



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA ANIMALE, PRODUZIONI E SALUTE

DIPARTIMENTO DI BIOMEDICINA COMPARATA E ALIMENTAZIONE

Corso di Laurea Magistrale a ciclo unico in

MEDICINA VETERINARIA

Analisi genomica del tumore mammario felino da campioni paraffinati: step preliminari e riferimenti specifici all'espressione del Transferrin Receptor 1 (TFR1)

Relatore: Prof.ssa Valentina Zappulli

Correlatore: Dr. Alessandro Sammarco

Correlatore: Dr. Nicolò Rensi

Laureando: Alessandro Calore

Matricola N. 1056045

ANNO ACCADEMICO 2018/2019

INDICE

Sommario

ABSTRACT	III
RIASSUNTO	V
1.INTRODUZIONE	1
1.1 Il tumore mammario nel gatto.....	1
1.2 Il gatto come modello animale	4
1.3 Tecniche di next generation sequencing (NGS)	7
1.3.1 Funzionamento della piattaforma Roche/454 Life science	9
1.3.2 Funzionamento della piattaforma Illumina/Solexa	11
1.3.3 Funzionamento della piattaforma Applied Biosystems/SOLiD	13
1.3.4 Funzionamento della piattaforma Helicos Biosciences	15
1.3.5 Applicazione delle tecniche di NGS	17
1.3.6 Whole exome sequencing	19
1.4 Estrazione di materiale genetico da campioni FFPE	20
1.5 Il recettore della transferrina n°1.....	22
1.5.1 Il recettore della transferrina n° 2.....	35
1.5.2 La transferrina	38
1.5.3 Il metabolismo del ferro.....	41
1.5.4 Il ruolo del Transferrin receptor 1 nelle neoplasie umane	47
1.5.5 Il TfR1 nel tumore al seno	49
1.5.6 Il TfR1 negli animali domestici	50
1.5.7 Il TfR1 come target per terapie antineoplastiche innovative.....	51
2. SCOPO DELLA TESI	55
3. MATERIALI E METODI	56
3.1selezione ed estrazione dei campioni FFPE	56
3.1.1 Purificazione in etanolo	63
3.1.2 Elettroforesi su gel di agarosio del materiale genetico estratto da campioni FFPE	64

3.2	Analisi d'espressione del TfR1 tramite colorazione immunoistochimica	65
3.2.1	conta manuale delle cellule e valutazione tramite <i>software Image J</i>	66
3.3	Analisi d'espressione del TfR1 su linee cellulari	69
3.3.1	Immunofluorescenza.....	69
3.3.2	Estrazione degli acidi nucleici dalle linee cellulari.....	70
3.3.4	Retrotrascrizione dell'RNA ottenuto dalle linee cellulari	71
3.3.3	Disegno dei <i>primers</i> per la <i>real-time</i> PCR	72
3.3.5	<i>Real-Time</i> PCR	73
3.3.6	Elettroforesi su gel di agarosio dell'amplificato ottenuto da RT-PCR.....	75
3.3.7	Preparazione dell'amplificato per il sequenziamento	76
4.	RISULTATI	78
4.1	Estrazione degli acidi nucleici da tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina	78
4.2	Analisi dell'espressione del TfR1 sulle linee cellulari di gatto, cane e donna.	80
4.2.1	Risultati dell'immunofluorescenza.....	80
4.2.2	Risultati dell'analisi molecolare	81
4.3	Indagine di espressione del TfR1 da campioni sottoposti ad immunoistochimica	85
4.3.1	Risultati della colorazione immunoistochimica	85
5.	DISCUSSIONE	88
6.	CONCLUSIONI.....	98
	Appendice	99
	Bibliografia	109
	Ringraziamenti	158

ABSTRACT

The first aim of this study was to show the feasibility of the application of the extraction technique actually used in human medicine for formalin fixed paraffin embedded samples to veterinary samples, particularly to feline mammary carcinomas.

Secondly, we wanted to test applicability of the obtained nucleic acids to the common molecular biology tests and above all to the innovative ones, like *whole exome sequencing*, in order to identify, catalogue and if possible compare healthy mammary tissue, neoplastic mammary tissue, neoplastic metastatic mammary tissue and lymph node metastasis.

This could open the way to a new genetic approach to classification, prognosis and to the development of new therapeutic drugs for feline mammary tumors.

The last goal was to show the expression of the *Transferrin Receptor 1* on various feline mammary tumours and his differences in its expression on the categories of tissues listed above.

Cancer in pets is one of the most unfortunately common and difficult to approach disease and it is also a tremendous public health problem for our society.

There is a continuous development of new diagnostic and therapeutic strategies and the veterinary medicine field is making enormous steps to identify, classify and treat those kinds of diseases.

This study follows this path of innovation using the new technologies developed in the last years to perform a study in one of the less studied field of veterinary medicine, the genetic oncology.

We aimed to follow the way to new analytic approaches to identify genetic mutations on cancer genome using samples very rarely used before and so to acquire more information out of enormous archives which can lead to innovative diagnostic and therapeutic protocols.

The importance of this study is not only for veterinary medicine but also for the human counterpart because our pets are revealing themselves as optimal models to study human cancer development and behaviour.

RIASSUNTO

Il primo obiettivo di questo studio è stato indagare la fattibilità dell'utilizzo di campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina per estrarre materiale genetico da impiegare in analisi successive, secondo protocolli già sperimentati in medicina umana ed applicati in questo particolare caso al tumore mammario felino.

Uno scopo secondario è stato anche quello di verificare la possibilità di utilizzo del DNA estratto dai campioni per effettuare metodiche di biologia molecolare classiche ed innovative, come ad esempio il *Whole Exome Sequencing*, al fine di evidenziare eventuali differenze presenti tra il genoma del tessuto mammario sano, di quello neoplastico, di quello neoplastico metastatico e di quello presente nelle stesse metastasi linfonodali.

Il fine è quello di gettare le basi per classificare le eventuali mutazioni presenti nelle varie categorie di tessuti sopra elencati e di correlarle tra loro a scopo classificativo, prognostico e terapeutico.

Ultimo obiettivo è stato quello di dimostrare la presenza del recettore per la transferrina di tipo 1 nei carcinomi mammari felini e la sua differenza di espressione tra le categorie di tessuti sopra elencati.

Le neoplasie negli animali sono una delle patologie più diffuse e rappresentano anche per l'uomo un problema enorme di sanità pubblica, ciò giustifica il continuo sviluppo di nuove tecniche diagnostiche e terapeutiche che sta progressivamente interessando anche la medicina veterinaria.

Questo studio segue questa scia di continua innovazione utilizzando alcune delle più recenti tecnologie sviluppate negli ultimi anni per incrementare le nozioni in nostro possesso in una delle branche più importanti ma meno studiate nel complesso della medicina veterinaria, cioè la genetica oncologica.

L'obiettivo è perciò quello di rendere possibile l'utilizzo di campioni raramente usati finora in medicina veterinaria per raccogliere informazioni da archivi molto ampi sul

genoma tumorale al fine di aprire la strada ed eventuali nuovi protocolli classificativi, diagnostici e terapeutici.

L'importanza è doppia in quanto i vantaggi non sarebbero limitati alla sola medicina veterinaria ma interesserebbero anche quella umana dato che le neoplasie spontanee dei nostri animali si stanno rivelando sempre più ottimi modelli per lo studio delle controparti umane.

1.INTRODUZIONE

1.1 Il tumore mammario nel gatto

Il tumore mammario nel gatto è la seconda tipologia di tumore più diffusa in Italia (Vascellari, Baioni, Ru, Carminato, & Mutinelli, 2009) e la terza a livello globale (MacVean, Monlux, Anderson, Silberg, & Roszel, 1978) e nella maggioranza dei casi (80-90%) si tratta di forme maligne (Graf et al., 2016).

Sono riportate piccole percentuali di neoplasie mammarie anche nel gatto maschio, in genere maligne (Graf et al., 2016).

I fattori predisponenti sono l'età, la razza e l'età alla quale è stata eseguita l'eventuale sterilizzazione, inoltre in generale le neoplasie maligne nel gatto sono in percentuale più frequenti che nel cane rispetto alle benigne (MacVean et al., 1978).

La sterilizzazione sembra essere protettiva nei confronti del tumore mammario felino se eseguita entro l'anno d'età con un calo di probabilità di sviluppo della neoplasia dell' 86% (Overley, Shofer, Goldschmidt, Sherer, & Sorenmo, 2005).

Le razze più soggette allo sviluppo del tumore mammario sono il Siamese ed affini (Egenvall et al., 2010) e la somministrazione continuativa di progestinici come contraccettivi sembra favorire lo sviluppo di questo tipo di neoplasia (W Misdorp, Romijn, & Hart, 1991).

L'aumentare dell'età sembra favorire lo sviluppo di neoplasie mammarie nel gatto e sembra che la razza Siamese sia meno soggetta a questo tipo di distribuzione epidemiologica sviluppando tumori mammari in media in età più precoce rispetto alle altre razze (H. M. Hayes, Milne, & Mandell, 1981).

Le mammelle nel gatto sono disposte in 4 paia di cui una inguinale, due addominali ed una toracica.

Sono vascolarizzate da vasi superficiali che derivano dall'arteria epigastrica superficiale craniale e caudale, la prima deriva dall'arteria toracica interna mentre la seconda dalla pudenda esterna.

Questi vasi decorrono paralleli alla linea alba e vanno diramandosi a circondare il capezzolo (Merighi, 2005).

Le mammelle del gatto sono drenate dai linfonodi ascellari ed inguinali superficiali (B. Singh, 2017).

La classificazione WHO del tumore mammario nel gatto si basa sulle caratteristiche istopatologiche anche se diversi studi hanno preso in considerazione una classificazione che associa istopatologia ad immunoistochimica similmente a quanto viene fatto in medicina umana (Beha et al., 2014; Brunetti et al., 2013).

Le lesioni si dividono in :

- Iperplastiche e displastiche

che comprendono ectasia duttale, iperplasia lobulare, iperplasia lobulare con attività secretoria, iperplasia lobulare con fibrosi, epiteliosi, papillomatosi e cambiamenti fibroadenomatosi (Wim. Misdorp, Armed Forces Institute of Pathology (U.S.), American Registry of Pathology., & WHO Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology., 1999)

- Lesioni benigne

rare nel gatto, comprendono adenoma, adenoma duttale, fibroadenoma ed adenoma intraduttale papillare (Wim. Misdorp et al., 1999)

- Lesioni maligne

comprendono carcinoma tubulare, carcinoma papillare, carcinoma solido, carcinoma cistico papillare, carcinoma cribriforme, carcinoma micro papillare invasivo, comedocarcinoma e più rari il carcinoma squamoso, mucinoso ed il *lipid rich* (Wim. Misdorp et al., 1999) ultimamente è stato segnalato il carcinoma complesso anche nella gatta (Seixas, Palmeira, Pires, & Lopes, 2008) con però dubbi sulla classificazione e da ritenere più probabilmente come un carcinoma duttale (V Zappulli et al., 2013) e quello infiammatorio (Pérez-Alenza, Jiménez, Nieto, & Peña, 2004).

Lo *staging* si basa sulla classificazione WHO modificata (Owen, 1980) e considera le dimensioni della massa, il coinvolgimento linfonodale e la presenza di metastasi a

distanza.

STAGE	TUMOR SIZE	LYMPH NODE STATUS	METASTASIS
Stage 1	T1 <2 cm	N0	M0
Stage 2	T2 2-3 cm	N0	M0
Stage 3	T1 or T2	N1 (positive)	M0
	T3 >3 cm	N0 or N1	M0
Stage 4	Any	Any	M1

Data from McNeill CJ, Sorenmo KU, Shofer FS, et al: Evaluation of adjuvant doxorubicin-based chemotherapy for the treatment of feline mammary carcinoma, *J Vet Intern Med* 23:123-129, 2009.

Immagine 1. Sono riportati i criteri per la classificazione delle neoplasie secondo lo *staging* approvato dalla WHO; modificata da (Withrow, Vail, & Page, 2013)

I fattori prognostici principali sono l'età (più l'animale è anziano più la sopravvivenza è bassa, anche se non c'è concordanza tra tutti gli studi eseguiti), lo stato riproduttivo (meno comuni le neoplasie negli animali sterilizzati ed in quelli non sottoposti a terapia ormonale contraccettiva), la razza (Siamesi e razze a pelo lungo sembrano avere un *out come* peggiore), l'invasione vascolare e linfonodale, diametro tumorale (prognosi peggiore se > 3 cm ma servono metodologie di misurazione standard), tipologia istologica (il carcinoma micro papillare invasivo ha un tempo medio di sopravvivenza minore rispetto alla media mentre sembra essere meno aggressivo della media il carcinoma duttale/complesso) e *grading* (osservando pleomorfismo cellulare, conta mitotica e formazione di tubuli).

