

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di: Biomedicina Comparata e Alimentazione

CORSO DI DOTTORATO DI RICERCA IN: SCIENZE VETERINARIE

CICLO XXXIII

VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL TFR-1 NEL TUMORE MAMMARIO DI GATTO
E CANE E DELLA POSSIBILE EFFICACIA TERAPEUTICA DI UNA NANOCAGE IN
COLTURE CELLULARI DI TUMORE MAMMARIO DI CANE E GATTO

Coordinatore: Prof. Mattia Cecchinato

Supervisore: Prof.ssa Laura Cavicchioli

Dottorando: Dott. Rensi Nicolò

N° matricola 1196059

ABSTRACT.....	III
1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 Ghiandola Mammaria Cenni di Anatomia	1
1.2 Il Tumore della Ghiandola Mammaria negli Animali	2
1.2.1 Tumore Mammario Felino	2
1.2.2 Tumore Mammario Canino.....	3
1.3 Ferro e Ferritina: Il Loro Metabolismo	5
1.4 Recettori della Transferrina	6
1.4.1 TFR-1: Transferrin Receptor One.....	6
1.4.2 TFR-2: Transferrin Receptor Two	7
1.5 Trasferrina.....	8
1.5.1 Internalizzazione TFR-1/Tf-Fe	8
1.6 Espressione e Ruolo del TR-1 nelle Neoplasie Umane	12
1.7 TFR-1 negli Animali.....	12
1.8 Nuove Terapie Antitumorali: il TFR-1 come Nuovo Target	14
1.9 La Nanocage di Ferritina.....	15
2. OBIETTIVI.....	18
2.1 PRIMA FASE: Valutazione Espressione TFR-1 negli Animali.....	18
2.2 SECONDA FASE: Valutazione dell'efficacia Terapeutica di una Nanocage di Ferritina	18
3. MATERIALI E METODI.....	19
3.1 Campioni Selezionati	19
3.1.1 Linee Cellulari.....	19
3.1.1.1 Gatto.....	19
3.1.1.2 Cane	19
3.1.2 Tessuti Tumorali	20
3.1.2.1 Tessuto di Gatto	20
3.1.2.2 Tessuto di Cane.....	20
3.2 Estrazione Proteica e Western Blotting	20
3.3 Immunoistochimica.....	21
3.4 Immunofluorescenza	22
3.5 Immunocitochimica	22
3.6 Citometria a Flusso	22
3.7 Espressione Genica Mediante Pcr e Real Time	23
3.8 Saggio di Proliferazione Cellulare Post Trattamento con HFn(DOX)	23
3.9 Apoptosi.....	24

3.10 Analisi Statistica	24
4. RISULTATI.....	25
4.1 Western Blotting	25
4.2 Valutazione dell'Espressione TFR-1	25
4.2.1 TFR-1 nel Gatto	25
4.2.1.1 Immunofluorescenza	25
4.2.1.2 Citometria a Flusso	26
4.2.1.3 Pcr e Sequenziamento	27
4.2.1.4 Espressione nei Tessuti, Immunoistochimica	27
4.2.2 TFR-1 nel Cane	29
4.2.2.1 Immunofluorescenza	29
4.2.2.2 Citometria a Flusso	29
4.2.2.3 Immunocitochimica	30
4.2.2.4 Real-Time e Sequenziamento	31
4.2.2.5 Espressione nei Tessuti Immunoistochimica	31
4.3 Valutazione dell'Efficacia Terapeutica.....	34
4.3.1 Proliferazione Cellulare in Gatto	34
4.3.2 Apoptosi.....	35
4.3.3 Proliferazione Cellulare in Cane	36
5. DISCUSSIONE.....	38
6. CONCLUSIONI.....	45
7. APPENDICE.....	46
8. BIBLIOGRAFIA	47

ABSTRACT

The transferrin receptor (TFR-1) has been found to be overexpressed in several solid tumors in humans and, in clinical oncology, has therefore been exploited in a selective anticancer therapy using nanotechnology. The ferritin (HF_n), a molecule able to recognize TFR-1, was used to create a nanocage loaded with doxorubicin HF_n(DOX). In veterinary medicine there are few studies that evaluate the expression of TFR-1 in tumors especially in mammary cancer and, even fewer are the studies that use it for therapy. The goal of this study is therefore the evaluation of TFR-1 expression in malignant mammary tumors of cats and dogs, either in tumor tissues and in cancer cell lines, and additionally to demonstrate the efficacy of HF_n(DOX) in feline and canine mammary tumor cell lines.

Interestingly, on tumor sections of different degrees of malignancy, we observed that in cats, the level of TFR-1 protein expression increases with the progression of malignancy, while in the dog a greater expression of the receptor has been identified on tumor sections compared to healthy mammary gland. As regards to the efficacy of the use of HF_n(DOX), in feline metastatic mammary cancer cells line, a lower cell proliferation has been observed compared to the administration of the drug alone, at specific concentrations and time points (specifically 0.01 μ M after 72 hours from treatment and 0.1 μ M after 48 and 72 hours). In dogs, on the other hand, HF_n(DOX) was effective only in tumor cells derived from a primary cancer at higher concentrations (5 μ M and 12.08 μ M after 72 hours) than those used in the cats. Apparently then, canine mammary cancer cells resulted more resistant to doxorubicin than the counterpart in cats, as in the dog it was necessary to use higher concentrations of drug either linked to the nanocage and free.

The results of this preliminary study confirmed the presence of the TFR-1 in the mammary tumor of cats and dogs, highlighting a correlation of its expression with the degree of tumor malignancy in particular in the cat, suggesting that the use of engineered nanomolecules could be an effective therapeutic option for mammary cancer in this animal species. For the dog, further studies are mandatory, including more cell lines, or using the nanocage loaded with other drugs.

In conclusion, the study demonstrated that the use of engineered molecules that selectively bind to specific receptors over-expressed on neoplastic cells is a promising field of study for new therapeutic horizons also in veterinary medicine.

1. INTRODUZIONE

1.1 Ghiandola Mammaria Cenni di Anatomia

La ghiandola mammaria è una ghiandola esocrina che distingue i mammiferi da tutti gli altri animali e ha il compito di secernere latte con il quale vengono nutriti, nei primi mesi di vita, i nuovi nati (Daniel 1996). Essa si sviluppa lungo la linea mammaria e negli animali il numero di mammelle varia a seconda della specie. Nei cani e gatti si hanno cinque paia di ghiandole: le prime due paia vengono definite craniali e caudali toraciche, si hanno poi le craniali e caudali addominali e per ultimo si definiscono le ghiandole mammarie inguinali (Barone 1990; Misdrop 1988). La ghiandola mammaria è una ghiandola tubulo-alveolare complessa, il cui sviluppo inizia durante la fase embrionale e raggiunge la maturazione funzionale solamente durante la fase di gravidanza e lattazione (Hassiotou and Geddes 2013). Dal punto di vista anatomico la mammella è formata da un parenchima formato da alveoli, uno stroma composto da tessuto connettivo, nel quale scorrono le vene e arterie epigastriche superficiali craniali e caudali. Strutturalmente la mammella è divisa in lobi separati da tessuto connettivo interlobulare. Ogni lobo è composto da vari lobuli a loro volta formati da alveoli, i quali sono definiti come l'unità funzionale della ghiandola. L'epitelio della mammella è composto da due epiteli cellulari con due tipologie cellulari differenti: epitelio basale ed epitelio luminale. Il primo è composto da cellule mioepiteliali che circondano gli alveoli con la capacità di contrarsi permettendo l'eiezione del latte, il secondo invece, è composto dalle cellule a forma cuboidale deputate a secernere il latte (Speroni et al. 2018; Inman et al. 2015; Hassiotou and Geddes 2013; Sleenckx et al. 2011). Le due diverse tipologie cellulari si distinguono anche per una diversa espressione immunofenotipica, facilmente riconoscibile e valutabile mediante tecnica immunoistochimica. Questa metodica si concentra sulla valutazione delle diverse citocheratine, frammenti intermedi tipici delle cellule epiteliali. Nello specifico, l'epitelio luminale risulta positivo per citocheratine 7, 8, 18 e 19, mentre l'epitelio basale/mioepiteliale per le citocheratine 5, 6, 14 e 17 (Hassiotou and Geddes 2013; Inman et al. 2015). La componente mioepiteliale, inoltre, risulta positiva anche per altri marker quali *epidermal growth factor* (EGFR), vimentina, CD10, P-caderina e, data la loro componente mioepiteliale, le cellule esprimono anche la proteina *smooth muscle actin* (SMA) e la calponina (Speroni et al. 2018)

1.2 Il Tumore della Ghiandola Mammaria negli Animali

1.2.1 Tumore Mammario Felino

Il tumore mammario del gatto (TMG) è la terza neoplasia più comune in questa specie, dopo il tumore alla cute e quello del sistema ematopoietico. La maggior parte delle neoplasie mammarie, circa il 90%, sono maligne, con un'aspettativa di vita che molto spesso non supera l'anno. (Adega, Borges, and Chaves 2016; Overley et al. 2005). Il tumore più diagnosticato nella specie felina è il carcinoma di terzo grado, altamente infiltrante, con un'elevata tendenza a metastatizzare. Le sedi più colpite da metastasi sono polmone (83%), linfonodi competenti (83%), fegato (25%), e pleura (22%) (Hassan et al. 2017; Adega, Borges, and Chaves 2016; Zappulli et al. 2015).

Per il tumore mammario del gatto sono stati identificati dei fattori predisponenti come l'età, la razza e l'età della sterilizzazione. Per quanto concerne l'età di insorgenza della neoplasia sono più soggette le gatte con un'età compresa tra i 10-12 anni, e la specie più colpita è quella siamese e simili (Zappulli et al. 2005). L'età della sterilizzazione, invece, influenza positivamente sul ritardo di insorgenza tumorale, solamente se effettuata entro il primo anno di vita, con un calo di sviluppo neoplastico di circa l'80% (Overley et al. 2005).

La classificazione istologica del cancro alla mammella nella specie felina, fa riferimento alla classificazione istologica utilizzata per la classificazione delle neoplasie umane proposta dalla World Health Organisation (WHO). Vengono considerate le seguenti categorie:

- Lesioni iperplastiche e displastiche dove sono comprese: ectasia duttale, iperplasia lobulare, iperplasia lobulare con fibrosi e con produzione di secreto, epiteliosi, papillomatosi.
- Lesioni benigne: rare nel gatto e includono adenoma e adenoma duttale e intraduttale papillare e fibroadenoma.
- Lesioni maligne: tra queste formazioni si include il carcinoma tubulare, papillare, carcinoma solido, carcinoma cribriforme, micro-papillare invasivo. Recentemente è stato identificato anche il carcinoma complesso, tuttavia in questa neoplasia non si nota la classica proliferazione della componente mioepiteliale. Questo aspetto ha portato a riclassificare tale carcinoma come un carcinoma adenoma/carcinoma duttale.

La classificazione istologica del tumore mammario felino viene accompagnata anche dalla definizione del *grading* tumorale. Per la specie felina il sistema di valutazione prende in considerazione il pleomorfismo cellulare, la formazione di tubuli e la conta mitotica. Questo sistema deriva dalla classificazione per le neoplasie dei tumori al seno di donna messo a punto da Elston e Ellis (Elston and Ellis 1991).

Alla classificazione istologica si affianca una classificazione molecolare usata in medicina umana. Quest'ultima classificazione valuta l'espressione di ER, PR, HER-2, delle citocheratine 5/6/14/19 e del marker di proliferazione cellulare Ki67. Il tumore al seno viene quindi suddiviso nei seguenti sottotipi molecolare e la medesima classificazione è stata ipotizzata anche per il tumore mammario felino (Zappulli et al. 2015):

- Luminal A: ER+, PR+, HER-2+
- Luminal B: ER+, PR+, HER-2-
- HER-2 *overexpression*: ER-, PR-, HER-2 +
- Basal-like: ER-, PR-, HER-2-, CK 14/5/6 +
- Normal-like: ER-, PR-, HER-2-, Ki 67+

Tra i vari sottotipi molecolari sopra descritti, è stato dimostrato che il più comune nelle gatte è il tumore appartenente al sottotipo definito Basal-like (Wiese et al. 2013). Tale neoplasia, non esprimendo i recettori per estrogeno (ER), progesterone (PR) ed *epidermal growth factor-2* (HER-2), può essere associata al tumore triplo negativo della donna (TNBC) (Caliari et al. 2014a). Uno studio del 2014 aggiunge un'ulteriore similitudine tra il tumore mammario del gatto con il TNBC, evidenziando una notevole positività delle cellule tumorali feline per la vimentina. Tutti questi aspetti suggeriscono come il gatto possa essere un modello di studio per il TNBC (Caliari et al. 2014b; Cannon 2015; MacEwen 1990)

1.2.2 Tumore Mammario Canino

Il tumore mammario del cane (TMC) è il tumore più frequente nelle cagne intere con un tasso di prevalenza di circa il 40%.

La ghiandola mammaria del cane, così come quella del gatto, è una ghiandola tubulo-alveolare, modificata per la produzione di latte. Tale ghiandola è divisa in lobuli separati tra di loro da tessuto connettivo interlobulare. L'epitelio ghiandolare è composto da due diverse tipologie cellulari; la parte luminale è formata da cellule epiteliali a struttura cuboidale, le quali sono giustapposte a cellule mioepiteliali responsabili, grazie alla loro contrazione, dell'eiezione del latte (Sleeckx et al. 2011). I TMCs possono avere una diversa morfologia a seconda della componente cellulare che prolifera, nel tumore mammario del cane, infatti, le due componenti cellulari possono andare incontro in modo indipendente ad una proliferazione anomala. Si parla di tumore semplice nel caso in cui sia solo una componente cellulare a proliferare (epiteliale o mioepiteliale); di tumore complesso, quando si assiste alla proliferazione di entrambe le tipologie cellulari (epiteliale e mioepiteliale). Esiste inoltre, per la specie cane, anche il tumore misto, in cui si ha una proliferazione anomala sia di cellule di origine epiteliale che di origine mesenchimale (Sleeckx et al. 2011; Peña et al. 2014b).

Per quanto concerne i fattori di rischio, per la specie canina, sono rilevanti l'età, la razza e la dieta. È stato dimostrato come il tumore mammario nel cane abbia un'insorgenza maggiore in animali di età avanzata, 8-9 anni e sia più frequente nelle razze definite *toy*. Per quanto riguarda invece la sterilizzazione, i dati in letteratura sono contrastanti. Un recente studio mette in discussione quanto si era sempre sostenuto, ovvero che l'ovariectomia precoce vada a ridurre l'insorgenza dello sviluppo tumorale (W. Beauvais 2012).

Per la classificazione del tumore mammario del cane, in letteratura vi sono diverse proposte, che sono un adattamento del sistema usato per la classificazione del tumore al seno di donna. La classificazione più recente, proposta dalla WHO, pubblicata nel 1999, è stata rivista nel 2011 e suddivide il tumore mammario del cane in 7 diversi sottotipi di tumore benigno e 23 sottotipi maligni (Goldschmidt et al. 2011). Generalmente i tumori maligni presentano caratteristiche specifiche, come un elevato indice mitotico, presenza di necrosi, perdita di differenziazione cellulare, discontinuità della membrana basale e pleomorfismo nucleare. Nonostante queste caratteristiche non è sempre facile distinguere tra tumore benigno e maligno.

Il sistema di attribuzione del grado tumorale, per i tumori mammari del cane così come per quelli del gatto, a livello mondiale, è quello di Elston e Ellis, che viene conosciuto come metodo di Nottingham. Tale sistema prende in considerazione tre caratteristiche morfologiche: la formazione di tubuli, il pleomorfismo nucleare e il numero di mitosi. A ciascun parametro viene dato un punteggio da 1 a 3 e successivamente sommando il punteggio di ciascun fattore si ottiene un punteggio totale che classifica i tumori nel seguente modo: 3-5 tumore di grado I: carcinomi poco differenziati, da 6-7

carcinoma di grado II, moderatamente differenziati , da 8-9 tumore di grado III, poco differenziati (Elston and Ellis 1991; Sleenckx et al. 2011).

La classificazione molecolare anche per il cane fa riferimento alla classificazione usata in medicina umana e vede la suddivisione del tumore mammario in:

- *luminal A*,
- *luminal B*,
- *basal-like*,
- carcinomi con overespressione di HER-2
- carcinomi normal-like.

Nella specie canina la suddivisione in sottotipi molecolari è importante perché è associata al tipo istologico. Molto spesso, infatti, i carcinomi semplici vengono classificati come basal-like, i carcinomi complessi invece luminal A così come i tumori di I e II grado. I carcinomi di III grado, invece, sono definiti per la maggior parte dei casi basal-like (Goldschmidt et al. 2011).

Il tumore mammario del cane è usato come modello per lo studio della carcinogenesi dei tumori al seno di donna. Cani e uomini, infatti, hanno in comune molte caratteristiche come età di insorgenza, eziologia della malattia su base ormonale e il suo decorso. Oltre a queste caratteristiche morfologiche e istopatologiche il tumore mammario del cane e quello della donna sono simili anche dal punto di vista molecolare. Similitudini si riscontrano in relazione all'espressione di ER e PR, così come per quanto riguarda altri ormoni e fattori di crescita come *insulin-growth factor* (IGF-1), e l'ormone della crescita GH. Un'ulteriore similitudine tra il tumore alla mammella dell'uomo e quello del cane è data dall'espressione della proteina nucleare Ki67. Questa proteina maggiormente espressa nelle cellule ciclanti, in oncologia umana, è un marker prognostico negativo, così come in medicina veterinaria è stata identificata in lesioni maligne di grandi dimensioni con la tendenza a metastatizzare (Kaszak et al. 2018).

Un'ulteriore similitudine tra tumore al seno di donna e il tumore mammario di cane è dato dalla presenza della proteina p53. In entrambe le specie l'espressione di questa proteina è riconducibile ad una prognosi infausta (Abdelmegeed and Mohammed 2018). Queste caratteristiche hanno portato a considerare il cane come un possibile modello di studio per il tumore mammario spontaneo della donna.

Lo studio della cancerogenesi e il tentativo di trovare una terapia che possa cercare di arginare lo sviluppo e la proliferazione delle sole cellule tumorali è una sfida inseguita da molto tempo. Una buona strada da percorrere potrebbe essere quella di cercare di capire le differenze tra il metabolismo di una cellula normale rispetto al metabolismo di una cellula cancerosa. Nello specifico analizzare l'eventuale differenza di espressione di proteine o di recettori che la cellula cancerosa possa usare per aumentare il suo metabolismo. Le vie metaboliche delle cellule tumorali, infatti, sono più attivate rispetto a quelle di una normale cellula. Una via metabolica su tutte è quella del ferro, elemento essenziale per la cellula.

1.1 Ghiandola Mammaria Cenni di Anatomia

La ghiandola mammaria è una ghiandola esocrina che distingue i mammiferi da tutti gli altri animali e ha il compito di secernere latte con il quale vengono nutriti nei primi mesi di vita i nuovi nati (Daniel 1996). Essa si sviluppa lungo la linea mammaria e negli animali il numero di mammelle varia a seconda della specie. Nei cani e gatti si hanno cinque paia di ghiandole: le prime due paia vengono definite craniali e caudali toraciche, si hanno poi le craniali e caudali addominali e per ultimo si definiscono le ghiandole mammarie inguinali (Barone 1990; Misdrop 1988). La ghiandola mammaria è una ghiandola tubulo-alveolare complessa, lo sviluppo inizia durante la fase embrionale e raggiunge la maturazione funzionale solamente durante la fase di gravidanza e lattazione (Hassiotou and Geddes 2013). Dal punto di vista anatomico la mammella è formata da un parenchima formato da alveoli, uno stroma composto da tessuto connettivo, nel quale scorrono le vene e arterie epigastriche superficiali craniali e caudali. Strutturalmente la mammella è divisa in lobi separati da tessuto connettivo interlobulare. Ogni lobo è composto da vari lobuli a loro volta formati da alveoli, i quali sono definiti come l'unità funzionale della ghiandola. L'epitelio della mammella è composto da due epitelii cellulari con due tipologie cellulari differenti: epitelio basale ed epitelio luminale. Il primo è composto da cellule mioepiteliali che circondano gli alveoli con la capacità di contrarsi permettendo l'eiezione del latte, il secondo invece, è composto dalle cellule a forma cuboidale deputate a secernere il latte (Speroni et al. 2018; Inman et al. 2015; Hassiotou and Geddes 2013; Sleenckx et al. 2011). Le due diverse tipologie cellulari, si distinguono anche per una diversa espressione immunofenotipica facilmente riconoscibile e valutabile mediante tecnica immunoistochimica. Questa metodica si concentra sulla valutazione delle diverse citocheratine, frammenti intermedi tipici delle cellule epiteliali. Nello specifico, l'epitelio luminale risulta positivo per citocheratine 7, 8, 18 e 19, mentre l'epitelio basale/mioepiteliale per le citocheratine 5, 6, 14 e 17 (Hassiotou and Geddes 2013; Inman et al. 2015). La componente mioepiteliale, inoltre, risulta positiva anche per altri marker quali *epidermal growth factor* (EGFR), vimentina, CD10, P-caderina e data la sua componente mioepiteliale le cellule esprimono anche la proteina *smooth muscle actin* (SMA) e la calponina (Speroni et al. 2018)

1.2 Il Tumore della Ghiandola Mammaria negli Animali

1.2.1 Tumore Mammario Felino

Il tumore mammario del gatto (TMG), è la terza neoplasia più comune in questa specie, dopo il tumore alla cute e quello del sistema ematopoietico. La maggior parte delle neoplasie mammarie, circa il 90%, sono maligne con un'aspettativa di vita che molto spesso non supera l'anno di età (Adega, Borges, and Chaves 2016; Overlay et al. 2005). Il tumore più diagnosticato nella specie felina è il carcinoma di terzo grado, altamente infiltrante con un'elevata tendenza a metastatizzare. Le sedi più colpite da metastasi sono polmone (83%), linfonodi competenti (83%), fegato (25%), e pleura (22%) (Hassan et al. 2017; Adega, Borges, and Chaves 2016; Zappulli et al. 2015).

Per il tumore mammario del gatto sono stati identificati dei fattori predisponenti come l'età, la razza e l'età della sterilizzazione. Per quanto concerne l'età di insorgenza della neoplasia sono più soggette le gatte con un'età compresa tra i 10-12 anni, e la specie più colpita è quella siamese e simili (Zappulli et al. 2005). L'età della sterilizzazione, invece, influenza positivamente sul ritardo di insorgenza tumorale solamente se effettuata entro il primo anno di vita, con un calo di sviluppo neoplastico di circa l'80% (Overlay et al. 2005).

La classificazione istologica del cancro alla mammella nella specie felina, fa riferimento alla classificazione istologica utilizzata per la classificazione delle neoplasie umane proposta dalla World Health Organisation (WHO). Vengono considerate le seguenti categorie:

- Lesioni iperplastiche e displastiche dove sono comprese: ectasia duttale, iperplasia lobulare, iperplasia lobulare con fibrosi e con produzione di secreto, epiteliosi, papillomatosi.
- Lesioni benigne: rare nel gatto e includono adenoma e adenoma duttale e intraduttale papillare e fibroadenoma.
- Lesioni maligne: tra queste formazioni si include il carcinoma tubulare, papillare, carcinoma solido, carcinoma cribriforme, micro-papillare invasivo. Recentemente è stato identificato anche il carcinoma complesso, tuttavia in questa neoplasia non si nota la classica proliferazione della componente mioepiteliale. Questo aspetto ha portato a riclassificare tale carcinoma come un carcinoma adenoma/carcinoma duttale.

La classificazione istologica del tumore mammario felino viene accompagnata anche dalla definizione del *grading* tumorale. Per la specie felina il sistema di valutazione prende in considerazione il pleomorfismo cellulare, la formazione di tubuli e la conta mitotica. Questo sistema deriva dalla classificazione per le neoplasie dei tumori al seno di donna messo a punto da Elston e Ellis (Elston and Ellis 1991).

Alla classificazione istologica si affianca una classificazione molecolare usata in medicina umana. Quest'ultima classificazione valuta l'espressione di ER, PR, HER-2, delle citocheratine 5/6/14/19 e del marker di proliferazione cellulare Ki67. Il tumore al seno viene quindi suddiviso nei seguenti sottotipi molecolare e la medesima classificazione è stata ipotizzata anche per il tumore mammario felino (Zappulli et al. 2015):

- Luminal A: ER+, PR+, HER-2+
- Luminal B: ER+, PR+, HER-2-
- HER-2 *overexpression*: ER-, PR-, HER-2 +
- Basal-like: ER-, PR-, HER-2-, CK 14/5/6 +
- Normal-like: ER-, PR-, HER-2-, Ki 67+

Tra i vari sottotipi molecolari sopra descritti, è stato dimostrato che il più comune nelle gatte è il tumore appartenente al sottotipo definito Basal-like (Wiese et al. 2013). Tale neoplasia, non esprimendo i recettori per estrogeno (ER), progesterone (PR) ed *epidermal growth factor-2* (HER-2), può essere associato al tumore triplo negativo della donna (TNBC) (Caliari et al. 2014a). Uno studio del 2014 aggiunge un'ulteriore similitudine tra il tumore mammario del gatto con il TNBC, evidenziando una notevole positività delle cellule tumorali feline per la vimentina. Tutti questi aspetti suggeriscono come il gatto possa essere un modello di studio per il TNBC (Caliari et al. 2014b; Cannon 2015; MacEwen 1990)

1.2.2 Tumore Mammario Canino

Il tumore mammario del cane (TMC), è il tumore più frequente nelle cagne intere con un tasso di prevalenza di circa il 40%.

