Genome-wide DNA methylation profiling reveals cancer-associated changes within early colonic neoplasia. *Oncogene* 2017; 36(35): 5035–5044.
- Harris K, Gelberg HB, Kiupel M, Helfand SC. Immunohistochemical features of epithelial-mesenchymal transition in feline oral squamous cell carcinoma. *Veterinary pathology* 2019; 56(6): 826-839.
- Harris, C. C., & Hollstein, M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *New England Journal of Medicine* 1993; 329(18): 1318-1327.
- Hastie T, Tibshirani R, Wainwright M. Statistical learning with sparsity: the lasso and generalizations. Boca Raton, FL, Chapman and Hall/CRC Press; 2015.
- Hauck ML, Oblak ML. Tumors of the Skin and Subcutaneous Tissues. In: Vail DM, Thamm DH, Liptak JM, *Withrow and MacEwen’s Small Animal Clinical Oncology*, 6th edition. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2019: 352-366.
- Haupt Y, Maya R, Kazaz A, Oren M. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 1997; 387(6630): 296–299.
- Hayes A, Scase T, Miller J, Murphy S, Sparkes A, Adams V. COX-1 and COX-2 expression in feline oral squamous cell carcinoma. *Journal of comparative pathology* 2006; 135(2-3): 93-99.
- Hayes AM, Adams VJ, Scase TJ, Murphy S. Survival of 54 cats with oral squamous cell carcinoma in United Kingdom general practice. *Journal of Small Animal Practice* 2007; 48(7): 394-399.
- Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* 2004; 59(2): S21-S26.
- Herring ES, Smith MM, Robertson JL. Lymph node staging of oral and maxillofacial neoplasms in 31 dogs and cats. *Journal of veterinary dentistry* 2002; 19(3):122–126.
- Hershey AE, Dubielzig RR, Padilla ML, Helfand SC. Aberrant p53 expression in feline vaccine-associated sarcomas and correlation with prognosis. *Veterinary Pathology* 2005; 42(6): 805-811.
- Herzog BH, Fu J, Wilson SJ, Hess PR, Sen A, McDaniel JM, Pan Y, Sheng M, Yago T, Silasi-Mansat R, McGee S, May F, Nieswandt B, Morris AJ, Lupu F, Coughlin SR, McEver RP, Chen H, Kahn ML, Xia L. Podoplanin maintains high endothelial venule integrity by interacting with platelet CLEC-2. *Nature* 2013; 502(7469): 105–109.
- Heyn H, Esteller M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. *Nature Reviews Genetics* 2012; 13(10): 679–692.
- Hoggard N, Munday JS, Luff J. Localization of *Felis catus* papillomavirus type 2 E6 and E7 RNA in feline cutaneous squamous cell carcinoma. *Veterinary Pathology* 2018; 55(3): 409–416.
- Hoque MO, Kim MS, Ostrow KL, Liu J, Wisman GBA, Park HL, Poeta ML, Jeronimo C, Henrique R, Lendvai Á, Schuurung E, Begum S, Rosenbaum E, Ongenaert M, Yamashita K, Joseph Califano J, Westra W, van der Zee AGJ, Criekinge WV, Sidransky D. Genome-wide promoter analysis uncovers portions of the cancer methylome. *Cancer Research* 2008; 68(8): 2661-2670.

- Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Tumor suppressor genes: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and human risk assessment. *Lung Cancer* 2001; 34(Suppl 2): S7-S15.
- Hutson CA, Willauer CC, Walder EJ, Stone JL, Klein MK. Treatment of mandibular squamous cell carcinoma in cats by use of mandibulectomy and radiotherapy: seven cases (1987-1989). *Journal of the American Animal Hospital Association* 1992; 201(5): 777-81.
- Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 1990; 335(8961): 675-679.
- Irimie AI, Ciocan C, Gulei D, Mehterov N, Atanasov AG, Dudea D, Berindan-Neagoe, I. Current Insights into oral cancer epigenetics. *International journal of molecular sciences* 2018; 19(3): 670.
- Ishida K, Kobayashi T, Ito S, Komatsu Y, Yokoyama T, Okada M, Abe A, Murasawa A, Yoshie H. Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *Journal of Periodontology* 2012; 83(7): 917-925.
- Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP, Brentnall TA. Accelerated age-related CpG island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Research* 2001; 61: 3573-3577.
- Itai S, Yamada S, Kaneko MK, Harada, H, Kagawa Y, Konnai S, Kato Y. Expression of Cat Podoplanin in Feline Squamous Cell Carcinomas. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy* 2017; 36(6): 243-250.
- Jergens AE, Hostetter SJ, Andreasen CB (2016). Oral Cavity, Gastrointestinal Tract, and Associated Structures. In: Raskin RE, Meyer DJ, *Canine and feline cytology*, third edition. St. Louis, MI: Elsevier, 2020: 220
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews Genetics* 2002; 3(6): 415-428.
- Jones PD, De Lorimier LP, Kitchell BE, Losonsky JM Gemcitabine as a radiosensitizer for nonresectable feline oral squamous cell carcinoma, *Journal of the American Animal Hospital Association* 2003; 39:463-467.
- Kalari S, Pfeifer GP. Identification of driver and passenger DNA methylation in cancer by epigenomic analysis. *Advances in Genetics* 2010; 70: 277-308.
- Kanwal R, Gupta K, Gupta S. Cancer Epigenetics: An Introduction. In: Verma M, ed. *Cancer Epigenetics: Risk Assessment, Diagnosis, Treatment, and Prognosis*. New York: Humana Press; 2015; 1238: 3-26.
- Kanwal R, Gupta S. Epigenetics and cancer. *Journal of Applied Physiology* 2010; 109(2): 598-605.
- Kastenhuber ER, Lowe SW. Putting p53 in Context. *Cell* 170(6): 1062-1078.
- Kiehl AR, Brown Calderwood Mays M. Epithelial tumors. In: John Wiley & Sons I, ed. *Atlas for the Diagnosis of Tumors in the Dog and Cat*. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc, 2016: 12-25.
- Kirpensteijn J, Kik M, Teske E, Rutteman GR. TP53 gene mutations in canine osteosarcoma. *Veterinary Surgery* 2008; 37(5): 454-460.
- Klausner JS, Bell FW, Hayden DW, Hegstad RL, Johnston SD. Hypercalcemia in two cats with squamous cell carcinomas. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1990; 196(1):103-105.
- Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *The American journal of pathology* 2009; 174(5): 1588-1593.
- Koenig A, Bianco SR, Fosmire S, Wojcieszyn J, Modiano JF. Expression and significance of p53, rb, p21/waf-1, p16/ink-4a, and PTEN tumor suppressors in canine melanoma. *Veterinary pathology* 2002; 39(4): 458-472.