Altri parametri come espressione di HER2 o cellule positive per Ki 67 sono stati presi in considerazione da vari studi senza però arrivare ad avere dati sufficienti e concordanti per poterli annoverare tra i fattori prognostici (V Zappulli et al., 2015).

1.2 Il gatto come modello animale

Le neoplasie che colpiscono spontaneamente gli animali domestici sono riconosciute da tempo essere degli ottimi modelli per lo studio delle corrispondenti neoplasie umane, (Vail & Macewen, 2000) in quanto i nostri animali domestici condividono con noi l'ambiente e quindi anche i fattori predisponenti legati ad esso (Valentina Zappulli, De Zan, Cardazzo, Bargelloni, & Castagnaro, 2005), presentano inoltre un'incidenza, istotipo, età rapportata d'insorgenza e comportamento biologico simili alla controparte umana (Macewen, 1990).

La relativamente breve vita dei nostri animali domestici e la progressione neoplastica più rapida ne predispone l'uso per lo studio della risposta comparata ad eventuali terapie in un arco di tempo più breve e compatibile con le esigenze di studio umane ed eticamente è più corretto trattare cercando di sviluppare nuovi trattamenti sia per l'animale che per l'uomo neoplasie emerse spontaneamente e non frutto di induzione in laboratorio (Zappulli et al., 2005).

Il gatto si sta affermando come modello animale ideale per lo studio del tumore mammario triplo negativo della donna (ER-,PR-,HER2-), una tipologia di neoplasia molto aggressiva e che difficilmente risponde alle terapie (Brunetti et al., 2013; Caliari et al., 2014; Maria et al., 2005).

Dal punto di vista molecolare la classificazione il tumore mammario umano si basa sulla classificazione seguente e viene diviso a seconda dell'espressione o meno di alcuni recettori (Estrogeni, Progesterone, HER2, citocheratine 5/6/14/19 e p63) in cinque categorie che sono: *luminal A*, *luminal B*, *c-erb-2 overexpressing*, *basal like* e *normal like* (Beha et al., 2014).

Luminal A = ER+, PR+, c-erb-2 +

Luminal B = ER+, PR+, c-erb-2 -

c-erb-2 overexpressing = ER-, PR-, c-erb-2 +

Basal like = ER-, PR-, c-erb-2 -, CK 14/5/6 +

Normal like = ER+, PR+, c-erb-2 -, Ki 67 +

Altro fattore estremamente interessante che eleva il gatto a modello ideale per lo

studio del tumore mammario umano è l'elevata omologia genetica nei tratti chiave per lo sviluppo e la progressione neoplastica nelle due specie (Adega, Borges, & Chaves, 2016; Maria et al., 2005).

Il sequenziamento del genoma del gatto (Pontius et al., 2007; Tamazian et al., 2014) ha permesso anche un confronto tra le varie razze e di avere quindi una mappatura che consentisse poi di rilevare eventuali anomalie genetiche responsabili o favorenti la trasformazione neoplastica del tessuto mammario e di vari organi, oltre anche a permettere lo studio di alterazioni responsabili di malattie congenite anche tramite tecniche di sequenziamento innovative (Lyons et al., 2016).

La grande omologia tra genoma umano e felino permette di estrapolare e valutare sequenze di RNA, DNA, cromosomi e proteine potenzialmente coinvolti nel processo di genesi tumorale (Adega et al., 2016), inoltre l'omologia tra i geni driver per la cancerogenesi è maggiore tra genoma umano e felino rispetto a quello murino (Cekanova & Rathore, 2014).

Basandosi su tecniche di citogenomica si è evidenziata una grande instabilità genetica delle cellule neoplastiche mammarie notevole anche a livello cromosomico (Adega et al., 2016) soprattutto a livello di alcuni tratti cromosomici come A3, D2, F1 e F2 nella linea cellulare K248C, B4 e C2 nella linea cellulare K248P (Minke et al., 1991) ed in generale un numero di cromosomi non sempre consoni con quello fisiologico della specie (Borges, Adega, & Chaves, 2016).

Similmente all'uomo, anche nel gatto il tumore mammario tende a metastatizzare in siti come i linfonodi regionali, polmoni, pleura, fegato, surrenali, encefalo, reni ed ossa (Bostock, 1986; Kennecke et al., 2010).

Analizzando il fenotipo molecolare del tumore primario e delle metastasi si è scoperto che non solo vi sono differenze in termini di espressione genetica tra tessuto mammario sano e neoplasia mammaria primaria ma anche tra quest'ultima e le sue metastasi a distanza anche in base alla classificazione istologica del tumore primario (Beha et al., 2014; Brunetti et al., 2013).

This table summarizes the critical cancer genes already analyzed in feline mammary carcinomas.

Gene	Type/Name	DNA Mutations	Expression Profile	Protein	References
<i>TP53</i>	Suppressor gene	Missense mutations and deletions	Mutant proteins Nuclear immunopositivity	p53	Mayr et al. 2000 [60], Mayr et al. 1995 [61], Mayr et al. 1998 [62], Nasir et al. 2000 [77]
<i>ERBB2</i>	Growth factor receptor tyrosine kinase 2	Sequence variants/haplotypes non-synonymous mutations	Underexpression Overexpression	erbB-2	Santos et al. 2012 [4], Santos et al. 2013 [41], De Maria et al. 2005 [2], Órdas et al. 2007 [79], Soares et al. 2013 [63], Soares et al. 2016 [78]
<i>MST1R</i>	Tyrosine kinase receptor	Point mutations	Overexpression	MST1R	De Maria et al. 2002 [48]
<i>ER</i>	Estrogen receptor	Sequence/isoform variants	Exon deleted splicing variants Underexpression in metastases when compared to the primary tumors	ER	Cardazzo et al. 2005 [50], Soares et al. 2016 [78]
<i>TWIST1</i>	Oncogene	Intronic germline sequence variants	Underexpression Overexpression	Twist-1	Baptista et al. 2012 [49], Yang et al. 2004 [72], Watanabe et al. 2004 [122]
<i>BCL-2</i>	Protein Phosphatase 1 Blocks the apoptotic death	No information	Overexpression	pro-survival protein BCL-2	Madewell et al. 1999 [76]
<i>CCNA2</i>	Cyclin A Regulator of CDK kinases	No information	Regular expression	Cyclin A	Murakami et al. 2000 [51]
<i>COX2</i>	Cytochrome C Oxidase Assembly Factor	No information	Variable expression	COX-2	Sayasith et al. 2009 [80]
<i>PTEN</i>	Suppressor gene Phosphatase and Tensin homolog	No information	Underexpression	PTEN	Ressel et al. 2009 [81]
<i>AKT</i>	Serine-threonine protein kinase	No information	Overexpression	Akt	Maniscalco et al. 2012 [82]
<i>mTOR</i>	Mechanistic Target of Rapamycin (Serine/Threonine Kinase)	No information	Overexpression and activation by phosphorylation via the <i>PI3K/AKT</i> signaling pathway in triple negative FMCs	mTOR	Maniscalco et al. 2013 [83]
<i>CXCR4</i>	Chemokine (CXC Motif) Receptor 4	No information	Overexpression	CXCR4	Ferrari et al. 2012 [84]

Gene	Type/Name	DNA Mutations	Expression Profile	Protein	References
<i>CTNNS</i>	Cadherin-Associated Protein	No information	Underexpression	Catenins	Zappulli et al. 2012 [85]
<i>CDH1</i> <i>CDH2</i>	Adhesion proteins	No information	Underexpression and abnormal cellular location	E-cadherin N-cadherin	Zappulli et al. 2012 [85], Buendia et al. 2014 [86]
<i>CDH3</i>	Adhesion proteins	No information	Overexpression	P-cadherin	Figueira et al. 2014 [119]
<i>CLDN2</i> <i>CLDN7</i>	Tight junctions membrane proteins	No information	Underexpression	Claudins 2 and 7	Flores et al. 2014a, b [87,88]
<i>NOTCH1</i>	Transmembrane protein	No information	Overexpression and aberrant location	NOTCH-1	Ressel et al. 2014 [89]
<i>PR</i>	Progesterone Receptor	No information	Underexpression in metastases	PR	Soares et al. 2016 [78]
<i>KRT 5/6</i>	Cytokeratin Intermediate filament protein	No information	Variable expression	CK5/6	Soares et al. 2016 [78]
<i>MKI67</i>	Nuclear protein associated to cellular proliferation	No information	Overexpression in metastases	Ki-67	Soares et al. 2016 [90]

Immagine 2. Riassunto dei principali geni analizzati finora con le annesse mutazioni o alterazioni più frequentemente riscontrate nei casi di tumore mammario felino; modificata da (Adega, Borges, & Chaves, 2016)

1.3 Tecniche di next generation sequencing (NGS)

Negli ultimi anni si stanno sviluppando sempre più tecniche di biologia molecolare innovative atte a sequenziare grandi genomi in tempo ristretto ed in un solo esperimento, consentendo di caratterizzare le neoplasie a livello di genomica, trascrittomica ed epigenetica catalogando tutte le mutazioni, le variazioni di coppie di basi azotate ed i riarrangiamenti somatici in un intero genoma tumorale con una risoluzione che arriva al paio di basi, il tutto in un tempo medio di alcune settimane (Reis-Filho, 2009).

L'utilizzo di queste tecniche potrebbe permettere un diverso approccio nella classificazione del tumore mammario sia in medicina umana che in medicina veterinaria, passando dall'attuale modalità descrittiva e prognostica ad una basata sulle aberrazioni molecolari che guidano la trasformazione neoplastica e sul network molecolare che queste ultime attivano o disattivano per mantenere le capacità di sopravvivenza della cellula tumorale ed in maniera ancor più importante basata sugli agenti antineoplastici conseguentemente efficaci sulle diverse sottotipologie di neoplasie mammarie così identificate (Reis-Filho, 2009).

Interessante è anche la prospettiva di distinguere le mutazioni *driver* da quelle secondarie ed indotte dalle terapie a cui il paziente è sottoposto (Reis-Filho, 2009).

Negli ultimi trent'anni il metodo di sequenziamento di DNA più utilizzato è stato quello secondo Sanger, basato sull'incorporamento selettivo nella sequenza terminale di un dideossinucleotide da parte di una DNA polimerasi durante una replicazione in vitro del DNA (Sanger & Coulson, 1975) ma dal 2005, quando è stata lanciata in commercio la prima piattaforma di pirosequenziamento massivo in parallelo, si sono progressivamente moltiplicate ed affinate le metodologie che sono state definite poi di NGS.

Nonostante le varie piattaforme in commercio differiscano per la conformazione di supporti, spazi e dei reagenti utilizzati per le procedure, esse hanno in comune alcune caratteristiche principali e ricorrenti cioè il sequenziamento massivo in

parallelo di sequenze modello di DNA o di singole molecole di DNA separate spazialmente ed amplificate in maniera clonale con una tecnica di sintesi *flow cell* e successivamente, grazie a cicli continui di estensione nucleotidica basata sull'uso di polimerasi o su legami di oligonucleotidi successivi, si riescono ad ottenere sequenze di centinaia di mega o gigabasi in un solo esperimento (Voelkerding, Dames, & Durtschi, 2009).

Le tecniche di NGS permettono anche il sequenziamento dell'RNA (Z. Wang, Gerstein, & Snyder, 2009) con tecniche di *digital gene expression*, sequenziamento di entrambi i tratti conclusivi del frammento di RNA e sequenziamento di piccole sequenze di RNA non codificante utilizzate per gli studi di trascrittomica (Reis-Filho, 2009).

Le piattaforme attualmente più utilizzate per il sequenziamento del DNA con tecniche NGS sono: Roche/454 Life sciences, Illumina/Solexa, Applied Biosystems/SOLiD ed Helicos biosciences and single-molecule sequencing (Voelkerding et al., 2009).

1.3.1 Funzionamento della piattaforma Roche/454 Life science

La prima si basa sulla convergenza tecnologica del pirosequenziamento e della PCR in emulsione (Nyren, Pettersson, & Uhlen, 1993; Ronaghi, Karamohamed, Pettersson, Uhlén, & Nyrén, 1996; Tawfik & Griffiths, 1998) e consiste in una piattaforma composta di pozzetti rivestiti di metallo per diminuire il “rumore genetico” di fondo ed una sequenza guida di DNA è creata tramite frammentazione per nebulizzazione o sonicazione.

I frammenti così creati sono collegati ad un oligonucleotide specifico tramite la ricostruzione della loro sub unità terminale e la *library* così creata è diluita alla concentrazione di una singola molecola, denaturata ed ibridizzata con microsfere contenenti sequenze complementari a quella dell’oligonucleotide già citato.

Le sfere sono poi poste in una micro vescicola in emulsione olio-acqua e qui avviene tramite PCR l’espansione clonale delle singole molecole di DNA connesse alla sfera.

Dopo l’amplificazione l’emulsione è distrutta e le sfere contenenti il DNA amplificato sono arricchite, poste dopo diluizione all’interno dei pozzetti con enzimi per il sequenziamento che avviene grazie all’aggiunta dei dideossinucleotidi che per ogni incorporazione rilasciano pirofosfato e grazie a questa reazione viene rilevato l’evento da una fotocamera permettendo di avere il risultato del sequenziamento (Voelkerding et al., 2009).