La ghiandola mammaria del cane, così come quella del gatto, è una ghiandola tubulo-alveolare, modificata per la produzione di latte. Tale ghiandola è divisa in lobuli separati tra di loro da tessuto connettivo interlobulare. L'epitelio ghiandolare è composto da due diverse tipologie cellulari; la parte luminale è formata da cellule epiteliali a struttura cuboidale, le quali sono giustapposte a cellule mioepiteliali responsabili, grazie alla loro contrazione, dell'eiezione del latte (Sleeckx et al. 2011). I TMCs possono avere una diversa morfologia a seconda della componente cellulare che prolifera, nel tumore mammario del cane, infatti, le due componenti cellulari possono andare incontro in modo indipendente ad una proliferazione anomala. Si parla di tumore semplice nel caso in cui sia solo una componente cellulare a proliferare (epiteliale o mioepiteliale); di tumore complesso, quando si assiste alla proliferazione di entrambe le tipologie cellulari (epiteliale e mioepiteliale). Esiste inoltre per la specie cane anche il tumore misto; in cui si ha una proliferazione anomala sia di cellule di origine epiteliale che di origine mesenchimale (Sleeckx et al. 2011; Peña et al. 2014b).

Per quanto concerne i fattori di rischio, per la specie canina sono rilevanti l'età, la razza e la dieta. È stato dimostrato come il tumore mammario nel cane abbia un'insorgenza maggiore in animali di età avanzata, 8-9 anni e sia più frequente nelle razze definite *toy*. Per quanto riguarda invece la sterilizzazione i dati in letteratura sono contrastanti. Un recente studio mette in discussione quanto si era sempre sostenuto, ovvero che l'ovariectomia precoce vada a ridurre l'insorgenza dello sviluppo tumorale (W. Beauvais 2012).

Per la classificazione del tumore mammario del cane, in letteratura ne sono proposte diverse che sono un adattamento del sistema usato per la classificazione del tumore al seno di donna. La classificazione più recente utilizzata proposta dalla WHO pubblicata nel 1999 è stata rivista nel 2011 e suddivide il tumore mammario del cane in 7 diversi sottotipi di tumore benigno e 23 sottotipi maligni (Goldschmidt et al. 2011). Generalmente i tumori maligni presentano caratteristiche specifiche come un elevato indice mitotico, presenza di necrosi, perdita di differenziazione cellulare, discontinuità della membrana basale e pleomorfismo nucleare. Nonostante queste caratteristiche non è sempre facile distinguere tra tumore benigno e maligno.

Il sistema di attribuzione del grado tumorale, per i tumori mammari del cane così come per quelli del gatto, a livello mondiale, è quello di Elston e Ellis, che viene conosciuto come metodo di Nottingham. Tale sistema prende in considerazione tre caratteristiche morfologiche: la formazione di tubuli, il pleomorfismo nucleare e il numero di mitosi. A ciascun parametro viene dato un punteggio da 1 a 3 e successivamente sommando il punteggio di ciascun fattore si ottiene un punteggio totale che classifica i tumori nel seguente modo: 3-5 tumore di grado I: carcinomi poco differenziati, da 6-7

carcinoma di grado II, moderatamente differenziati , da 8-9 tumore di grado III, poco differenziati (Elston and Ellis 1991; Sleenckx et al. 2011).

La classificazione molecolare anche per il cane fa riferimento alla classificazione usata in medicina umana e vede la suddivisione del tumore mammario in:

- *luminal A*,
- *luminal B*,
- *basal-like*,
- carcinomi con overespressione di HER-2
- carcinomi normal-like.

Nella specie canina la suddivisione in sottotipi molecolari è importante perché è associata al tipo istologico. Molto spesso, infatti, i carcinomi semplici vengono classificati come basal-like, i carcinomi complessi invece luminal A così come i tumori di I e II grado. I carcinomi di III grado, invece, sono definiti per la maggior parte dei casi basal-like (Goldschmidt et al. 2011).

Il tumore mammario del cane è usato come modello per lo studio della carcinogenesi dei tumori al seno di donna. Cani e uomini, infatti, hanno in comune molte caratteristiche come età di insorgenza, eziologia della malattia su base ormonale e il suo decorso. Oltre a queste caratteristiche morfologiche e istopatologiche il tumore mammario del cane e quello della donna sono simili anche dal punto di vista molecolare. Similitudini si riscontrano in relazione all'espressione di ER e PR, così come per quanto riguarda altri ormoni e fattori di crescita come *insulin-growth factor* (IGF-1) e l'ormone della crescita GH. Un'ulteriore similitudine tra il tumore alla mammella dell'uomo e quello del cane è data dall'espressione della proteina nucleare Ki67. Questa proteina maggiormente espressa nelle cellule ciclanti, in oncologia umana, è un marker prognostico negativo, così come in medicina veterinaria è stata identificata in lesioni maligne di grandi dimensioni con la tendenza a metastatizzare (Kaszak et al. 2018).

Un'ulteriore similitudine tra il tumore al seno di donna e il tumore mammario di cane è dato dalla presenza della proteina p53. In entrambe le specie l'espressione di questa proteina è riconducibile ad una prognosi infausta (Abdelmegeed and Mohammed 2018). Queste caratteristiche hanno portato a considerare il cane come un possibile modello di studio per il tumore mammario spontaneo della donna.

Lo studio della cancerogenesi e il tentativo di trovare una terapia che possa cercare di arginare lo sviluppo e la proliferazione delle sole cellule tumorali è una sfida inseguita da molto tempo. Una buona strada da percorrere potrebbe essere quella di cercare di capire le differenze tra il metabolismo di una cellula normale rispetto al metabolismo di una cellula cancerosa. Nello specifico, analizzare l'eventuale differenza di espressione di proteine o di recettori che la cellula cancerosa può usare per aumentare il suo metabolismo. Le vie metaboliche delle cellule tumorali, infatti, sono più attivate rispetto a quelle di una normale cellula. Una via metabolica su tutte è quella del ferro, elemento essenziale per la cellula.

1.3 Ferro e Ferritina: Il Loro Metabolismo

Il ferro (Fe), essendo implicato in molti processi biologici fondamentali come la respirazione cellulare, la sintesi di DNA, il metabolismo energetico, la crescita, lo sviluppo e la differenziazione cellulare, è un elemento essenziale per l'organismo (Oriana Marques et al. 2014; Dev and Babitt 2017). Una concentrazione intracellulare eccessiva di Fe, tuttavia, può causare danni irreparabili all'organismo, come ad esempio stress ossidativo, danno al DNA, danno lipidico e proteico. L'*intake*, lo stoccaggio e l'export di questo ione devono essere, quindi, finemente regolati (Oriana Marques et al. 2014).

Il Fe è assunto per la maggior parte attraverso la dieta, sotto forma di ferro inorganico. A livello intestinale lo ione, ridotto dalla forma 3^+ a quella meno tossica 2^+ , grazie all'intervento di alcune ferro-riduttasi quali il citocromo B, entra negli enterociti mediante il trasportatore di metalli bivalenti, (DMT1) e, una volta all'interno degli enterociti, una parte del Fe viene immediatamente utilizzata per le funzioni biologiche, un'altra parte invece esce dalla cellula attraverso la ferroportina e si riversa nel torrente circolatorio per essere portato, ossidato nuovamente a ferro 3^+ e legato alla transferrina (Tf), a tutti gli altri organi (Pantopoulos et al. 2012; Dev and Babitt 2017). Gli ioni di Fe che non vengono immediatamente utilizzati, per evitare gli effetti collaterali causati da un eccesso di tale ione, vengono stoccati legati alla ferritina (Fn). (Dev and Babitt 2017). Nello specifico, 4500 atomi di ferro possono essere immagazzinati nella cavità interna della Ft.

L'internalizzazione del Fe è regolata sia a livello intracellulare sia a livello sistemico. La regolazione intracellulare a sua volta è mediata da due importanti meccanismi: il sistema delle *iron proteins elements* (IRP1, IRP2) e attraverso il sistema dell'*hypoxia inducibile factor* (HFI).

In base alla variazione di concentrazione del Fe, IRP1 e IRP2 attivano o spengono la trascrizione di due importanti proteine, il TFR-1, recettore deputato all'internalizzazione del Fe e della ferritina, Fn. Brevemente, IRP1 e IRP2, si legano a regioni specifiche, definite *iron responsive elements* (IRE), sul filamento di mRNA nella regione 5' UTR della Fn e in posizione 3' UTR del TFR-1. L'intero processo avviene nel seguente metodo: con concentrazioni basse di Fe, IRP1 si lega al TFR-1 favorendone la trascrizione, mentre IRP2 agisce in modo contrario, legandosi cioè alla ferritina, impedendone la trascrizione. A concentrazioni elevate di Fe, invece, il meccanismo è opposto (Dev and Babitt 2017).

Il secondo sensore intracellulare deputato alla regolazione intracellulare di Fe prende il nome di *hypoxia inducibile factor*, (HF): in condizioni di ipossia cellulare e di scarso livello di Fe, le 4 subunità del recettore (HFI1 α , HFI2 α , HIF3 α e HFI β) normalmente separate tra di loro, si uniscono e traslocano nel nucleo, attivando l'espressione del TFR-1. In caso di eccesso di concentrazione di Fe, l'unione delle subunità non avviene riducendo l'internalizzazione del Fe (Dev and Babitt 2017).

A livello sistemico, invece, il Fe viene regolato grazie all'epidicina, ormone prodotto dal fegato. L'epidicina agisce attraverso una regolazione negativa sull'*intake* dello ione. L'ormone, infatti, legandosi alla ferroportina e al DMT1, inattiva i recettori causando una ritenzione intracellulare di Fe (Pantopoulos et al. 2012).

Un'eccessiva concentrazione intracellulare di Fe, oltre ad essere dannosa per le cellule sane, viene sfruttata dalle cellule neoplastiche per sostenere il loro metabolismo. Il Fe, infatti, contribuisce allo sviluppo tumorale attraverso due meccanismi. In primo luogo, l'effetto ossidante dell'*overload* dello ione, danneggiando il DNA, favorisce lo sviluppo di oncogeni. In secondo luogo, le cellule tumorali hanno un metabolismo di base più rapido rispetto alle cellule sane. Questo è dovuto ad un maggior tasso di proliferazione cellulare. Per sopperire a questo metabolismo maggiore, le cellule neoplastiche

hanno la necessità di internalizzare una maggior quantità di nutrienti, tra cui, appunto, il Fe. È stato dimostrato come le cellule tumorali abbiano un profilo di espressione proteico diverso rispetto alle cellule sane e, in particolare, si è notata una maggior espressione degli importatori del Fe tra cui il TFR-1 e una diminuzione degli esportatori di tale composto e delle proteine per lo stoccaggio dello ione come la ferritina (Dev and Babitt 2017).

Il recettore per il TFR-1 negli ultimi anni, a causa della sua maggior espressione sulle cellule tumorali rispetto alle cellule sane, è stato oggetto di molti studi. I ricercatori, infatti, stanno studiando la possibilità di utilizzare tale recettore come un *gate* selettivo per internalizzare solo nelle cellule cancerose farmaci antitumorali. Recenti studi hanno infatti dimostrato come diversi anticorpi monoclonali contro il TFR-1 siano in grado di inibire il legame con la transferrina, provocando una riduzione della proliferazione cellulare delle cellule tumorali, in particolare in linfoma e in cellule leucemiche (Oriana Marques et al. 2014).

1.4 Recettori della Transferrina

1.4.1 TFR-1: *Transferrin Receptor One*

Il recettore per la transferrina (*Transferrin Receptor one* TFR-1) è una glicoproteina transmembranaria di tipo II formata da due monomeri identici di circa 760 amminoacidi l'uno, uniti tra di loro da ponti disolfuro. Il peso molecolare di ciascun singolo monomero è di circa 90-95 kDa. (Jing and Trowbridge 1987; Daniels et al. 2006). Ogni monomero a sua volta è formato da tre domini; un dominio esterno extracellulare (*ectodomain*) C-terminale, formato da 671 amminoacidi, un dominio transmembranario a singola α elica formato da 28 amminoacidi e un dominio intracellulare N-terminale, formato da 61 amminoacidi.

Il dominio extracellulare è formato a sua volta da tre sottodomini (*subdomain*) che dal punto di vista strutturale possono essere classificati in una parte apicale (*apical domain*), una parte simile ad una proteasi, definita *proteasi-like* e un terzo sottodominio formato da più strati di foglietti β con due α elice (Lawrence et al. 1999). I tre sottodomini presentano rispettivamente tre siti di glicosidazione *N-linked* e uno sito *O-linked*. I siti di *N-linked* si trovano sui residui di arginina in posizione 251, 317 (nella porzione apicale) e 727 (in *proteasi-like*). Il singolo sito *O-linked* si trova invece sul residuo di treonina in posizione 104 (figura 1, (Daniels et al. 2012)) (Ponka and Lok 1999). L'*ectodomain* è il dominio più importante poiché, oltre a permettere il legame dei ponti disolfuro sulle cisteine 98 e 89, ospita il sito in cui avviene il legame del recettore del TFR-1 con il suo ligando, la transferrina (Tf), formando il complesso recettore-ligando (TFR-1/Tf) (Daniels et al. 2006; Ponka and Lok 1999).

Il TFR-1 è presente sulla membrana cellulare di tutte le cellule ed è stato trovato espresso anche nella barriera ematoencefalica. La sua espressione, tuttavia, aumenta nelle cellule con un'intensa attività proliferativa, come le cellule eritroidi e quelle del tessuto placentare (Gammella et al. 2017). A livello embrionale l'espressione del TFR-1 è fondamentale per lo sviluppo cerebrale e per l'eritropoiesi (Ponka and Lok 1999). Cellule con elevata attività metabolica sono anche le cellule cancerose, il TFR-1 infatti, è espresso maggiormente in diversi tessuti tumorali comparati con la rispettiva componente sana. L'aumentata espressione del TFR-1 nei tumori è inoltre spiegata dal fatto che la sua attivazione è influenzata anche dal pro-oncogene c-Myc, molto espresso nelle cellule tumorali (O'Donnell et al. 2006).

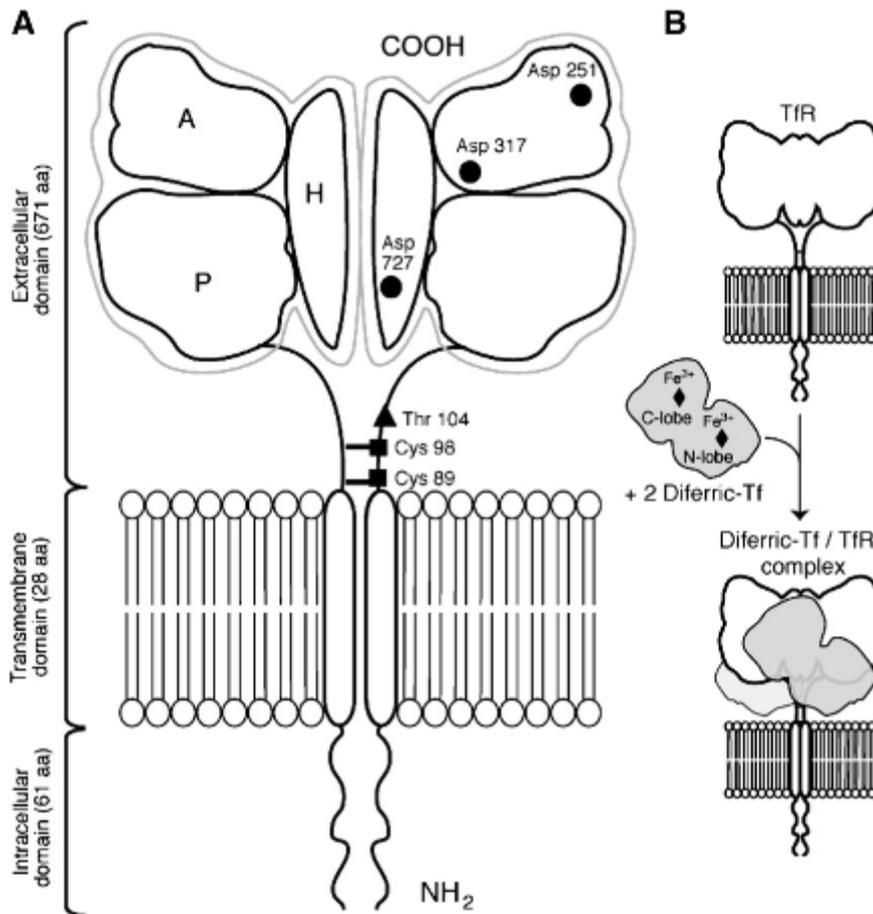


Figura 1. Rappresentazione schematica del TFR-1 e dell'assorbimento del ferro tramite endocitosi mediata dal recettore. (A) TFR-1 si trova sulla superficie cellulare come un omodimero formato da due monomeri collegati da ponti disolfuro alle cisteine 89 e 98 (■). Il TFR-1 presenta tre domini: intracellulare, transmembranario ed extracellulare. È presente un sito di glicosilazione O-linked alla treonina 104 (▲) e tre siti di glicosilazione N-linked sui residui di asparagina 251, 317 e 727 (●). Il dominio extracellulare è formato da tre sottodomini: apicale (A), elicoidale (H) e uno simile alla proteasi (P). (B) Ogni monomero lega la transferrina, a sua volta formata dai lobi N e C. Ciascun lobo di transferrina lega una molecola di ferro (Daniels et al. 2012).

1.4.2 TFR-2: *Transferrin Receptor Two*

Nel 1999 è stato identificato un altro recettore facente parte della famiglia dei recettori per la transferrina, il *transferrin receptor 2* (TFR-2) (Kawabata 2019). Questo recettore è strutturalmente simile al TFR-1, con cui condivide il 45% di identità e il 66% di omologia. La differenza sostanziale tra i due recettori sta nel fatto che TFR-1 è espresso in maniera ubiquitaria sulla superficie cellulare e che la sua espressione è direttamente correlata alla richiesta di ferro da parte dell'organismo, mentre il TFR-2 è espresso esclusivamente sugli epatociti e non interagisce con il ciclo del ferro. Il ligando per entrambi i recettori è la Tf; il TFR-2, però, ha un'affinità di circa 25-30 volte inferiore per tale proteina rispetto al TFR-1 (Kawabata 2019). Il TFR-2, visti i motivi appena descritti, non è mai stato studiato per poter essere sfruttato per una terapia antitumorale mirata. La sua funzione biologica principale è quella di mantenere un equilibrio del ferro più a livello sistemico piuttosto che a livello cellulare (Trinder and Baker 2003).

1.5 Trasferrina

La transferrina è una proteina monomerica formata da due subunità (*C-lobe* e *N-lobe*) del peso di circa 40 kDa l'una, in grado di legare fino ad un massimo di due atomi di ferro (transferrina diferrica). La sua funzione principale è infatti quella di trasportare il Fe ferrico (Fe^{3+}) dal sito di assorbimento ai vari distretti corporei per evitare che si possano accumulare degli aggregati di idrossido di ferro dannosi per l'organismo così come proteggere dagli effetti del ferro libero che potrebbe catalizzare la formazione di radicali liberi con conseguente aumento di stress ossidativo per la cellula (Kawabata 2019; Muckenthaler et al. 2017). La transferrina viene sintetizzata dal fegato e in circolo circa un terzo di tale proteina è saturata con il ferro. I valori medi nel siero umano sono per gli uomini di 120 $\mu\text{g/dL}$ e 100 $\mu\text{g/dL}$ per le donne (Kawabata 2019). Il legame con il ferro permette la formazione del complesso Tf/Fe., che si forma grazie ai due domini presenti rispettivamente sulle due subunità della transferrina (N1, N2 e C1, C2). La quantità di ferro legato alla transferrina è importante in quanto l'affinità della transferrina per il suo recettore TFR-1 è direttamente proporzionale al numero di atomi di ferro. La transferrina diferrica ha un'affinità 30 volte più alta per il TFR-1 rispetto alla transferrina monoferrica e 500 volte maggiore rispetto alla apo-Tf (Daniels et al. 2006). Il legame con il TFR-1 avviene mediante le due subunità. Il *C-lobe* interagisce con la parte laterale del dominio extracellulare del TFR-1, mentre la subunità *N-lobe* si inserisce tra il dominio extracellulare e quello transmembranario del TFR-1. In questo modo ogni monomero del TFR-1 è in grado di legare due molecole di Tf, trasportando all'interno della cellula fino a quattro atomi di ferro. La transferrina è in grado di legare oltre al ferro anche altri metalli come gallio, alluminio, zinco o cadmio (Kawabata 2019).

1.5.1 Internalizzazione TFR-1/Tf-Fe

L'alta affinità della Tf diferrica per il TFR-1 permette la formazione del legame TFR-1/Tf-Fe. Una stessa proteina di transferrina si lega al TFR-1 per circa 200 volte, passate le quali il recettore viene degradato dall'apparato di Golgi (Dautry Varsat, Ciechanover, and Lodish 1983). Il tempo necessario per rinnovare tutti i recettori espressi sulla cellula è di circa 21 minuti. A seguito della formazione del legame TFR-1/Tf-Fe si assiste all'internalizzazione del recettore mediante un processo attivo: si parla di endocitosi clatrina-dipendente. Durante questo processo si è identificato il ruolo importante anche della proteina *transferrin receptor trafficking protein* (TTP), che, legandosi mediante un residuo SH_3 alla clatrina, favorisce l'internalizzazione del complesso TFR-1/Tf-Fe (Tosoni et al. 2005). Il complesso poi viene internalizzato dalla cellula sotto forma di endosoma (Qian et al. 2002). L'attivazione di pompe protoniche porta il pH all'interno dell'endosoma fino a valori di 5. Il rapido cambiamento di pH causa una modifica conformazionale della Tf e favorisce il distacco del Fe da quest'ultima. Il Fe slegato mediante il DMT1 viene fatto uscire dalla cellula e portato nei distretti corporei oppure, in caso di *overloading*, stoccato all'interno della ferritina (Theil 2013). Il TFR-1, invece, ancora legato alla Tf, viene riportato sulla membrana cellulare; l'endosoma si fonde con la membrana cellulare esponendo nuovamente il recettore all'esterno della cellula e favorendo il distacco della Tf permettendo in questo modo l'inizio di un nuovo ciclo (Daniels et al. 2006; Dautry Varsat, Ciechanover, and Lodish 1983).

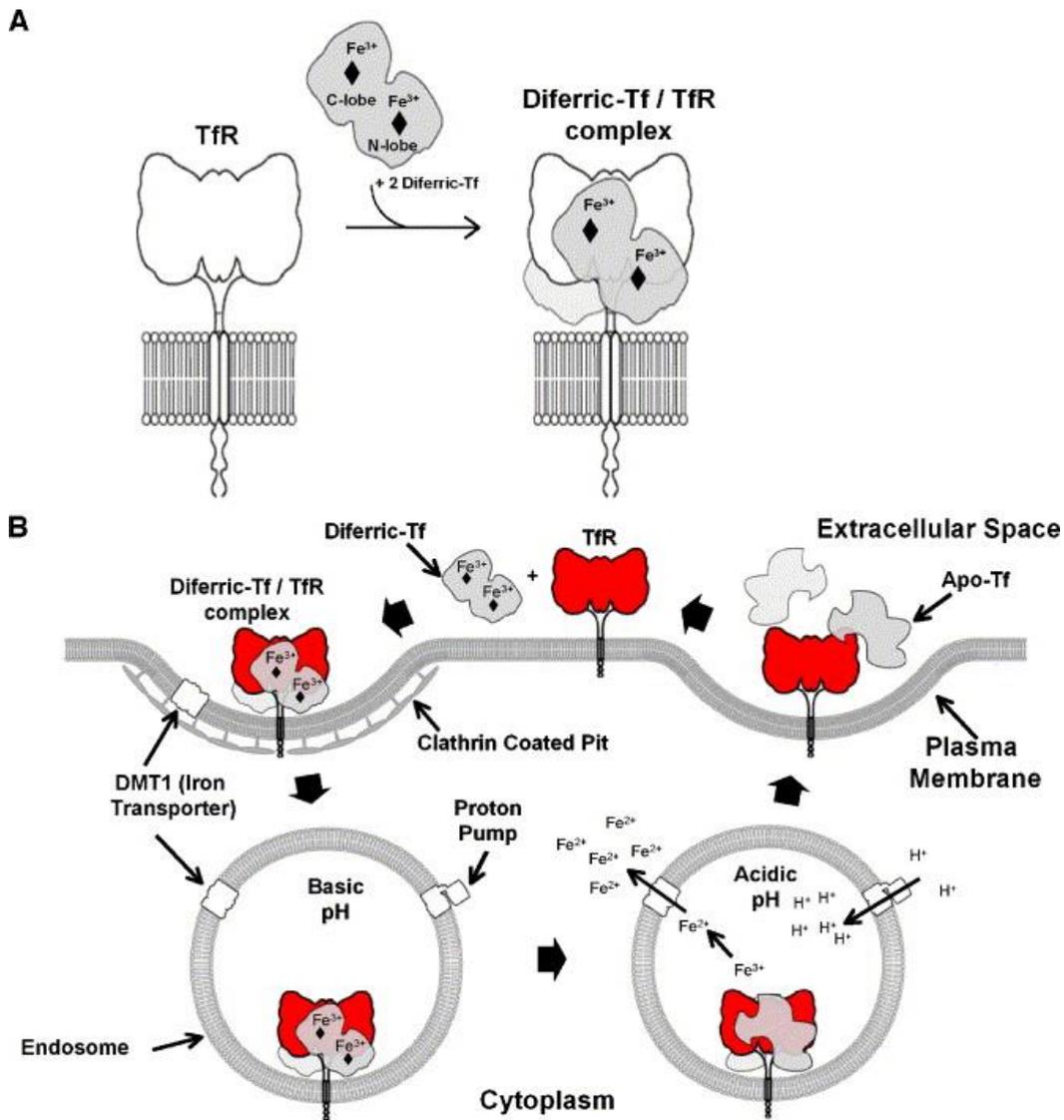


Figure 2. Rappresentazione schematica dell'internalizzazione del complesso Tf/Fe tramite il legame con il recettore TFR-1 attraverso un processo di endocitosi mediato dalla clatrina. (A) formazione del complesso TFR-1/TF-Fe. (B) schema del processo di endocitosi. Il complesso TFR-1/Tf-Fe viene internalizzato in un endosoma, il pH di abbassa per l'entrata di ioni, il Fe di libera dalla Tf e viene escretto dall'endosoma e riversato nel citoplasma. L'endosoma è riportato sulla membrana cellulare dove si fonde e si riespone il TFR-1 nello spazio extracellulare con il distacco della Tf e la ripartenza del ciclo (Daniels et al. 2006).