- Koshino A, Goto-Koshino, Y, Setoguchi A, Ohno K, Tsujimoto, H. Mutation of p53 gene and its correlation with the clinical outcome in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2016; 30(1): 223-229.
- Kruiswijk F, Labuschagne CF, Vousden KH. p53 in survival, death and metabolic health: a lifeguard with a licence to kill. *Nature reviews Molecular cell biology* 2015; 16(7): 393-405
- Ku CK, Kass PH, Christopher MM: Cytologic-histologic concordance in the diagnosis of neoplasia in canine and feline lymph nodes: a retrospective study of 367 cases, *Veterinary and Comparative Oncology* 2017; 15(4): 1206-1217.
- Kubbutat MH, Jones SN, Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*. 1997; 387(6630): 299-303.
- Kulis M, Esteller M. DNA methylation and cancer. In *Advances in genetics*. Academic Press., 2010; 70: 27-56).
- Kulkarni V, Saranath D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncology* 2004; 40(2): 145-153.
- Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Neoplasia. In: *Robbins and Cotran's Pathologic Basis of Disease*, 10th edition Philadelphia: Elsevier, 2020: 281-336.
- Ladelfa MF, Peche LY, Toledo MF, Laiseca JE, Schneider C, Monte M. Tumor-specific MAGE proteins as regulators of p53 function. *Cancer Letters* 2012, 325(1): 11-17.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2014; 15(3): 178-196.
- Lana SE, Ogilvie GK, Withrow SJ, Straw RC, Rogers. Feline cutaneous squamous cell carcinoma of the nasal planum and the pinnae: 61 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1997; 33(4): 329-332.
- Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 1977; 33(1): 159-174.
- Landras, A, Reger de Moura C, Jouenne F, Lebbe C, Menashi S, Mourah S. CD147 Is a Promising Target of Tumor Progression and a Prognostic Biomarker. *Cancers* 2019 11(11): 1803.
- Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; 278(5701): 261-263.
- Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358(6381): 15-16.
- Langenbach A, McManus PM, Hendrick MJ, Shofer FS, Sorenmo KU. Sensitivity and specificity of methods of assessing the regional lymph nodes for evidence of metastasis in dogs and cats with solid tumors. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2001; 218(9): 1424-1428.
- Langevin SM, Stone RA, Bunker CH, Grandis JR, Sobol RW, Taioli E. MicroRNA-137 promoter methylation in oral rinses from patients with squamous cell carcinoma of the head and neck is associated with gender and body mass index. *Carcinogenesis* 2010; 31(5): 864-870.
- Langland OE, Langlais RP, Preece JW. Radiologic diagnosis of periodontal disease. In: Langland OE, Langlais RP, Preece JW, eds. *Principles of dental imaging*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 357-374.
- Laptenko O, Prives C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. *Cell Death & Differentiation* 2006; 13(6): 951-961.
- Lavin MF, Guevan N. The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death and Differentiation* 2006, 13(6): 941-950.

- LeBlanc AL, LaDue TA, Turrel JM, Klein MK. Unexpected toxicity following use of gemcitabine as a radiosensitizer in head and neck carcinomas: a Veterinary Radiation Therapy Oncology Group pilot study. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 2004; 45: 466–470.
- Lee CH, Kim WH, Lim JH, Kang MS, Kim DY, Kweon OK. Mutation and overexpression of p53 as a prognostic factor in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Science* 2004; 5(1): 63-70.
- Lee JJ, Murphy GF, Lian CG. Melanoma epigenetics: novel mechanisms, markers, and medicines. *Laboratory Investigation* 2014; 94(8), 822-838.
- Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature Reviews Cancer* 2018; 18(5): 269–282.
- Lei Y, Xie Y, Tan YS, Prince ME, Moyer JS, Nör J, Wolf GT. Telltale tumor infiltrating lymphocytes (TIL) in oral, head & neck cancer. *Oral oncology* 2016; 61: 159-165.
- Lewis Jr JS, Thorstad WL, Chernock RD, Haughey BH, Yip JH, Zhang Q, El-Mofty SK. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *The American journal of surgical pathology* 2010; 34(8).
- Lewis JR, O'Brien, TG, Skorupski, KA, Krick EL, Reiter, AM, Jennings MW, Journey CH, Shofer FS. Polyamine inhibitors for treatment of feline oral squamous cell carcinoma: a proof-of-concept study. *Journal of Veterinary Dentistry* 2013; 30(3): 140-145.
- Lewis JS. p16 Immunohistochemistry as a standalone test for risk stratification in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head and neck pathology* 2012; 6(1): 75-82.
- Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 2002; 18(11): 1427–1431.
- Li X, Fan Q, Li J, Song J, Gu Y. MiR-124 down-regulation is critical for cancer associated fibroblasts-enhanced tumor growth of oral carcinoma. *Experimental Cell Research* 2017; 351(1): 100-108.
- Li YF, Hsiao YH, Lai YH, Chen YC, Chen YJ, Chou JL, Chan MWY, Lin YH, Tsou YA, Tsai MH, Tai CK. DNA methylation profiles and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Epigenetics* 2015; 10(3): 229-236.
- Lian Y, Meng L, Ding P, Sang, M. Epigenetic regulation of MAGE family in human cancer progression-DNA methylation, histone modification, and non-coding RNAs. *Clinical Epigenetics* 2018; 10(1): 115.
- Liang G, Weisenberger DJ. DNA methylation aberrancies as a guide for surveillance and treatment of human cancers. *Epigenetics* 2017; 12(6): 416–432.
- Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40 transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979; 17(1): 43–52.
- Liptak JM. Cancer of the gastrointestinal tract. In: Vail DM, Thamm DH, Liptak JM, *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*, 6th edition. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2019: 432-448.
- Lisanti S, Omar WA, Tomaszewski B, De Prins S, Jacobs G, Koppen G, Mathers JC, Langie SA. Comparison of methods for quantification of global DNA methylation in human cells and tissues. *PLoS One* 2013; 8: e79044.
- Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Chatelain B, Remacle M, Marbaix E. Prognostic value of cell proliferation markers, tumour suppressor proteins and cell adhesion molecules in primary squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *European archives of oto-rhino-laryngology* 2003; 260(1): 28-34.

- Liu Y, Chen C, Xu Z, Scuoppo C, Rillahan CD, Gao J, Spitzer B, Bosbach B, Kasthuber ER, Baslan T, Ackermann S, Cheng L, Wang Q, Niu T, Schultz N, Levine RL, Mills AA, Lowe SV. Deletions linked to TP53 loss drive cancer through p53-independent mechanisms. *Nature* 2016; 531(7595): 471-475.
- Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 1992; 70(6): 923-935.
- Lo PK, Sukumar S. Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics* 2008; 9(12): 1879-1902
- Locke WJ, Guanzon D, Ma C, Liew YJ, Duesing KR, Fung KYC, Ross JP. DNA Methylation Cancer Biomarkers: Translation to the Clinic. *Frontiers in Genetics* 2019; 10: 1150.
- Loukopoulos P, Thornton JR, Robinson WF. Clinical and pathologic relevance of p53 index in canine osseous tumors. *Veterinary pathology* 2003; 40(3): 237-248.
- Macha MA, Matta A, Kaur J, Chauhan SS, Thakar A, Shukla NK, Gupta SD, Ralhan R. Prognostic significance of nuclear pSTAT3 in oral cancer. *Head & neck* 2011; 33: 482-489.
- Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, Friend SH. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250(4985): 1233-1238.
- Mallona I, Díez-Villanueva A, Peinado MA. Methylation plotter: a web tool for dynamic visualization of DNA methylation data. *Source code for biology and medicine* 2014; 9(1): 11.
- Maltzman W, Czyzyk L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Molecular and Cellular Biology* 1984; 4(9): 1689-1694.
- Manuali E, Forte C, Vichi G, Genovese DA, Mancini D, De Leo AAP, Cavicchioli L, Pierucci P, Zappulli V. Tumours in European Shorthair cats: a retrospective study of 680 cases. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2020; doi: 10.1177/1098612X20905035
- Marconato L, Rossi F, Bettini G, Bonfanti U, Buchholz J. Tumori del cavo orale. In: Amadori D, Marconato L, eds. *Oncologia medica veterinaria e comparata*. Vermezzo (MI), Poletto editore: 2012; 354-358.
- Marconato L, Gelain ME, Comazzi S. The dog as a possible animal model for human non-Hodgkin lymphoma: A review. *Hematological Oncology* 2013a; 31(1): 1-9.
- Marconato L, Buchholz J, Keller M, Bettini G, Valenti P, Kaser-Hotz B. Multimodal therapeutic approach and interdisciplinary challenge for the treatment of unresectable head and neck squamous cell carcinoma in six cats: a pilot study. *Veterinary and Comparative Oncology* 2013b; 11(2): 101-112.
- Marconato, L, Weyland M, Tresch N, Rossi F, Leone V, Rohrer Bley, C. Toxicity and outcome in cats with oral squamous cell carcinoma after accelerated hypofractionated radiotherapy and concurrent systemic treatment. *Veterinary and comparative oncology* 2019; 18(3), 362-369.
- Marsit CJ, Christensen BC, Houseman EA, Karagas MR, Wrensch MR, Yeh RF, Nelson HH, Wiemels JL, Zheng S, Posner MR, McClean MD, Wiencke JK, Kelsey KT. Epigenetic profiling reveals etiologically distinct patterns of DNA methylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 2009; 30(3): 416-422.
- Martin CK, Tannehill-Gregg SH, Wolfe TD, Rosol T. Bone-invasive oral squamous cell carcinoma in cats: pathology and expression of parathyroid hormone-related protein. *Veterinary pathology* 2011; 48(1), 302-312.