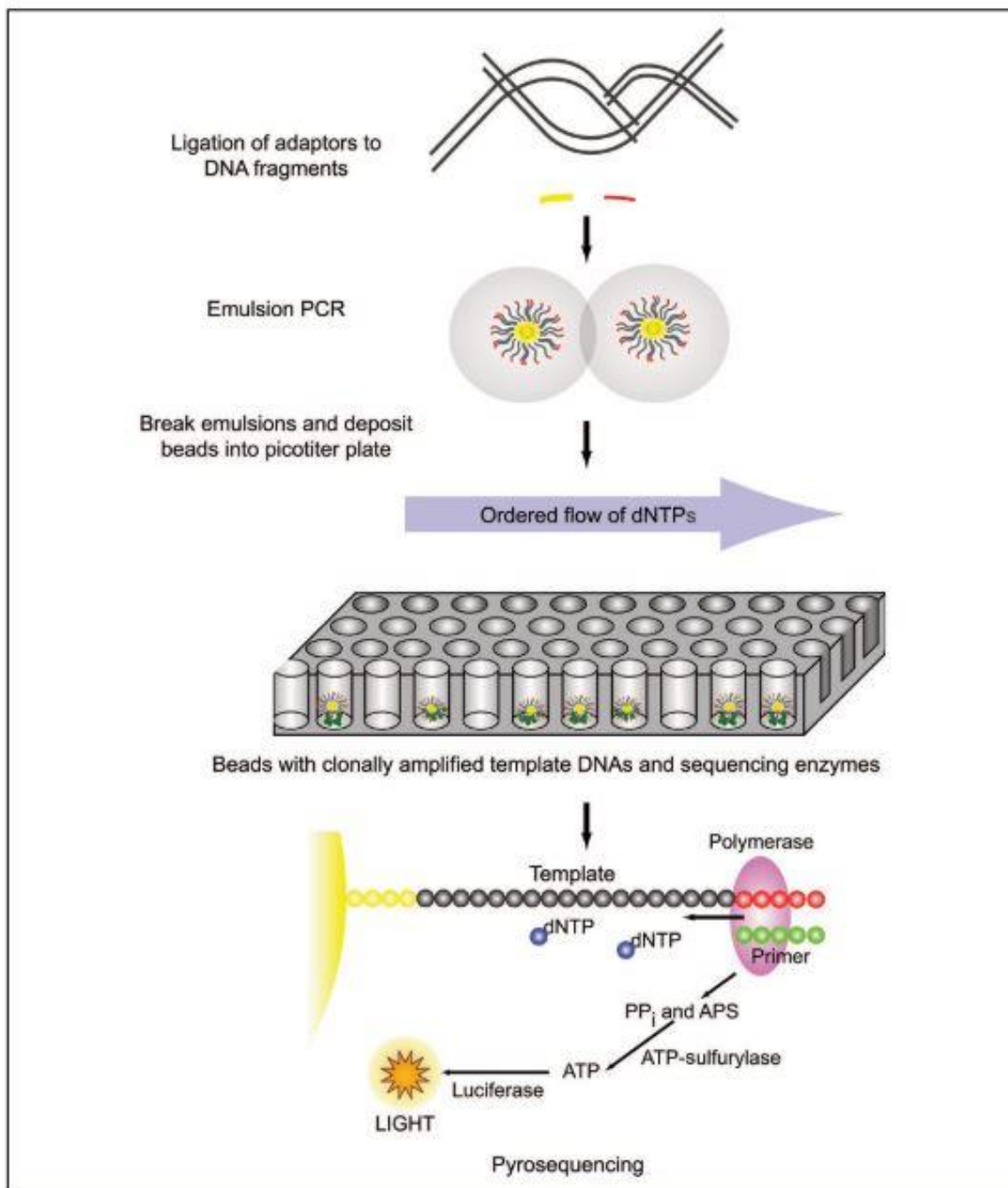


Fig. 1. Roche 454 GS FLX sequencing.

Template DNA is fragmented, end-repaired, ligated to adaptors, and clonally amplified by emulsion PCR. After amplification, the beads are deposited into picotiter-plate wells with sequencing enzymes. The picotiter plate functions as a flow cell where iterative pyrosequencing is performed. A nucleotide-incorporation event results in pyrophosphate (PP_i) release and well-localized luminescence. APS, adenosine 5'-phosphosulfate.

Immagine 3. La seguente rappresentazione grafica descrive e riassume graficamente il processo descritto a proposito del funzionamento della piattaforma Roche/454 Life science; Tratta da (Voelkerding et al., 2009)

1.3.2 Funzionamento della piattaforma Illumina/Solexa

La seconda si basa su di un supporto composto da una base trasparente con sulla superficie otto corsie sulle quali sono legate ancora oligonucleotidiche.

La sequenza guida di DNA è frammentata fino alla lunghezza di alcune centinaia di basi e riparato alle estremità fino a formare una sequenza interrotta nell'estremità 5' mentre l'attività polimerasica del frammento di Klenow (con attività polimerasica esclusiva da 5' a 3') aggiunge un'adenosina al frammento 3', il tutto per favorire successivamente il legame con l'oligonucleotide ancorato al supporto grazie alla timina presente nell'estremità 3' di quest'ultimo.

Il DNA nel supporto è amplificato tramite tecnica a ponte, cioè ancorando i frammenti di DNA che si piegano a ponte connettendosi anche con l'oligonucleotide successivo.

Cicli multipli d'amplificazione successivi trasformano il singolo frammento guida di DNA in un *cluster* amplificato clonalmente.

Per il sequenziamento i *clusters* sono denaturati per lasciare solo i filamenti *forward* che vengono legati per ibridazione ad un *primer* complementare alla sequenza adattatrice, segue poi l'aggiunta di una polimerasi e dei 4 nucleotidi di stop marcati ognuno con una diversa molecola fluorescente.

Dopo l'incorporazione i reagenti in eccesso sono lavati via e viene fatto partire il secondo ciclo di sequenziamento ottenendo in circa tre giorni un *output* per ogni piattaforma superiore al miliardo di paia di basi per esperimento.

La particolarità di questo sistema è quella di poter leggere i frammenti da entrambe le terminazioni, facilitando l'allineamento e l'assemblamento delle *library* anche in caso di piccoli frammenti (Voelkerding et al., 2009).

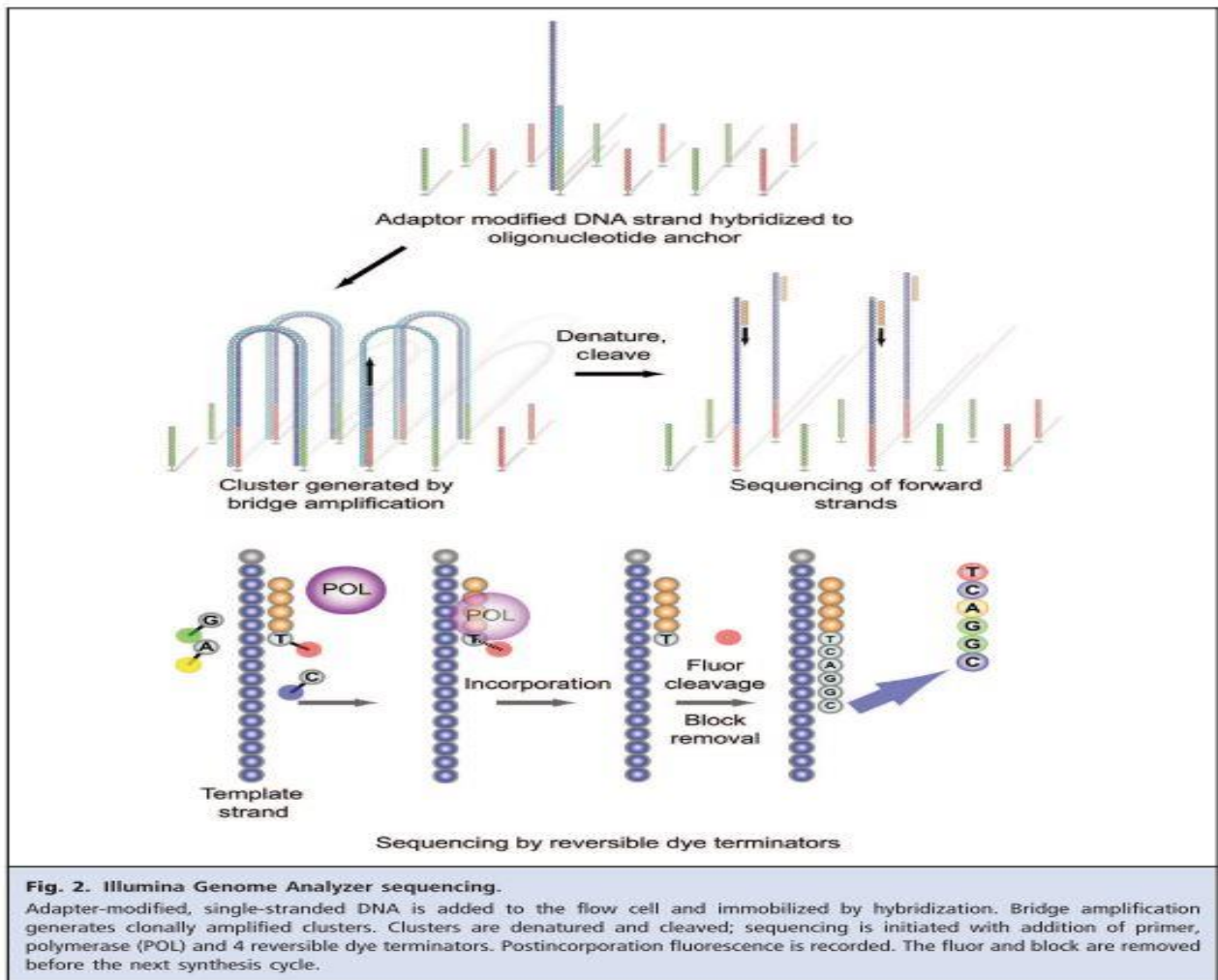


Fig. 2. Illumina Genome Analyzer sequencing.

Adaptor-modified, single-stranded DNA is added to the flow cell and immobilized by hybridization. Bridge amplification generates clonally amplified clusters. Clusters are denatured and cleaved; sequencing is initiated with addition of primer, polymerase (POL) and 4 reversible dye terminators. Postincorporation fluorescence is recorded. The fluor and block are removed before the next synthesis cycle.

Immagine 4. La seguente rappresentazione grafica descrive e riassume graficamente il processo descritto a proposito del funzionamento della piattaforma Illumina/Solexa; tratta da (Voelkerding et al., 2009).

1.3.3 Funzionamento della piattaforma Applied Biosystems/SOLiD

La terza si basa sulla legatura dei nucleotidi; le sequenze di preparazione sono simili a quelle del metodo precedente con i frammenti di DNA legati agli oligonucleotidi, attaccati alle sfere ed amplificati clonalmente su emulsione.

Le sfere sono adese ad una piattaforma di sequenziamento ed il sequenziamento inizia allineando un oligonucleotide *primer* complementare all'adattatore sulla sequenza del DNA modello.

IL *primer* è orientato per fornire un gruppo 5' fosforilato per il legame interrogando così la sonda utilizzata durante la prima fase di legatura della sequenza.

Ciascuna sonda d'interrogazione è costituita da un ottamero che consiste in una sequenza 3'-5' di due basi specifiche per ogni sonda seguite da 6 basi degenerate collegate a all'estremità 5' marcata da una molecola fluorescente diversa a seconda del nucleotide finale.

Nella prima fase di ligazione della sequenza sono inserite la sonda ed una ligasi termostabile, facendo sì che le sonde competano per allinearsi alla sequenza modello subito prima del *primer* e far partire la prima reazione di ligazione.

Segue poi un lavaggio per rimuovere le sonde non legate ed una raccolta dei segnali ottici emanati dalle sonde tramite fotocamera.

In seguito vengono tagliate le sonde e lavate via per rigenerare la sequenza terminale 5' fosfato.

Seguono poi cinque cicli di ligazione analoghi a quello appena descritto per allungare il primo *primer* che viene poi denaturato ed un nuovo *primer* con una base diversa rispetto al precedente è allineato.

Sono eseguiti cinque cicli ognuno con *primer* che si differenziano l'uno dall'altro per il cambio e la perdita di una base come precedentemente descritto ed in questo modo ogni sequenza di DNA modello è sequenziata due volte (Voelkerding et al., 2009).