La regolazione dell'espressione del TFR-1 è, come accennato in precedenza, strettamente legata alla regolazione dell'*intake* del ferro, in quanto il TFR-1 viene utilizzato dalla cellula per internalizzare tale ione. La regolazione del TFR-1 è la medesima regolazione post-trascrizionale descritta in precedenza. Nello specifico, nella regione 3'UTR del filamento di mRNA del TFR-1 l'IRE, costituita da 30 nucleotidi ripetuti a formare una struttura a loop, è riconosciuta dalla proteina IRP1 (Pantopoulos 2004). In condizioni di scarsa concentrazione di ferro, si assiste al distacco del *cluster* di 4Fe-4S dalla IRP1; questo permette alla IPR1 di legarsi alla regione IRE stabilizzando l'mRNA del TFR-1. L'mRNA stabilizzato non può essere degradato con la conseguenza di una maggiore trascrizione. Nel caso invece di un'eccessiva concentrazione intracellulare di ferro, l'obiettivo della cellula è quello di limitare l'*intake* di ulteriori ioni e di aumentare lo stoccaggio di quelli già presenti. Questa elevata concentrazione di ferro provoca che il *cluster* di 4Fe-4S non si stacchi dalla IRP1, impedendone il legame con l'mRNA, favorendone, invece, la sua degradazione da parte di proteasomi (Daniels et al. 2006; Pantopoulos 2004). La regolazione della concentrazione del ferro e quindi del TFR-1 è influenzata anche dalla concentrazione dell'espressione della ferritina. In caso di elevata concentrazione di ferro, la proteina IRP2 subisce in primo luogo un'ubiquitinazione che provoca una degradazione della stessa da parte di proteasomi. In questo modo è impedito il legame con IRE sul mRNA della ferritina, favorendone la trascrizione e aumentando così lo stoccaggio del ferro. In condizioni, invece, di basse concentrazioni di ferro, l'IRP2 poiché non viene ubiquitinata, si lega agli IRE della ferritina. Questo legame impedisce che l'mRNA venga trascritto e quindi prodotta la proteina (Daniels et al. 2006).

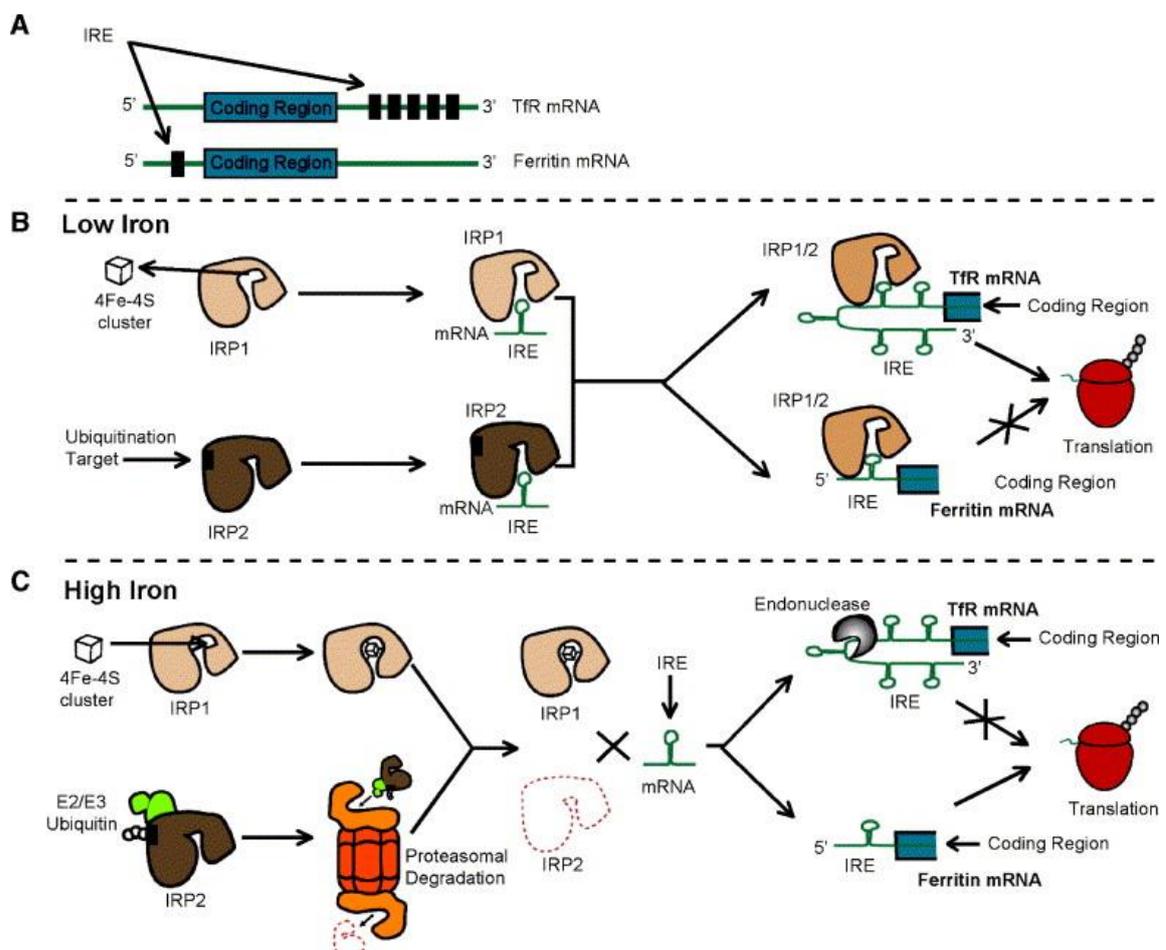


Figura 3. Schema della regolazione dell'espressione del TFR-1 e della ferritina al variare della concentrazione di Fe. (A) l'espressione di entrambe le proteine è una regolazione post trascrizionale influenzata dal legame di IRP1 e IRP2 alle regioni IRE presenti sugli mRNA del TFR-1 e della ferritina. (B) condizione di bassa concentrazione di ferro

intracellulare, il cluster 4Fe-4S si dissocia da IRP1 permettendo il legame con IRE e IRP2 non viene ubiquitinata. Il legame tra IRP1 e IRP2 permette la trascrizione e traduzione di TFR-1 mentre il blocco della produzione di ferritina. (C) condizione di elevate concentrazione di ferro. Il cluster 4Fe-4S non si stacca da IRP1, IRP2 è ubiquitinata e quindi degradata. IRP1 non si lega a IRE dell'mRNA del TFR-1 e quindi non si ha traduzione con produzione di TFR-1, si ha invece traduzione della ferritina (Daniels et al. 2006).

1.6 Espressione e Ruolo del TR-1 nelle Neoplasie Umane

Il ferro è un elemento necessario per le cellule in quanto è implicato in funzioni essenziali come, ad esempio, la proliferazione cellulare. L'organismo, per assumere tale ione, usa il recettore TFR-1, che è presente sulla membrana cellulare di tutte le cellule dell'organismo. Le cellule dello strato basale dell'epidermide o dell'epitelio intestinale e di tutti quei tessuti con un elevato tasso di proliferazione, hanno la necessità di grandi quantitativi di nutrienti per sopperire alle richieste del loro metabolismo e quindi, hanno sulla loro superficie un maggior numero di recettori TFR-1 rispetto alle altre cellule dell'organismo (Candelaria et al. 2021). Il recettore è stato riscontrato anche in cellule eritroidi immature e nel tessuto placentare. Entrambi queste cellule sono comunque sempre cellule ad elevato tasso di proliferazione (Testi, Boffi, and Montemiglio 2019).

Tra tutte le cellule con un elevato livello di proliferazione cellulare, le cellule cancerose sono una parte. Il TFR-1, è espresso maggiormente in svariati tessuti neoplastici, se confrontati con la propria controparte sana. Un esempio per l'essere umano sono il tumore all'esofago, il tumore al fegato, al colon, le neoplasie al polmone, il tumore all'ovaio e alla prostata e per alcuni di questi, come per il tumore alla mammella della donna, il TFR-1 può fungere anche da fattore prognostico (Shen et al. 2018). Per quanto concerne il tumore alla mammella, uno studio recente dimostra che all'interno del tumore al seno di donna, il TFR-1, non solo è più espresso rispetto al tessuto sano, ma la sua espressione aumenta all'aumentare del grado di malignità (Singh et al. 2011).

Grazie all'aumentata espressione del TFR-1, le cellule tumorali hanno un importante vantaggio metabolico poiché riescono ad ottenere una maggior concentrazione intracellulare di ferro. Tale ione viene utilizzato dalle cellule cancerose come fonte di energia per una proliferazione cellulare più rapida, con la conseguenza di una capacità maggiore delle cellule di invadere tessuti circostanti e di metastatizzare. Livelli elevati di ferro vengono sfruttati dalle cellule neoplastiche anche per ottenere un silenziamento per feedback dei geni pro-apoptotici come il p53. Con un'elevata concentrazione intracellulare di ferro, la produzione di radicali liberi aumenta, incrementando lo stress ossidativo in cui versa la cellula. Nelle cellule tumorali la proliferazione cellulare è aumentata anche perché l'elevata concentrazione intracellulare di ferro va ad alterare inattivando, la via metabolica delle tirosinfosfatasi pRB e proteina p21/cdk- n1a (Shen et al. 2018).

1.7 TFR-1 negli Animali

Sono estremamente rari i lavori scientifici che valutano l'espressione del TFR-1 negli animali e in particolare negli animali da compagnia. Priest et al, nel 2011, hanno iniziato ad indagare l'espressione del recettore nel cane, analizzando diverse tipologie di linfomi. Da questo studio è emerso come il TFR-1 è espresso in maniera differente in base al tipo e al grado di linfoma, sottolineando una maggior espressione del recettore all'aumentare del grado tumorale (Priest et al. 2011).

Successivamente a questo studio, si è accesa l'attenzione su questo recettore andando ad investigare la sua presenza anche in altre tipologie tumorali, trovando nel cane una maggiore espressione del recettore nelle cellule neoplastiche del tumore al cervello, del melanoma o del carcinoma squamoso, rispetto a quelle sane (De Vico et al. 2020). Parlando poi del tumore mammario del cane e del gatto, in letteratura è presente solamente un lavoro che valuta l'espressione del recettore in lesioni benigne e maligne (O Marques et al. 2017). Negli animali, inoltre, il TFR-1 è stato indentificato in tutte quelle cellule per le quali il Parvovirus ha tropismo, in quanto tale virus usa il TFR-1 per entrare nelle cellule (Parker et al. 2001).

I dati presenti in letteratura sull'espressione del TFR-1 negli animali sono ancora preliminari, tuttavia confermano il fatto che anche negli animali il recettore ha un livello di espressione maggiore nei tessuti tumorali rispetto alla controparte sana. Questo aspetto pone le basi per indagare più nel dettaglio questo recettore per cercare di poterlo sfruttare, anche negli animali, come un *gate* selettivo per trasportare all'interno delle sole cellule neoplastiche farmaci antitumorali(Daniels et al. 2012).

1.8 Nuove Terapie Antitumorali: il TFR-1 come Nuovo Target

La ricerca oncologica umana ha come obiettivo quello di trovare una cura efficace e mirata contro le cellule neoplastiche. La selettività permette così di attaccare solamente le cellule cancerose evitando danni alle cellule e ai tessuti sani. È stato riconosciuto che le cellule neoplastiche hanno un'espressione maggiore di determinati recettori rispetto alle cellule sane. Il TFR-1, essendo uno di questi, negli ultimi decenni è diventato un ottimo target per una terapia selettiva e specifica contro il cancro.

In medicina umana vengono impiegate diverse tipologie di trattamenti che sfruttano l'overespressione del TFR-1 (Shen et al. 2018; Sun et al. 2014). Queste cure si basano su due diversi approcci.

Il primo approccio, ormai quasi del tutto inutilizzato, definito come "via diretta", cercava di inibire il recettore TFR-1 tramite anticorpi specifici, bloccando l'intake di ferro e di conseguenza l'approvvigionamento di nutrienti per la cellula. Gli anticorpi anti-TFR-1 che venivano usati erano di due tipologie. I primi erano detti "neutralizzanti", ovvero molecole che, legandosi al recettore, impedivano la formazione del complesso TFR-1/Tf-Fe. I secondi, invece "non neutralizzanti", permettevano il legame tra Tf e TFR-1, con la conseguente internalizzazione del recettore ma andavano ad agire interferendo con il ciclo del Fe favorendo la degradazione del TFR-1. L'aspetto in comune tra le due diverse tipologie di anticorpi era il fatto di ridurre l'intake di Fe da parte della cellula, privandola così dei nutrienti necessari per la sopravvivenza, rendendola più sensibile ai vari farmaci antitumorali e favorendo inoltre una maggiore attivazione della cascata delle caspasi con la conseguenza di un più elevato tasso di apoptosi (Candelaria et al. 2021).

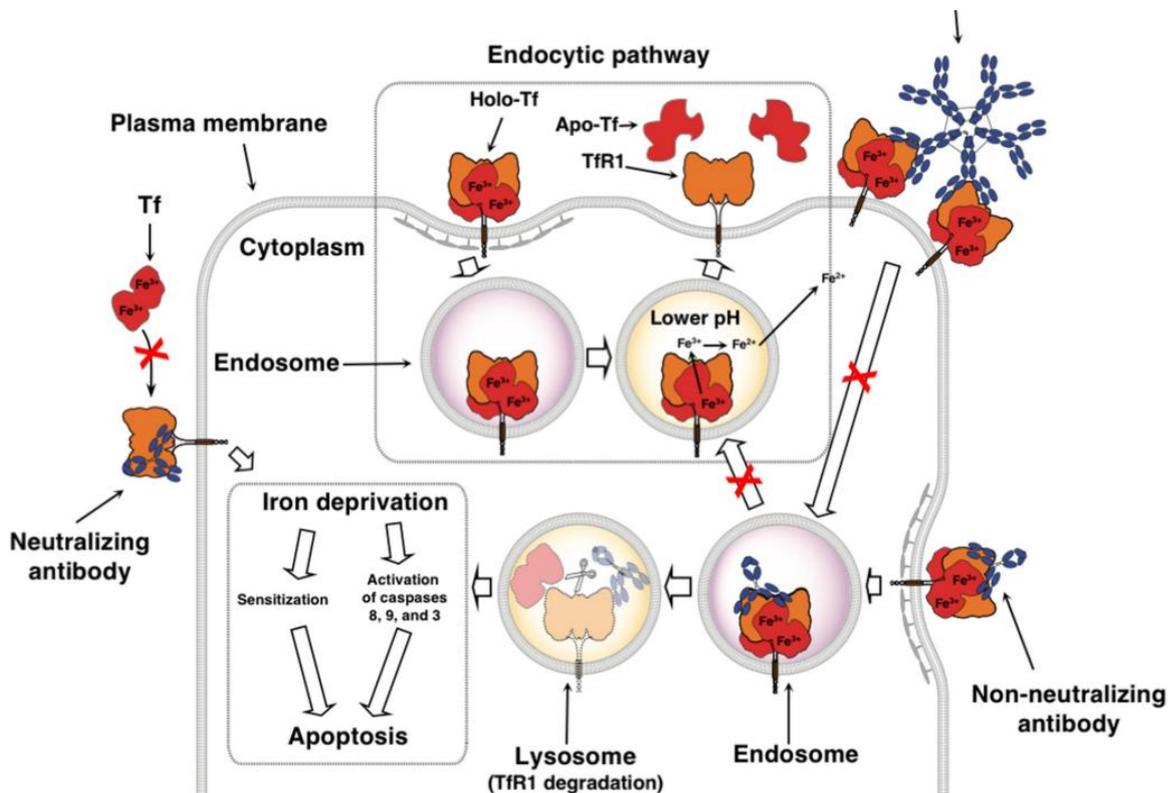


Figura 4. Rappresentazione schematica della via "diretta". Si possono identificare gli anticorpi "neutralizzanti" e "non neutralizzanti" e il loro meccanismo di azione (Candelaria et al. 2021).

Il secondo approccio, invece, è definito come “indiretto” e prevede di non bloccare il recettore, ma di sfruttarlo come un varco per internalizzare all’interno della cellula farmaci che vengono veicolati attraverso *carrier* (Candelaria et al. 2021).

La letteratura evidenzia come negli ultimi anni ci sia stata una maggior propensione all’utilizzo della strategia definita “indiretta”, in quanto la terapia del *drug delivery* è una tecnica più selettiva e permette di ridurre gli effetti collaterali salvaguardando tutte le cellule sane (Daniels et al. 2012). I ligandi del TFR-1, Tf, ferritina, sono sfruttati come *carrier*. A queste molecole, tramite un legame labile e sensibile al pH acido, si legano diverse sostanze come farmaci antitumorali, tra i quali si annoverano Doxorubicina, Adrimicina, o Cisplatino, ma vi è la possibilità anche di poter legare tossine derivanti da batteri, vegetali o funghi, creando in questo modo delle immunotossine, oppure delle ribonucleasi (Rybak et al. 1991; Zabielska-Koczywas and Lechowski 2017). Tra le tossine più utilizzate sono da menzionare quelle vegetali come la saponina, derivante dalla pianta *Saponaria Officinalis*, o la Gelonina. Per quanto riguarda invece le tossine batteriche è stato utilizzato *Pseudomonas aeruginosa*, o la tossina difterica prodotta dal *Corynebacterium Diphtheriae*. Non per ultima è stata usata anche come tossina funginea la restrictocina (Candelaria et al. 2021; Daniels et al. 2012).

Anche i liposomi sono stati utilizzati come vettori. All’interno di queste molecole a doppio strato lipidico sono stati caricati farmaci, ma recentemente anche vettori virali modificati in grado di agire direttamente nel nucleo della cellula. Queste nanoparticelle lipidiche sono state utilizzate anche recentemente nella pandemia causata da Covid-19. I liposomi, infatti sono stati utilizzati per la creazione dei vaccini Pfizer/Biontech e Moderna; grazie al loro doppio strato lipidico svolgono la funzione di proteggere l’ mRNA virale permettendo all’organismo di instaurare la reazione anticorpale. Questa loro funzione sottolinea come questa tecnologia sia estremamente importante non solo per il *drug delivery* ma possa essere sfruttata anche come profilassi per la cura e la prevenzione di malattie pandemiche una su tutti Covid-19 (Cardoso et al. 2020). Per quanto concerne il *drug delivery*, inoltre, i liposomi hanno la possibilità di legare sulla loro superficie la transferrina o la ferritina. In questo modo la terapia contro il cancro diventa sempre più selettiva (Zabielska-Koczywas and Lechowski 2017; Harris et al. 2002). L’utilizzo dei liposomi coniugati con queste due molecole ha permesso di ridurre ulteriormente l’eventuale citotossicità legata ai *carrier*. Transferrina e ferritina sono infatti molecole presenti fisiologicamente nell’organismo e quindi biocompatibili.

1.9 La Nanocage di Ferritina

Negli ultimi decenni la nanotecnologia, disciplina che prevede l’utilizzo, in campo biomedico, di molecole ingegnerizzate, sta acquisendo sempre più importanza, tanto da affiancare sempre di più l’oncologia. I materiali utilizzati definiti con il termine di nanoparticelle hanno dimensioni che variano dai pochi nanometri fino a diverse centinaia (Farokhzad and Langer 2009). Alcune di queste molecole come i liposomi, caricati con la Doxorubicina, sono già entrati nella pratica clinica. La loro caratteristica principale è quella di legarsi selettivamente al TFR-1, recettore overespresso sulle cellule tumorali, e quindi essere più selettivi nei confronti delle cellule cancerose riducendo la cardiotossicità alle cellule sane (Xing et al. 2015). I liposomi, tuttavia, presentano dei limiti come, ad esempio, una limitata dose caricabile di farmaci e il fatto che per essere selettivi hanno la necessità di aver legato alla loro superficie il ligando specifico per il TFR-1. Questo legame potrebbe non essere sufficientemente stabile riducendo la selettività del *carrier* per le cellule cancerose che overesprimono il TFR-1. Per questi motivi la nanotecnologia si sta concentrando sul creare una nanoparticella in grado di legarsi direttamente al recettore. Una possibile soluzione potrebbe essere

quella di utilizzare come proteina la ferritina. Tale molecola è una proteina non tossica per l'organismo in quanto presente fisiologicamente all'interno del corpo. Ha una struttura formata da 24 subunità, 12 catene pesanti (HF_n) e 12 catene leggere (LF_n). Tali subunità sono auto assemblate in una sfera con un diametro esterno di 12 nm e con una cavità interna di 8 nm (Bhushan et al. 2014). Nello spazio interno di questa proteina è possibile caricare diverse sostanze, tra cui farmaci antitumorali. È stata infatti creata una nanocage di catene pesanti di ferritina con all'interno caricato il farmaco antitumorale Doxorubicina (HF_n(DOX)) (Bellini et al. 2014). Questa nanocage è stata utilizzata come vettore specifico nei confronti del TFR-1. Le catene pesanti di ferritina, infatti, si legano direttamente al TFR-1, il quale è stato dimostrato essere overespresso sulle sole cellule tumorali (Palombarini et al. 2020). HF_n(DOX) agisce come un vero e proprio “cavallo di Troia”. La nanocage, internalizzata dalla cellula tramite il fisiologico *intake* di ferro, cela il farmaco, evitando il problema della chemio resistenza e lo rilascia quando essa è all'interno del citoplasma. Il farmaco trovandosi direttamente nel citoplasma può agire più efficacemente provocando un danno nucleare maggiore. Il composto HF_n(DOX) è stato testato su linee cellulari di tumore mammario al seno di donna e i risultati hanno evidenziato una maggiore efficacia della terapia tramite la nanocage rispetto alla sola somministrazione del farmaco libero (Serena Mazzucchelli et al. 2017; Bellini et al. 2014).

La doxorubicina può essere caricata all'interno della nanocage di ferritina mediante due diversi meccanismi (Fig5). Il primo metodo prevede di far incubare la ferritina direttamente in una soluzione satura di farmaco. Per gradiente di concentrazione si assiste al passaggio del farmaco dalla soluzione alla nanocage attraverso i pori tra le catene pesanti e leggere della proteina. Questa metodica presenta però degli svantaggi: i pori hanno un diametro fisso e quindi non è possibile far passare molecole di grandi dimensioni. Per questi motivi la tecnica più utilizzata prevede di sfruttare la capacità di “memoria” delle catene pesanti di ferritina. A valori di pH bassi tali catene si aprono e successivamente, riportando il pH alla neutralità, si autoassemblano ritornando alla forma sferica. Incubando la nanocage in una soluzione contenente il farmaco e variando il pH è stato dimostrato che, alla fine della fase di auto assemblamento, all'interno della nanocage era stato inglobato il farmaco (Bellini et al. 2014; Truffi et al. 2016).

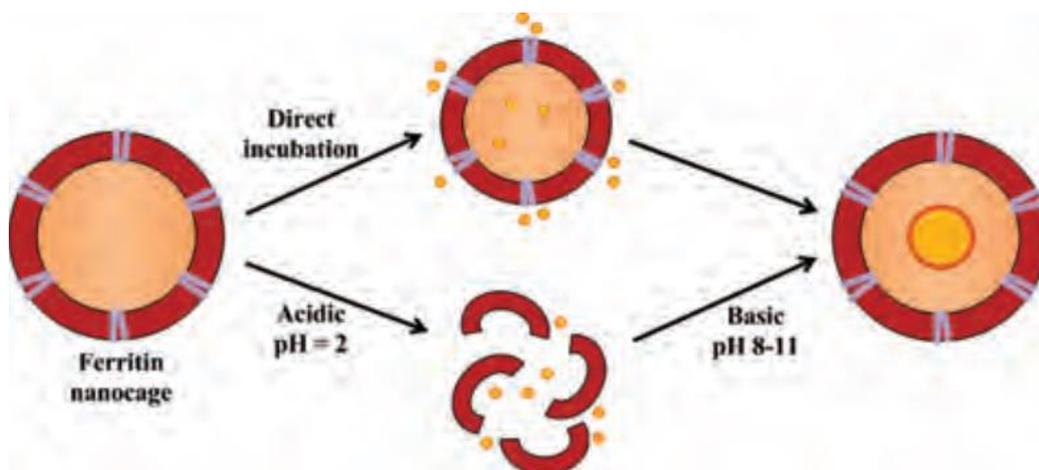


Figura 5. Schema delle due diverse modalità di caricamento dei farmaci all'interno della nanocage di ferritina. Incubazione diretta e passaggio della sostanza all'interno della nanocage per gradiente di concentrazione. Variazione di pH, si sfrutta la capacità di “memoria” delle catene pesanti di ferritina (Bhushan et al. 2014).

Il TFR-1 viene riconosciuto come detto anche dalla transferrina; tuttavia, per gli studi è stata scelta la ferritina come proteina per creare un vettore specifico, vista la sua facilità di produzione e di

costruzione. Tale proteina, infatti, è facilmente sintetizzabile in laboratorio in quanto può essere prodotta in *Escherichia coli* e purificata a 80°C ed è facile da modificare inserendo sulla superficie dei recettori per specifici target tumorali oltre anche al TFR-1, come è accaduto anche per le cellule del carcinoma epatocellulare riconosciute dal recettore GRP78 (He, Fan, and Yan 2019).

La nanocage di ferritina, oltre ad essere caricata con farmaci antitumorali, ha il vantaggio di essere utilizzata anche come mezzo di diagnostica tumorale: è stata caricata con sostanze per l'*imaging* in risonanza magnetica, così come anche per radio e chemioterapia.