- Martinez-Ruzafa I, Dominguez PA, Dervisis NG, Sarbu L, Newman NG, Cadile CD, Kitchell BE. Tolerability of gemcitabine and carboplatin doublet therapy in cats with carcinomas. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2009; 23(3): 570-577.
- Martin-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, Yurrita MM, Munoz-Guerra M, Cruces J, Quintanilla M. Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *International journal of cancer* 2005; 113(6): 899-910.
- Mascolo M, Siano M, Ilardi G, Russo D, Merolla F, Rosa GD, Staibano S. Epigenetic dysregulation in oral cancer. *International journal of molecular sciences* 2012; 13(2): 2331-2353.
- Mauldin GN, Matus RE, Patnaik AK, Bond BR, Mooney SC. Efficacy and toxicity of doxorubicin and cyclophosphamide used in the treatment of selected malignant tumors in 23 cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 1998; 2(2): 60-65.
- Maunakea AK, Nagarajan RP, Bilienky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, Johnson BE, Hong C, Nielsen C, Zhao Y, Turecki G, Delaney A, Varhol R, Nina Thiessen N, Shchors K, Heine VM, Rowitch DH, Xing X, Fiore C, Schillebeeckx M, Jones SJM, Haussler D, Marra MA, Hirst M, Wang T, Costello JF. Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. *Nature* 2010; 466(7303): 253-257.
- Mayr B, Schaffner G, Kurzbauer R, Schneider A, Reifinger M, Loupal G. Mutations in tumour suppressor gene p53 in two feline fibrosarcomas. *British Veterinary Journal* 1995; 151(6): 707-713.
- Mayr B, Reifinger M, Alton K, Schaffner G. Novel p53 tumour suppressor mutations in cases of spindle cell sarcoma, pleomorphic sarcoma and fibrosarcoma in cats. *Veterinary Research Communications* 1998a; 22(4): 249-255.
- Mayr B, Reifinger M, Loupal G. Polymorphisms in feline tumour suppressor gene p53. Mutations in an osteosarcoma and a mammary carcinoma. *The Veterinary Journal* 1998b; 155(1): 103-106.
- Mayr B, Blauensteiner J, Edlinger A, Reifinger M, Alton K, Schaffner G, Brem, G. Presence of p53 mutations in feline neoplasms. *Research in Veterinary Science* 2000; 68(1): 63-69.
- Megquier K, Turner-Maier J, Swofford R, Kim JH, Sarver AL, Wang C, Sakthikumar S, Johnson J, Koltookian M, Lewellen M, Scott MC, Schulte AJ, Borst L, Tonomura N, Alfoldi J, Painter C, Thomas R, Karlsson EK, Breen M, Modiano JF, Elvers I, Lindblad-Toh K. Comparative genomics reveals shared mutational landscape in canine hemangiosarcoma and human angiosarcoma. *Molecular Cancer Research* 2019; 17(12): 2410-2421.
- Melzer K, Guscetti F, Bley CR, Sumova A, Roos M, Kaser-Hotz B. Ki67 reactivity in nasal and periocular squamous cell carcinomas in cats treated with electron beam radiation therapy. *Journal of veterinary internal medicine* 2006; 20: 676-681.
- Metsalu T, Vilo J. ClustVis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using Principal Component Analysis and heatmap. *Nucleic acids research* 2015; 43(W1): W566-570.
- Meuten DJ, Moore FM, George JW. Mitotic Count and the Field of View Area: Time to Standardize. *Veterinary Pathology* 2016; 53(1): 7-9.
- Midgley CA, Lane DP. p53 protein stability in tumour cells is not determined by mutation but is dependent on Mdm2 binding. *Oncogene* 1997; 15(10): 1179-1189.
- Miller CW, Aslo AC, Tsay D, Slamon K, Ishizaki J, Toquchida T, Yamamuro B, Lampkin HP, Koeffler HP. Frequency and structure of p53 gene rearrangements in human osteosarcoma, *Cancer Research* 1990; 50(24): 7950-7954.