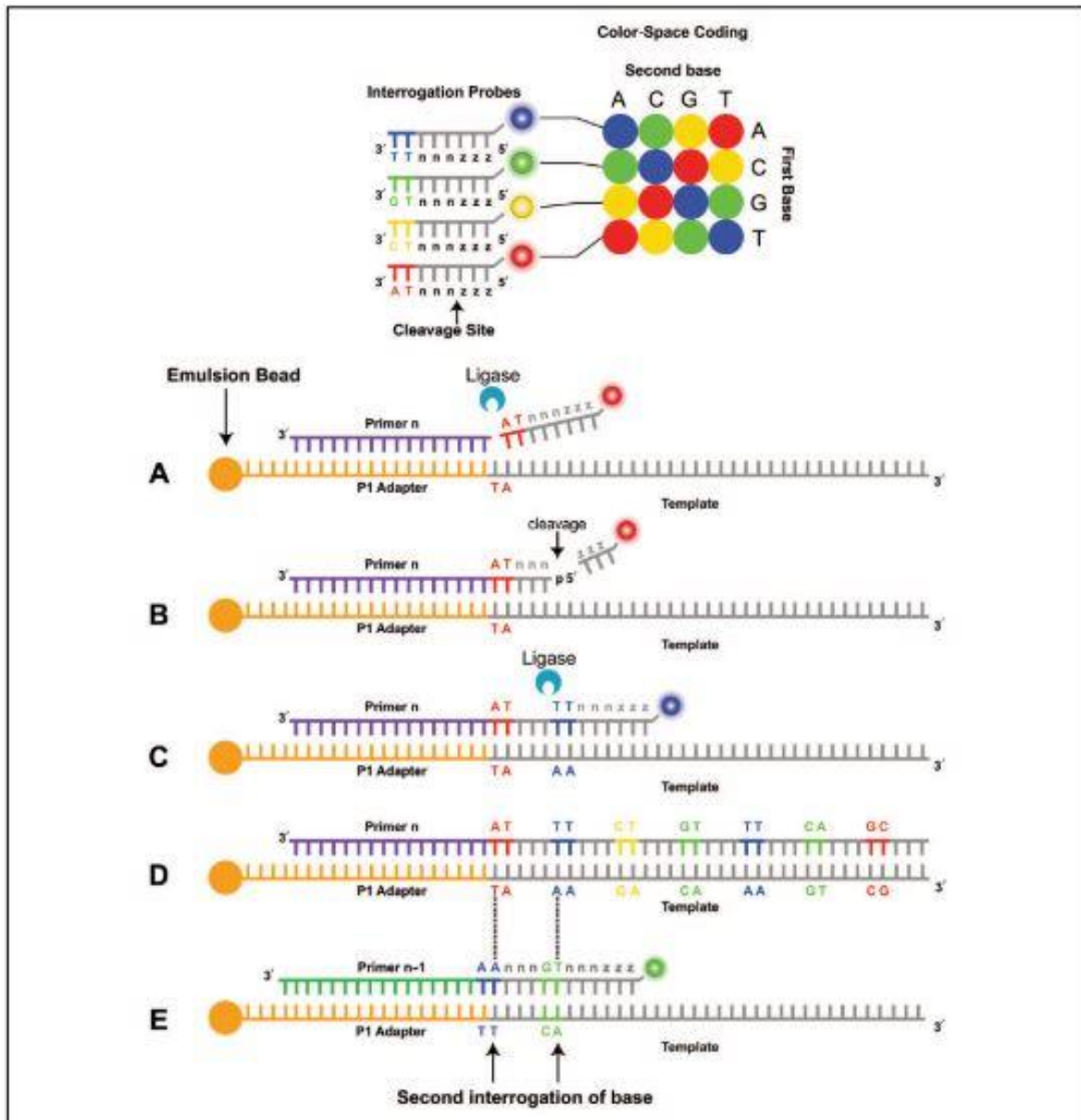


Fig. 3. Applied Biosystems SOLiD sequencing by ligation.

Top: SOLiD color-space coding. Each interrogation probe is an octamer, which consists of (3'-to-5' direction) 2 probe-specific bases followed by 6 degenerate bases (nnnzzz) with one of 4 fluorescent labels linked to the 5' end. The 2 probe-specific bases consist of one of 16 possible 2-base combinations. Bottom: (A), The P1 adapter and template with annealed primer (n) is interrogated by probes representing the 16 possible 2-base combinations. In this example, the 2 specific bases complementary to the template are AT. (B), After annealing and ligation of the probe, fluorescence is recorded before cleavage of the last 3 degenerate probe bases. The 5' end of the cleaved probe is phosphorylated (not shown) before the second sequencing step. (C), Annealing and ligation of the next probe. (D), Complete extension of primer (n) through the first round consisting of 7 cycles of ligation. (E), The product extended from primer (n) is denatured from the adapter/template, and the second round of sequencing is performed with primer (n - 1). With the use of progressively offset primers, in this example (n - 1), adapter bases are sequenced, and this known sequence is used in conjunction with the color-space coding for determining the template sequence by deconvolution (see Fig. 1 in the online Data Supplement). In this technology, template bases are interrogated twice.

Immagine 5. La seguente rappresentazione grafica descrive e riassume graficamente il processo descritto a proposito del funzionamento della piattaforma Applied Biosystems/SOLiD; tratta da (Voelkerding et al., 2009).

1.3.4 Funzionamento della piattaforma Helicos Biosciences

La quarta si basa non sull'amplificazione clonale del tratto di DNA modello ma sulla frammentazione dello stesso con annessa poliadenilazione della sub unità 3' con l'adenosina finale marcata con un fluoroforo.

I filamenti poliadenilati denaturati sono poi ibridizzati ad oligonucleotidi ricchi in sequenze di timina fissati alla piattaforma di sequenziamento.

In seguito una fotocamera con dispositivo ad accoppiamento di carica registra le posizioni dei frammenti catturati ed il tutto poi è clivato e lavato per poi procedere con il sequenziamento che si basa sull'aggiunta di una polimerasi e di uno dei quattro nucleotidi coniugato con cianina 5.

Dopo ulteriore clivaggio e lavaggio è ripetuto questo protocollo aggiungendo ogni volta, fino ad averli usati tutti, un nuovo nucleotide marcato con il colorante già citato.

Dopo il sequenziamento che consiste nell'aggiunta dei quattro nucleotidi per almeno 25-30 volte (e che viene ripetuto due volte per aumentare l'accuratezza) si ottengono sequenze di lettura di 45-50 basi che moltiplicate per tutti i DNA modello iniziali consentono in 24h di sequenziale circa 1Gb (Braslavsky, Hebert, Kartalov, & Quake, 2003; Voelkerding et al., 2009).

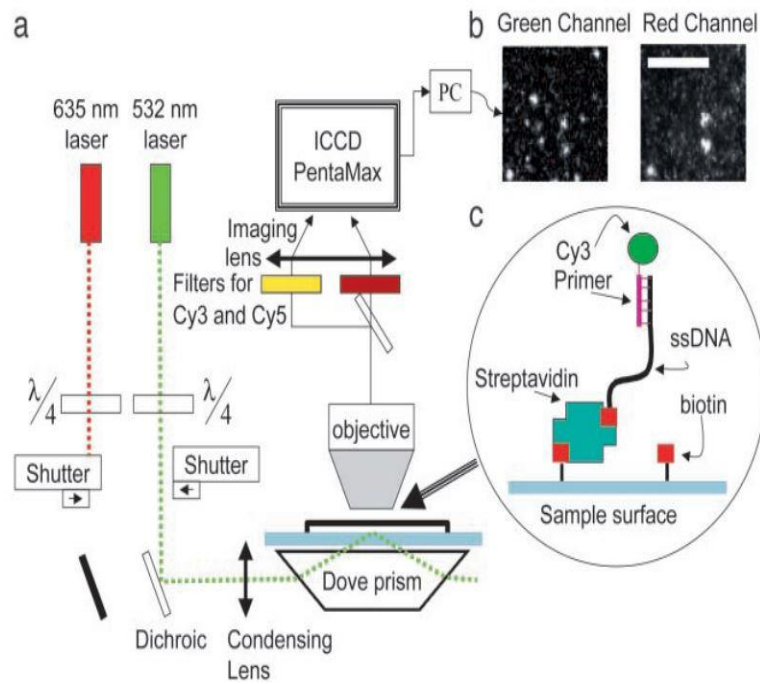


Fig. 1. The experimental system. (a) Schematic drawing of the optical setup. The green laser illuminates the surface in total internal reflection mode while the red laser is blocked. Both Cy3 and Cy5 fluorescence spectra are recorded independently by the intensified charge-coupled device. (b) Single-molecule images obtained by the system. The two images show colocation of Cy3- and Cy5-labeled nucleotides in the same template. (Scale bar = 10 μm .) (c) Schematic of primed DNA template attached to the surface of a microscope slide via streptavidin-biotin.

Immagine 6. La seguente rappresentazione grafica descrive e riassume graficamente il processo descritto a proposito del funzionamento della piattaforma Helicos Biosciences; tratta da (Braslavsky et al., 2003)

1.3.5 Applicazione delle tecniche di NGS

Le applicazioni di queste tecniche innovative di sequenziamento genetico sono le più ampie, andando dal sequenziamento di interi genomi, sia microbici che animali ed umani (Bentley et al., 2008; Pearson et al., 2007; Wheeler et al., 2008) fino all'uso della doppia trascrizione applicata allo studio delle neoplasie, data la difficoltà legata alla formazione di sequenze di lettura corte che mal si sposano con il sequenziamento canonico di genomi non conosciuti (*de novo*) e molto complessi come quelli tumorali (Morozova & Marra, 2008; Tuzun et al., 2005).

Possibile anche l'uso per individuare variazioni nei singoli nucleotidi presenti nella sequenza (Smith et al., 2008) o per determinare l'aplotipo con inserzioni e delezioni di un dato gene d'interesse (Voelkerding et al., 2009).

Altra applicazione estremamente interessante si trova nell'analisi meta genomica per l'individuazione in un campione di un specie d'interesse (ad esempio batterica o virale) e di confrontarne l'affinità con quelle conosciute per capirne la filogenesi e l'origine o nel campo della sicurezza alimentare per individuare le frodi di *aliud pro alio* (Hensel, Malorny, & Borowiak, 2017; Keijser et al., 2008; Palacios et al., 2008; Taboada, Graham, Carriço, & Van Domselaar, 2017).

Campo fondamentale per le tecnologie di NGS è quello della trascrittomica basato sul sequenziamento dell'RNA per mappare e quantificare i trascritti nei campioni biologici (Voelkerding et al., 2009).

Per fare ciò si converte l'mRNA in cDNA che viene poi frammentato e sequenziato tramite tecniche NGS avendo il vantaggio di poter eseguire il tutto senza conoscere il sito d'origine del frammento (Vera et al., 2008) e fornendo informazioni anche sulle variazioni del tratto genetico interessato; la quantificazione dell'espressione si basa sul numero totale di frammenti di RNA letti per ogni esone (Gowda et al., 2006; Nielsen, Høgh, & Emmersen, 2006).

Oltre a ciò con queste tecnologie si possono analizzare RNA sia non codificanti che codificanti spesso non rilevati dalle tecniche standard (Brent, 2008) e che possono

portare in sé variazioni di sequenza nucleotidica (Bainbridge et al., 2006) o in vere proprie sequenze di trascrizione aberranti, come ad esempio nel caso delle neoplasie (Ruan et al., 2007).

Queste tecniche possono essere molto utili anche per lo studio degli *small non coding* RNAs, piccoli frammenti di RNA non codificanti che sembrano avere svariati ruoli nell'organismo, soprattutto induttori e regolatori (Filipowicz, Bhattacharyya, & Sonenberg, 2008) grazie alla loro capacità di individuarne di nuovi (Meyers, Souret, Lu, & Green, 2006) ed alla capacità di non confondere i sncRNA effettivi dai frammenti di RNA prodotti per degradazione di filamenti più grandi con le canoniche metodiche di sequenziamento (Berezikov et al., 2006; Morin et al., 2008).

In conclusione un altro campo di enorme interesse per l'applicazione di queste tecniche è la ricerca sulle proteine leganti il DNA, la loro mappatura assieme a quella dei nucleosomi e la caratterizzazione delle modificazioni epigenetiche d'istoni e DNA, in particolare grazie alla caratterizzazione del profilo delle metilazioni nel DNA (K. H. Taylor et al., 2007) ed al rilevamento delle modificazioni degli istoni (Roh, Ngau, Cui, Landsman, & Zhao, 2004) e la localizzazione delle proteine leganti il DNA tramite una tecnica innovativa che prevede l'uso di microsonde d'ibridazione grazie alle quali si può trovare il sito retro trascrivendo la sua sequenza e senza perciò dover sapere a priori la collocazione di quel tratto genetico (D. S. Johnson, Mortazavi, Myers, & Wold, 2007; Korshunova et al., 2008) e, per concludere, possono essere usate per mappare la posizione dei nucleosomi lungo tutto il genoma (Morozova & Marra, 2008).