È stato dimostrato che tutti i farmaci che hanno un'elevata tendenza a legarsi ai metalli, hanno un'ottima possibilità di poter essere caricati nella nanocage di ferritina. Alcuni esempi, oltre alla doxorubicina, sono il chemioterapico cisplatino e deferoxmina e olaparib. Quest'ultimo è stato testato in confronto al farmaco libero e si è dimostrato come il farmaco caricato sulla nanocage abbia un effetto di circa 1000 volte maggiore rispetto al farmaco libero in cellule umane di tumore al seno di donna triplo negativo (S Mazzucchelli et al. 2017).

Tutti questi dati suggeriscono che la nanocage di ferritina sia un ottimo *carrier* per internalizzare diverse sostanze all'interno delle sole cellule tumorali sia per cercare un trattamento ma anche per una diagnosi tumorale precoce.

Questa nuova tecnologia però è stata testata solo in medicina umana. Non sono presenti studi che vadano a testare tale composto nell'oncologia veterinaria. Questo "vuoto" scientifico deve essere colmato e il progetto di dottorato cerca di inserirsi in questo contesto, per poter utilizzare questa innovativa e alquanto soddisfacente terapia anche per la cura di uno dei tumori più aggressivi e frequenti che colpiscono gli animali da compagnia, il tumore mammario.

2. OBIETTIVI

Considerata la potenziata espressione del recettore per la transferrina di tipo 1 (TFR-1) nelle cellule neoplastiche, l'obiettivo del progetto di dottorato è quello di approfondire la conoscenza del TFR-1 in ambito oncologico in alcune specie animali, al fine di poterlo utilizzare come *gate* selettivo per l'ingresso nelle cellule tumorali di *carriers* caricati con farmaci antitumorali.

Il progetto di studio pertanto è stato suddiviso in due fasi:

2.1 PRIMA FASE: Valutazione Espressione TFR-1 negli Animali

Nella letteratura scientifica sono poche le informazioni relative alla valutazione dell'espressione del TFR-1 nelle specie animali; pertanto, la prima fase è stata quella di verificare la presenza del recettore in tessuti sia sani che tumorali e in colture cellulari provenienti da gatto e cane. In seguito alla verifica della presenza del recettore nei tessuti e sulle linee cellulari si è proceduto alla quantificazione del recettore all'interno di tumori spontanei di gatto e cane per verificare se, così come accade nell'uomo, anche in veterinaria, all'aumentare del grado di malignità tumorale, aumenta l'espressione genica e proteica del recettore stesso.

2.2 SECONDA FASE: Valutazione dell'efficacia Terapeutica di una Nanocage di Ferritina

Nella medicina oncologica umana l'aumentata espressione del TFR-1 nei tessuti tumorali rispetto alla controparte sana, è stata sfruttata per ottenere una cura antitumorale innovativa, selettiva ed efficace. Sono state costruite, infatti, molecole *carriers* ingegnerizzate, che sono in grado di legarsi selettivamente solo al TFR-1 e sono state caricate con farmaci antitumorali.

L'Università degli Studi di Milano Bicocca (prof. D. Prosperi, Dip. di Biotecnologie e Bioscienze) con uno studio del 2014 ha sviluppato una nanocage, formata da catene pesanti di ferritina (HF_n), proteina riconosciuta dal TFR-1, che racchiude al suo interno il farmaco antitumorale doxorubicina (HF_n(DOX)) e ha testato il composto su linee cellulari di cancro al seno della donna con risultati molto soddisfacenti (Bellini et al. 2014).

In letteratura, non sono presenti studi che valutano l'efficacia di tali composti nelle specie animali quindi grazie alla collaborazione con il gruppo di ricerca del prof. Prosperi, è stato possibile sviluppare il secondo obiettivo del progetto: valutare in linee cellulari di tumore mammario di gatto e di cane, se il composto HF_n(DOX) ha un effetto terapeutico maggiore rispetto all'utilizzo del solo farmaco. Questo progetto preliminare potrebbe in un futuro portare alla scoperta di una cura più selettiva e più efficace per un tumore molto frequente negli animali da compagnia e ovviare agli effetti collaterali dovuti alla somministrazione di solo chemioterapici come la doxorubicina.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campioni Selezionati

La valutazione dell'espressione del TFR-1 e dell'efficacia del trattamento con (HF_n(DOX)), è stata eseguita su due specie animali, nello specifico gatto e cane. Per entrambe le specie sono state usate due diverse matrici:

- Linee cellulari di tumore mammario di gatto e cane; gentilmente offerte dalla professoressa Raffaella De Maria del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Torino.
- Tessuti di ghiandola mammaria neoplastica di gatto e cane, derivanti dall'archivio del Servizio Diagnostico di Patologia Veterinaria del Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione (Università di Padova).

3.1.1 Linee Cellulari

3.1.1.1 Gatto

FMCm (*Feline metastatic mammary cancer*) è una linea cellulare di tumore mammario di gatto. La lettera "m" indica che la linea deriva da una metastasi al linfonodo inguinale di un gatto con un carcinoma semplice (Rina Uyama et al. 2005).

FMCm è stata coltivata nel terreno di coltura Gbco® Advance RPMI 1640 1X (Thermo Fisher Scientific, Waltham; MA, USA), al quale è stato aggiunto 10% di siero fetale bovino (FBS, PAN™ BIOTECH, Aidenbach, Germany), 1% di penicillina/streptomycina (Corning® 100 mL Penicillin-Streptomycin, 100X, Corning, NY, USA). La linea cellulare è stata incubata in atmosfera umidificata con temperatura costante di 37°C e con il 5% di CO₂.

3.1.1.2 Cane

Per il cane sono state selezionate due linee di tumore mammario di cane, CIPp (*Canine primary mammary cancer*), CIPm (*Canine metastatic mammary cancer*). Le lettere "p" ed "m", indicano, rispettivamente, linea cellulare derivante dalla massa primaria alla ghiandola mammaria, e linea cellulare proveniente da una metastasi al linfonodo regionale da carcinoma mammario (R. Uyama et al. 2006).

CIPp e CIPm, sono state coltivate con gli stessi terreni di coltura utilizzati per le linee cellulari di gatto descritti in precedenza.

In questo studio, inoltre, sono state utilizzate come controllo positivo per confermare la presenza del TFR-1, due linee cellulari di cancro al seno; nello specifico MCF-7 e MDA-MB-231. Tali linee sono state ottenute da American Type Culture Collection (ATCC), e sono linee che derivano da un adenocarcinoma mammario (MCF-7) e da un'effusione pleurica di una metastasi di un adenocarcinoma mammario (MDA-MB-231). Come terreno di coltura è stato usato Gibco® Dulbecco's Modified Eagle Medium 1X (DMEM, Thermo Fisher Scientific, Waltham; MA, USA) con l'aggiunta del 10% di siero fetale bovino (FBS, PAN™ BIOTECH, Aidenbach, Germany), 1% di penicillina/streptomycina (Corning® 100 mL Penicillin-Streptomycin, 100X, Corning, NY, USA).

Tutte le linee cellulari al raggiungimento della confluenza desiderata sono state staccate dalla fiasca di coltura utilizzando 0.25% di tripsina-acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) (Gbco® trypsin-EDTA 1X, Thermo Fisher Scientific, Waltham; MA, USA).

3.1.2 Tessuti Tumoriali

I campioni di tessuto neoplastico del gatto e del cane sono stati ricavati dall'archivio del Servizio Diagnostico di Patologia Veterinaria del Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione (Università di Padova).

I campioni provenivano da animali che a seguito della diagnosi clinica di tumore mammario, sono stati sottoposti alla rimozione chirurgica della massa. Poiché queste procedure sono una normale attività clinica ospedaliera per ottenere questi campioni non è stato necessario chiedere un'approvazione etica. Il tessuto prelevato dall'animale è stato fissato in formalina al 10%, incluso in paraffina (FFPE) e colorato con ematossilina eosina. La valutazione istopatologica è stata effettuata da due patologi, per classificare la neoplasia e fornirne il *grading* durante la visita clinica.

3.1.2.1 Tessuto di Gatto

Dall'archivio sono stati selezionati 27 campioni di tessuto ghiandolare mammario e i linfonodi tributari. I campioni, basandosi sulla classificazione proposta dalla World Health Organisation (WHO), recentemente aggiornata (Zapulli et al. 2019), sono stati suddivisi nelle seguenti 4 categorie:

- Tessuto derivante da ghiandola mammaria sana (*healthy tissue* HT), 8 casi;
- Tessuto derivante da carcinoma mammario che non ha sviluppato metastasi (*feline mammary carcinoma without lymph node metastasis* N0 FMCs), 7 casi;
- Tessuto derivante da carcinoma mammario che ha sviluppato metastasi (*feline mammary carcinoma with lymph node metastasis* N+ FMCs), 7 casi;
- Tessuto derivante da metastasi al linfonodo dei tumori del gruppo precedente (*lymph node metastasis* LM), 6 casi.

3.1.2.2 Tessuto di Cane

Per quanto concerne il cane sono stati presi in considerazione 40 campioni che, in base alla classificazione proposta da Goldschmidt et al. del 2011, sono stati suddivisi nelle seguenti categorie (Goldschmidt et al. 2011):

- Tessuto derivante da adenoma semplice, 5 casi;
- Tessuto derivante da adenoma complesso, 5 casi;
- Tessuto derivante da carcinoma semplice di I grado, 5 casi;
- Tessuto derivante da carcinoma semplice di II grado, 5 casi;
- Tessuto derivante da carcinoma complesso di I grado, 5 casi;
- Tessuto derivante da carcinoma complesso di II grado, 5 casi;
- Tessuto derivante da carcinoma e mioepitelioma maligno, 5 casi;
- Tessuto derivante iperplasia lobulare della ghiandola mammaria, 5 casi.

3.2 Estrazione Proteica e Western Blotting

L'anticorpo monoclonale di topo contro il TFR-1 umano (clone H68.4 Thermo Fisher Scientific numero di catalogo 13-6890), utilizzato in questo lavoro non era mai stato testato sulle specie canina e felina, e in letteratura non sono presenti studi che dimostrino una cross reazione dell'anticorpo nei confronti del TFR-1 degli animali. Questo aspetto ci ha obbligati, come prima azione, a verificare attraverso Western Blotting (WB) la cross-reattività di tale anticorpo per queste specie animali.

Sono stati estratti, da tutte le linee cellulari, 20 ng di proteine; l'estrazione è stata eseguita usando un buffer di lisi (RIPA buffer, Thermo Fisher Scientific, Waltham; MA, USA), un inibitore delle proteasi (Sigma Aldrich, St. Luis, MO, USA), e la quantificazione mediante il kit commerciale

(Pierce BCA™, Thermo Fisher Scientific, Waltham; MA, USA). Successivamente, tali proteine sono state denaturate a 95°C per 5 minuti e caricate in un gel di NuPAGE a gradiente da 4% a 12% Bis-tris gel (Thermo Fischer Scientific). Il tutto è stato trasferito su una membrana di nitrocellulosa dove i siti aspecifici sono stati bloccati aggiungendo latte in polvere al 5% risospeso nel buffer salino (TBS) con l'aggiunta dello 0.05% di Twenn-20 (TBS-T). Dopo 1 ora di incubazione a temperatura ambiente, la membrana è stata incubata per 1 notte a 4°C con l'anticorpo primario contro il TFR-1 (clone H68.4 Thermo Fisher Scientific numero di catalogo 13-6890) alla diluizione di 1:300. Per avere un controllo interno, la membrana è stata incubata anche con un anticorpo housekeeping contro la beta-actina ((C4) sc-47778 Biotechnology, Dallas, TX, USA), diluito 1:1000.

L'anticorpo secondario anti-topo coniugato con la perossidasi (GE Helathcare Life Science, Buckinghamshire, UK) è stato diluito 1:3000 ed incubato per 1 ora a temperatura ambiente.

La cross-reattività nei confronti delle specie canina e felina è stata dimostrata utilizzando Ibright 1500 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) attraverso un kit a chemiluminescenza (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA).

3.3 Immunoistochimica

I campioni FFPE di tumore mammario di cane e gatto, selezionati per questo studio, sono stati utilizzati per la valutazione sia qualitativa che quantitativa dell'espressione proteica su tessuto del TFR-1. L'immunoistochimica (IHC) è stata eseguita sia sui tessuti di cane sia su quelli di gatto utilizzando lo stesso protocollo operativo, la sola differenza tra le due specie è riscontrabile nella diversa diluizione dell'anticorpo primario.

L'IHC è stata eseguita su sezioni di 4 µm, utilizzando un coloratore semiautomatico (Ventana Benchmark XT, Roche-Diagnostic), il quale è in grado di aliquotare in modo automatico sia tutti i reagenti necessari, sia di eseguire la controcolorazione finale con ematossilina. L'unico intervento manuale effettuato dall'operatore è quello relativo all'aggiunta dell'anticorpo primario. L'anticorpo secondario e il polimero utilizzato per la visualizzazione della reazione anticorpale mediante horseadish peroxidase (HRP) erano presenti nel kit (UltraView Universal DAB, Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ, USA).

L'anticorpo utilizzato è stato un monoclonale di topo contro il TFR-1 umano (clone H68.4 Thermo Fisher Scientific numero di catalogo 13-6890). Le diluizioni utilizzate sono state 1:25 per i tessuti di gatto e 1:100 per i tessuti di cane. L'anticorpo è stato incubato per 32 minuti ad una temperatura di 37°C. Nella letteratura il TFR-1 è espresso nella placenta; come controllo positivo è stato usato un tessuto derivante da tale organo (Priest et al. 2011). Come controllo negativo, invece è si è deciso di usare un tessuto di linfonodo al quale non è stato aggiunto l'anticorpo secondario.

La conta cellulare, eseguita manualmente, prevedeva di contare 100 cellule in 10 campi a 40X, scelti in modo casuale sul vetrino, valutando la positività sia citoplasmatica che di membrana e assegnando per ogni cellula un valore da 0 a 3 in base all'intensità di segnale (0=cellule negative, 1=cellule debolmente positive, 2=cellule mediamente positive, 3=cellule altamente positive).

La valutazione immunoistochimica semiquantitativa si è basata sull'utilizzo dell'indice di valutazione H-score. Questo parametro prende in considerazione la somma delle percentuali delle cellule debolmente positive, la percentuale di cellule mediamente positive moltiplicata per due, la percentuale di cellule altamente positive moltiplicata per 3. In questo modo per ogni campione è possibile ottenere un range di valori compreso da 0 e 300 (Peña et al. 2014a).

3.4 Immunofluorescenza

La valutazione proteica del TFR-1 sulle linee cellulari FMCm, CIPp e CIPm è stata valutata qualitativamente attraverso l'immunofluorescenza (IF). 25.000 cellule sono state piastrate su un vetrino posizionato all'interno di una piastra a 24 pozzetti fino al raggiungimento dell'80% di confluenza. Le cellule sono state lavate con PBS e fissate al vetrino mediante paraformaldeide al 4% e permeabilizzate con 0.1% di Triton-X-100 (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA). Tutti i siti aspecifici sono stati bloccati aggiungendo 1% di albumina fetale bovina (BSA, Sigma- Aldrich, St Louis, MO, USA),

L'anticorpo primario utilizzato è il medesimo usato per l'IHC, diluito per entrambe le specie animali 1:250. Dopo 3 ore di incubazione, è stato aggiunto l'anticorpo secondario coniugato con un fluoroforo alla diluizione di 1:2000 (AlexaFluor® 555, Thermo Fischer Scientific). Il tutto è stato lasciato incubare a temperatura ambiente per 45 minuti. La positività al TFR-1 è stata valutata osservando una colorazione rossa citoplasma/membranaria utilizzando un microscopio a fluorescenza (Leica DM 4000B), equipaggiato con una fotocamera Leica DC300F.

3.5 Immunocitochimica

Le linee cellulari CIPp e CIPm sono state utilizzate per la valutazione dell'espressione proteica del TFR-1 mediante tecnica di immunocitochimica (ICC). 25.000 cellule sono state seminate su un vetrino posizionato all'interno di una piastra a 24 pozzetti. Dopo 2 giorni al raggiungimento di circa l'80% di confluenza le cellule sono state fissate al vetrino mediante l'aggiunta di una soluzione 1:1 di metanolo e acetone per 5 minuti. Successivamente il vetrino è stato stoccato per almeno 24 ore a -20°C. l'ICC è stata eseguita da un coloratore semiautomatico (Ventana Benchmark XT, Roche-Diagnostic). L'anticorpo primario usato anti TFR-1 (clone H68.4 Thermo Fisher Scientific numero di catalogo 13-6890) è stata diluito 1:100 e aggiunto manualmente così come la controcolorazione con ematossilina. L'anticorpo secondario e il polimero utilizzato per la visualizzazione della reazione anticorpale mediante horseadish peroxidase (HRP), invece, erano gli stessi utilizzati per l'IHC e presenti nel kit (UltraView Universal DAB, Ventana Medical Systems, Oro Valley, AZ, USA), sono stati dispensati dal coloratore.

3.6 Citometria a Flusso

La Citometria a flusso (FC) è stata utilizzata per valutare qualitativamente l'espressione proteica del TFR-1 su FMCm, CIPp, CIPm. L'FC è stata eseguita su 500.000 cellule risospese in 50 µL di RPMI 1640 addizionato con sodio azide e FBS (1000 cells/µL) su tre replicati biologici. Il TFR-1 è transmembranario, quindi è stato necessario permeabilizzare le cellule mediante l'aggiunta di FoxP3 (Thermo Fischer Scientific, Waltman, MA, USA). Il protocollo per questa tecnica prevedeva di incubare per 1 ora le cellule con lo stesso anticorpo utilizzato per l'IF, diluito 1:100 e successivamente aggiungere come anticorpo secondario (anti-mouse IgG (H+L) Alexa flour® 647) per 45 minuti incubando a 4°C. I campioni poi sono stati lavati con 900 µL di PBS e preparati per l'acquisizione attraverso il citofluorimetro (CyFlow Space (Partec-System, Sysmex Europe GmbH, Nordstedt-Amburgo, Germany) dove sono stati acquisiti per ogni campione 20.000 eventi. I dati sono stati analizzati mediante il software gratuito FCSalyzer (version 0.9.16-alpha) analizzando sia la morfologia (FSC) che la complessità cellulare (SSC). La positività per il TFR-1 è stata identificata utilizzando il canale 5 di fluorescenza vs FSC.

Ad ogni replicato biologico è stata preparata una aliquota di sospensione cellulare dove non è stato aggiunto l'anticorpo secondario. Tale aliquota è stata considerata come controllo negativo per eliminare dall'analisi tutti gli eventuali legami non specifici.

3.7 Espressione Genica Mediante Pcr e Real Time

L'espressione genica del TFR-1 nel cane e nel gatto è stata valutata sulla linea FMCm mediante un'*end point* RT-PCR, mentre sulle linee CIPp e CIPm è stata utilizzata una *quantitative reverse transcription PCR* (RT-qPCR). L'RNA è stato estratto da FMCm, CIPp e CIPm, utilizzando il kit commerciale RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) seguendo il protocollo suggerito dal produttore. Successivamente, 500 ng di RNA sono stati retrotrascritti utilizzando il kit commerciale ReverAid First Strand complementary DNA (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA; USA). Con il software PRIMER-BLAST, National Center for Biotechnology Information (NCBI), sono stati disegnati, sulla giunzione esone-esone, i primer per il gene del TFR-1 (TFRC) per ciascuna specie animale, e per il gene della Beta-actina (ACTB), usato come *housekeeping*.

- TFRC *Felis catus*. Forward: GGTGCCAGTGTCACAAAACC Reverse: ATGCCACATAGCCCTCTGGA
- TFRC *Canis lupus familiaris*. Forward. CTTTGGACATGCTCACCTGG; Reverse: TATGCTGGGCAATCCTGACG.
- ACTB: Forward: GATCAAGATCATCGCACCCCC; Reverse: GCAACTAAAGTAACAGTCCGCC.

Il cDNA derivante dalle linee CIPp e CIPm è stato amplificato utilizzando la mix di reazione PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem, Foster City, CA; USA) all'interno di Stratagene Mx3000 (Agilent Technologies). Per ogni campione è stato preso il rispettivo ciclo soglia (CT) e normalizzato rispetto al CT del gene *reference* ottenendo un ΔCT . La quantificazione relativa dell'espressione genica si è ottenuta utilizzando il metodo denominato $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ e le CIPp sono state considerate come campione di riferimento. L'aumento di espressione genica è stato espresso come *fold change*.

Sul cDNA estratto dalla linea FMCm è stata eseguita, invece, una PCR utilizzando Phire™ Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) Mj research PTC-200 Thermal cycler). Il prodotto di PCR aveva una lunghezza attesa di 529 bp ed è stato visualizzato dopo una corsa elettroforetica su gel al 2% di agarosio.

Tutti gli amplificati ottenuti, sono stati successivamente trattati con il kit Exosap-IT PCR product cleanup (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) per poter essere sequenziati.

Il sequenziamento Sanger è stato eseguito da BMR Genomics (Università di Padova).

3.8 Saggio di Proliferazione Cellulare Post Trattamento con HF_n(DOX)

Per questo lavoro ci è stata gentilmente fornita dall'Università di Milano e in particolare dal gruppo coordinato dal Professore Davide Prosperi, una nanocage formata da catene pesanti di ferritina (HF_n) caricata con il farmaco antitumorale doxorubicina (HF_n(DOX)). La totale biocompatibilità e la bassa tossicità cellulare del composto era già stata valutata in precedenza (Bhushan et al. 2014; Truffi et al. 2016)

L'efficacia sulla proliferazione cellulare di HF_n(DOX) è stata valutata sulle linee cellulari FMCm, CIPp e CIPm, mediante un test di proliferazione cellulare CellTiter 96® AqueousOne Solution *cell proliferation assay* (MTS, Promega, Madison, WI, USA).

FMCm, CIPp, CIPm, sono state quindi testate con diverse concentrazioni di HF_n(DOX), di solo farmaco (DOX), di nanocage non caricata con il farmaco (HF_n) e con il solo terreno di coltura (RPMI). Nello specifico la linea cellulare di gatto, FMCm, è stata trattata con le seguenti concentrazioni: 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, le linee di cane, CIPp e CIPm, oltre alle stesse concentrazioni usate per il gatto sono state testate anche a 5 μ M, 12.08 μ M (solo CIPp), 9.43 μ M (solo CIPm), e 50 μ M. Le due concentrazioni diverse per le linee CIPp e CIPm sono state scelte in quanto corrispondono alla EC₅₀ della doxorubicina per queste linee cellulari (Levi et al. 2021). Tutte le linee cellulari sono state sottoposte a trattamento per 24, 48, 72 ore, e dopo tali periodi sono stati aggiunti 20 μ L di MTS, con successiva incubazione per 1 ora a 37°C. Dopo il periodo di incubazione è stata letta l'assorbanza a 490nm tramite lo spettrofotometro SpectraCount (Packard Instrument, Meriden, CT, USA). Per ogni esperimento sono stati eseguiti 4 replicati tecnici e tre replicati biologici. I dati sono espressi come media e deviazione standard di tali replicati.

3.9 Apoptosi

Si è deciso di quantificare l'apoptosi solo sulla linea cellulare FMCm in quanto dal *proliferation assay* è emerso che la HF_n(DOX) aveva una maggiore efficacia solamente nella specie gatto. A tale scopo 150.000 cellule sono state coltivate in una piastra a 6 pozzetti con il loro terreno di coltura, e sono state trattate con diverse concentrazioni di HF_n(DOX), DOX da sola e RPMI. Le concentrazioni usate sono quelle che sono risultate essere significative al test di proliferazione cellulare. Nello specifico quindi dopo 48 ore post trattamento ad una concentrazione di 0.1 μ M e 72 ore dal trattamento a concentrazione di 0.01 μ M e di 0.1 μ M. È stato usato il kit Annexin V–Fluorescein isothiocyanate (FITC) Apoptosis Detection Kit (eBioscience, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Il protocollo utilizzato è il seguente: sono stati prelevati 200 μ L di sospensione cellulare, poi centrifugati a 1100 rpm per 10 minuti a 4 °C permettendo la formazione di un pellet di cellule. Successivamente sono stati aggiunti 200 μ L di buffer con 5 μ L di annessina V coniugata con il fluoroforo FITC, incubando le cellule per 10 minuti al buio a temperatura ambiente. Dopo il periodo di incubazione le cellule sono state lavate con il buffer di lavaggio e centrifugate nuovamente e dopo l'aggiunta di ulteriori 900 μ L di buffer sono state preparate per l'acquisizione tramite il citofluorimetro CyFlow Space (Partec-System, Sysmex Europe GmbH, Norderstedt-Amburgo, Germany). Mediante il software open source FCSalyzer (version 0.9.16-alpha) sono stati acquisiti e analizzati 20.000 eventi.

3.10 Analisi Statistica

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando Prism 8.0.1 (GraphPad Software). La distribuzione normale dei campioni è stata valutata mediante il test di Shapiro. Quando i campioni superavano tale test per verificare la differenza tra i gruppi è stato applicato il test statistico Anova ad una via con il test a comparazioni multiple di Turkey, in alternativa in caso di distribuzione non normale è stato usato il test Kruskal-Wallis a comparazioni multiple Dunn. Quando il confronto prevedeva solamente due gruppi è stato eseguito il dei T-test. Il livello di significatività è stato fissato a $p < 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 Western Blotting

La tecnica biochimica Western blotting è stata usata per verificare la cross reattività dell'anticorpo monoclonale di topo contro il TFR-1 umano (clone H68.4 Thermo Fisher Scientific numero di catalogo 13-6890) nelle specie canina e felina. La figura 6A mostra una proteina di 90 kDa, corrispondente al peso molecolare atteso del TFR-1, confermando la cross reattività dell'anticorpo nei confronti di queste due specie animali. È inoltre evidente il peso molecolare di 43 kDa della proteina actina-beta usata come housekeeping in FMCm, CIPp, CIPm, MCF-7 e MDA-MB-231 (Fig. 6B).