- Miller MA, Nelson SL, Turk JR, Pace, LW, Brown TP, Shaw DP, Fischer JR, Gosser HS. Cutaneous neoplasia in 340 cats. *Veterinary Pathology* 1991; 28(5): 389-395.
- Mishra R. Biomarkers of oral premalignant epithelial lesions for clinical application. *Oral Oncology* 2012; 48(7): 578-584.
- Mitra SA, Mitra AP, Triche TJ. A central role for long non-coding RNA in cancer. *Frontiers in genetics* 2012; 3:17.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 1994; 9(6): 1799-1805.
- Mochizuki H, Goto-Koshino Y, Sato M, Fujino Y, Ohno K, Tsujimoto H. Comparison of the antitumor effects of an MDM2 inhibitor, nutlin-3, in feline lymphoma cell lines with or without p53 mutation. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2012; 147(3-4): 187-194.
- Moll UM, Riou G, Levine AJ. Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1992; 89(15): 7262-7266.
- Monteiro L, Warnakulasuriya S. Genetic aberrations and molecular pathways in head and neck cancer. In: Warnakulasuriya S, Khan Z, eds. *Squamous cell Carcinoma*. Dordrecht, Springer, 2017: 97-111.
- Monteiro LS, Delgado ML, Ricardo S, Garcez F, Do Amaral B, Pacheco, JJ. Lopes C, Bousbaa H. EMMPRIN expression in oral squamous cell carcinomas: Correlation with tumor proliferation and patient survival. *BioMed research international* 2014; 2014: 905680.
- Monteiro LS, Diniz-Freitas M, Garcia-Caballero T, Warnakulasuriya S, Forteza J, Fraga M. Combined cytoplasmic and membranous EGFR and p53 overexpression is a poor prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 2012; 41(7): 559-567.
- Morandi L, Gissi D, Tarsitano A, Asioli S, Monti V, Del Corso G, Marchetti C, Montebugnoli L, Foschini MP. DNA methylation analysis by bisulfite next-generation sequencing for early detection of oral squamous cell carcinoma and high-grade squamous intraepithelial lesion from oral brushing. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2015; 43(8): 1494-1500.
- Morandi L, Gissi D, Tarsitano A, Asioli S, Gabusi A, Marchetti C, Montebugnoli L, Foschini MP. CpG location and methylation level are crucial factors for the early detection of oral squamous cell carcinoma in brushing samples using bisulfite sequencing of a 13-gene panel. *Clinical Epigenetics* 2017a; 9(1): 85.
- Morandi L, Righi A, Maletta F, Rucci P, Pagni F, Gallo M, Rossi S, Caporali L, Sapino A, Lloyd RV, Asioli S. Somatic mutation profiling of hobnail variant of papillary thyroid carcinoma. *Endocrine-related Cancer* 2017b; 24(2): 107-117.
- Morimoto CY, Tedardi MV, da Fonseca IIM, Kimura KC, Sanches DS, Epiphanyo TF, de Francisco Strefezzi R, Dagli MLZ. Evaluation of the global DNA methylation in canine mast cell tumour samples by immunostaining of 5-methyl cytosine. *Veterinary and Comparative Oncology* 2017; 15(3): 1014-1018.
- Morrison WB, DeNicola DB. Advantages and disadvantages of cytology and histopathology for the diagnosis of cancer. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)* 1993; 8(4): 222-227.
- Mudaliar MAV, Haggart RD, Miele G, Sellar G, Tan KAL, Goodlad JR, Milne E, Vail DM, Kurzman I, Crowther D, Argyle DJ. Comparative Gene Expression Profiling Identifies Common Molecular Signatures of NF- κ B Activation in Canine and Human Diffuse Large B Cell Lymphoma (DLBCL). *PLoS One* 2013; 8(9): e72591.
- Müller S. Oral lichenoid lesions: distinguishing the benign from the deadly. *Modern Pathology* 2017; 30(1): S54-S67.

- Munday JS, Howe L, French A, Squires RA, Sugiarto H. Detection of papillomaviral DNA sequences in a feline oral squamous cell carcinoma. *Research in Veterinary Science* 2009; 86(2):359-61.
- Munday JS, Gibson I, French AF. Papillomaviral DNA and increased p16CDKN2A protein are frequently present within feline cutaneous squamous cell carcinomas in ultra-violet-protected skin. *Veterinary Dermatology* 2011a; 22(4): 360–366.
- Munday JS, Knight CG, French AF. Evaluation of feline oral squamous cell carcinomas for 16CDKN2A protein immunoreactivity and the presence of papillomaviral DNA. *Research in Veterinary Science* 2011b; 90: 280-283.
- Munday JS, Aberdein D. Loss of retinoblastoma protein, but not p53, is associated with the presence of papillomaviral DNA in feline viral plaques, Bowenoid in situ carcinomas, and squamous cell carcinomas. *Veterinary Pathology* 2012; 49(3): 538-545.
- Munday JS, French AF, Gibson, IR, Knight CG. The presence of p16CDKN2 protein immunostaining within feline nasal planum squamous cell carcinomas is associated with an increased survival time and the presence of papillomaviral DNA. *Veterinary Pathology* 2013; 50(2): 269–273
- Munday JS, Löhr CV, Kiupel M. Tumors in the Alimentary Tract. In: Meuten DJ, ed. *Tumors in Domestic Animals*. Ames, Iowa, John Wiley & Sons, Inc: 2017; 502-509.
- Munday JS, He Y, Aberdein D, Klobukowska HJ. Increased p16CDKN2A, but not p53, immunostaining is predictive of longer survival time in cats with oral squamous cell carcinomas. *Veterinary Journal* 2019a; 248:64-70.
- Munday JS, Ariyaratna H, Aberdein D, Thomson NA. Immunostaining for p53 and p16CDKN2A Protein Is Not Predictive of Prognosis for Dogs with Malignant Mammary Gland Neoplasms. *Veterinary Sciences* 2019b; 6(1): 34.
- Munday JS, Sharp CR, Beatty JA. Novel viruses: Update on the significance of papillomavirus infections in cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2019c; 21(5): 409-418.
- Murakami Y, Tateyama S, Rungsipipat A, Uchida K, Yamaguchi R. Immunohistochemical analysis of cyclin A, cyclin D1 and P53 in mammary tumors, squamous cell carcinomas and basal cell tumors of dogs and cats. *Journal of Veterinary Medical Science* 2000; 62(7): 743–750.
- Murphy BG, Bell CM, Soukup JW. Odontogenic tumors. In: *Veterinary Oral and Maxillofacial Pathology*, first edition. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell, 2020: 91-128.
- Murphy BG, Bell CM, Soukup JW. Tumors arising from the soft tissue. In: *Veterinary Oral and Maxillofacial Pathology*, first edition. Hoboken, New Jersey: Wiley-Blackwell, 2020: 139-148.
- Nagamine E, Hirayama K, Matsuda K, Okamoto M, Ohmachi T et al. (2017). Invasive Front Grading and Epithelial-Mesenchymal Transition in Canine Oral and Cutaneous Squamous Cell Carcinomas. *Veterinary Pathology* 2017; 54(5): 783-791.
- Nagata S, Hamada T, Yamada N, Yokoyama S, Kitamoto S, Kanmura Y, Nomura M, Kamikawa Y, Yonezawa S, Sugihara K. Aberrant DNA methylation of tumor-related genes in oral rinse: a noninvasive method for detection of oral squamous cell carcinoma. *Cancer* 2012; 118(17): 4298-4308.
- Nakamura H, Li M, Zarycki J, Jung, JU. Inhibition of p53 tumor suppressor by viral interferon regulatory factor. *Journal of Virology* 2001; 75(16): 7572-7582.
- Nambiar PR, Haines DM, Ellis JA, Kidney BA, Jackson ML. Mutational analysis of tumor suppressor gene p53 in feline vaccine site-associated sarcomas. *American Journal of Veterinary Research* 2000; 61(10): 1277-1281.