Nonostante le tecniche di NGS siano ancora molto legate alla ricerca di base esse stanno man mano prestandosi con l'avanzare degli studi e con il loro progressivo miglioramento anche ad applicazioni in svariati campi, soprattutto connessi con la diagnostica molecolare legata all'identificazione di mutazioni su biopsie tumorali liquide o solide (Voelkerding et al., 2009), nell'identificazione delle modifiche che portano molti agenti eziologici virali o batterici a sviluppare farmaco resistenza (C.

Wang, Mitsuya, Gharizadeh, Ronaghi, & Shafer, 2007) alterazioni genetiche e metaboliche di singoli organelli (Voelkerding et al., 2009), alle alterazioni genetiche che favoriscono la comparsa di patologie ereditarie (Fokstuen et al., 2008; Lyons et al., 2016) e modificazioni del cariotipo fetale anche dai fluidi placentari (R. W. K. Chiu et al., 2008).

1.3.6 Whole exome sequencing

Il *Whole Exome Sequencing* (WES) è una tecnica di NGS che si basa sul sequenziamento solo dei tratti codificanti per proteine del DNA detti esoni, tutti gli esoni di un individuo formano l'esoma (ACMG, 2015).

Considerando che i geni codificanti per proteine sono circa l'1% dell'intero genoma ma che albergano l'85% delle mutazioni causanti o favorenti vari tipi di patologie (M. Choi et al., 2009), si comprende come le tecniche di WES siano e sempre più saranno in futuro un valido e prezioso aiuto per la ricerca e la diagnostica (E. M. Van Allen et al., 2014).

Questa tecnica può essere utilizzata per trovare variazioni di singoli nucleotidi, inserzioni e delezioni di materiale genetico, alterazione del numero di cromosomi e riarrangiamenti genetici di varia natura (Shimoda et al., 2016).

Nonostante gli studi di WES siano molto utilizzati attualmente nell'uomo sia per la ricerca di base che per la diagnostica (M. Choi et al., 2009) e per la ricerca di base sul cane (Broeckx et al., 2017), pochi lavori di NGS sono stati eseguiti nel gatto, nonostante le enormi potenzialità che quest'animale offre sia come modello per alcune patologie umane (Lyons et al., 2016) sia per la caratterizzazione delle modificazioni genetiche che potrebbero essere in futuro utili in terapia e diagnostica medico veterinaria applicata a questa specie.

1.4 Estrazione di materiale genetico da campioni FFPE

Il materiale genetico utilizzato per le tecniche di biologia molecolare può provenire da varie fonti, dai campioni di tessuto congelati fino ai campioni conservati tramite fissazione in formalina ed inclusione in paraffina (Zhang, Lehmann, Shyr, & Guo, 2017). Questi ultimi però pur essendo i campioni più disponibili data la loro modalità di conservazione molto usata da vari patologi per l'istologia, semplice e poco costosa, hanno come limite teorico gli artefatti creati da questo processo di conservazione (Zhang et al., 2017).

Durante il processo di fissazione del tessuto il DNA può essere alterato da modificazioni chimiche e frammentazioni (Daugaard, Kjeldsen, Hager, Hansen, & Wojdacz, 2015; Zhang et al., 2017) oltre che da *cross linking* tra proteine ed acidi nucleici (Lewis, Maughan, Smith, Hillan, & Quirke, 2001).

Danni ancora più gravi derivanti dal processo di fissazione sono causati all'RNA, come degradazione e modificazione chimica (Chung, Braunschweig, & Hewitt, 1992), danno alle code poli-A (Mckinney, Moon, Kulesh, Larsen, & Schoepp, 2009) e legame covalente dei nucleotidi da aggiunta di monometilolo (Masuda, Ohnishi, Kawamoto, Monden, & Okubo, 1999) e si è notato essere strettamente correlato questo processo di decadimento al tempo di conservazione del campione fissato in formalina (Guo et al., 2016).

Oltre a ciò, la fissazione in formalina altera l'appaiamento delle basi portando ad artefatti come combinazioni errate C-T/G-A (Srinivasan, Sedmak, & Jewell, 2002; C. Williams et al., 1999).

Nonostante questi punti sfavorevoli si è notato come tecniche di deparaffinazione e di estrazione da formalina sempre più avanzate e sequenziamento ad alta copertura siano in grado di fornire campioni da FFPE paragonabili come qualità e quantità del materiale genetico a quelli derivati da tessuto fresco, sia per il DNA che per quanto riguarda l'RNA (Munchel et al., 2015; Zhang et al., 2017).

L'utilizzo di campioni FFPE, finora utilizzati solo per le analisi istologiche, anche per studi di genetica è una rivoluzione enorme in quanto consente l'esecuzione di studi retrospettivi su una gran quantità di materiale disponibile e stoccato a basso costo (Munchel et al., 2015).

Ulteriori vantaggi, concentrandosi sullo studio delle alterazioni genetiche da neoplasia, sono e saranno ancor più in prospettiva futura l'uso di campioni FFPE per analisi NGS volte a trovare mutazioni *driver* per le neoplasie e selezionare la terapia conseguente più adatta, lo studio delle mutazioni *driver* anche dal punto di vista retrospettivo per avere un quadro sempre più completo delle alterazioni che portano allo sviluppo ed alla progressione della neoplasia e l'uso dei campioni per ulteriori analisi NGS volte fornire sempre più informazioni anche su altre forme di alterazione del codice genetico, ad esempio regolatorie, tipo la metilazione.

Tutto questo cercando anche di superare le tre sfide principali per il futuro che sono lo sviluppo di tecniche NGS sempre più sofisticate, precise, semplici, rapide ed economiche da usare in generale e sui campioni suddetti, l'ottenere tramite tecnica di estrazione del materiale genetico sempre più omogeneo e costante per quantità e qualità, la riduzione delle quantità di materiale minimo da usare per ottenere un'analisi responsiva ed infine il miglioramento degli algoritmi d'interpretazione dei risultati aggiornando i programmi di bioinformatica in uso con le scoperte che man mano avverranno per avere sempre più conoscenze sulle neoplasie e le loro mutazioni genetiche scatenanti (E. M. Van Allen et al., 2014).

1.5 Il recettore della transferrina n°1

Il recettore per la transferrina (*transferrin receptor* o TfR) è una glicoproteina transmembranaria di tipo due composta da un omodimero dato da due monomeri ognuno del peso molecolare di circa 90 kDa e collegato da due ponti disolfuro (Jing & Trowbridge, 1987).

Ogni monomero è composto da un dominio esterno, uno a singola α elica transmembranaria ed uno intracellulare con azoto (N) terminale (Fuchs, Lücken, Tauber, Engel, & Geßner, 1998).

Il dominio esterno a sua volta possiede tre siti di glicosilazione *N-linked* ed uno *O-linked* fondamentali per la conformazione della proteina e del suo riciclo sulla superficie cellulare (G. R. Hayes, Williams, Lucas, & Enns, 1997).

E' presente una palmitolazione nella porzione transmembranaria che si ipotizza abbia la funzione di favorire l'adesione del recettore alla membrana cellulare e per contribuirne, si presume, all'endocitosi (Alvarez, Gironi, & Davis, 1990).

E' presente anche una fosforilazione nella porzione intracellulare del recettore che però ha funzione ancora non chiarita, sicuramente non legata in ogni caso all'endocitosi dello stesso (Rothenberger, Iacopetta, & Kühn, 1987).

La porzione extracellulare del recettore dal punto di vista strutturale si può suddividere secondo un'architettura composta da tre domini: il primo, simile strutturalmente ad una proteasi e perciò definito *protease-like*, presenta una struttura simile a quella delle carbossi o amino-peptidasi; il secondo, composto da più strati di fogli β con due α eliche alle estremità ed il terzo che consta di un fascio di quattro α eliche che sembrano coadiuvare i ponti disolfuro nel legame dei due monomeri componenti il recettore (Lawrence et al., 1998).

S'ipotizza che il recettore, date le sue caratteristiche strutturali ed aminoacidiche, si sia evoluto da una peptidasi simile alla carbossipeptidasi di tipo 2 presente nella membrana cellulare (Bzdega et al., 1997).

A pH inferiore al 6, condizione che si ritrova quando il recettore viene internalizzato, il TfR subisce un cambio conformazionale che porta all'associazione spontanea non covalente dei due monomeri, evento comunque limitato dal legame con la transferrina (Turkewitz, Schwartz, & Harrison, 1988).

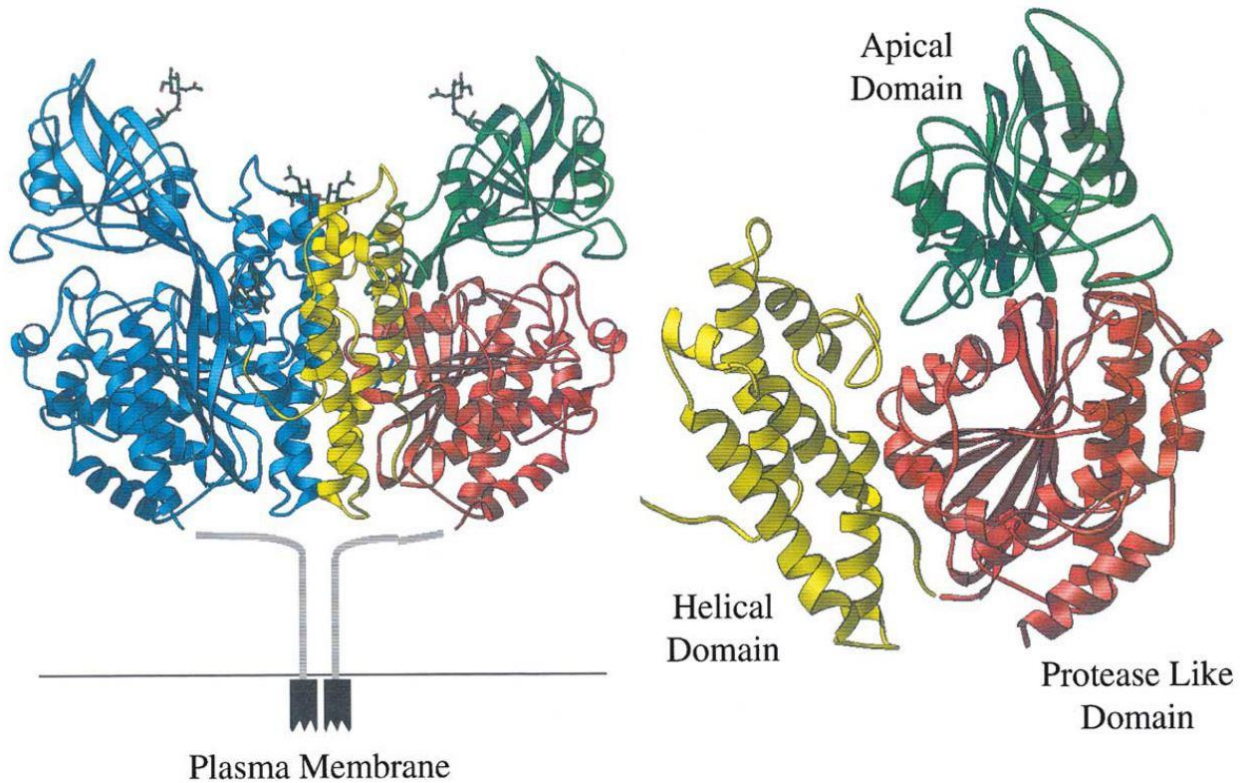


Immagine 7. La seguente rappresentazione grafica riporta la struttura cristallina di una molecola di hTfR ricombinante alla risoluzione di 3,2Å e di uno dei suoi due monomeri separato e sul quale sono evidenziati i domini principali; tratto da (Aisen, 2004).

Il TfR ha la funzione biologica di legare la transferrina (Jandl, Inman, Simmons, & Allen, 1959), proteina ematica deputata al legame con una o due molecole di ferro per trasportarlo nel torrente ematico dai siti di assorbimento ai vari organi del corpo (Holmberg & Laurell, 1947).

Esistono delle differenze nella struttura del TfR tra le varie specie di mammiferi soprattutto per quanto riguarda i residui esposti sulla superficie del recettore (Hueffer et al., 2003) e conseguentemente per quanto riguarda l'omologia tra le sequenze genetiche dei tratti codificanti per lo stesso.

Le differenze tra i tratti canino e felino risultano modeste, comprese attorno al 13% della sequenza, mentre quelli felino ed umano differiscono per circa il 22% (Hueffer et al., 2003; Parker et al., 2001).