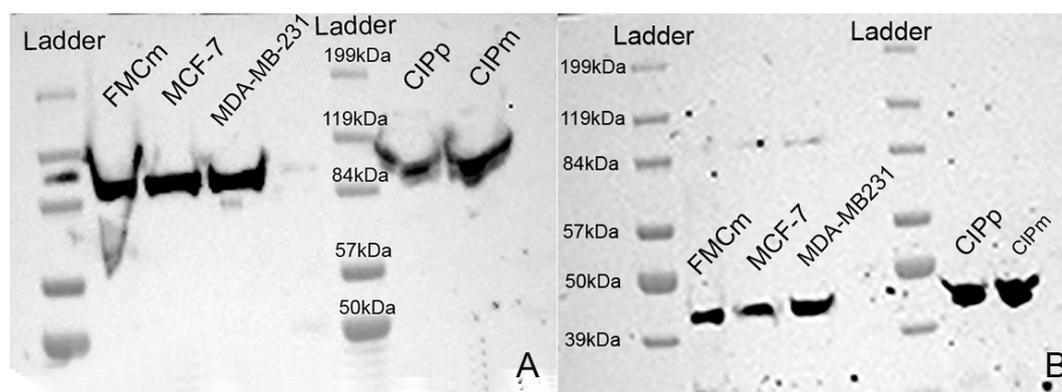


Figura 6. Western blotting per anticorpo contro TFR-1. (A) cross reattività dell'anticorpo sulle proteine estratte da FMCm, MCF-7, MDA-MB-231, CIPp e CIPm. Il TFR-1 si evidenzia come una proteina di 90 kDa. (B) western blotting per il gene housekeeping (beta actina) sulle proteine estratte da FMCm, MCF-7, MDA-MB-231, CIPp, CIPm. la beta actina ha un peso di 43 kDa.

Successivamente alla validazione dell'anticorpo è stato possibile valutare l'espressione del TFR-1 nel gatto e nel cane su cellule e tessuti tramite diverse tecniche.

Verranno trattati nello specifico i risultati di espressioni divisi per specie.

4.2 Valutazione dell'Espressione TFR-1

4.2.1 TFR-1 nel Gatto

I primi risultati dimostrano che il TFR-1 è presente nella specie felina e, nello specifico, è stato possibile evidenziare il recettore sia sui tessuti tumorali e sani sia *in vitro*.

4.2.1.1 Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza evidenzia la presenza del TFR-1 sulle FMCm. Il recettore è ben visibile all'interno del citoplasma e sulla membrana cellulare; colorazione rossa (Fig. 7)

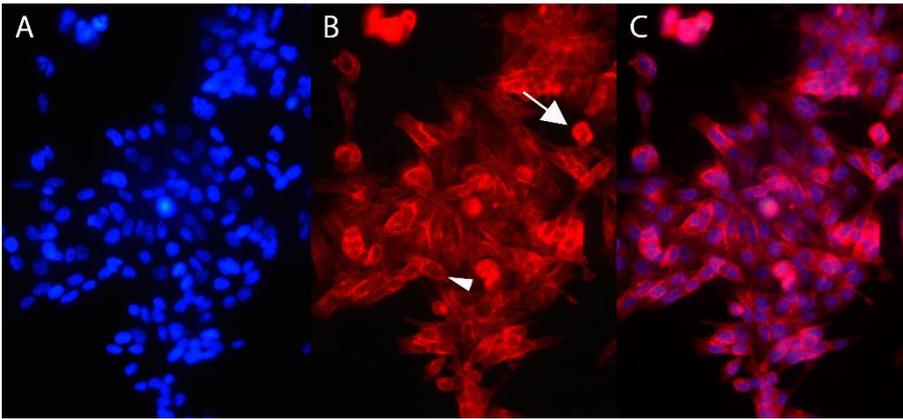


Figura 7. Immunofluorescenza per TFR-1 eseguita sulle FMCm (20X). (A) colorazione DAPI per identificazione dei nuclei. (B) cellule TFR-1⁺, positività a livello di membrana cellulare (testa della freccia) e positività a livello citoplasmatico (freccia). (C) unione delle due immagini precedenti.

4.2.1.2 Citometria a Flusso

L'espressione proteica del TFR-1 è stata dimostrata anche attraverso la citometria a flusso (FC). La figura 8A sottolinea la morfologia cellulare. È possibile evidenziare una distribuzione *a nuvola* delle FMCm, morfologia tipica di cellule a bassa complessità e con forma variabile. Si nota anche come tutte le cellule appartengano alla stessa tipologia cellulare (Fig. 8A). Il 95% degli eventi catturati mostrano una positività per il TFR-1 (Fig. 8B). La specificità dell'anticorpo, invece, è dimostrata dal controllo negativo nella figura 8C.

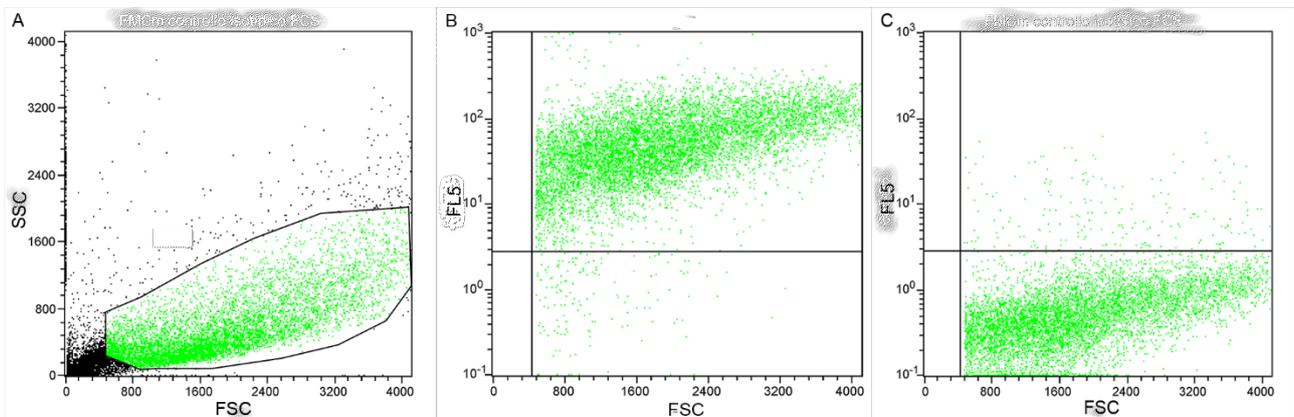


Figura 8. Citometria a flusso per TFR-1 eseguita su FMCm. (A) *morphology scatter plot*, si evidenzia la morfologia delle cellule e la loro distribuzione a nuvola. (B) FSC vs FL5 si evidenziano cellule TFR-1⁺. (C) controllo negativo, cellule TFR-1.

4.2.1.3 Pcr e Sequenziamento

L' RT- PCR eseguita su FMCm evidenzia la presenza di un mRNA della lunghezza attesa 526bp (Fig 9). Il sequenziamento Sanger inoltre conferma che il frammento amplificato appartiene alla specie *Felis catus* avendo il 99% di omologia con la sequenza del TFRC del gatto (identificazione di sequenza (ID) NM_001009312.1).

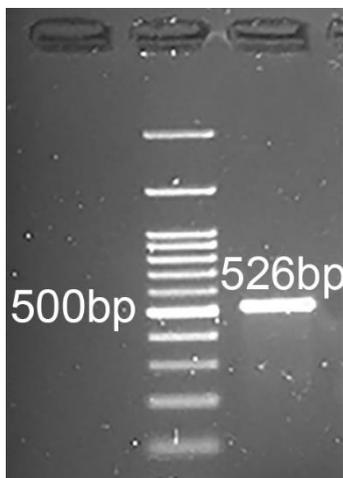


Figura 9. Amplificazione genica mediante RT-PCR del gene del TFR-1 (TFRC) di *Felis catus*. Il frammento amplificato ha una lunghezza, come previsto, di 526 bp.

4.2.1.4 Espressione nei Tessuti, Immunoistochimica

La IHC mostra una positività dei tessuti di gatto nei confronti del TFR-1. È possibile identificare una positività anche nei tessuti sia a livello di citoplasma che di membrana (Fig. 10). Tuttavia, si notano valori diversi nell'intensità di espressione tra i vari campioni e all'interno degli stessi. L'H-score, infatti, mostra un incremento di espressione del livello proteico di espressione tra il tessuto della ghiandola mammaria sana (media $40.07 \pm SD 38.95$) rispetto al tessuto derivante da un carcinoma mammario che ha sviluppato metastasi (media $112.28 \pm SD 40.51$). Le metastasi al linfonodo, inoltre, hanno un livello di espressione proteico del TFR-1 ($99.48 \pm SD 27.95$) significativamente più elevato rispetto al tessuto di ghiandola mammaria sana (media $40.07 \pm SD 38.95$) ($p < 0.05$). La figura 11 evidenzia inoltre un *trend* nell'aumento di espressione del TFR-1 con l'aumentare della malignità tumorale. Nello specifico le metastasi al linfonodo esprimono maggiormente il TFR-1 rispetto ai tessuti che hanno sviluppato le metastasi, i quali esprimono più TFR-1 rispetto ai tessuti tumorali che non hanno dato metastasi, i quali a loro volta esprimono più recettore rispetto al tessuto sano.

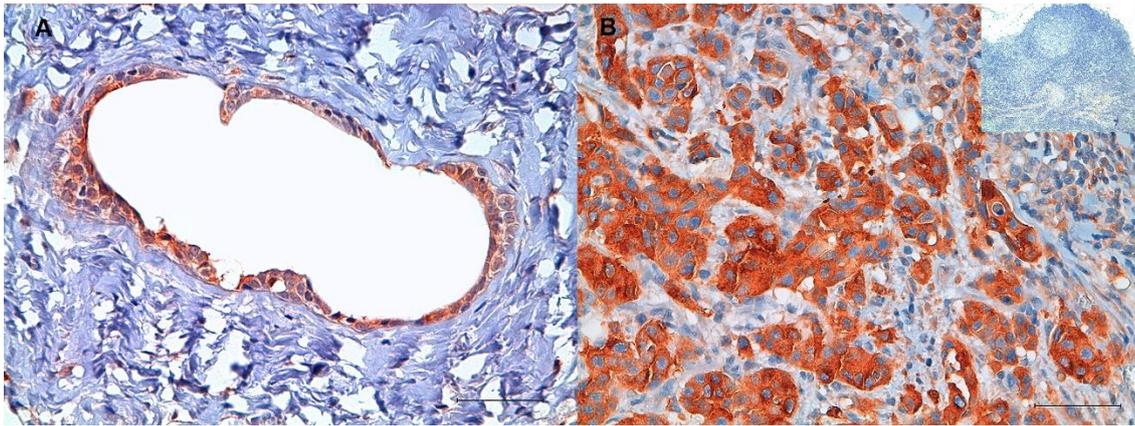


Figura 10. Immunoistochimica per TFR-1 eseguita su tessuto di ghiandola mammaria di gatto. (A) tessuto di ghiandola mammaria sana di gatto, si evidenzia una moderata positività al TFR-1 a livello citoplasmatico/membranario. (B) carcinoma mammario felino con metastasi al linfonodo. È visibile una intensa colorazione citoplasmatica delle cellule neoplastiche accompagnata da una media colorazione di cellule endoteliali e infiammatorie, fibroblasti. L'inserto mostra un linfonodo sano di gatto usato come controllo negativo (10X). Le immagini sono state catturate con un obiettivo 40X. L'unità di misura scelta è 50 μ M.

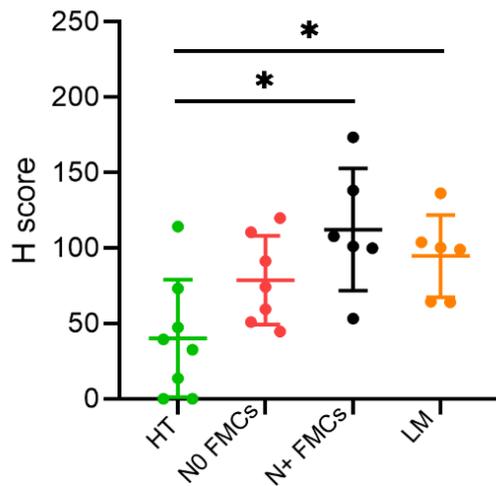


Figura 11. Indice H-score per valutazione dell'espressione proteica del TFR-1 sui tessuti di ghiandola mammaria di gatto 27 campioni. Tessuto sano (HT) ($n= 8$, verde) (media $40.07 \pm DV 38.95$), carcinoma mammario felino che non ha dato metastasi al linfonodo (NO FMCs) ($n= 7$, rosso) (media $78.72 \pm DV 29.41$), carcinoma mammario felino che ha dato metastasi al linfonodo (N+ FMCm) ($n= 6$, nero) (media $112.28 \pm DV 40.51$), metastasi al linfonodo (LM) ($n= 6$, arancione) (media $99.48 \pm DV 27.95$). si nota come il valore di H-score sia significativamente più elevato nel carcinoma mammario felino che ha dato metastasi rispetto al tessuto sano e nelle metastasi al linfonodo rispetto sempre al tessuto sano ($p < 0.05$).

4.2.2 TFR-1 nel Cane

I risultati dimostrano che il TFR-1 è presente anche nella specie canina e, nello specifico, è stato possibile evidenziare il recettore sia sui tessuti tumorali e sani sia *in vitro*.

4.2.2.1 Immunofluorescenza

L'immunofluorescenza ha permesso di visualizzare la presenza del recettore TFR-1 sulle linee cellulari tumorali di cane. Il TFR-1 è riscontrabile sulle CIPp (Fig. 12) e CIPm (Fig. 13) a livello della membrana cellulare ma anche all'interno di citoplasma.

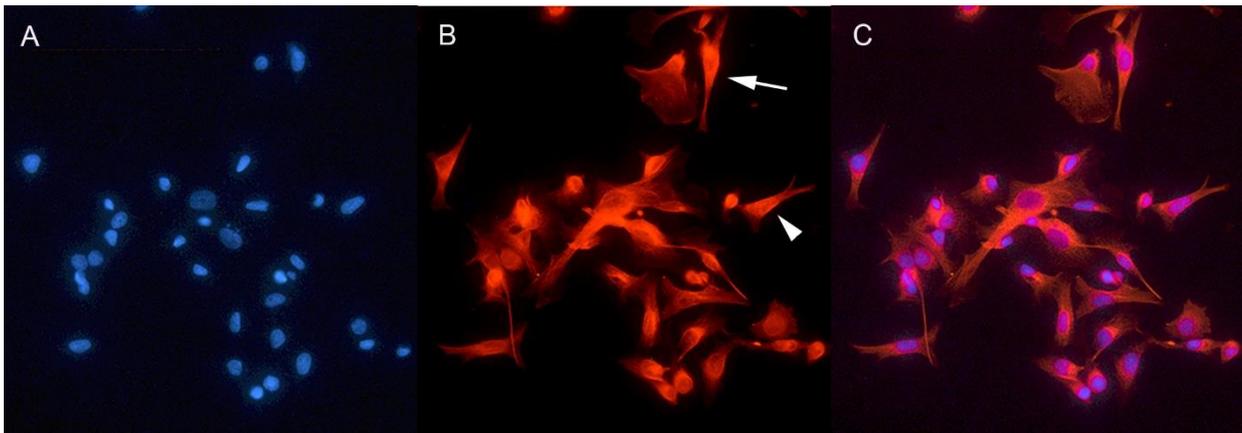


Figura 12. Immunofluorescenza per TFR-1 su CIPp (20X). (A) colorazione DAPI dei nuclei. (B) CIPp TFR-1+. Recettore presente all'interno del citoplasma (testa della freccia), presenza del recettore a livello di membrana cellulare (freccia). (C) unione delle immagini precedenti

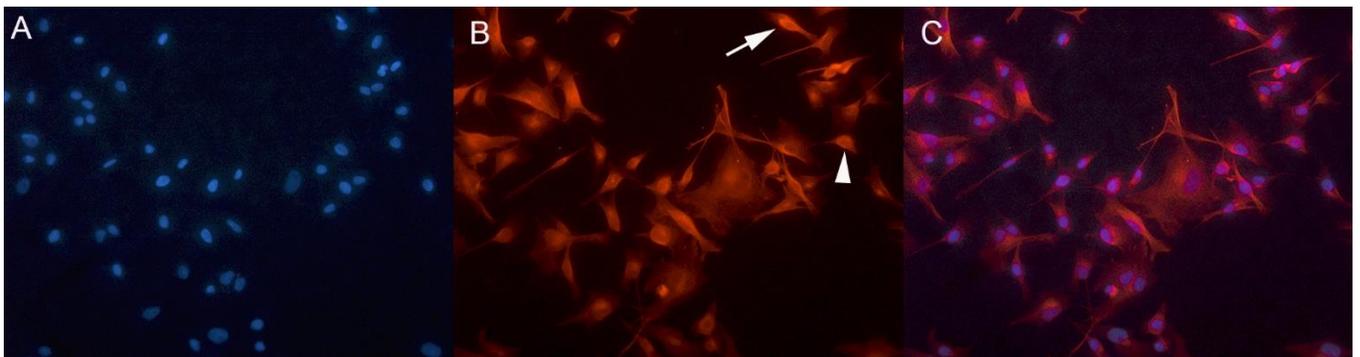


Figura 13 Immunofluorescenza per TFR-1 su CIPm (20X). (A) colorazione dapi die nuclei di CIPm. (B) cellule TFR-1 +. Localizzazione citoplasmatica del recettore (testa della freccia) e localizzazione a livello di membrana cellulare (freccia). (C) unione delle immagini precedenti.

4.2.2.2 Citometria a Flusso

L'espressione proteica del TFR-1 su CIPp e CIPm è stata dimostrata anche attraverso la citometria a flusso. Le figure 14A e 15A evidenziano la morfologia cellulare; si può notare una distribuzione *a nuvola* tipica di cellule a bassa complessità e a forma variabile (Fig. 14A e Fig. 15A). La percentuale di cellule positive per TFR-1 in entrambe le linee cellulari è alta: 97% CIPp (Fig. 14A) e 98% CIPm (Fig. 15B). La specificità dell'anticorpo, invece, è dimostrata dal controllo negativo sia per le CIPp (Fig. 14C) che per le CIPm (Fig. 15C).

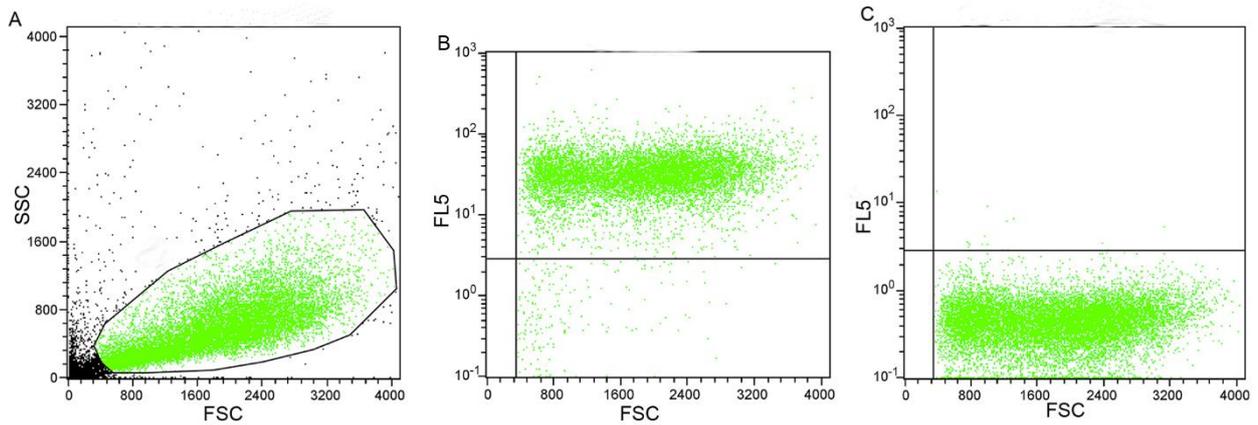


Figura 14. Citometria a flusso per TFR-1 su CIPp. (A) *morphology scatter plot*, si evidenzia la morfologia delle cellule e la loro distribuzione a nuvola. (B) FSC vs FL5 si evidenzia cellule TFR-1⁺. (C) controllo negativo, cellule TFR-1⁻.

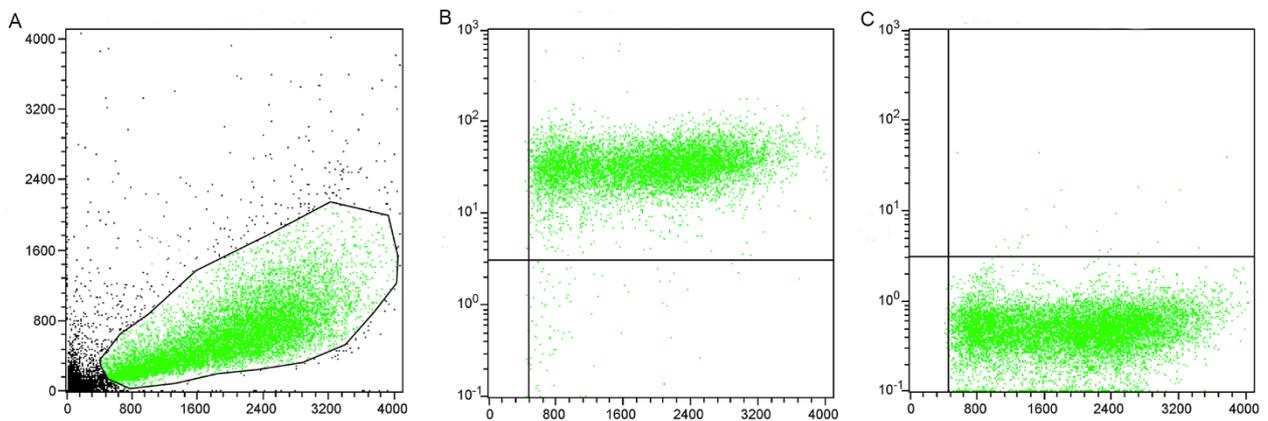


Figura 15. Citometria a flusso per TFR-1 su CIPm. (A) *morphology scatter plot*, si evidenzia la morfologia delle cellule e la loro distribuzione a nuvola. (B) FSC vs FL5 si evidenzia cellule TFR-1⁺. (C) controllo negativo, cellule TFR-1⁻.

4.2.2.3 Immunocitochimica

Su CIPp e CIPm è stata eseguita anche l'immunocitochimica ed è stato possibile identificare la localizzazione citoplasmatica e di membrana del recettore sia sulle CIPp (Fig. 16A), che sulle CIPm (Fig. 16B).

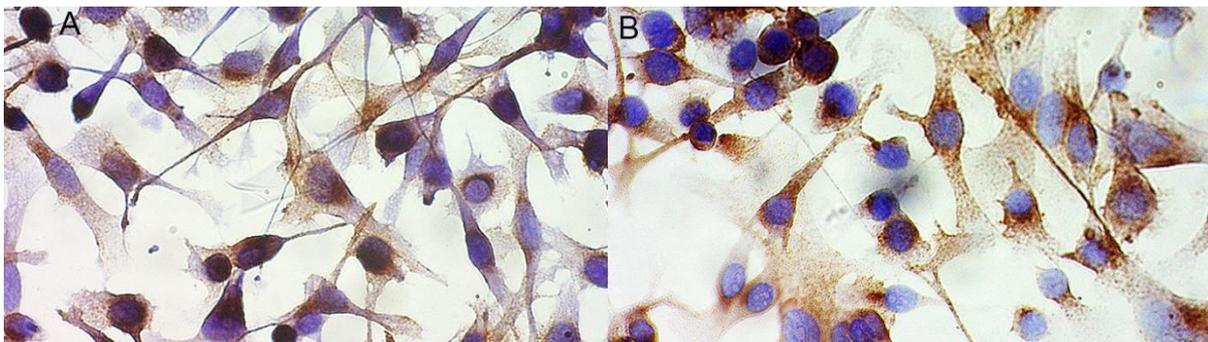


Figura 16. Immunocitochimica per TFR-1 eseguita su linee cellulari di tumore mammario di cane. (A) CIPp TFR-1 + è visibile la localizzazione citoplasmatica del recettore. (B) CIPm TFR-1+ si nota una distribuzione citoplasmatica del recettore. Entrambe le immagini sono state acquisite con obiettivo 40X.

4.2.2.4 Real-Time e Sequenziamento

La valutazione dell'espressione genica del TFR-1 è stata eseguita su CIPp e CIPm mediante qRT-PCR. I valori di espressione dell'mRNA del TFR-1 sono stati calcolati utilizzando il metodo del $\Delta\Delta Ct$. Osservando i valori di *fold change* è possibile notare come il TFR-1 sia significativamente più espresso nelle CIPm rispetto alle CIPp ($p < 0.05$) (Fig. 17)

Il sequenziamento Sanger mostra che i frammenti amplificati hanno il 98.61% di omologia con l'mRNA del TFRC di *canis lupus familiaris* (identificazione della sequenza (ID): NM_001003111.1).

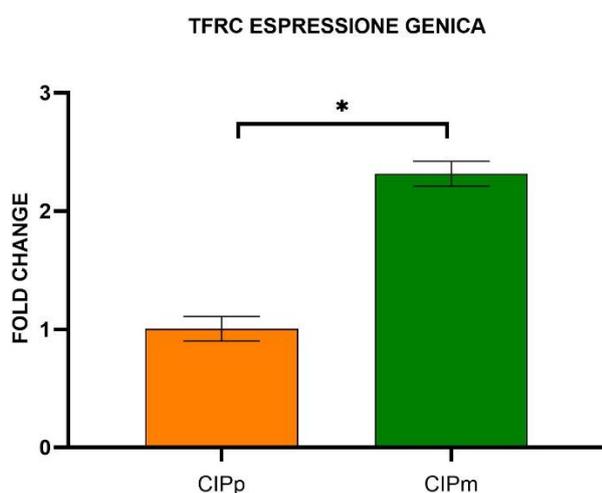


Figura 17. Valutazione espressione genica del TFR-1 su CIPp e CIPm. il livello di espressione dell'mRNA del TFR-1 è stato valutato tramite il metodo $\Delta\Delta Ct$. CIPm mostrano un *fold change* di 2 volte maggiore rispetto a quello delle CIPp ($p < 0.05$).