- Nambiar PR, Jackson ML, Ellis JA, Chelack BJ, Kidney BA, Haines DM. Immunohistochemical detection of tumor suppressor gene p53 protein in feline injection site-associated sarcomas. *Veterinary Pathology* 2001; 38(2): 236-238.
- Nasir L, Krasner H, Argyle DJ, Williams A. Immunocytochemical analysis of the tumour suppressor protein (p53) in feline neoplasia. *Cancer Letters* 2000; 155(1): 1-7.
- Nasir L, Rutteman GR, Reid SW, Schulze C, Argyle DJ. Analysis of p53 mutational events and MDM2 amplification in canine soft-tissue sarcomas. *Cancer Letters* 2001; 174(1): 83-89.
- Nasry WHS, Wang H, Jones K, Dirksen WP, Rosol TJ, Rodriguez-Lecompte JC, Martin CK. CD147 and cyclooxygenase expression in feline oral squamous cell carcinoma. *Veterinary sciences* 2018; 5(3): 72.
- Nebbio A, Tambaro FP, Dell'Aversana C, Altucci L. Cancer epigenetics: moving forward. *PLoS Genetics* 2018; 14(6): e1007362.
- Nemec A, Murphy B, Kass PH, Verstraete FJM. Histological subtypes of oral non-tonsillar squamous cell carcinoma in dogs. *Journal of comparative pathology* 2012; 147(2-3): 111-120.
- Nieto MA, Huang RYJ, Jackson RA, Thiery JP. EMT. *Cell* 2016; 166(1) :21-45.
- Nishida N, Nagasaka T, Nishimura T, Ikai I, Boland CR, Goel A. Aberrant methylation of multiple tumor suppressor genes in aging liver, chronic hepatitis, and hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47: 908-918.
- Niwa T, Tsukamoto T, Toyoda T, Mori A, Tanaka H, Maekita T, Ichinose M, Tatematsu M, Ushijima T. Inflammatory processes triggered by helicobacter pylori infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Research* 2010; 70(4): 1430-1440.
- Noguchi S, Mori T, Nakagawa T, Itamoto K, Haraguchi T, Mizuno T. DNA methylation contributes toward silencing of antioncogenic microRNA-203 in human and canine melanoma cells. *Melanoma Research* 2015; 25(5): 390-398.
- Northrup NC, Selting KA, Rassnick KM, Kristal O, O'Brien MG, Dank G, Dhaliwal RS, Jagannatha S, Cornell KK, Gieger TL. Outcomes of cats with oral tumors treated with mandibulectomy: 42 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2006; 42(5): 350-360.
- Okuda M, Umeda A, Sakai T, Ohashi T, Momoi Y, Youn HY, Watari T, Goitsuka R, Tsujimoto H, Hasegawa A. Cloning of feline p53 tumor-suppressor gene and its aberration in hematopoietic tumors. *International Journal of Cancer* 1994; 58(4): 602-607.
- O'Neill SH, Newkirk KM, Anis EA, Brahmabhatt R, Frank LA, Kania SA. Detection of human papillomavirus DNA in feline premalignant and invasive squamous cell carcinoma. *Veterinary Dermatology* 2011; 22(1), 68-74.
- Ogilvie GK, Moore AS, Obradovich JE, Elmslie RE, Vail DM, Straw RC, Salmon MD, Klein MK, Atwater SW, Ciekot PE. Toxicoses and efficacy associated with administration of mitoxantrone to cats with malignant tumors. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1993; 202(11): 1839-1844.
- Ogilvie GK, Moore AS. Skin Tumors. In: Ogilvie GK, Moore AS, *Feline oncology*. Trenton, NJ, Veterinary Learning Systems, 2001: 412-419.
- Ohta H., Yamazaki J, Jelinek J, Ishizaki T, Kagawa Y, Yokoyama N, Nagata N, Sasaki N, Takiguchi M. Genome-wide DNA methylation analysis in canine gastrointestinal lymphoma. *Journal of Veterinary Medical Science* 2020; 82(5): 632-638.
- Okada Y, Yamazaki H, Sekine-Aizawa Y, Hirokawa N. The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell* 1995; 81(5): 769-780.

- Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358(6381), 80-83.
- Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Costa JPO, Simões AL, Di Matteo MAS, Zucoloto S. Prognostic factors and survival analysis in a sample of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2008; 106(5): 685-695.
- Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2010; 2(1): a001008.
- Olivos DJ, Mayo LD. Emerging Non-Canonical Functions and Regulation by p53: p53 and Stemness. *International journal of molecular sciences* 2016; 17(12): 1982.
- Øster B, Thorsen K, Lamy P, Wojdacz TK, Hansen LL, Birkenkamp-Demtröder K, Sørensen KD, Søren Laurberg, Torben F. Ørntoft TF, Andersen CL. Identification and validation of highly frequent CpG island hypermethylation in colorectal adenomas and carcinomas. *International Journal of Cancer* 2011; 129(12): 55-66.
- Pagliarone S, Frattone L, Pirocchi V, Della Salda L, Palmieri C. Altered expression of p53, but not Rb, is involved in canine prostatic carcinogenesis. *Research in Veterinary Science* 2016; 105: 195-199.
- Papaioannou N, Psalla D, Zavlaris M, Loukopoulos P, Tziris N, Vlemmas I. Immunohistochemical expression of dog TERT in canine testicular tumours in relation to PCNA, ki67 and p53 expression. *Veterinary Research Communication* 2009; 33(8): 905-919.
- Parrales A, Iwakuma T. Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. *Frontiers in Oncology* 2015; 5:288.
- Parry D, Bates S, Mann DJ, Peters G. Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *The EMBO journal* 1995; 14(3): 503-511.
- Partridge, M, Costea DE, Huang X. The changing face of p53 in head and neck cancer. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2007; 36(12): 1123-1138.
- Pattani KM, Zhang Z, Demokan S, Glazer C, Loyo M, Goodman S, Sidransky D, Bermudez F, Jean-Charles G, McCaffrey T, Padhya T, Phelan J, Spivakovsky S, Yoo Bowne H, Goldberg JD, Rolnitzky L, Robbins M, Kerr AR, Sirois D, Califano JA. Endothelin receptor type B gene promoter hypermethylation in salivary rinses is independently associated with risk of oral cavity cancer and premalignancy. *Cancer Prevention Research* 2010; 3(9): 1093-1103.
- Peltonen JK, Helppi HM, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T, Vähäkangas KH. p53 in head and neck cancer: functional consequences and environmental implications of TP53 mutations. *Head and Neck Oncology* 2010; 2(1): 36.
- Peng XH, Huang HR, Lu J, Liu X, Zhao FP, Zhang B, Lin SX, Wang L, Chen HH, Xu X, Wang F, Li XP. MiR-124 suppresses tumor growth and metastasis by targeting Foxq1 in nasopharyngeal carcinoma. *Molecular Cancer* 2014; 13(1): 186.
- Penwick RC, Nunamaker DM. Rostral mandibulectomy: a treatment for oral neoplasia in the dog and cat. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1987; 23: 19-25.
- Pereira M, Oliveira DT, Landman G, Kowalski LP. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. *Journal of the Canadian Dental Association* 2007; 73(4).
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human Mutation* 2007; 28(6): 622-629.

- Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P. Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene* 2002; 21(48): 7435-7451.
- Pfeifer GP. Defining driver DNA methylation changes in human cancer *International Journal of Molecular Sciences* 2018; 19(4): 1166.
- Piegols HJ, Takada M, Parys M, Dexheimer T, Yuzbasiyan-Gurkan V. Investigation of novel chemotherapeutics for feline oral squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2018; 9(69): 33098.
- Planello AC, Singhania R, Kron KJ, Bailey SD, David Roulois D, Lupien M, Peres Line SR, de Souza AP, De Carvalho DD. Pre-neoplastic epigenetic disruption of transcriptional enhancers in chronic inflammation. *Oncotarget*. 2016; 7(13): 772-786.
- Poeta ML, Manola J, Goldwasser MA, Forastiere A, Benoit N, Califano JA, Ridge JA, Goodwin J, Kenady D, Saunders J, Westra W, Sidransky D, Koch WM. Tp53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New England Journal of Medicine* 2007; 357(25): 2552–25561.
- Poirier VJ, Kaser-Hotz B, Vail DM, Straw RC. Efficacy and toxicity of an accelerated hypofractionated radiation therapy protocol in cats with oral squamous cell carcinoma. *Veterinary radiology & ultrasound* 2013; 54(1): 81-88.
- Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nature Biotechnology* 2010; 28(10): 1057-1068.
- Postorino-Reeves NC, Turrel JM, Withrow SJ. Oral squamous cell carcinoma in the cat. *Journal of the American Animal Hospital Association* 1993; 29: 438-441.
- Psyrris A, Gouveris P, Vermorken JB. Human papillomavirus-related head and neck tumors: clinical and research implication. *Current opinion in oncology* 2009; 21(3), 201-205.
- Pyo SW, Hashimoto M, Kim YS, Kim CH, Lee SH, Johnson KR, Wheelock MJ, Park JU. Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: correlation with the clinicopathologic features and patient outcome. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2007; 35(1): 1–9.
- Qiao X, Liu W, Cao Y Miao C, Yang W, Su N, Ye L, Li L, Li C. Performance of different imaging techniques in the diagnosis of head and neck cancer mandibular invasion: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncology* 2018; 86: 150-164.
- Qiu H, Lin D. Roles of DNA mutation in the coding region and DNA methylation in the 5' flanking region of BRCA1 in canine mammary tumors. *Journal of Veterinary Medical Science* 2016; 78(6): 943-949.
- Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck* 2001; 23(2): 147-159.
- Qureshi SA, Bashir MU, Yaqinuddin A. Utility of DNA methylation markers for diagnosing cancer. *International Journal of Surgery* 2010; 8(3): 194-219.
- Ramos-Vara JA, Borst LB. Immunohistochemistry: Fundamentals and Applications in Oncology. In: Meuten DJ, ed. *Tumors in Domestic Animals*. Ames, Iowa: John Wiley & Sons, Inc: 2017: 43-87.
- Randall EK, Jones MD, Kraft SL, Worley DR. The development of an indirect computed tomography lymphography protocol for sentinel lymph node detection in head and neck cancer and comparison to other sentinel lymph node mapping techniques. *Veterinary and Comparative Oncology* 2020 doi: 10.1111/vco.12585
- Randall EK, Kraft SL, Yoshikawa H, LaRue SM. Evaluation of 18F-FDG PET/CT as a diagnostic imaging and staging tool for feline oral squamous cell carcinoma. *Veterinary and Comparative Oncology* 2016; 14(1): 28–38.

- Rasotto R, Caliani D, Castagnaro M, Zanetti R, Zappulli V (2011). An Immunohistochemical Study of HER-2 Expression in Feline Mammary Tumours. *Journal of Comparative Pathology* 2011; 144(2-3): 170-179.
- Rautava, J, Syrjänen S. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head and Neck Pathology* 2012; 6(1): 3-15.
- Raybaud-Diogene H, Fortin A, Morency R, Roy J, Monteil RA, Tetu B. Markers of radioresistance in squamous cell carcinomas of the head and neck: a clinicopathologic and immunohistochemical study. *Journal of clinical oncology*; 15(3), 1030-1038.
- Reed TP, Brisson BA, Schutt LK. Cystic ectopic lingual thyroid tissue in a male cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2011; 239(7): 981-984.
- Renzi A, De Bonis P, Morandi L, Lenzi J, Tinto D, Rigillo A, Bettini G, Bellei E, Sabattini S. Prevalence of p53 dysregulations in feline oral squamous cell carcinoma and non-neoplastic oral mucosa. *PloS One* 2019; 14(4): e0215621.
- Renzi A, Morandi L, Lenzi J, Rigillo A, Bettini G, Bellei E, Giacomini A, Tinto D, Sabattini S. Analysis of DNA methylation and TP53 mutational status for differentiating feline oral squamous cell carcinoma from non-neoplastic mucosa: A preliminary study. *Veterinary and Comparative Oncology* 2020; doi: 10.1111/vco.12624
- Ribeiro AS, Paredes J. P-cadherin linking breast cancer stem cells and invasion: a promising marker to identify an “intermediate/metastable” EMT state. *Frontiers in Oncology* 2015; 4: 371.
- Rivera C. Essentials of oral cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2015, 8(9), 11884–11894.
- Rodriguez-Paredes M, Bormann F, Raddatz G, Gutekunst J, Lucena-Porcel C, Kohler F, Wurzer E, Schmidt K, Gallinat S, Wenck H, Röwert-Huber J, Denisova E, Feuerbach L, Park J, Brors B, Herpel E, Nindl I, Hofmann TG, Winnefeld M, Lyko F. Methylation profiling identifies two subclasses of squamous cell carcinoma related to distinct cells of origin. *Nature Communications* 2018; 9(1): 577.
- Roh JL, Westra WH, Califano JA, Sidransky D, Koch WM. Tissue imprint for molecular mapping of deep surgical margins in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head & Neck* 2012; 34(11): 1529-1536.
- Rossa C, D’Silva NJ. Non-murine models to investigate tumor-immune interactions in head and neck cancer. *Oncogene* 2019; 38(25): 4902-4914.
- Sabatini ME, Chiocca S. Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. *British journal of cancer* 2019; 122(3): 306-314.
- Sabattini S, Marconato L, Zoff, A, Morini M, Scarpa F, Capitani O, Bettini G. Epidermal growth factor receptor expression is predictive of poor prognosis in feline cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2010; 12(10): 760-768.
- Sabhlok A, Ayl R. Palliative radiation therapy outcomes for cats with oral squamous cell carcinoma (1999–2005). *Veterinary radiology & ultrasound* 2014; 55(5): 565-570.
- Sakthikumar S, Elvers I, Kim J, Arendt ML, Thomas R, Turner-Maier J, Swofford R, Johnson J, Schumacher SE, Alföldi J, Axelsson E, Guillermo Couto C, Kisseberth WC, Pettersson ME, Getz G, Meadows JRS, Modiano JF, Breen M, Kierczak M, Forsberg-Nilsson K, Marinescu VD, Lindblad-Toh K. SETD2 is recurrently mutated in whole-exome sequenced canine osteosarcoma. *Cancer Research* 2018; 78(13): 3421-3431.