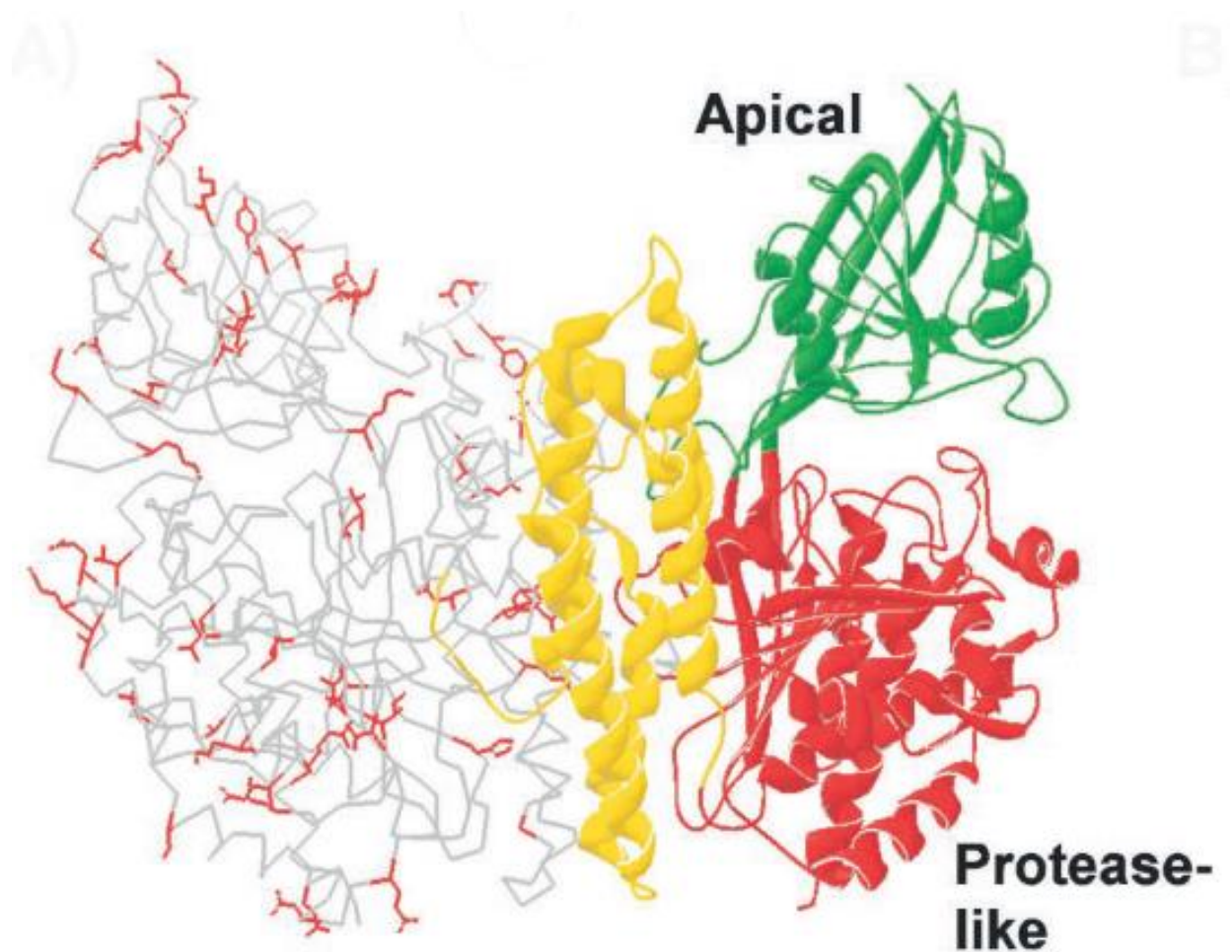


Immagine 8. Rappresentazione grafica delle differenze strutturali tra TfR canino e felino usando come base la proteina umana, evidenziate tramite le linee rosse esaltanti i residui interessati.

Uno dei due monomeri è evidenziato dal diagramma a nastro mentre l'altro è visualizzato tridimensionalmente come α eliche carboniose; modificato da (Hueffer et al., 2003).

L'affinità di legame tra la proteina ed il suo recettore è massima per la transferrina diferrica (olotransferrina), trenta volte più bassa per la monoferrica e cinquecento volte per la transferrina non legata a molecole di ferro (apotransferrina) (Young, Bomford, & Williams, 1984).

Una volta legato alla transferrina, il complesso recettore-ligando viene internalizzato tramite una vescicola rivestita di clatrina e da molecole adattatrici che formano una struttura facilitante il processo d'invaginazione mediato dalla clatrina stessa e facilitato da una molecola detta AP2 (Conner & Schmid, 2003; Sorkin, 2004; Traub, 2003).

Le molecole di clatrina sono così richiamate a livello di membrana plasmatica ed organizzate a formare un reticolo che contribuisce a creare una vescicola d'invaginazione che contiene il recettore, il tutto è mediato dalla molecola ad attività GTPasica dinamina (Orth & McNiven, 2003; Praefcke & McMahon, 2004; Song & Schmid, 2003).

Una proteina in particolare, denominata TTP (*Transferrin receptor Trafficking Protein*) sembra essere implicata nella regolazione specifica del processo d'internalizzazione riassunto sopra, grazie ai suoi siti legame per AP2 e per la clatrina.

La distribuzione della TTP è sia membranaria che citoplasmatica, con concentrazioni estremamente elevate all'interno delle vescicole e delle zattere contenenti clatrina e specifiche per il TfR ma assente all'interno di endosomi ed apparato del Golgi.

L'interazione con le vescicole sopra riportate sembra essere mediata un dominio della molecola contenente un gruppo SH₃.

Essa regola l'internalizzazione del TfR1 e di tutte le molecole che si legano ad esso (come Tf, HFE o LAMP1 (Warren, Green, Stenberg, & Enns, 1998)) per competizione delle stesse per il legame con la proteina.

In aggiunta, la dinamina compete come le altre molecole per il legame con la TTP grazie al suo dominio SH₃ con un'affinità di legame 10 volte superiore rispetto alle

concorrenti ed il loro legame blocca l'azione della dinamina stessa, riducendo l'internalizzazione del TfR, mentre la fosforilazione di una delle due blocca questo processo inibitorio.

La regolazione dell'internalizzazione del TfR mediata dal TTP sembra vedere in quest'ultimo tre ruoli possibili ancora da chiarire:

- Potrebbe fungere da adattatore collegando TfR e clatrina grazie anche all'AP2
- Potrebbe reclutare la dinamina e coordinare così le varie proteine formanti il reticolo indispensabile per il processo d'invaginazione, permesso da una successiva fosforilazione del TTP che blocca la sua inibizione del processo
- Potrebbe agire in maniera simile alla precedente ma fungendo da inibitore che viene spiazzato dalla concentrazione del TfR, permettendo così l'attivazione della dinamina (Tosoni et al., 2005)

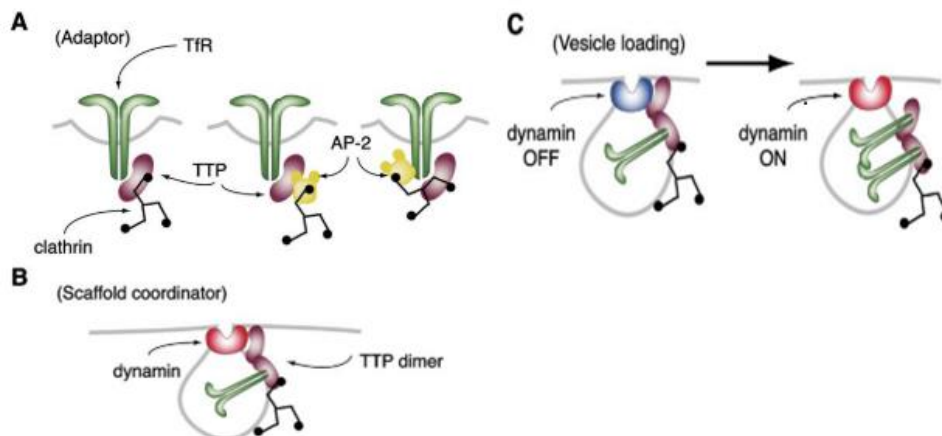


Immagine 9. Illustrazione del funzionamento ipotizzato della TTP a seconda che essa funga da adattatore collegando TfR e clatrina grazie all'AP2 (A), da reclutatrice della dinamina e coordinatrice del processo di formazione della vescicola (B) o da coordinatrice solo dopo essere stata spiazzata dal TfR favorendo conseguentemente l'attivazione della dinamina (C); modificata da (Tosoni et al., 2005).

La transferrina interagisce con il recettore andandosi a legare, soprattutto, ai siti di legame posti lateralmente ai monomeri, a livello di dominio C e in due brevi tratti

del dominio N, che la pongono conseguentemente di lato tra i monomeri e la parete cellulare (Cheng, Zak, Aisen, Harrison, & Walz, 2004a).

Il complesso Tf-TfR giunge poi in un endosoma definito CURL (*compartment of uncoupling of receptor and ligand*) (Dautry-Varsat, Ciechanover, & F.Lodish, 1983) dove il pH, grazie a pompe protoniche, scende fino a circa 5,6 favorendo il distacco del ferro, il quale per mezzo del trasportatore DMT1 viene portato nei comparti cellulari dov'è richiesto (M. D. Fleming et al., 1998) o viene stoccato legandolo alla ferritina intracellulare (Pauline M Harrison & Arosio, 1996).

Il distacco del ferro avviene prima dal dominio N e poi da quello C della transferrina, viceversa avviene per il suo legame (Hémadi, Ha-Duong, & El Hage Chahine, 2006).

Il recettore legato al ligando viene poi trasferito nuovamente sulla superficie esterna della cellula dove, grazie al pH fisiologico (circa 7,3), si ha il distacco della transferrina che può tornare in circolo e far ripartire il ciclo descritto legandosi ad altre molecole di ferro (Dautry-Varsat et al., 1983).

Durante la durata della vita della transferrina, il legame tra il recettore e questa proteina avviene per circa 200 volte (Katz, 1961), superato tale valore il recettore è progressivamente sostituito nell'apparato del Golgi (circa il 10% di quelli internalizzati) (Ponka & Lok, 1999).

Per riciclare tutti i recettori presenti sulla superficie cellulare sono necessari circa 21 minuti ed è stata dimostrata l'esistenza di un pool intracellulare di recettori TfR subito pronti all'uso che corrisponde a circa $\frac{3}{4}$ di quelli espressi nella superficie esterna della cellula (Bleil & Bretscher, 1982).

Importante per l'alta efficienza del processo d'internalizzazione anche una regione denominata YTFR formata da quattro peptidi all'interno della coda citoplasmatica (Collawn et al., 1993).

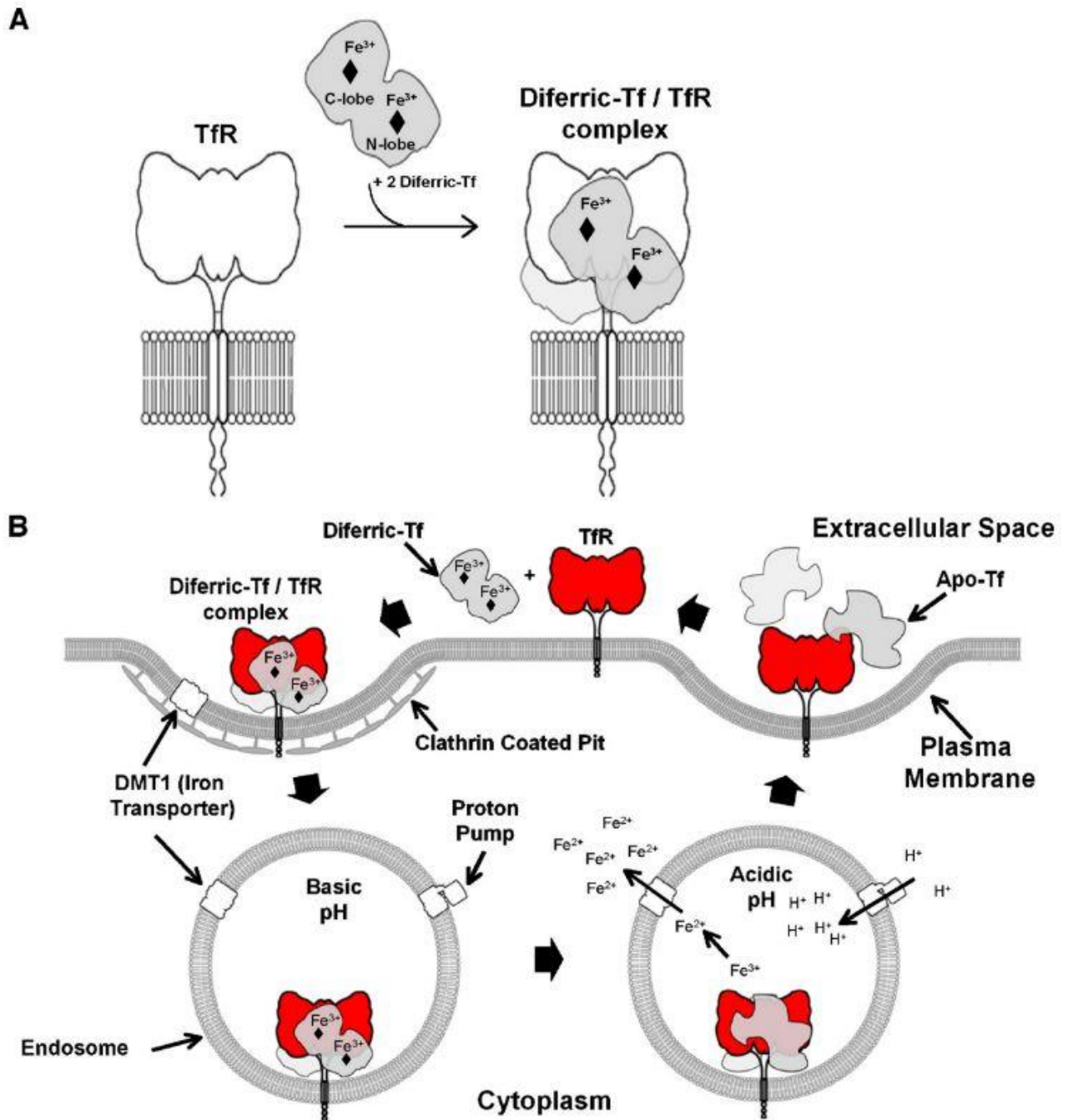


Immagine 10. Rappresentazione grafica dell'interazione tra TfR1 e Tf (A), notare che quest'ultima non si lega al centro del recettore ma lateralmente e rappresentazione grafica del processo d'internalizzazione e riciclo del complesso recettore-ligando (B); tratta da (Daniels, Delgado, Rodriguez, Helguera, & Penichet, 2006)

Il recettore TfR1 è espresso in quasi tutte le cellule del corpo ad eccezione dei reticolociti maturi (Pan, Teng, Wu, Adam, & Johnstone, 1985) ed è presente in maggior quantità nei distretti ad alto tasso di proliferazione come epitelio intestinale, strato basale dell'epidermide e conseguentemente anche nei tessuti tumorali (Omary, Trowbridge, & Minowada, 1980; Shindelman, Ortmeyer, & Sussman, 1981; Sutherland et al., 1981).