4.2.2.5 Espressione nei Tessuti Immunoistochimica

L'immunoistochimica evidenzia una positività per il TFR-1 nei tessuti di ghiandola mammaria tumorale di cane. La positività si nota a livello del citoplasma e della membrana cellulare (Fig. 18). H-score evidenzia come non vi sia una differenza statisticamente significativa tra le varie tipologie tumorali e soprattutto tra le diverse tipologie tumorali e l'iperplasia tumorale (Fig. 19A). Si può notare, invece, come ciascun tessuto iperplastico evidenzi valori di H-score più bassi rispetto alla sua corrispettiva parte tumorale (Fig. 19 B-E), si nota una differenza statisticamente significativa tra il tessuto iperplastico attorno al tessuto derivante da carcinoma semplice di primo grado, rispetto alla sua controparte tumorale, così come per quanto riguarda il carcinoma e mioepitelioma maligno. In questi tessuti la componente iperplastica ha valori di espressione del TFR-1 inferiori rispetto alla parte tumorale (Fig. 19C e Fig. 19E).

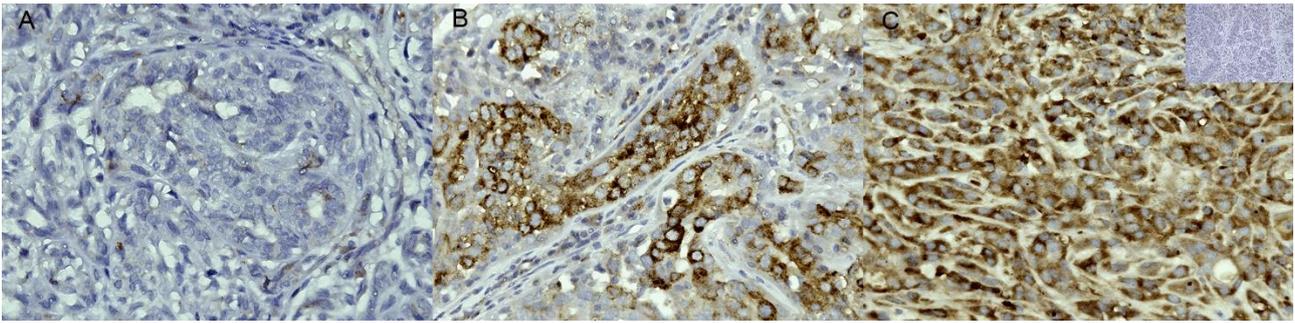


Figura 18. Immunoistochimica per TFR-1 eseguita su tessuti di ghiandola mammaria di cane. (A) tessuto di ghiandola mammaria di cane iperplastica. È possibile evidenziare una leggera positività a livello di citoplasma. (B) carcinoma mammario semplice di secondo grado di cane; si nota una forte positività delle cellule neoplastiche. La positività all'interno del citoplasma/membrana delle cellule neoplastiche è visibile anche nel carcinoma e mioepitelioma maligno di cane (C). L'inset evidenzia il linfonodo sano usato come il controllo negativo, (10X). IHC TFR-1, 40X.

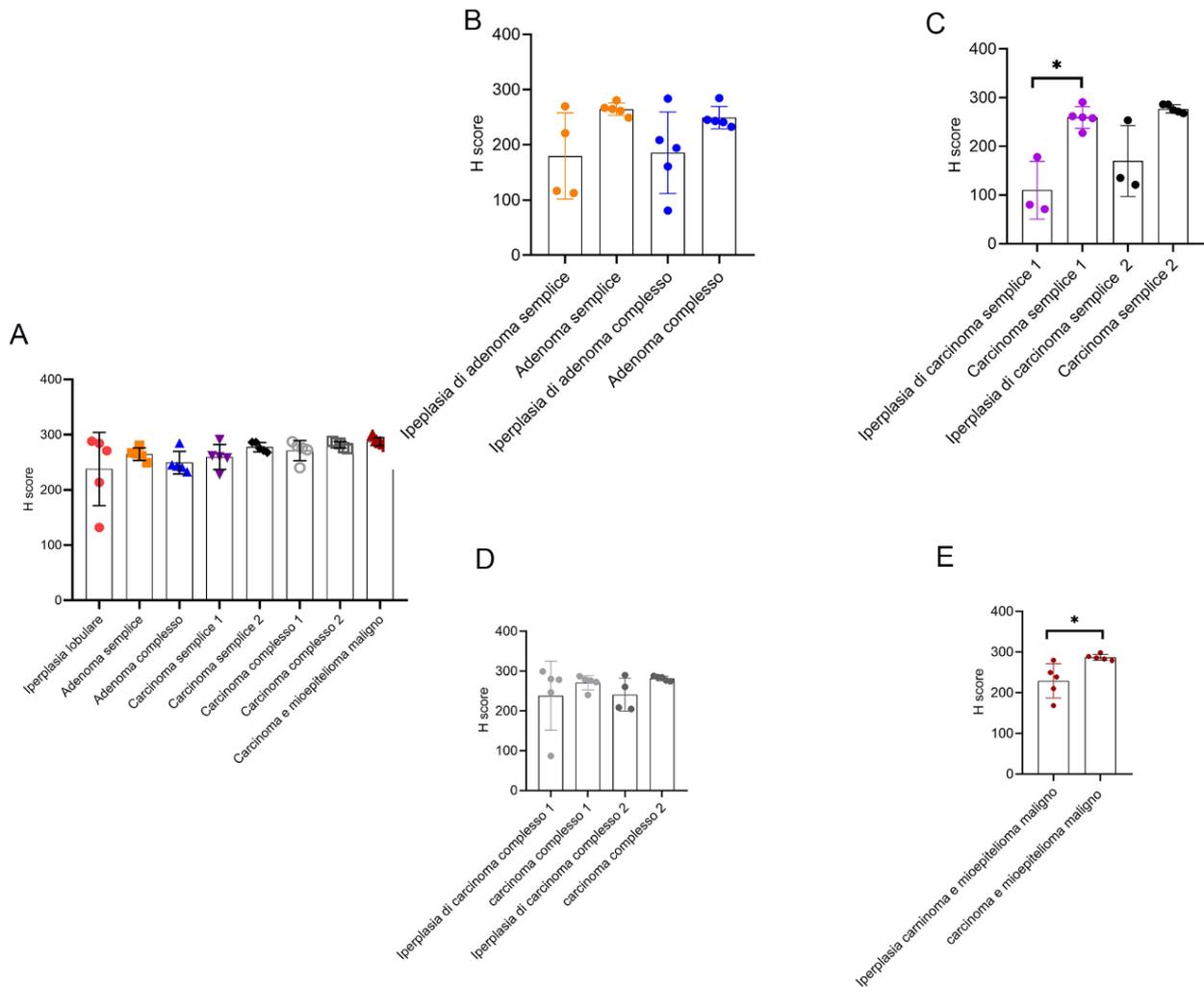


Figura 19. Indice H-score per valutazione dell'espressione proteica del TFR-1 sui tessuti di ghiandola mammaria di cane 40 campioni. (A) H-score dei differenti tessuti tumorali considerati per l'analisi. (B) H-score di tessuto tumorali di adenoma semplice

e complesso con le rispettive iperplasie. (C) H-score di tessuti di carcinoma semplice di primo e secondo grado e le rispettive iperplasie. Da notare come il carcinoma semplice di primo grado abbia un valore di H-score significativamente più elevato rispetto alla rispettiva iperplasia ($p < 0.5$). (D) H-score di tessuto di carcinoma complesso di primo e secondo grado e le rispettive iperplasie. (E) H-score di tessuto di carcinoma e mioepitelioma maligno e la rispettiva iperplasia. Da notare come il tessuto derivante da carcinoma e mioepitelioma maligno abbia un valore di H-score significativamente più elevato rispetto al tessuto iperplastico ($p < 0.5$).

4.3 Valutazione dell'Efficacia Terapeutica

4.3.1 Proliferazione Cellulare in Gatto

Il test di proliferazione cellulare è stato eseguito per verificare l'efficacia di HFn(DOX) rispetto alla sola DOX sulle FMCm. Si può notare come le FMCm trattate con HFn(DOX) alla concentrazioni di 0.01 μM hanno un tasso di proliferazione più basso rispetto alle stesse cellule trattate con la sola DOX. Questa differenza statisticamente significativa ($p < 0.05$) è visibile dopo 72 ore dal trattamento (Fig. 20A). La figura numero 20B evidenzia inoltre che, aumentando la concentrazione a 0.1 μM , la differenza di proliferazione tra FMCm trattate con HFn(DOX) rispetto a FMCm trattate con solo DOX è visibile non solo a 72 ore ma già a 48 ore post trattamento (Fig. 20B). Alla concentrazione di 1 μM , invece, non è riscontrabile nessuna differenza di proliferazione tra cellule trattate con HFn(DOX) e sola DOX (Fig. 20C)

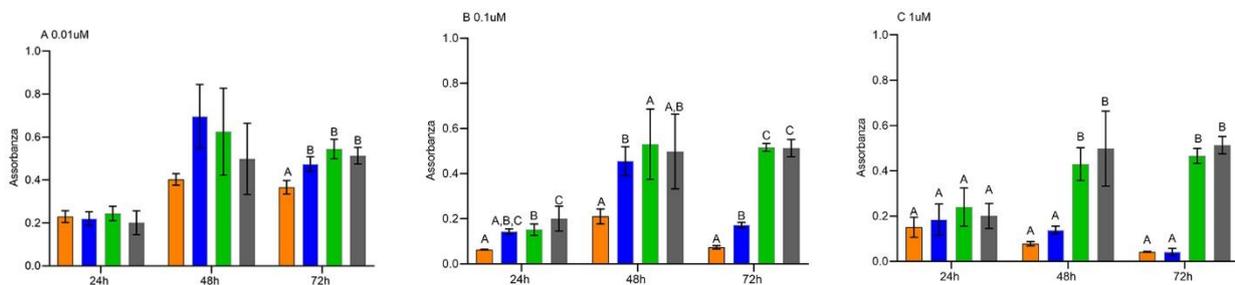


Figura 20. Proliferazione cellulare MTS su FMCm. FMCm trattate con HFn(DOX) (colonna arancione), FMCm trattate con la sola DOX (colonna blu), FMCm trattate con solo HFn (colonna verde), FMCm trattate con solo RPMI (colonna grigia) a tre diverse concentrazioni e tre diversi tempi di trattamento. (A) Cellule trattate alla concentrazione 0.01 μM . (B) Cellule trattate alla concentrazione 0.1 μM . (C) Cellule trattate alla concentrazione 1 μM . Le cellule trattate con HFn(DOX) proliferano meno rispetto alle cellule trattate con solo DOX dopo 72 ore dal trattamento alla concentrazione di 0.01 μM (A) ($p < 0.05$) e dopo 48 ore e 72 ore post trattamento alla concentrazione 0.1 μM (B) ($p < 0.05$).

4.3.2 Apoptosi

La valutazione del tasso di apoptosi è stata calcolata sulle FMCm per capire se questo calo della proliferazione era in relazione con la morte cellulare. Si può notare come HFn(DOX) induca una morte cellulare per apoptosi maggiore rispetto alle alla sola somministrazione di DOX in forma libera. Questa induzione avviene dopo 72 ore dal trattamento alla concentrazione di 0.01 μ M e 0.1 μ M (Fig. 21).

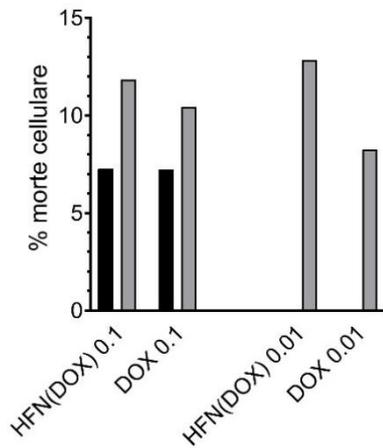


Figura 21. Tasso di apoptosi su FMCm. Le cellule trattate con HFn(DOX) e con solo DOX a diverse concentrazioni 0.1 μ M e 0.01 μ M per diversi tempistiche, 48 ore post trattamento (colonna nera) e 72 ore dopo il trattamento (colonna grigia). Si nota come le FMCm trattate con HFn(DOX) hanno un tasso di apoptosi maggiore rispetto alle cellule trattate con sola DOX dopo 72 ore di trattamento.

4.3.3 Proliferazione Cellulare in Cane

Sulle linee tumorali di cane, CIPp e CIPm è stata eseguito il test di proliferazione cellulare per verificare l'efficacia del trattamento mediante HFn(DOX) rispetto all'uso del solo farmaco libero DOX.

Per quanto concerne le CIPp, si può notare come le cellule trattate con HFn(DOX) e con sola DOX a concentrazioni basse (0.01 μ M, 0.1 μ M) hanno un valore di proliferazione simile rispetto alle cellule in cui non è stato aggiunto nessun farmaco antitumorale (Fig. 22 A-B). Dalla concentrazione 1 μ M dopo 48h ore dal trattamento (Fig. 22C), invece, si nota come le cellule trattate abbiano valori di assorbanza statisticamente inferiori rispetto alle cellule non trattate. Questa differenza è mantenuta aumentando le concentrazioni del trattamento a 5 μ M, 12.08 μ M, 50 μ M a tutti i *time point* (24, 48, 72 ore) (Fig. 22 D-F). Focalizzando, invece, l'attenzione sui due trattamenti utilizzati, si nota che le cellule trattate con HFn(DOX) hanno valori di assorbanza più bassi rispetto alle cellule trattate con la sola DOX solo alla concentrazione di 5 μ M e a 12.08 μ M dopo 48 ore dal trattamento (Fig. 22 D-E). La sola HFn, invece, non provoca nessuna diminuzione di assorbanza statisticamente significativa rispetto ai controlli a tutte le concentrazioni e a tutte le tempistiche utilizzate (Fig. 22 A-F).

Spostando l'attenzione sulle CIPm, si nota come queste cellule trattate sia con HFn(DOX) che con sola DOX, a basse concentrazioni (0.01 μ M, 0.1 μ M) hanno valori di proliferazione simili alle cellule non trattate (Fig. 23 A-B). La concentrazione di 1 μ M dopo 48 ore dal trattamento è una concentrazione a partire dalla quale le cellule trattate sia con HFn(DOX) che con la sola DOX, hanno un valore di assorbanza inferiore rispetto alle CIPm non trattate e questo aspetto è mantenuto aumentando le concentrazioni (5 μ M, 9.43 μ M, 50 μ M) a 24, 48, 72 ore dal trattamento (Fig. 23 C-F). Si può notare dalla figura 23 che le CIPm trattate con HFn(DOX) non hanno valori di proliferazione cellulare inferiori rispetto alle cellule trattate con la sola DOX: questo è visibile a tutte le concentrazioni e a tutte le tempistiche usate (Fig. 23 A-F). La sola HFn, invece, non provoca nessuna diminuzione di assorbanza statisticamente significativa rispetto ai controlli a tutte le concentrazioni e a tutte le tempistiche utilizzate (Fig. 23 A-F).

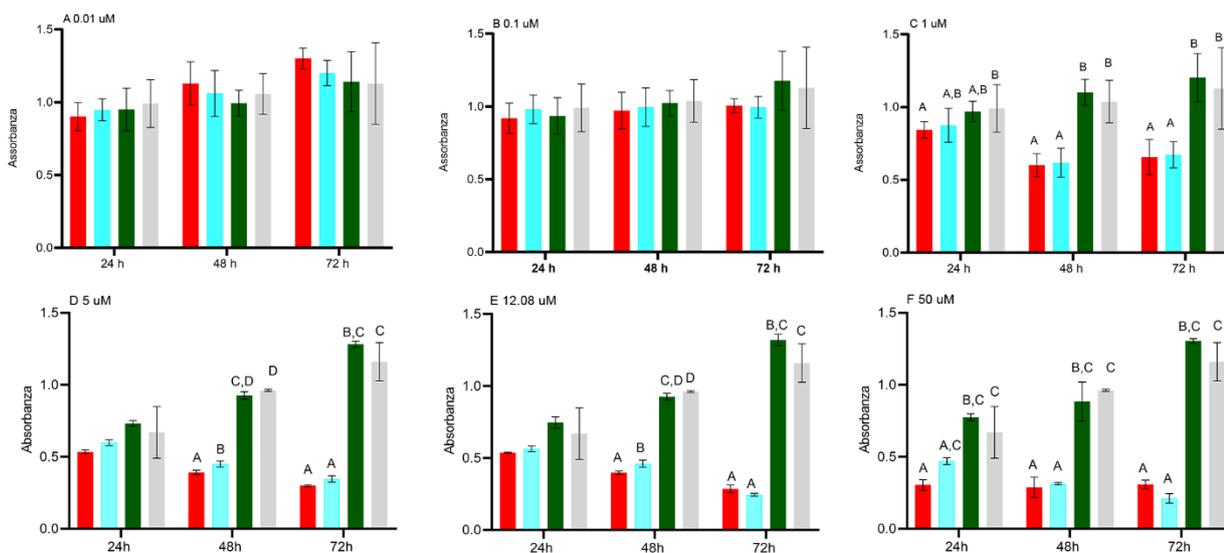


Figura 22. Proliferazione cellulare MTS test su CIPp. CIPp trattate con HFn(DOX) (colonna rossa), CIPp trattate con sola DOX (colonna azzurra), CIPp trattate con sola HFn (colonna verde), CIPp trattate con solo RPMI (colonna grigia) a diverse concentrazioni per diverse tempistiche. (A) concentrazione di trattamento 0.01 μ M. (B) concentrazione di trattamento 0.1 μ M. (C) concentrazione 1 μ M. (D) concentrazione 5 μ M. (E)

concentrazione di trattamento 12.08 μM . (F) concentrazione 50 μM . Le cellule trattate con HFn(DOX) alla concentrazione 5 μM dopo 48h proliferano meno rispetto alle cellule trattate con la sola DOX dopo 48 ore di trattamento alle concentrazioni 5 μM (D) e 12.08 μM (E). ($p < 0.05$).

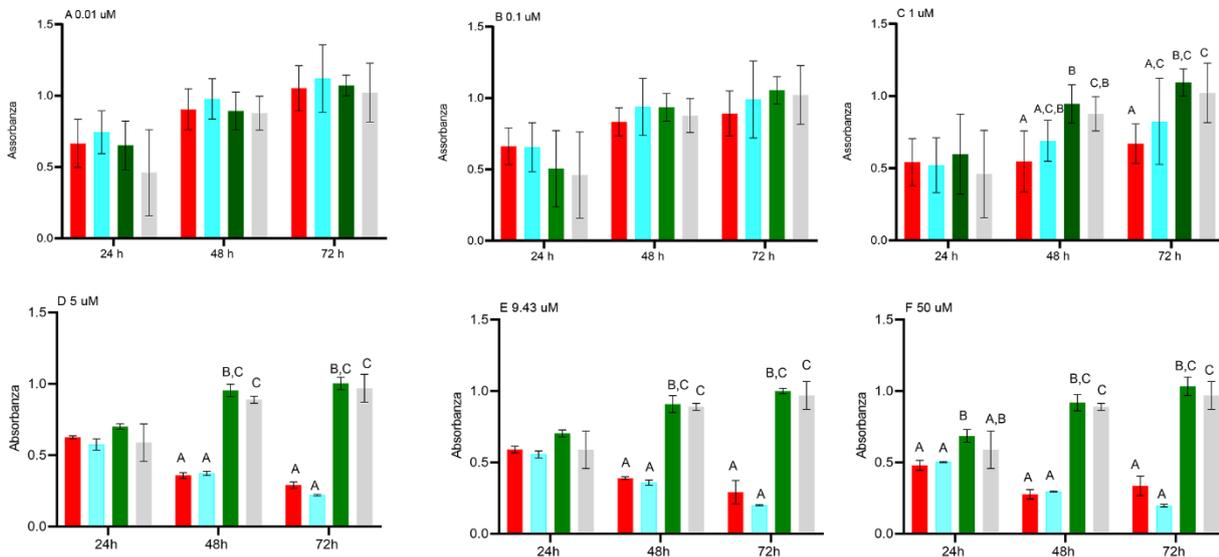


Figura 23. Proliferazione cellulare MTS test su CIPm. CIPm trattate con HFn(DOX) (colonna rossa), CIPm trattate con sola DOX (colonna azzurra), CIPm trattate con sola HFn (colonna verde), CIPp trattate con solo RPMI (colonna grigia) a diverse concentrazioni per diverse tempistiche. (A) concentrazione di trattamento 0.01 μM . (B) concentrazione di trattamento 0.1 μM . (C) concentrazione di trattamento 1 μM . (D) concentrazione di trattamento 5 μM . (E) concentrazione di trattamento di trattamento 9.43 μM . (F) concentrazione di trattamento 50 μM .

5. DISCUSSIONE

L'obiettivo principale dell'oncologia è cercare una cura specifica e selettiva per le sole cellule cancerose, evitando così ai pazienti gli effetti collaterali dovuti alla somministrazione dei farmaci antitumorali (Zugazagoitia et al. 2016). La scoperta di molecole maggiormente espresse sulle sole cellule neoplastiche rispetto alle cellule sane ha aiutato i ricercatori nel raggiungere tale obiettivo in quanto tali molecole possono essere sfruttate, attraverso la nanotecnologia, come *target* per trasportare direttamente nelle cellule tumorali i farmaci (Qian et al. 2002). Le molecole più studiate sono specifici recettori over-espresi sulle sole cellule tumorali, tra i quali anche il TFR-1 (S Mazzucchelli et al. 2017).

In medicina umana il TFR-1 è sovra-espreso in diverse tipologie tumorali come cancro al polmone, colon, fegato e al seno (Shen et al. 2018). In medicina veterinaria, invece, sono pochi gli studi che concentrano la loro attenzione su questo recettore, recentemente identificato nell'osteosarcoma canino e nel melanoma orale sempre di cane (De Vico et al. 2020). I risultati ottenuti dal nostro studio contribuiscono ad aumentare la conoscenza di questo recettore negli animali da compagnia poiché, in primis, evidenziano la presenza del TFR-1 negli animali e successivamente ne valutano la quantità relativa sulle cellule e sui tessuti di tumore mammario di gatto e cane. Così come nelle cellule tumorali umane, il TFR-1 è stato trovato anche nelle cellule di tumore mammario di cane e gatto e la sua espressione nelle cellule neoplastiche è risultata maggiore rispetto alle cellule non neoplastiche. Le cellule cancerose hanno un'attività metabolica maggiore rispetto alle altre cellule e quindi hanno una più elevata necessità di nutrienti compreso il ferro. La maggior richiesta di nutrienti viene compensata incrementando anche negli animali l'espressione del TFR-1, principale via intracellulare di internalizzazione del ferro (Oriana Marques et al. 2014; Shpyleva et al. 2011).

Il tumore alla mammella del cane e del gatto condivide molti aspetti con il tumore mammario al seno di donna. Nello specifico, il tumore mammario felino, data la sua frequente negatività dal punto di vista molecolare per ER, PR ed HER-2, è comparato al tumore doppio e triplo negativo della donna (DBC, TBC) (Caliari et al. 2014a). Il cancro della mammella del cane invece è paragonato, per l'età di insorgenza, per il decorso della malattia, lo *staging* e *grading* tumorale e per la sua frequente positività ai recettori degli ormoni sessuali, al tumore ER+ della donna (Abdelmegeed and Mohammed 2018). Tali similitudini contribuiscono a considerare cane e gatto come potenziali modelli di studio per il tumore al seno di donna.

I dati derivanti dal nostro studio hanno evidenziato come nel tumore mammario di gatto, l'espressione proteica del TFR-1 è risultata maggiore nei tessuti tumorali che hanno sviluppato metastasi ai linfonodi e nelle rispettive metastasi rispetto alla ghiandola mammaria sana e nelle neoplasie non metastatizzanti. Tali risultati confermano che il livello di espressione proteico del TFR-1 del gatto, così come accade per il tumore al seno di donna, aumenta con l'aumentare del grado di malignità tumorale (Singh et al. 2011). Questa caratteristica di aumento del livello di espressione evidenziata nella specie felina, differisce lievemente con i risultati di un altro studio nel quale gli autori non riscontravano nessuna differenza tra le lesioni mammarie benigne e maligne di cane e gatto (O Marques et al. 2017). I tumori di gatto da noi analizzati sono in numero limitato e sono stati considerati solamente tumori maligni. Lesioni benigne nei gatti sono estremamente rare, tuttavia rispetto allo studio di Marques e colleghi del 2017, sono stati inseriti dei tumori con differenti gradi di malignità includendo le metastasi ai linfonodi e i tessuti sani. Questa scelta è stata dettata dal fatto di voler investigare la possibilità che con l'incremento della progressione metastatica aumenti l'espressione del recettore, come accade nel tumore al seno di donna. Il risultato ottenuto ha

confermato quanto detto sopra ed è in linea, invece, con quanto riscontrato nel linfoma canino dove il livello proteico del TFR-1 è risultato essere maggiore in linfomi ad alto grado rispetto a linfomi a basso grado (Priest et al. 2011).

Per quanto concerne la valutazione dell'espressione del TFR-1 nei tessuti FFPE di tumore mammario di cane, vi è da sottolineare che, in questa specie, frequentemente la ghiandola mammaria da cui vengono asportati chirurgicamente i tumori si trova in uno stato iperplastico a causa del processo ciclico fisiologico della ghiandola stessa (Sorenmo et al. 2011). Per questo motivo non è stato possibile confrontare l'espressione tumorale con quella di tessuto mammario sano quiescente, ma solo con tessuto iperplastico. In tali cellule il livello di espressione proteico del TFR-1 è risultato essere più basso rispetto alla componente tumorale. Per tale ragione, nonostante non siano stati considerati dei tessuti sani, è stato comunque possibile affermare che, anche nel cane, l'espressione del TFR-1 è maggiore nelle cellule di tumore mammario rispetto alle cellule non neoplastiche. Pur avendo confrontato tumori maligni e benigni e gradi diversi di malignità, nel cane, non è stato riscontrato un incremento di espressione all'aumentare della malignità. Data la scarsa disponibilità di tumori metastatici e relative metastasi nel cane, che genericamente presenta un tumore meno aggressivo rispetto alla specie felina, non è stato possibile verificare, come invece evidenziato nel gatto, un eventuale aumento di espressione in relazione allo sviluppo di metastasi.