- Sánchez-Danés A, Blanpain C. Deciphering the cells of origin of squamous cell carcinomas. *Nature Reviews Drug Discovery* 2018; 17(3): 47-59.
- Sanders DS, Perry I, Hardy R, Jankowski J. Aberrant P-cadherin expression is a feature of clonal expansion in the gastrointestinal tract associated with repair and neoplasia. *The Journal of Pathology* 2000; 190(5): 526–530.
- Sato M, Mochizuki H, Goto-Koshino Y, Fujiwara-Igarashi A, Takahashi M, Ohno K, Tsujimoto H. Prognostic significance of hypermethylation of death-associated protein kinase (DAPK) gene CpG island in dogs with high-grade B-cell lymphoma. *Veterinary and comparative oncology* 2018; 16(3): 409-415.
- Saxonov S, Berg P, Brutlag DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 2006; 103: 1412–1417.
- Scheel C, Weinberg RA. Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition: concepts and molecular links. *Seminars in Cancer Biology* 2012; 22(5–6): 396–403.
- Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology* 2000; 182(3): 311-322.
- Schussel J, Zhou XC, Zhang Z, Pattani K, Bermudez F, Jean-Charles G, McCaffrey T, Padhya T, Phelan J, Spivakovskiy S, Brait M, Li R, Yoo Bowne H, Goldberg JD, Rolnitzky L, Robbins M, Kerr AR, Siros D, Califano JA. EDNRB and DCC salivary rinse hypermethylation has a similar performance as expert clinical examination in discrimination of oral cancer/dysplasia versus benign lesions. *Clinical Cancer Research* 2013; 19(12): 3268-3275.
- Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D, Lowe SW. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 1997; 88(5): 593–602.
- Shang B, Liu Y, Jiang SJ, Liu Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: a systematic review and meta-analysis *Scientific Reports* 2015; 5: 15179.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010; 31(1): 27–36.
- Shaw RJ, Hobkirk AJ, Nikolaidis G, Woolgar JA, Triantafyllou A, Brown JS, Liloglou T, Risk JM. Molecular staging of surgical margins in oral squamous cell carcinoma using promoter methylation of p16(INK4A), cytoglobin, E-cadherin, and TMEFF2. *Annals of Surgical Oncology* 2013; 20(8): 2796–2802.
- Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 1997; 91(3): 325–334.
- Shin YJ, Choung HW, Lee JH, Rhyu IC, Kim HD. Association of periodontitis with oral cancer: a case-control study. *Journal of Dental Research* 2019; 98(5): 526-533.
- Shirole NH, Pal D, Kasthuber ER, Senturk S, Boroda J, Pisterzi P, Miller M, Munoz G, Anderlueh M, Ladanyi M, Lowe SW, Sordella R. TP53 exon-6 truncating mutations produce separation of function isoforms with pro-tumorigenic functions. *Elife* 2016; 5: e17929.
- Simes RJ. An improved Bonferroni procedure for multiple tests of significance. *Biometrika* 1986; 73(3): 751-754.
- Sironi G, Riccaboni P, Mertel L, Cammarata G, Brooks DE. p53 protein expression in conjunctival squamous cell carcinomas of domestic animals. *Veterinary Ophthalmology* 1999; 2(4): 227-231.
- Skorupski KA, O'Brien TG, Guerrero T, Rodriguez CO, Burns MR. Phase I/II clinical trial of 2-difluoromethyl-ornithine (DFMO) and a novel polyamine transport inhibitor (MQT 1426) for feline oral squamous cell carcinoma. *Veterinary and comparative oncology* 2011; 9(4), 275-282.

Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJM, Haesevoets A, Snijders PJF, Pawlita M, Meijer CJLM, Braakhuis BJM, Leemans CR, Brakenhoff RH. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *International Journal of Cancer* 2007; 121(11): 2465-2472.

Snyder LA, Bertone ER, Jakowski RM, Dooner MS, Jennings-Ritchie J, Moore AS. P53 expression and environmental tobacco smoke exposure in feline oral squamous cell carcinoma. *Veterinary Pathology* 2004; 41(3): 209-214.

Soltero-Rivera, MM, Krick, EL, Reiter AM, Brown DC, Lewis JR. Prevalence of regional and distant metastasis in cats with advanced oral squamous cell carcinoma: 49 cases (2005–2011). *Journal of feline medicine and surgery* 2014; 16(2): 164-169.

Sousa B, Ribeiro AS, Nobre AR, Lopes N, Martins D, Pinheiro C, Vieira AF, Albergaria A, Gerhard R, Schmitt F, Balzatar F, Paredes J. The basal epithelial marker P-cadherin associates with breast cancer cell populations harboring a glycolytic and acid-resistant phenotype. *BMC Cancer*. 2014; 14(1): 734.

Sparger EE, Murphy BG, Kamal FM, Arzi B, Naydan D, Skouritakis CT, Cox DP, Skorupski K. Investigation of immune cell markers in feline oral squamous cell carcinoma. *Veterinary immunology and immunopathology* 2018; 202 52-62.

Spruijt CG, Vermeulen M. DNA methylation: old dog, new tricks? *Nature structural & molecular biology* 2014; 21(11): 949-954.

Spugnini EP, Baldi A. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology: State-of-the-Art and Perspectives. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* 2019; 49(5): 967-979.

Spyropoulos DD, Pharr PN, Lavenburg KR, Jackers P, Papas TS, Ogawa M, Watson DK. Hemorrhage, impaired hematopoiesis, and lethality in mouse embryos carrying a targeted disruption of the Fli1 transcription factor. *Molecular and Cellular Biology* 2000; 20(15): 5643-5652.

Stebbins KE, Morse CC, Goldschmidt MH. Feline Oral Neoplasia: A Ten-Year Survey. *Veterinary Pathology* 1989; 26(2): 121-128.

Stelow EB, Mills SE. Squamous cell carcinoma variants of the upper aerodigestive tract. *Pathology Patterns Reviews* 2005; 124(suppl_1), S96-S109.

Studer E, Stapley RB. The role of dry food in maintaining healthy teeth and gums in the cat. *Veterinary Medicine, Small Animal Clinician* 1973; 68: 1124-1126.

Sun Q, Zhang J, Cao W, Wang X, Xu Q, Yan M, Wu X, Chen W. Dysregulated miR-363 affects head and neck cancer invasion and metastasis by targeting podoplanin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2013; 45(3): 513-520.

Supic G, Kozomara R, Jovic N, Zeljic K, Magic Z. Prognostic significance of tumor-related genes hypermethylation detected in cancer-free surgical margins of oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncology* 2011; 47(8): 702–708.

Supsavhad W, Dirksen, WP, Martin CK, Rosol TJ. Animal models of head and neck squamous cell carcinoma. *The Veterinary Journal* 2016a; 210: 7-16.

Supsavhad W, Dirksen WP, Hildreth BE, Rosol TJ. p16, pRb, and p53 in Feline Oral Squamous Cell Carcinoma. *Veterinary Sciences* 2016b; 3(3): 18.

Tannehill-Gregg SH, Levine AL, Rosol TJ. Feline head and neck squamous cell carcinoma: a natural model for the human disease and development of a mouse model. *Veterinary and Comparative Oncology* 2006; 4(2): 84-97.