La sua espressione è strettamente legata anche alla maturazione dei linfociti, soprattutto T (Ned, Swat, & Andrews, 2003) ed ai tessuti che per loro funzione metabolica richiedono un elevato quantitativo di ferro come trofoblasti placentari o cellule eritroidi in maturazione (Trowbridge, 1988).

Negli animali la sua espressione è stata dimostrata solamente nel cane a livello di linfociti (Priest, McDonough, Erb, Daddona, & Stokol, 2011), a livello oro-faringeo in melanomi e carcinomi squamo cellulari (Ploypetch et al., 2017) e nei tessuti per i quali i parvovirus canino e felino presentano tropismo, in quanto il recettore TfR1 si è scoperto essere la via d'entrata del suddetto virus a livello cellulare (Hueffer et al., 2003; Parker et al., 2001).

Mancano ad oggi lavori che dimostrino il suo livello d'espressione nei tessuti sia sani sia neoplastici, soprattutto nel gatto, per il quale si conosce unicamente la sequenza genetica e la collocazione all'interno del cromosoma n°2; oltre alla già citata espressione maggiore nei tessuti a rapida proliferazione (Parker et al., 2001).

È stato dimostrato che la regolazione dell'espressione del TfR1 dipende in maniera preponderante dalla concentrazione intracellulare di ferro che influenza per via post trascrizionale, tramite due proteine leganti l'mRNA dette IRP 1 e 2 (*iron-regulatory proteins*), l'espressione del recettore stesso (Hentze & Kuhnt, 1996; Richardson & Ponka, 1997).

È stato dimostrato essere anche influenzata la sua espressione dalla disponibilità sufficiente o meno d'ossigeno da parte della cellula (Bianchi, Tacchini, & Cairo, 1999; Tacchini, Bianchi, Bernelli-Zazzera, & Cairo, 1999).

Le due proteine regolatorie elencate si legano a delle regioni specifiche dell'mRNA della ferritina e del TfR1 dette IRE (*iron responsive elements*) presenti nelle regioni non tradotte dell'mRNA ed a seconda dei casi:

- Se il livello intracellulare del ferro è basso si ha il distacco del *cluster* 4Fe-4S dalla IRP1 e la sintesi de novo della IRP2, ciò consente il legame di entrambe alle regioni IRE sia della ferritina che del TfR stabilizzando così l'mRNA di quest'ultimo e favorendone perciò una sintesi maggiore e più efficace e bloccando la sintesi della precedente.
- Se il livello intracellulare di ferro è alto il *cluster* 4FE-4S rimane adeso alla IRP1 e l'IRP2 è ubiquitinata favorendone la degradazione da parte di proteosomi esitando perciò nella degradazione dell'mRNA del TfR e nella libera trascrizione di quello della ferritina (Richardson & Ponka, 1997).

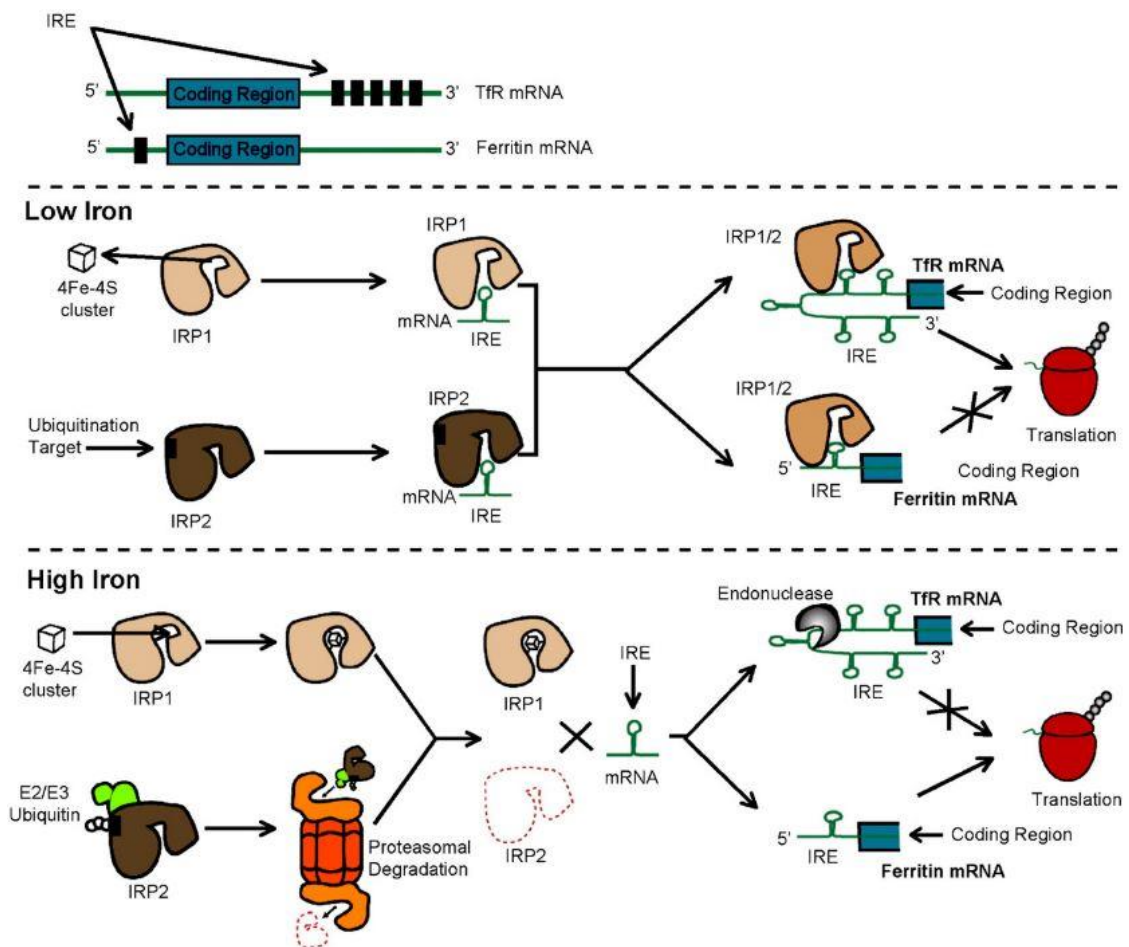


Immagine 11. Rappresentazione grafica della regolazione dell'espressione del TfR a seconda dello stato del ferro all'interno della cellula; tratta da (Daniels et al., 2006)

Il recettore interagisce anche con la molecola HFE, omologa alle proteine del complesso maggiore d'istocompatibilità di tipo 1 (MHC1) (Feder et al., 1997) ed implicata nella malattia tipicamente umana definita "emocromatosi ereditaria" nel momento in cui l'omonimo tratto genetico subisce una mutazione specifica (Cys260Tyr) (Feder et al., 1996).

Essa necessita per il suo funzionamento del legame con la proteina di superficie cellulare β 2microglobulina (Feder et al., 1996).

Questa proteina non gioca un ruolo solo nella patologia sopra indicata ma sembra fungere da regolatore del TfR, modulandone l'adesione al suo ligando tramite un'azione competitiva (Roy, Penny, Feder, & Enns, 1999).

L'HFE si lega al dominio ad elica dei due monomeri costituenti il TfR e risultando perciò in un legame 2:1 con il recettore (2 molecole HFE per 1 di TfR) anche se sono osservate conformazioni 1:1 (Bennett, Lebrón, & Bjorkman, 2000).

Il tutto avviene però in assenza di olotransferrina o transferrina monoferrica (Bennett et al., 2000; Lebrón, West, & Bjorkman, 1999) anche se è stato osservato in vitro un legame ternario Tf-TfR-HFE che riduce l'affinità del recettore per la transferrina di un fattore pari a 25 (Gross, Irrinki, Feder, & Enns, 1998).

Le due proteine competono per il recettore poiché i siti di legame delle stesse combaciano (Anthony P. West et al., 2001) e ciò avviene a livello di superficie cellulare poiché l'HFE non rimane legata al recettore a pH inferiore a 6 (Lebrón et al., 1998).

S'ipotizza dunque che l'internalizzazione del TfR legato all'HFE ed il suo successivo distacco siano i meccanismi che portano alla degradazione invece che al riciclo del recettore esitando così in un minor assorbimento di ferro da parte della cellula (Davies et al., 2003).

E' stato anche evidenziato un meccanismo per cui il legame dell'HFE al TfR riduce la possibilità della transferrina di legarsi al recettore dato il cambiamento conformazionale dello stesso che vede ridotto lo spazio tra il dominio ad elica e quello *protease-like* (Bennett et al., 2000).

Alcuni autori ipotizzano anche che L'HFE abbia un ruolo diverso a seconda della saturazione della transferrina e della densità cellulare del TfR, agendo alternativamente come bloccante dell'*uptake* del ferro o impedendone l'espulsione a seconda dei casi (Townsend & Drakesmith, 2002).

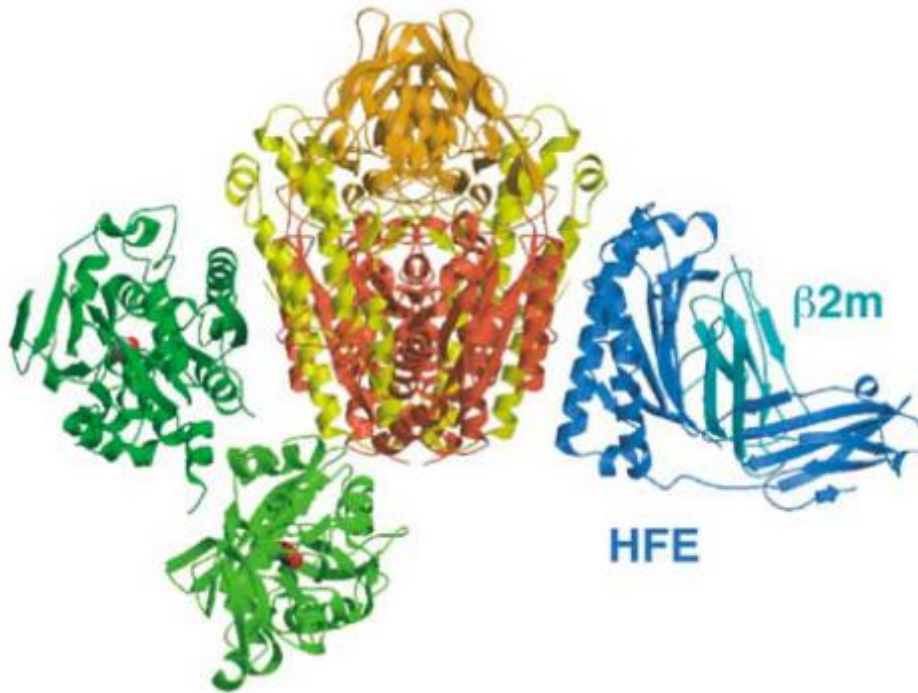


Immagine 12. Rappresentazione con modello tridimensionale ad α eliche del TfR legato ad una molecola di transferrina (sinistra) ed una di HFE (destra).