La quantificazione dell'espressione proteica del TFR-1 sui tessuti FFPE è stata eseguita sia nel cane che nel gatto utilizzando il metodo semiquantitativo chiamato H-score. È stato scelto tale indice in quanto, oltre ad essere uno dei più utilizzati in medicina veterinaria, è l'unico che descrive in maniera chiara e precisa come calcolare le somme dei valori degli indici che permettono di descrivere l'espressione di un recettore sia in relazione alla quantità che all'intensità della positività (Peña et al. 2014b).

L'identificazione della presenza del TFR-1 negli animali è stata confermata anche utilizzando delle linee cellulari di tumore mammario mediante IF, FC e per il cane anche tramite ICC. Queste metodiche hanno permesso di evidenziare la localizzazione citoplasmatica e di membrana del recettore. Il TFR-1 è una glicoproteina transmembranaria formata da tre diversi domini: uno esterno, uno transmembranario e uno interno alla membrana citoplasmatica. Il TFR-1 fisiologicamente a seguito della formazione del complesso TFR-1/Fe, viene internalizzato nel citoplasma con la formazione di un endosoma nel quale il dominio intracellulare del recettore è esposto sulla faccia esterna nel citoplasma. Le tecniche molecolari di visualizzazione usate prevedono l'utilizzo di anticorpi che, dopo la permeabilizzazione della cellula, vadano a legarsi al dominio intracellulare del TFR-1; in questo modo è stato possibile identificare il recettore sia a livello di membrana cellulare che di citoplasma (Daniels et al. 2006; Gammella et al. 2017).

La conferma della presenza del recettore nei tessuti di tumore mammario di gatto e di cane e la sua maggiore espressione nelle cellule tumorali rispetto alle cellule sane hanno permesso di poter considerare il TFR-1 un ottimo target terapeutico anche nel cane e nel gatto. L'overespressione del TFR-1 nei tumori maligni è già stata sfruttata in medicina umana per internalizzare, attraverso l'utilizzo di vettori nanotecnologici, come ad esempio nanocage di ferritina, HF_n, farmaci antitumorali in modo più selettivo rispetto alle normali terapie (S Mazzucchelli et al. 2017; Liang et al. 2014b). In questo studio, dopo aver verificato tramite il Western Blotting che il recettore TFR-1 in questi animali fosse in grado di cross-reagire con gli anticorpi del recettore umano, si è valutata l'efficienza di un trattamento che prevedeva l'utilizzo di tale nanocage di ferritina caricata con la doxorubicina (HF_n(DOX)), la quale, sfruttando l'espressione del TFR-1, internalizzasse

maggiormente e in modo più efficiente il farmaco nelle sole cellule tumorali, come già dimostrato in oncologia umana (Bellini et al. 2014).

HF_n si è dimostrata essere un'ottima molecola per la terapia del *drug delivery* sia per la sua non tossicità sia per la facilità nel caricare al suo interno diversi composti (Tesarova et al. 2020). La ferritina è una molecola presente fisiologicamente all'interno dell'organismo e la sua somministrazione esogena non provoca nessun'alterazione per le colture cellulari (Palombarini et al. 2020). Tale nanocage inoltre è formata dalle sole catene pesanti della ferritina che hanno fisiologicamente maggiore affinità per il TFR-1 rispetto alle catene leggere (He, Fan, and Yan 2019). Altro aspetto importante della nanocage di ferritina è il fatto di poter caricare nella cavità interna di 8 nm molecole di grandi dimensioni, ma soprattutto non solo molecole affini dal punto di vista chimico (Bhushan et al. 2014). I diversi composti caricati all'interno della nanocage di ferritina vengono caricati sfruttando la capacità di memoria e di auto assemblamento delle catene pesanti della proteina. Abbassando il pH, infatti, è possibile aprire la nanocage, riportando poi il pH alla neutralità tali catene si auto assemblano tornando alla posizione di partenza inglobando al loro interno il composto che quindi si ritrova all'interno della nanocage ma non legato ad essa tramite legami chimici (Monti, Ferraro, and Merlino 2019).

In medicina veterinaria, come detto, non esistono studi nei quali sia stato testato questo nuovo trattamento terapeutico. Il composto HF_n(DOX), è stato quindi testato sulle linee cellulari FMC_m, CIP_p e CIP_m. La valutazione dell'efficacia del trattamento tra cellule trattate con HF_n(DOX), la sola DOX e la sola HF_n per le due specie animali è stata eseguita mediante un test di proliferazione MTS. Questo test si basa sulla valutazione del valore di assorbanza delle cellule a seguito della formazione del formazano, prodotto dall'enzima deidrogenasi presente solamente nelle cellule in attività metabolica. Questo permette di poter considerare il valore di assorbanza direttamente proporzionale al numero di cellule vitali (Scudiero et al. 1988). Il trattamento terapeutico è stato eseguito su due specie diverse. Questa diversità ha comportato il fatto di non poter utilizzare per le due specie la medesima concentrazione del farmaco. Per la specie gatto è stata usata la stessa concentrazione utilizzata in un precedente studio eseguito sulle cellule MDA-MB-468 (Bellini et al. 2014). Queste cellule derivanti da una metastasi di un'effusione pleurica di un adenocarcinoma mammario umano possono essere paragonate alle FMC_m, in quanto anch'esse derivano da una metastasi al linfonodo inguinale di un gatto con un carcinoma semplice (Rina Uyama et al. 2005). Per la specie cane invece non erano presenti studi che valutavano l'utilizzo della nanocage sulle linee cellulari, ma ci si è basati su un recente studio che valutava EC₅₀ della doxorubicina nelle medesime cellule da noi utilizzate (Levi et al. 2021).

Dopo aver scelto le varie concentrazioni per le diverse specie, le cellule sono state trattate con i diversi composti per tre diverse tempi di trattamento (24h, 48h, 72h).

Le cellule FMC_m, CIP_p e CIP_m sono state trattate anche con l'HF_n non caricata con DOX per escludere che la nanocage possa influenzare la proliferazione cellulare. I dati confermano l'effetto non tossico della proteina come evidenziato anche in medicina umana (Bellini et al. 2014).

Le cellule FMC_m trattate con HF_n(DOX) hanno dei valori di assorbanza inferiori rispetto alle cellule trattate con il solo farmaco a concentrazioni medio-basse. Tali risultati indicano che queste cellule sono sensibili alla doxorubicina e che HF_n(DOX) permette di indurre un effetto antiproliferativo più elevato rispetto alla somministrazione della sola DOX così come è stato evidenziato nel tumore mammario di donna (S Mazzucchelli et al. 2017).

La doxorubicina è internalizzata dalle cellule in maniera rapida ed efficace grazie al fatto che essa è all'interno della nanocage di ferritina la quale si lega al TFR-1 e penetra nella cellula con la stessa modalità con la quale le cellule internalizzano fisiologicamente il ferro, ovvero mediante il TFR-1 (Bellini et al. 2014). L'effetto antiproliferativo maggiore nelle FMCm si è notato con concentrazioni di farmaco medio-basse, nello specifico dopo 72h a concentrazioni di 0.01 μM , mentre, alzando la concentrazione a 0.1 μM , l'effetto antiproliferativo maggiore delle HF_n(DOX) rispetto alla sola somministrazione di doxorubicina, è riscontrabile anche a 48h. Le ore di trattamento sono importanti, infatti le cellule FMCm hanno un tempo di duplicazione (DT) di circa 29h (Rina Uyama et al. 2005). È necessario quindi un tempo di trattamento superiore al DT per permettere alle cellule di internalizzare il composto ed ottenere l'effetto antiproliferativo. È importante sottolineare come anche la concentrazione del farmaco possa influenzare il trattamento. A concentrazioni basse, infatti, come 0.01 μM , le cellule hanno la necessità di maggiore tempo per internalizzare il farmaco molto probabilmente perché è necessario più tempo per accumulare il farmaco all'interno delle cellule, al contrario a concentrazioni elevate come ad esempio 1 μM non si nota nessuna differenza di proliferazione tra le cellule trattate con HF_n(DOX) e con la sola DOX. La concentrazione di doxorubicina di 1 μM è troppo elevata, in quanto causa molto probabilmente, per queste cellule un eccessivo accumulo di farmaco con entrambi i trattamenti, provocando un tasso di morte cellulare simile (Bellini et al. 2014). Per la specie felina, dai risultati descritti in questo studio, è emerso che il trattamento con HF_n(DOX) induce una minor proliferazione cellulare rispetto a trattare le cellule con la sola doxorubicina non solo alla stessa concentrazione di 0.1 μM dopo 48 ore dal trattamento efficace anche per il tumore mammario di donna, ma anche dopo 72 ore con concentrazioni di 0.01 μM (Bellini et al. 2014). Per confermare come tale calo della vitalità possa essere causato da una maggior morte cellulare è stato calcolato il tasso di morte cellulare per apoptosi. I dati confermano che a seguito della somministrazione di HF_n(DOX) la cellula attiva principalmente la via di morte cellulare per apoptosi rispetto alla somministrazione della sola DOX. Questa differenza è evidente a sole 72 ore dal trattamento con la concentrazione di 0.1 μM e a 0.01 μM . Le differenze, invece, non sono visibili dopo 48 ore dal trattamento. Ciò potrebbe essere legato al fatto che la doxorubicina potrebbe indurre la morte cellulare anche attraverso l'attivazione di altre vie metaboliche quali autofagia, senescenza e necrosi (Tacar, Sriamornsak, and Dass 2013). Nello studio qui descritto non è stato valutato il tasso di necrosi. La doxorubicina, infatti, causa la morte cellulare principalmente attivando la cascata apoptotica intercalandosi nel DNA e inibendo l'enzima topoisomerasi (Tacar and Dass 2013). Il test di proliferazione cellulare è stato eseguito, inoltre, *in vitro* utilizzando delle colture cellulari coltivate su piastre petri. In tale condizione è presente il fenomeno chiamato "late apoptosis o secondary necrosis" che prevede la rottura della membrana dei corpi apoptotici. In condizioni normali essi vengono eliminati dai macrofagi, tale processo non può avvenire nelle colture cellulari e quindi il tasso di necrosi calcolato con il propidio ioduro potrebbe essere sovrastimato e non affidabile (Berghe et al. 2010).

HF_n(DOX) è stata testata anche sulle linee cellulari di tumore mammario di cane, nello specifico sono state utilizzate due diverse linee di tumore mammario. La prima CIP_p derivante da una lesione primaria e la seconda, CIP_m, ottenuta da una metastasi al linfonodo regionale da carcinoma mammario di cane (Murai et al. 2012). Su entrambe le linee è stato eseguito lo stesso processo di trattamento farmacologico descritto in precedenza per la specie gatto, la sola differenza tra i due protocolli è riferita alla concentrazione di farmaco utilizzata. I primi risultati che si sono ottenuti hanno immediatamente evidenziato la necessità di aumentare la concentrazione del farmaco. CIP_p e CIP_m, infatti, alle concentrazioni medio basse utilizzate per la specie gatto (0.01 μM , 0.1 μM), sia di HF_n(DOX) che di sola DOX presentavano valori di assorbanza uguali alle cellule che non avevano subito nessun trattamento farmacologico. L'aumento della concentrazione del farmaco è dettato dal

fatto che le linee cellulari di tumore mammario di cane, sono meno sensibili alla doxorubicina data la loro maggior chemioresistenza (Levi et al. 2021). Tra i principali meccanismi attuati dalle cellule per proteggersi dai farmaci si annoverano la riduzione dell'assorbimento e l'aumento di espressione di proteine per l'efflusso di farmaci, tuttavia, il meccanismo più riscontrato consta nell'aumento dell'espressione dei trasportatori *ATP-Binding-cassette (ABC)* e l'aumento di espressione della proteina associata alla resistenza al cancro al seno BCRP. Negli animali domestici queste due molecole sono state identificate in diverse tipologie tumorali come linfoma, osteosarcoma e tumore mammario (Honscha et al. 2009). In quest'ultimo tumore è stata evidenziata come la presenza della proteina associata alla resistenza al cancro al seno di cane (cBCRP) trasportasse la doxorubicina all'esterno delle cellule tumorali a tal punto da considerare questo farmaco come non adatto per il trattamento del tumore mammario di cane (Honscha et al. 2009). I meccanismi sopra descritti molto probabilmente sono attivati anche dalle cellule di tumore mammario da noi utilizzate e quindi è stato necessario usare concentrazioni più elevate di farmaco rispetto alla specie gatto. I risultati del nostro studio hanno evidenziato che le cellule CIPp e CIPm trattate sia con la HF_n(DOX) che con la sola DOX hanno proliferato meno rispetto alle cellule non trattate a partire dalla concentrazione di farmaco di 1 μ M dopo 48 ore dal trattamento. L'effetto antiproliferativo del trattamento con la doxorubicina sia legata ad HF_n che somministrata in forma libera, è risultato essere efficace in un rapporto di causa-effetto legato alla dose e al tempo di somministrare per le CIPp anche alle concentrazioni di 5 μ M, 12.08 μ M e 50 μ M, mentre per le CIPm alle concentrazioni di 5 μ M, 9.43 μ M e 50 μ M. In entrambe le linee, tuttavia, 24 ore di trattamento sono risultate essere sufficienti solo alla concentrazione di 50 μ M sia di HF_n(DOX) che di sola DOX. Queste concentrazioni molto più elevate rispetto sia a quelle usate per la specie felina (0.01 μ M, 0.1 μ M 1 μ M) che identificate nella specie umana, confermano la resistenza di CIPp e CIPm alla doxorubicina (S Mazzucchelli et al. 2017).

Per quanto concerne la valutazione dell'efficacia del trattamento con HF_n(DOX) rispetto alle somministrazione della sola DOX nelle cellule di tumore mammario di cane, i risultati evidenziano che l'utilizzo della nanocage associata alla doxorubicina ha causato una minor proliferazione cellulare rispetto alla somministrazione delle sola doxorubicina solo nelle CIPp dopo 48 ore di trattamento alla concentrazione di 5 μ M e di 12.08 μ M. Concentrazioni efficaci così elevate confermano il fatto di una resistenza intrinseca di queste cellule alla doxorubicina non superata dalla nanocage di ferritina. La necessità di utilizzare concentrazioni così elevate di composto ostacola anche, il ruolo della nanocage. Il fatto che l'efficienza del trattamento avvenga dopo un periodo di tempo di 48 ore è indicativo del fatto che la nanocage di ferritina in queste linee cellulari non è in grado di veicolare il farmaco all'interno delle cellule più rapidamente del normale modo in cui la doxorubicina penetra nelle cellule ovvero per diffusione semplice. Questo aspetto è in contrasto con quanto evidenziato in letteratura, dove HF_n permette un'internalizzazione rapida della doxorubicina. La nanocage infatti si lega al recettore TFR-1 dopo soli 15 minuti di incubazione e tutto il composto HF_n(DOX) è internalizzato completamente dopo 3 ore (Bellini et al. 2014). Una spiegazione del perché questo non accada nelle cellule CIPp e CIPm potrebbe essere data da due fattori. Il primo motivo è legato al fatto di usare una concentrazione di farmaco troppo elevata. Questo crea un gradiente tra la parte extracellulare e intracellulare troppo elevato rendendo l'internalizzazione per diffusione semplice molto più rapida di quanto non avvenga a medio-basse concentrazioni. Un secondo motivo potrebbe essere legato al tempo di duplicazione delle cellule. CIPp e CIPm hanno un *doubling time* rispettivamente di 24.6 e di 20.7 (Levi et al. 2021). Questo DT indica la necessità da parte delle cellule CIPp e CIPm di un tempo maggiore per poter internalizzare il farmaco similmente a quanto evidenziato per la specie felina, FMCm, dove le prime differenze di proliferazione tra HF_n(DOX) e sola DOX si sono evidenziate dopo 48 ore dal trattamento.

La valutazione dell'espressione genica del TFR-1 ha evidenziato un livello di espressione maggiore nelle CIPm rispetto alle CIPp, nello specifico il recettore è risultato avere un'espressione doppia nelle cellule metastatiche rispetto a quelle primarie. Basandosi su questi dati e considerando che HF_n(DOX) sfrutta il TFR-1 per internalizzare il farmaco, il risultato atteso per il *proliferation test* era quello di una maggiore efficacia della HF_n(DOX) nelle cellule con il livello di espressione del TFR-1 maggiore (Bellini et al. 2014; Liang et al. 2014a). Questo aspetto, come descritto in precedenza, non è stato evidenziato nella specie cane. In letteratura non è presente nessuno studio che vada ad indagare la presenza di una correlazione tra valore di espressione del TFR-1 con l'efficacia della terapia. A livello cellulare, inoltre si evidenzia che tramite IF e ICC è stato possibile valutare solo qualitativamente il recettore e non effettuare una valutazione quantitativa stabilendo così una reale maggiore espressione di TFR-1 in CIPm rispetto a CIPp. Nel nostro studio, inoltre, non vi è stata la possibilità di indagare il livello "basale" di espressione del TFR-1 in cellule sane sia per la specie cane che per la specie gatto a causa della difficoltà oggettive per ottenere tali cellule. In commercio non sono presenti ed è molto difficile estrarle e coltivarle in laboratorio.

Si deve sottolineare anche che la valutazione dell'espressione proteica del TFR-1 in tessuti di tumore mammario di cane non mostra una correlazione tra aumento di espressione del recettore all'aumento del grado di malignità tumorale. Questo aspetto è in contrasto con quanto riscontrato nel tumore al seno di donna e dal nostro studio per la specie felina, dove aumentando la malignità tumorale si è evidenziato un aumento dell'espressione proteica del TFR-1 (Singh et al. 2011). I risultati di espressione proteica del recettore per la specie cane sono in accordo con quanto detto da O Marques e colleghi nel 2017 dove si evidenziava la presenza del recettore nella ghiandola mammaria tumorale di cane senza però evidenziare differenza tra lesioni benigne e maligne (O Marques et al. 2017). Agli aspetti descritti sopra, si deve aggiungere la resistenza intrinseca di queste cellule per la doxorubicina, che potrebbe ridurre l'effetto del chemioterapico anche a seguito della somministrazione della HF_n.

Tutti questi aspetti evidenziano un'apparente minor sensibilità delle linee cellulari di cane alla doxorubicina e in particolare una scarsa efficacia dell'impiego della HF_n(DOX) nelle CIPm rispetto alle cellule di tumore mammario di gatto. Le FMCm hanno evidenziato una minor proliferazione dopo essere state trattate con HF_n(DOX) a concentrazioni medio-basse rispetto alla somministrazione della sola doxorubicina. Nello specifico 72 ore a 0.01 μ M e a 0.1 μ M, per 48 e 72 ore post trattamento. Nonostante lo studio sia stato svolto solo in vitro e solo su una linea cellulare, potrebbe indicare una maggior efficacia del trattamento tramite HF_n(DOX) sul carcinoma mammario di gatto rispetto alla specie cane.

Trattare il tumore mammario degli animali utilizzando nanomolecole ingegnerizzate caricate con i normali farmaci antitumorali è una novità. Lo studio qui descritto rappresenta quindi un punto di partenza per poter utilizzare questa tecnologia anche per la cura del tumore mammario degli animali domestici. Studi ulteriori e più approfonditi sono necessari soprattutto per il tumore mammario del cane, in particolare per capire meglio la resistenza che questa specie ha nei confronti della doxorubicina. Certamente è da considerare uno studio che includa più linee cellulari per ogni specie. La nanocage di ferritina qui descritta, nella specie cane, potrebbe comunque risultare molto utile. HF_n è una molecola dalle ampie possibilità. Sfruttando la capacità di inglobare i composti al suo interno senza avere un'interazione chimica con essi, è possibile caricare diverse sostanze. Sono stati caricati infatti composti come oro e altri ioni, quest'ultimi utilizzati principalmente per la diagnosi tumorale (Theil 2013; Zhang, Zhang, and Zhao 2020). HF_n quindi potrebbe essere sfruttata non solo per la terapia farmacologica ma per una diagnosi precoce di cancro (Truffi et al. 2016).

Recentemente HFn è stata caricata con la curcumina e il composto è stato testato con effetti soddisfacenti su linee cellulari di tumore mammario di donna. La curcumina è da sempre considerata un ottimo chemioterapico (Giordano and Tommonaro 2019; Pandolfi et al. 2017). Uno sviluppo per studi futuri potrebbe essere quello di verificare tale composto anche nei tumori mammari degli animali, nello specifico nel tumore mammario del cane data la sua resistenza alla doxorubicina.

In conclusione, tutti questi risultati evidenziano come una possibile e promettente terapia per la cura del cancro possa essere quella del *drug delivery* selettivo mediante nanotecnologia. La possibilità di veicolare farmaci in modo sempre più selettivo e specifico alle sole cellule tumorali è certamente un modo per cercare di vincere la dura battaglia nella cura contro il cancro sia in medicina umana, sia negli animali da compagnia.

6. CONCLUSIONI

In letteratura sono pochi gli studi che analizzano l'espressione del TFR-1 negli animali domestici e solo recentemente questo recettore è stato descritto in diverse tipologie tumorali sottolineando come anche negli animali, il recettore è più espresso nelle cellule tumorali rispetto alla loro componente sana.

I risultati ottenuti da questo progetto di dottorato hanno dimostrato come anche negli animali, in particolare nel tumore mammario di gatto e cane il TFR-1 è più espresso nelle cellule neoplastiche rispetto alla componente non neoplastica. Questo aspetto è maggiormente visibile nella specie felina dove l'aumento di espressione del recettore è legato all'aumento della malignità tumorale e allo sviluppo metastatico.

Lo studio inoltre ha evidenziato un aspetto importante, ovvero che il TFR-1 può essere utilizzato anche negli animali come un gate per una potenziale cura selettiva ed efficace contro il cancro.

L'utilizzo della nanocage di ferritina caricata con la doxorubicina, infatti, si è dimostrata un trattamento più efficace rispetto alla somministrazione del farmaco in forma libera. Nella specie felina l'efficacia è risultata maggiore rispetto alla specie cane sottolineando una preferenza di utilizzo della terapia in questa specie. Per poter utilizzare efficacemente questa nanomolecola nel cane sono necessari studi ulteriori, in quanto è necessario capire più nel dettaglio il meccanismo di azione della doxorubicina in questa specie. Altri sviluppi per il futuro con più linee cellulari ed eventualmente in vivo sono necessari per approfondire tali risultati e per possibilmente testare la nanocage caricata anche con altri composti magari più efficaci in particolare per il cane.

7. APPENDICE

Questo progetto di dottorato ha permesso di incrementare la conoscenza di questo recettore negli animali. Tali conoscenze sono state condivise con la comunità scientifica mediante la pubblicazione sulla rivista “Cancer” dell’articolo qui sotto riportato.



Article

Evaluation of TFR-1 Expression in Feline Mammary Cancer and In Vitro Antitumor Efficacy Study of Doxorubicin-Loaded H-Ferritin Nanocages

Nicolò Rensi ^{1,*}, Alessandro Sammarco ^{1,2}, Valentina Moccia ¹, Alessandro Calore ¹, Filippo Torrigiani ¹, Davide Prospero ³, Maria Antonietta Rizzuto ³, Michela Bellini ³, Raffaella De Maria ⁴, Federico Bonsembiante ^{1,5}, Silvia Ferro ¹, Rossella Zanetti ¹, Valentina Zappulli ¹ and Laura Cavicchioli ¹

- ¹ Department of Comparative Biomedicine and Food Science, University of Padua, 35020 Padua, Italy; alessandro.sammarco@unipd.it (A.S.); valentina.moccia@phd.unipd.it (V.M.); alessandro.calore.1@studenti.unipd.it (A.C.); filippo.torrigiani@unipd.it (F.T.); federico.bonsembiante@unipd.it (F.B.); silvia.ferro@unipd.it (S.F.); rossella.zanetti@unipd.it (R.Z.); valentina.zappulli@unipd.it (V.Z.); laura.cavicchioli@unipd.it (L.C.)
 - ² Department of Neurology and Radiology, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02114, USA
 - ³ NanoBiolab, Department of Biotechnology and Bioscience, University of Milano-Bicocca, 20126 Milan, Italy; davide.prosperi@unimib.it (D.P.); maria.rizzuto@unimib.it (M.A.R.); michela.bellini@unimib.it (M.B.)
 - ⁴ Department of Veterinary Science, University of Turin, 10095 Turin, Italy; raffaella.demaria@unito.it
 - ⁵ Department of Animal Medicine, Productions and Health, University of Padua, 35020 Padua, Italy
- * Correspondence: nicolo.rensi@phd.unipd.it



Citation: Rensi, N.; Sammarco, A.; Moccia, V.; Calore, A.; Torrigiani, F.; Prospero, D.; Rizzuto, M.A.; Bellini, M.; De Maria, R.; Bonsembiante, F.; et al. Evaluation of TFR-1 Expression in Feline Mammary Cancer and In Vitro Antitumor Efficacy Study of Doxorubicin-Loaded H-Ferritin Nanocages. *Cancers* **2021**, *13*, 1248. <https://doi.org/10.3390/cancers13061248>

Academic Editor: Clare Hoskins

Received: 12 February 2021

Accepted: 9 March 2021

Published: 12 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and

Simple Summary: Transferrin receptor one (TFR-1), recognized by ferritin, is overexpressed in many tumor cells. This feature has been exploited to produce a selective overload of drugs within tumor cells by creating an engineered ferritin nanocage loaded with doxorubicin (HF_n(DOX)). This bionanotechnology has been tested in human cancer, but there are no studies in veterinary oncology. This work, after evaluating the expression of TFR-1 in feline tumors, demonstrated for the first time the effectiveness in vitro of this nanocage in animals. These results confirm that engineered bionanocages also offer unprecedented opportunities for animal cancer to be applied in veterinary medicine and in comparative studies including spontaneous animal models of cancer.