- Taylor D, Koch WM, Zahurak M, Shah K, Sidransky D, Westra WH. Immunohistochemical detection of p53 protein accumulation in head and neck cancer: correlation with p53 gene alterations. *Human pathology* 1999; 30(10): 1221-1225.
- Teifke JP, Löhr CV. Immunohistochemical detection of p53 overexpression in paraffin wax-embedded squamous cell carcinomas of cattle, horses, cats and dogs. *Journal of Comparative Pathology* 1996; 114(2): 205–210.
- Theon AP, Madewell BR, Shearn VI, Moulton JE. Prognostic factors associated with radiotherapy of squamous cell carcinoma of the nasal plane in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1995; 206: 991-996.
- Thompson AK, Kelley BF, Prokop LJ, Murad MH, Baum CL. Risk Factors for Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Recurrence, Metastasis, and Disease-Specific Death: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Dermatology* 2016; 152(4): 419–428.
- Thomson NA, Munday JS, Dittmer KE. Frequent detection of transcriptionally active *Felis catus* papillomavirus 2 in feline cutaneous squamous cell carcinomas. *Journal of General Virology* 2016; 97(5): 1189–1197.
- Tiwari M. Primary intraosseous carcinoma of the mandible: a case report with literature review. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 2011; 15(2): 205-210.
- Todoroff RJ, Brodey RS. Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1979; 175(6): 567-571.
- Truong AH, Ben-David Y. The role of Fli-1 in normal cell function and malignant transformation. *Oncogene* 2000; 19(55): 6482-6489.
- Tsai, HC, Baylin SB. Cancer epigenetics: linking basic biology to clinical medicine. *Cell Research* 2011; 21(3): 502-517.
- Ueda Y, Dockhorn-Dworniczak B, Blasius S, Mellin W, Wuisman P, Böcker W, Roessner A. (1993). Analysis of mutant p53 protein in osteosarcomas and other malignant and benign lesions of bone. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1993; 119(3): 172-178.
- Van Houten, VM, Tabor MP, van den Brekel MW, Alain Kummer, J, Denkers F, Dijkstra J, Leemans R, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Mutated p53 as a molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland* 2002; 198(4): 476-486.
- Van Leeuwen IS, Hellmèn E, Cornelisse CJ, Van den Burgh B, Rutteman GR. 1996. P53 mutations in mammary tumor cell lines and corresponding tumor tissues in the dog. *Anticancer Research* 1996; 16: 3737–3744.
- Van Nimwegen SA, Bakker RC, Kirpensteijn J, Van Es RJJ, Koole R, Lam MGEH, Hesselink JW, Nijssen JFW. Intratumoral injection of radioactive holmium (¹⁶⁶Ho) microspheres for treatment of oral squamous cell carcinoma in cats. *Veterinary and comparative oncology* 2018; 16(1): 114-124.
- Van Rensburg, IBJ. Oral verrucous carcinoma in two dogs. *Journal of the South African Veterinary Association*, 1982; 53(3): 209-210.
- Van Tongelen A, Lorient A, De Smet C. Oncogenic roles of DNA hypomethylation through the activation of cancer-germline genes. *Cancer Letters* 2017; 396: 130-137.
- Van Vlodrop IJ, Niessen HE, Derks S, Baldewijns MM, Van Criekinge W, Herman JG, Van Engeland M. Analysis of promoter CpG island hypermethylation in cancer: location, location, location! *Clinical Cancer Research* 2011; 17(13): 4225-4231.

- Vascellari M, Baioni E, Ru G, Carminato A, Mutinelli, F. (2009). Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. *BMC veterinary research* 2009; 5(1): 39.
- Vassilev LT, Vu BT., Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammiott U, Lukacs C, Klein C, Fotouhi N. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science* 2004; 303(5659): 844-848.
- Veldhoen N, Stewart J, Brown R, Milner J. Mutations of the p53 gene in canine lymphoma and evidence for germ line p53 mutations in the dog. *Oncogene* 1998; (2): 249-255.
- Vojtesek B, Lane DP. Regulation of p53 protein expression in human breast cancer cell lines. *Journal of Cell Science* 1993; 105(3): 607-612.
- Vos JH, Van der Gaag I. Canine and feline oral-pharyngeal tumours. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 1987; 34(1-10):420-427.
- Vozdova M, Kubickova S, Fictum P, Fröhlich J, Jelinek F, Rubes J. Prevalence and prognostic value of c-kit and TP53 mutations in canine mast cell tumours. *The Veterinary Journal* 2019; 247: 71-74.
- Vrba L, Futscher BW. A suite of DNA methylation markers that can detect most common human cancers. *Epigenetics* 2018; 13(1): 61-72.
- Wallis SP, Stafford ND, Greenman J. Clinical relevance of immune parameters in the tumor microenvironment of head and neck cancers. *Head & Neck* 2015; 37(3): 449-459.
- Wiles V, Hohenhaus A, Lamb K, Zaidi B, Camps-Palau M, Leibman N. Retrospective evaluation of toceranib phosphate (Palladia) in cats with oral squamous cell carcinoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2017; 19(2): 185-193.
- William LE, Packer RA. Association between lymph node size and metastasis in dogs with oral malignant melanoma: 100 cases (1987-2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 2003; 222(9): 1234-1236.
- Wong K, van der Weyden L, Schott CR, Foote A, Constantino-Casas, F, Smith S, Dobson JM, Murchison EP, Wu H, Yeh I, Fullen DR, Joseph N, Bastian BC, Patel RM, Martincorena I, Robles-Espinoza CD, Vivek Iyer, Marieke L. Kuijjer, Mark J. Arends, Thomas Brenn, Paul W. Harms, Wood GA, Adams DJ. Cross-species genomic landscape comparison of human mucosal melanoma with canine oral and equine melanoma. *Nature communications* 2019; 10(1): 1-14.
- Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond. *Nature Reviews Genetics* 2017, 18(9): 517-534.
- Wypij JM, Heller DA. Pamidronate disodium for palliative therapy of feline bone-invasive tumors. *Veterinary Medicine International* 2014; 2014: 675172.
- Wypij JM. A naturally occurring feline model of head and neck squamous cell carcinoma. *Pathology Research International* 2013; 2013: 502197.
- Yamada S, Itai S, Nakamura T, Yanaka M, Saidoh N, Chang YW, Handa S, Harada H, Kagawa Y, Ichii O, Konnai S, Kaneko MK, Kato Y. PMab-52: Specific and Sensitive Monoclonal Antibody Against Cat Podoplanin for Immunohistochemistry. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy* 2017; 36(5): 224-230.
- Yin Y, Tainsky MA, Bischoff FZ, Strong LC, Wahl GM. Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* 1992; 70(6): 937-948.

- York, D, Higgins RJ, LeCouteur RA, Wolfe AN, Grahn R, Olby N, Campbell M, Dickinson PJ. TP53 mutations in canine brain tumors. *Veterinary Pathology* 2012; 49(5): 796–801.
- Yoshikawa H, Ehrhart EJ, Charles JB, Custis JT, LaRue SM. Assessment of predictive molecular variables in feline oral squamous cell carcinoma treated with stereotactic radiation therapy. *Veterinary and comparative oncology* 2016; 14(1): 39-57.
- Yoshikawa H, Ehrhart EJ, Charles JB, Thamm DH, LaRue SM. Immunohistochemical characterization of feline oral squamous cell carcinoma. *American Journal of Veterinary Research* 2012; 73(11): 1801-1806.
- Yoshikawa H, Randall EK, Kraft SL, LaRue SM. Comparison between 2-18 fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography and contrast-enhanced computed tomography for measuring gross tumor volume in cats with oral squamous cell carcinoma, *Veterinary Radiology & Ultrasound* 2013; 54(3): 307–313.
- Yuan P, Temam S, El-Naggar A, Zhou X, Liu DD, Lee JJ, Mao L. Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. *Cancer* 2006; 107(3): 563-569.
- Zacchetti A, van Garderen E, Rutteman GR. Immunohistochemical evaluation of p53 expression with different antibodies in malignant canine tumours with or without p53 gene mutation. *Veterinary and Comparative Oncology* 2007; 5(2): 108–118.
- Zhang S, Barros SP, Moretti AJ Yu N, Jing Zhou J, Preisser JS, Niculescu MD, Offenbacher S. Epigenetic regulation of TNFA expression in periodontal disease. *Journal of Periodontology* 2013; 84(11): 1606-1616.
- Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 1998; 92(6): 725–734.
- Zhao Y, Ling Z, Hao Y, Pang X, Han X, Califano JA, Shan L, Gu X. MiR-124 acts as a tumor suppressor by inhibiting the expression of sphingosine kinase 1 and its downstream signaling in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2017; 8(15): 25005-25020.
- Zhou G, Liu Z, Myers JN. TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response. *Journal of cellular biochemistry* 2016; 117(12): 2682–2692.