Abstract: The transferrin receptor 1 (TFR-1) has been found overexpressed in a broad range of solid tumors in humans and is, therefore, attracting great interest in clinical oncology for innovative targeted therapies, including nanomedicine. TFR-1 is recognized by H-Ferritin (HF_n) and has been exploited to allow selective binding and drug internalization, applying an HF_n nanocage loaded with doxorubicin (HF_n(DOX)). In veterinary medicine, the role of TFR-1 in animal cancers remains poorly explored, and no attempts to use TFR-1 as a target for drug delivery have been conducted so far. In this study, we determined the TFR-1 expression both in feline mammary carcinomas during tumor progression, as compared to healthy tissue, and, in vitro, in a feline metastatic mammary cancer cell line. The efficacy of HF_n(DOX) was compared to treatment with conventional doxorubicin in feline mammary cancer cells. Our results highlighted an increased TFR-1 expression associated with tumor metastatic progression, indicating a more aggressive behavior. Furthermore, it was demonstrated that the use of HF_n(DOX) resulted in less proliferation of cells and increased apoptosis when compared to the drug alone. The results of this preliminary study suggest that the use of engineered bionanocages also offers unprecedented opportunities for selective targeted chemotherapy of solid tumors in veterinary medicine.

Keywords: TFR-1; feline; mammary gland; carcinoma; metastasis; doxorubicin; H-Ferritin; nanocage

8. BIBLIOGRAFIA

- Abdelmegeed, Somaia M., and Sulma Mohammed. 2018. "Canine Mammary Tumors as a Model for Human Disease (Review)." *Oncology Letters*. Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8411>.
- Adega, Filomena, Ana Borges, and Raquel Chaves. 2016. "Cat Mammary Tumors: Genetic Models for the Human Counterpart." *Veterinary Sciences* 3 (3): 17. <https://doi.org/10.3390/vetsci3030017>.
- Barone, R. 1990. *Mamelles. Tome 4 Splanchnologie II*. Edition vi. Paris.
- Bellini, Michela, Serena Mazzucchelli, Elisabetta Galbiati, Silvia Sommaruga, Luisa Fiandra, Marta Truffi, Maria A Rizzuto, et al. 2014. "Protein Nanocages for Self-Triggered Nuclear Delivery of DNA-Targeted Chemotherapeutics in Cancer Cells." *Journal of Controlled Release* 196: 184–96. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.10.002>.
- Berghe, T. Vanden, N Vanlangenakker, E Parthoens, W Deckers, M Devos, N Festjens, C J Guerin, U T Brunk, W Declercq, and P Vandenabeele. 2010. "Necroptosis, Necrosis and Secondary Necrosis Converge on Similar Cellular Disintegration Features." *Cell Death and Differentiation* 17 (6): 922–30. <https://doi.org/10.1038/cdd.2009.184>.
- Bhushan, Bharat, S. Uday Kumar, Ishita Matai, Abhay Sachdev, Poornima Dubey, and P. Gopinath. 2014. "Ferritin Nanocages: A Novel Platform for Biomedical Applications." *Journal of Biomedical Nanotechnology* 10 (10): 2950–76. <https://doi.org/10.1166/jbn.2014.1980>.
- Caliari, Diego, Valentina Zappulli, Roberta Rasotto, Barbara Cardazzo, Federica Frassinetti, Michael H. Goldschmidt, and Massimo Castagnaro. 2014a. "Triple-Negative Vimentin-Positive Heterogeneous Feline Mammary Carcinomas as a Potential Comparative Model for Breast Cancer." *BMC Veterinary Research* 10 (1). <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0185-8>.
- Caliari, Diego, Valentina Zappulli, Roberta Rasotto, Barbara Cardazzo, Federica Frassinetti, Michael H Goldschmidt, and Massimo Castagnaro. 2014b. "Triple-Negative Vimentin-Positive Heterogeneous Feline Mammary Carcinomas as a Potential Comparative Model for Breast Cancer." *BMC Veterinary Research* 10 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12917-014-0185-8>.
- Candelaria, Pierre V., Lai Sum Leoh, Manuel L. Penichet, and Tracy R. Daniels-Wells. 2021. "Antibodies Targeting the Transferrin Receptor 1 (TfR1) as Direct Anti-Cancer Agents." *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.607692>.
- Cannon, Claire M. 2015. "Cats, Cancer and Comparative Oncology." *Veterinary Sciences*. MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/vetsci2030111>.
- Cardoso, Valéria Maria de Oliveira, Bruna Juliana Moreira, Edson José Comparetti, Isabella Sampaio, Leonardo Miziara Barboza Ferreira, Paula Maria Pincela Lins, and Valtencir Zucolotto. 2020. "Is Nanotechnology Helping in the Fight Against COVID-19?" *Frontiers in Nanotechnology* 2 (November). <https://doi.org/10.3389/fnano.2020.588915>.
- Daniel, Medina. 1996. "The Mammary Gland: A Unique Organ for the Study of Development and Tumorigenesis Title." *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 1 (1): 5–19.
- Daniels, Tracy R., Tracie Delgado, Jose A. Rodriguez, Gustavo Helguera, and Manuel L. Penichet.

2006. “The Transferrin Receptor Part I: Biology and Targeting with Cytotoxic Antibodies for the Treatment of Cancer.” *Clinical Immunology*. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2006.06.010>.
- Daniels, Tracy R, Ezequiel Bernabeu, José A Rodríguez, Shabnum Patel, Maggie Kozman, Diego A Chiappetta, Eggehard Holler, Julia Y Ljubimova, Gustavo Helguera, and Manuel L Penichet. 2012. “The Transferrin Receptor and the Targeted Delivery of Therapeutic Agents against Cancer.” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1820 (3): 291–317. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.07.016>.
- Dautry Varsat, A., A. Ciechanover, and H. F. Lodish. 1983. “PH and the Recycling of Transferrin during Receptor-Mediated Endocytosis.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (8 I): 2258–62. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.8.2258>.
- Dev, Som, and Jodie L Babitt. 2017. “Overview of Iron Metabolism in Health and Disease.” *Hemodialysis International*. <https://doi.org/10.1111/hdi.12542>.
- Elston, C. W., and I. O. Ellis. 1991. “Pathological Prognostic Factors in Breast Cancer. I. The Value of Histological Grade in Breast Cancer: Experience from a Large Study with Long-term Follow-up.” *Histopathology* 19 (5): 403–10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>.
- Farokhzad, Omid C, and Robert Langer. 2009. “Impact of Nanotechnology on Drug Delivery.” *ACS Nano* 3 (1): 16–20. <https://doi.org/10.1021/nn900002m>.
- Gammella, Elena, Paolo Buratti, Gaetano Cairo, and Stefania Recalcati. 2017. “The Transferrin Receptor: The Cellular Iron Gate.” *Metallomics* 9 (10): 1367–75. <https://doi.org/10.1039/c7mt00143f>.
- Giordano, Antonio, and Giuseppina Tommonaro. 2019. “Curcumin and Cancer.” *Nutrients*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu11102376>.
- Goldschmidt, Michael H., L. Peña, R Rasotto, and V Zappulli. 2011. “Classification and Grading of Canine Mammary Tumors.” *Veterinary Pathology* 48 (1): 117–31. <https://doi.org/10.1177/0300985810393258>.
- Harris, Lyndsay, Gerald Batist, Robert Belt, Douglas Rovira, Rudolph Navari, Nozar Azarnia, Lauri Welles, et al. 2002. “Liposome-Encapsulated Doxorubicin Compared with Conventional Doxorubicin in a Randomized Multicenter Trial as First-Line Therapy of Metastatic Breast Carcinoma.” *Cancer* 94 (1): 25–36. <https://doi.org/10.1002/cncr.10201>.
- Hassan, B B, S M Elshafae, W Supsavhad, J K Simmons, W P Dirksen, S M Sokkar, and T J Rosol. 2017. “Feline Mammary Cancer: Novel Nude Mouse Model and Molecular Characterization of Invasion and Metastasis Genes.” *Veterinary Pathology* 54: 32–43. <https://doi.org/10.1177/0300985816650243>.
- Hassiotou, Foteini, and Donna Geddes. 2013. “Anatomy of the Human Mammary Gland: Current Status of Knowledge.” *Clinical Anatomy* 26 (1): 29–48. <https://doi.org/10.1002/ca.22165>.
- He, Jiuyang, Kelong Fan, and Xiyun Yan. 2019. “Ferritin Drug Carrier (FDC) for Tumor Targeting Therapy.” *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.09.002>.
- Honscha, K. U., A. Schirmer, A. Reischauer, H. A. Schoon, A. Einspanier, and G. Gäbel. 2009. “Expression of ABC-Transport Proteins in Canine Mammary Cancer: Consequences for

Chemotherapy.” *Reproduction in Domestic Animals* 44 (SUPPL. 2): 218–23. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01382.x>.

Inman, Jamie L., Claire Robertson, Joni D. Mott, and Mina J. Bissell. 2015. “Mammary Gland Development: Cell Fate Specification, Stem Cells and the Microenvironment.” *Development (Cambridge)* 142 (6): 1028–42. <https://doi.org/10.1242/dev.087643>.

Jing, S. Q., and I. S. Trowbridge. 1987. “Identification of the Intermolecular Disulfide Bonds of the Human Transferrin Receptor and Its Lipid-Attachment Site.” *The EMBO Journal* 6 (2): 327–31. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb04758.x>.

Kaszak, Ilona, Anna Ruszczak, Szymon Kanafa, Kamil Kacprzak, Magdalena Król, and Piotr Jurka. 2018. “Current Biomarkers of Canine Mammary Tumors.” *Acta Vet Scand* 60: 66. <https://doi.org/10.1186/s13028-018-0417-1>.

Kawabata, Hiroshi. 2019. “Transferrin and Transferrin Receptors Update.” *Free Radical Biology and Medicine*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.06.037>.

Lawrence, C. Martin, Sanjoy Ray, Marina Babyonyshev, Renate Galluser, David W. Borhani, and Stephen C. Harrison. 1999. “Crystal Structure of the Ectodomain of Human Transferrin Receptor.” *Science* 286 (5440): 779–82. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.779>.

Levi, Michela, Roberta Salaroli, Federico Parenti, Raffaella De Maria, Augusta Zannoni, Chiara Bernardini, Cecilia Gola, et al. 2021. “Doxorubicin Treatment Modulates Chemoresistance and Affects the Cell Cycle in Two Canine Mammary Tumour Cell Lines.” *BMC Veterinary Research* 17 (1). <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02709-5>.

Liang, Minmin, Kelong Fan, Meng Zhou, Demin Duan, Jiyan Zheng, Dongling Yang, Jing Feng, and Xiyun Yan. 2014a. “H-Ferritin-Nanocaged Doxorubicin Nanoparticles Specifically Target and Kill Tumors with a Single-Dose Injection.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (41): 14900–905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407808111>.

———. 2014b. “H-Ferritin-Nanocaged Doxorubicin Nanoparticles Specifically Target and Kill Tumors with a Single-Dose Injection.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (41): 14900–905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407808111>.

MacEwen, E. Gregory. 1990. “Spontaneous Tumors in Dogs and Cats: Models for the Study of Cancer Biology and Treatment.” *CANCER AND METASTASIS REVIEW* 9 (2): 125–36. <https://doi.org/10.1007/BF00046339>.

Marques, O, A Canadas, F Faria, E Oliveira, I Amorim, F Seixas, A Gama, et al. 2017. “Expression of Iron-Related Proteins in Feline and Canine Mammary Gland Reveals Unexpected Accumulation of Iron.” *Biotechnic and Histochemistry* 92 (8): 584–94. <https://doi.org/10.1080/10520295.2017.1369160>.

Marques, Oriana, Berta Martins da Silva, Graça Porto, and Carlos Lopes. 2014. “Iron Homeostasis in Breast Cancer.” *Cancer Letters* 347 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.01.029>.

Mazzucchelli, S, M Truffi, F Baccharini, M Beretta, L Sorrentino, M Bellini, M A Rizzuto, et al. 2017. “H-Ferritin-Nanocaged Olaparib: A Promising Choice for Both BRCA-Mutated and Sporadic Triple Negative Breast Cancer.” *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07617-7>.

- Mazzucchelli, Serena, Michela Bellini, Luisa Fiandra, Marta Truffi, Maria A. Rizzuto, Luca Sorrentino, Erika Longhi, Manuela Nebuloni, Davide Prosperi, and Fabio Corsi. 2017. "Nanometronomic Treatment of 4T1 Breast Cancer with Nanocaged Doxorubicin Prevents Drug Resistance and Circumvents Cardiotoxicity." *Oncotarget* 8 (5): 1–14. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14204>.
- Misdrop, W. 1988. "Canine Mammary Tumours: Protective Effect of Late Ovariectomy and Stimulating Effect of Progestins." *Vet Q* 10, 26–33.
- Monti, Dara Maria, Giarita Ferraro, and Antonello Merlino. 2019. "Ferritin-Based Anticancer Metallodrug Delivery: Crystallographic, Analytical and Cytotoxicity Studies." *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 20: 101997. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.04.001>.
- Muckenthaler, Martina U, Stefano Rivella, Matthias W Hentze, and Bruno Galy. 2017. "A Red Carpet for Iron Metabolism." *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.034>.
- Murai, K., T. Nakagawa, Y. Endo, A. Kamida, K. Yoshida, M. Mochizuki, R. Nishimura, and N. Sasaki. 2012. "Establishment of a Pair of Novel Cloned Tumour Cell Lines with or without Metastatic Potential from Canine Mammary Adenocarcinoma." *Research in Veterinary Science* 93 (1): 468–72. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.06.012>.
- O'Donnell, Kathryn A., Duonan Yu, Karen I Zeller, Jung-Whan Kim, Frederick Racke, Andrei Thomas-Tikhonenko, and Chi V Dang. 2006. "Activation of Transferrin Receptor 1 by C-Myc Enhances Cellular Proliferation and Tumorigenesis." *Molecular and Cellular Biology* 26 (6): 2373–86. <https://doi.org/10.1128/mcb.26.6.2373-2386.2006>.
- Overley, Beth, Frances S. Shofer, Michael H. Goldschmidt, Dave Sherer, and Karin U. Sorenmo. 2005. "Association between Ovarihysterectomy and Feline Mammary Carcinoma." *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19 (4): 560–63. <https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2005.tb02727.x>.
- Palombarini, Federica, Elisa Di Fabio, Alberto Boffi, Alberto Maccone, and Alessandra Bonamore. 2020. "Ferritin Nanocages for Protein Delivery to Tumor Cells." *Molecules* 25 (4). <https://doi.org/10.3390/molecules25040825>.
- Pandolfi, Laura, Michela Bellini, Renzo Vanna, Carlo Morasso, Andrea Zago, Sofia Carcano, Svetlana Avvakumova, et al. 2017. "H-Ferritin Enriches the Curcumin Uptake and Improves the Therapeutic Efficacy in Triple Negative Breast Cancer Cells." *Biomacromolecules* 18 (10): 3318–30. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b00974>.
- Pantopoulos, Kostas. 2004. "Iron Metabolism and the IRE/IRP Regulatory System: An Update." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1012 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1196/annals.1306.001>.
- Pantopoulos, Kostas, Suheel Kumar Porwal, Alan Tartakoff, and L Devireddy. 2012. "Mechanisms of Mammalian Iron Homeostasis." *Biochemistry* 51 (29): 5705–24. <https://doi.org/10.1021/bi300752r>.
- Parker, John S L, William J Murphy, Dai Wang, Stephen J. O'Brien, and Colin R Parrish. 2001. "Canine and Feline Parvoviruses Can Use Human or Feline Transferrin Receptors To Bind, Enter, and Infect Cells." *Journal of Virology* 75 (8): 3896–3902.

<https://doi.org/10.1128/jvi.75.8.3896-3902.2001>.

- Peña, L., A. Gama, M. H. Goldschmidt, J. Abadie, C. Benazzi, M. Castagnaro, L. Díez, et al. 2014a. “Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry.” *Veterinary Pathology* 51 (1): 127–45. <https://doi.org/10.1177/0300985813509388>.
- Peña, L., A. Gama, M. H. Goldschmidt, J. Abadie, C. Benazzi, M. Castagnaro, L. Díez, et al. 2014b. “Canine Mammary Tumors: A Review and Consensus of Standard Guidelines on Epithelial and Myoepithelial Phenotype Markers, HER2, and Hormone Receptor Assessment Using Immunohistochemistry.” *Veterinary Pathology* 51 (1): 127–45. <https://doi.org/10.1177/0300985813509388>.
- Ponka, Prem, and Chun Nam Lok. 1999. “The Transferrin Receptor: Role in Health and Disease.” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 31 (10): 1111–37. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00070-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00070-9).
- Priest, H, S. McDonough, H Erb, J Daddona, and T Stokol. 2011. “Transferrin Receptor Expression in Canine Lymphoma.” *Veterinary Pathology* 48 (2): 466–74. <https://doi.org/10.1177/0300985810377074>.
- Qian, Zhong Ming, Hongyan Li, Hongzhe Sun, and Kwokping Ho. 2002. “Targeted Drug Delivery via the Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis Pathway.” *Pharmacological Reviews*. <https://doi.org/10.1124/pr.54.4.561>.
- Rybak, S. M., S. K. Saxena, E. J. Ackerman, and R. J. Youle. 1991. “Cytotoxic Potential of Ribonuclease and Ribonuclease Hybrid Proteins.” *Journal of Biological Chemistry* 266 (31): 21202–7. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54841-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54841-9).
- Scudiero, Dominic A., Robert H. Shoemaker, Kenneth D. Paull, Anne Monks, Siobhan Tierney, Thomas H. Nofziger, Michael J. Currens, Donna Seniff, and Michael R. Boyd. 1988. “Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines.” *Cancer Research* 48 (17): 4827–33.
- Shen, Ying, Xin Li, Dandan Dong, Bin Zhang, Yanru Xue, and Peng Shang. 2018. “Transferrin Receptor 1 in Cancer: A New Sight for Cancer Therapy.” *American Journal of Cancer Research* 8 (6): 916–31.
- Shpyleva, Svitlana I., Volodymyr P. Tryndyak, Olga Kovalchuk, Athena Starlard-Davenport, Vasyl F. Chekhun, Frederick A. Beland, and Igor P. Pogribny. 2011. “Role of Ferritin Alterations in Human Breast Cancer Cells.” *Breast Cancer Research and Treatment* 126 (1): 63–71. <https://doi.org/10.1007/s10549-010-0849-4>.
- Singh, Meenakshi, Kimberly Mugler, Dulan W Hailoo, Stephanie Burke, Barbara Nemesure, Kathleen Torkko, and Kenneth R Shroyer. 2011. “Differential Expression of Transferrin Receptor (TfR) in a Spectrum of Normal to Malignant Breast Tissues: Implications for in Situ and Invasive Carcinoma.” *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology* 19 (5): 417–23. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e318209716e>.
- Sleeckx, N., H. de Rooster, E. J.B. Veldhuis Kroeze, C. van Ginneken, and L. van Brantegem. 2011. “Canine Mammary Tumours, an Overview.” *Reproduction in Domestic Animals* 46 (6): 1112–

31. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01816.x>.

Sorenmo, K. U., R. Rasotto, V. Zappulli, and M. H. Goldschmidt. 2011. "Development, Anatomy, Histology, Lymphatic Drainage, Clinical Features, and Cell Differentiation Markers of Canine Mammary Gland Neoplasms." *Veterinary Pathology* 48 (1): 85–97. <https://doi.org/10.1177/0300985810389480>.

Speroni, Lucia, Cheryl M. Schaeberle, Carlos Sonnenschein, and Ana M. Soto. 2018. "Mammary Gland Development." *Encyclopedia of Reproduction*, 786–92. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64420-3>.

Sun, Tianmeng, Yu Shrike Zhang, Bo Pang, Dong Choon Hyun, Miaoxin Yang, and Younan Xia. 2014. "Engineered Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Therapy." *Angewandte Chemie - International Edition* 53 (46): 12320–64. <https://doi.org/10.1002/anie.201403036>.

Tacar, Oktay, and Crispin R. Dass. 2013. "Doxorubicin-Induced Death in Tumour Cells and Cardiomyocytes: Is Autophagy the Key to Improving Future Clinical Outcomes?" *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/jphp.12144>.

Tacar, Oktay, Pornsak Sriamornsak, and Crispin R Dass. 2013. "Doxorubicin: An Update on Anticancer Molecular Action, Toxicity and Novel Drug Delivery Systems." *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x>.

Tesarova, Barbora, Kamil Musilek, Simona Rex, and Zbynek Heger. 2020. "Taking Advantage of Cellular Uptake of Ferritin Nanocages for Targeted Drug Delivery." *Journal of Controlled Release* 325 (May): 176–90. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.06.026>.

Testi, Claudia, Alberto Boffi, and Linda Celeste Montemiglio. 2019. "Structural Analysis of the Transferrin Receptor Multifaceted Ligand(s) Interface." *Biophysical Chemistry* 254. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2019.106242>.

Theil, Elizabeth C. 2013. "Ferritin: The Protein Nanocage and Iron Biomineral in Health and in Disease." *Inorganic Chemistry* 52 (21): 12223–33. <https://doi.org/10.1021/ic400484n>.

Tosoni, Daniela, Claudia Puri, Stefano Confalonieri, Anna Elisabetta Salcini, Pietro De Camilli, Carlo Tacchetti, and Pier Paolo Di Fiore. 2005. "TTP Specifically Regulates the Internalization of the Transferrin Receptor." *Cell* 123 (5): 875–88. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.021>.

Trinder, Debbie, and Erica Baker. 2003. "Transferrin Receptor 2: A New Molecule in Iron Metabolism." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35 (3): 292–96. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00258-3](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00258-3).

Truffi, Marta, Luisa Fiandra, Luca Sorrentino, Matteo Monieri, Fabio Corsi, and Serena Mazzucchelli. 2016. "Ferritin Nanocages: A Biological Platform for Drug Delivery, Imaging and Theranostics in Cancer." *Pharmacological Research* 107: 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.03.002>.

Uyama, R., T. Nakagawa, S.-H. Hong, M. Mochizuki, R. Nishimura, and N. Sasaki. 2006. "Establishment of Four Pairs of Canine Mammary Tumour Cell Lines Derived from Primary and Metastatic Origin and Their E-Cadherin Expression." *Veterinary and Comparative Oncology* 4 (2): 104–13. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5810.2006.00098.x>.

Uyama, Rina, Sung-Hyeok HONG, Takayuki NAKAGAWA, Mitsuhiro YAZAWA, Tsuyoshi

- KADOSAWA, Manabu MOCHIZUKI, Hajime TSUJIMOTO, Ryohei NISHIMURA, and Nobuo SASAKI. 2005. "Establishment and Characterization of Eight Feline Mammary Adenocarcinoma Cell Lines." *Journal of Veterinary Medical Science* 67 (12): 1273–76. <https://doi.org/10.1292/jvms.67.1273>.
- Vico, Gionata De, Manuela Martano, Paola Maiolino, Francesca Carella, and Leonardo Leonardi. 2020. "Expression of Transferrin Receptor-1 (TFR-1) in Canine Osteosarcomas." *Veterinary Medicine and Science* 6 (3): 272–76. <https://doi.org/10.1002/vms3.258>.
- W. Beauvais, J. M. Cardwell and D. C. Brodbelt. 2012. "The Effect of Neutering on the Risk of Mammary Tumours in Dogs – a Systematic Review." *Journal of Small Animal Practice* 53 (June): 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2012.01220.x>.
- Wiese, David A., Tuddow Thaiwong, Vilma Yuzbasiyan-Gurkan, and Matti Kiupel. 2013. "Feline Mammary Basal-like Adenocarcinomas: A Potential Model for Human Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) with Basal-like Subtype." *BMC Cancer* 13 (September). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-403>.
- Xing, Meiyuan, Feifei Yan, Sufen Yu, and Peng Shen. 2015. "Efficacy and Cardiotoxicity of Liposomal Doxorubicin-Based Chemotherapy in Advanced Breast Cancer: A Meta-Analysis of Ten Randomized Controlled Trials." *PLoS ONE* 10 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133569>.
- Zabielska-Koczywaś, Katarzyna, and Roman Lechowski. 2017. "The Use of Liposomes and Nanoparticles as Drug Delivery Systems to Improve Cancer Treatment in Dogs and Cats." *Molecules*. <https://doi.org/10.3390/molecules22122167>.
- Zappulli, Valentina, R Rasotto, D Caliari, M Mainenti, L. Peña, M H Goldschmidt, and M Kiupel. 2015. "Prognostic Evaluation of Feline Mammary Carcinomas: A Review of the Literature." *Veterinary Pathology* 52 (1): 46–60. <https://doi.org/10.1177/0300985814528221>.
- Zappulli, Valentina, Gabrita De Zan, Barbara Cardazzo, Luca Bargelloni, and Massimo Castagnaro. 2005. "Feline Mammary Tumours in Comparative Oncology." *Journal of Dairy Research* 72 (SPEC. ISS.): 98–106. <https://doi.org/10.1017/S0022029905001263>.
- Zapulli, Valentina, Laura Peña, Roberta Rasotto, Michael H. Goldschmidt, Adelina Gama, Jennifer L. Scruggs, and Matti Kiupel. 2019. *Surgical Pathology of Tumors of Domestic Animals - Volume 2: Mammary Tumors*. Edited by Davis Thompson Foundation. Gurnee, Illinois.
- Zhang, Chenxi, Xiaorong Zhang, and Guanghua Zhao. 2020. "Ferritin Nanocage: A Versatile Nanocarrier Utilized in the Field of Food, Nutrition, and Medicine." *Nanomaterials* 10 (9): 1–25. <https://doi.org/10.3390/nano10091894>.
- Zugazagoitia, Jon, Cristiano Guedes, Santiago Ponce, Irene Ferrer, Sonia Molina-Pinelo, and Luis Paz-Ares. 2016. "Current Challenges in Cancer Treatment." *Clinical Therapeutics*. Excerpta Medica Inc. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2016.03.026>.