L'immagine è codificata secondo il colore: rosso = dominio *protease-like* del TfR, giallo = dominio ad elica del TfR, arancio = dominio apicale del TfR, verde scuro = lobo C della transferrina, verde chiaro = lobo N della transferrina, blu = HFE ed azzurro = $\beta 2$ microglobulina; modificata da (Cheng, Zak, Aisen, Harrison, & Walz, 2004b).

Come già accennato in precedenza, il *transferrin receptor 1* è indotto non solo da un meccanismo di feedback cellulare riguardante la regolazione del ferro ma anche da situazioni che portano la cellula ad uno stato d'ipossia o che mimano la stessa (Tacchini et al., 1999).

Il fattore principale tra quelli attivati dalla condizione d'ipossia a livello cellulare è L'HIF1 (*hypoxia inducible factor 1*) (Bunn & Poyton, 1996) che a sua volta attiva a cascata dei meccanismi di trascrizione utili a far fronte alla condizione di privazione d'ossigeno in cui si trova la cellula (Bianchi et al., 1999; Tacchini et al., 1999).

La molecola è un etero dimero composto da una sub unità α ed una β , quest'ultima strutturalmente identica alla proteina ARNT (*aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator*), a sua volta capace di dimerizzare con l'*aryl hydrocarbon receptor* (Semenza, 1998; G. Wang & Semenza, 1992).

Essa in condizioni di normossia non è rilevabile poiché la sua sub unità regolatoria è idrossilata da prolil-idrossilasi ferro dipendenti (Morwenna & Ratcliffe, 1997).

La condizione ipossica d'altro canto favorisce la stabilizzazione dell'HIF1, provocando la sua dimerizzazione e l'unione con il coattivatore della trascrizione p300/CBP che ne favorisce il legame con gli HRE (*hypoxia regulatory elements*) di varie proteine, implicate nella regolazione del ferro ematico (Zolta'n Arany et al., 1996).

E' così stimolata la sintesi di TfR nelle cellule che subiscono l'ipossia (Rolf, Kvietikova, Gassmann, & Wenger, 1997; Tacchini et al., 1999) e più in generale questa condizione influisce su tutto il metabolismo del ferro favorendone l'assorbimento intestinale e l'eritropoiesi (Debnam & Srail, 1997).

Da notare come, al contrario della regolazione del TfR da parte del contenuto di ferro cellulare, che risulta essere post trascrizionale, questa mediata dall'ipossia sia strettamente trascrizionale e dovuta al legame dell'HIF1 con la regione HRE presente nell'mRNA del TfR (Tacchini et al., 1999).

Essendo anche le IRP influenzate dalla condizione dell'ossigeno cellulare (Hanson & Leibold, 1998) si nota come i *pathways* regolatori dipendenti dal ferro e

dall'ossigeno sia strettamente correlati e cooperino per mantenere l'omeostasi cellulare (Bianchi et al., 1999; Christova & Templeton, 2007; Schneider & Leibold, 2003).

Esiste anche una regolazione dell'HIF1 ferro dipendente tramite il legame della sua sub unità regolatoria α con la proteina VHL (von Hippel-Lindau), sintetizzata in base alle condizioni del ferro intracellulare (Maxwell et al., 1999).

Il *transferrin receptor 1* oltre alle innumerevoli funzioni già elencate, relative principalmente al metabolismo intracellulare del ferro, svolge anche altre importanti funzioni in particolari tipologie di cellule.

Esso sembra avere infatti, nell'uomo, proprietà immunoregatorie data la capacità di legare IgA1 ed il suo coinvolgimento in alcuni tipi di nefropatia immunomediata (Moura et al., 2001).

Oltre a ciò il recettore è coinvolto anche nella maturazione dei linfociti T e nel loro meccanismo d'attivazione antigene-indipendente (Cano et al., 1990; Manger, Weiss, Hardy, & Stobo, 1986).

Il recettore è implicato nella regolazione del ciclo cellulare, soprattutto essendo parte del *pathway* regolatorio dipendente dal gene c-myc (O'Donnell et al., 2006) ed esitando nell'aumento della proliferazione, con annessa sua attività relativamente ai tessuti tumorali che lo sovraesprimono.

Il TfR1 è coinvolto nella maturazione dei timociti e del sistema nervoso centrale, in quanto la sua mancanza provoca morte entro i 12,5 giorni di gestazione in topi *knock-out* usati come modello animale (Levy, Jin, Fujiwara, Kuo, & Andrews, 1999).

Oltre ai linfociti T, il recettore è implicato anche nella maturazione dei linfociti B, per i quali però non risulta essere strettamente necessario, almeno in ogni sottotipo di cellula B, dato lo sviluppo anche in topi *knock-out* di quasi tutte le linee cellulari (Ned et al., 2003).

Oltre alle funzioni immunitarie esso prende parte anche nella maturazione dei reticolociti e nella formazione dell'eme (Pan et al., 1985).

1.5.1 Il recettore della transferrina n° 2

Nel 1999 è stato identificato un secondo recettore legante la transferrina ed implicato nell'assorbimento del ferro a livello cellulare, denominato TfR2 o *transferrin receptor 2* (Kawabata et al., 1999).

Nell'uomo il recettore è identificato da due trascritti denominati TfR2 α e TfR2 β , il primo va a formare una proteina transmembranaria di tipo 2 formata da una lunga regione extracellulare, una trans membrana ed una citoplasmatica breve.

La regione extracellulare contiene due residui di cisteina che ne suggeriscono un'organizzazione dimerica come quella del TfR1, con il quale condivide il 45% d'identità ed il 66% di similarità, mentre quella intracellulare possiede una sequenza YQRV del tutto simile per funzionalità alla YTFR del TfR1.

La forma β codifica invece per una regione intracellulare, una trans membrana e per una extracellulare che risulta essere una forma troncata della corrispettiva espressa nell' α , suggerendo che la funzione di questa isoforma sia quella forse di un recettore solubile intracellulare (Kawabata et al., 1999).

L'affinità di legame per la transferrina del TfR2 risulta essere 25-30 volte inferiore rispetto a quella del TfR1 (West et al., 2000) e perché esso avvenga, diversamente rispetto al TfR1, sembra essere fondamentale la giunzione del braccio apicale presente nella regione extracellulare del recettore (Kleven, Jue, & Enns, 2018).

L'espressione del recettore è stata rilevata in organi come fegato e precursori eritroidi, in maniera meno preponderante anche nella milza, muscolo, prostata, polmoni e cellule immunitarie mononucleate (Kawabata et al., 1999; Kawabata, Nakamaki, et al., 2001).

Nel topo è stato identificato l'ortologo che sembra essere lievemente espresso anche in reni, cuore, piccolo intestino e testicoli (R. E. Fleming et al., 2000; Kawabata, Germain, et al., 2001).

La regolazione del TfR2 sembra essere indipendente dai livelli di ferro intracellulare (Kawabata et al., 2000) ed l'mRNA stesso non contiene regioni IRE nella sua regione 3' non tradotta (R. E. Fleming et al., 2000; Kawabata et al., 1999).

L'espressione del recettore sembra essere dipendente dal ciclo cellulare e la sua funzione si deduce essere perciò correlata al supplemento di ferro alle cellule sia sane che tumorali in intensa replicazione (Kawabata et al., 2000).

Il TfR2 dipende anche dal ciclo cellulare per quanto riguarda la sua funzione nel fegato e nelle cellule mieloidi, nel primo mantiene sempre alta la sua espressione indipendentemente dalla fase di sviluppo dell'organo mentre nelle seconde è estremamente espresso nelle cellule immature e cala vistosamente in quelle mature (Kawabata, Nakamaki, et al., 2001).

Il *transferrin receptor 2* è implicato dunque in un *pathway* di assorbimento del ferro da parte delle cellule alternativo rispetto a quello del TfR1 (A. D. Robb, Ericsson, & Wessling-Resnick, 2004) e caratterizzato da bassa affinità ma alta capacità (Richardson & Baker, 1994).

La funzione di questo recettore sembra perciò essere più correlata al mantenimento dell'equilibrio del ferro a livello corporeo piuttosto che a livello cellulare (Hofmann, Tong, Ajioka, Kushner, & Koeffler, 2002).

Il TfR2 ha capacità di legame con la proteina HFE (Goswami & Andrews, 2006), hemojuvelina (D'Alessio, Hentze, & Muckenthaler, 2012) e CD81 (J. Chen & Enns, 2015) ed è implicato anche nella regolazione dell'ormone epcidina anche se con meccanismo non ancora chiarito ma che probabilmente implica l'unione della transferrina con il recettore, sia come apotransferrina formando complessi dalla breve emivita (Kleven et al., 2018) sia come olotransferrina stabilizzandolo favorendo il suo riciclo invece che la degradazione a livello lisosomiale (B. M. Johnson & Enns, 2004; A. Robb & Wessling-Resnick, 2004).

Sembra che la stabilizzazione del recettore avvenga non solo grazie al legame della transferrina diferrica ma anche quando essa è legata a vari altri metalli, come ad esempio cobalto o manganese, che mimano uno stato d'ipossia andando perciò ad

alterare l'espressione dell'epcidina probabilmente proprio grazie al TfR2 (Herbison et al., 2009).

Il meccanismo ad ora più accreditato, ma ancora non del tutto chiarito, di regolazione dell'epcidina da parte del TfR2 implica il legame di quest'ultimo con L'HFE, spiazzata dall'olotransferrina per il legame con il TfR1 quando quest'ultima è presente in alte concentrazioni, e la successiva stimolazione alla produzione d'emojuvelina e conseguentemente di epcidina dato il meccanismo di stabilizzazione del recettore da parte dell'HFE (Nemeth, 2008).

1.5.2 La transferrina

La transferrina (Tf) è una proteina dal peso molecolare di 80 kDa e dotata di due siti di legame per altrettante molecole di ferro (Holmberg & Laurell, 1947; C.-B. Laurell & Ingleman, 1947).

E' implicata nel trasporto del ferro a livello ematico per soddisfare i bisogni delle cellule e per sostenere l'eritropoiesi (Jandl et al., 1959).

La sua conformazione è bilobata e può legare per ogni lobo una molecola di ferro con grande affinità (Aisen, 1978).

La sua struttura comprende un dominio N ed uno C per ogni lobo e collegati tra loro da un breve peptide ma ben distanziati in forma in dissociata per permettere il legame con il ferro in questa zona grazie a dei gruppi carbonato (Cheng et al., 2004a).

Essa fa parte di una superfamiglia di glicoproteine, molto antiche dal punto di vista evolutivo e presenti in vari distretti corporei, comprendenti: la transferrina, prodotta dal fegato e riversata soprattutto nel torrente ematico ma anche in saliva, bile e fluido cerebrospinale (Leibman & Aisen, 1979), l'ovotransferrina tipica di uccelli e rettili (Jeltsch & Chambon, 1982; J. Williams, Elleman, Kingston, Wilkins, & Kuhn, 1982), la lattoferrina tipica del latte ed altre secrezioni (Baggiolini, C, PL, & Heremans, 1970; Metz-boutigue et al., 1984) ed infine la melanotransferrina (o p97), unica incapace di legare il ferro, recentemente isolata da melanociti sani, neoplastici ed in alcuni tessuti fetali (Rose et al., 1986).

Lattoferrina ed ovotransferrina sembrano avere azione antibatterica (Iyer & Lönnnerdal, 1993; J. Williams et al., 1982) mentre la melanotransferrina sembra intervenire sulla regolazione del ciclo cellulare (Kwok & Richardson, 2002).

La transferrina può presentarsi senza essere legata al ferro (apotransferrina), può legare una molecola di ferro (transferrina monoferrica) o può legare due atomi di ferro (olotransferrina) (Leibman & Aisen, 1979) e le modificazioni date dal legame con il metallo influenzano la cinetica di entrambi i lobi della molecola in quanto

un' α elica nel dominio C vicino al lobo terminale N favorisce il cambio di conformazione post legame e comunica all'altro lobo della proteina l'avvenuto legame modificandone l'affinità per il ferro stesso (Jameson, Anderson, Norris, Thomas, & Baker, 1999).

Il ferro viene rilasciato dalla tasca presente nel dominio C grazie all'interazione tra lo stesso ed il recettore, coadiuvato dal dominio N che favorisce il legame e modula il rilascio del metallo (Zak & Aisen, 2003) grazie ad una protonazione dei residui aminoacidici e contemporanea decarbossilazione dei domini stessi (Hémadi et al., 2006).

Questa molecola, come già detto, si lega al TfR1 e 2 per trasportare il ferro all'interno della cellula e questa interazione con i recettori avviene non centralmente ma di lato, tra la membrana ed il dominio ad elica degli stessi (il dominio C della Tf si lega al dominio ad elica del TfR mentre il dominio N s'incanala tra recettore e membrana) (Cheng et al., 2004b).

In medicina veterinaria essa sembra anche essere un possibile marcatore nel cane per diagnosticare neoplasie del tratto oro-nasale (Ploypetch et al., 2017).

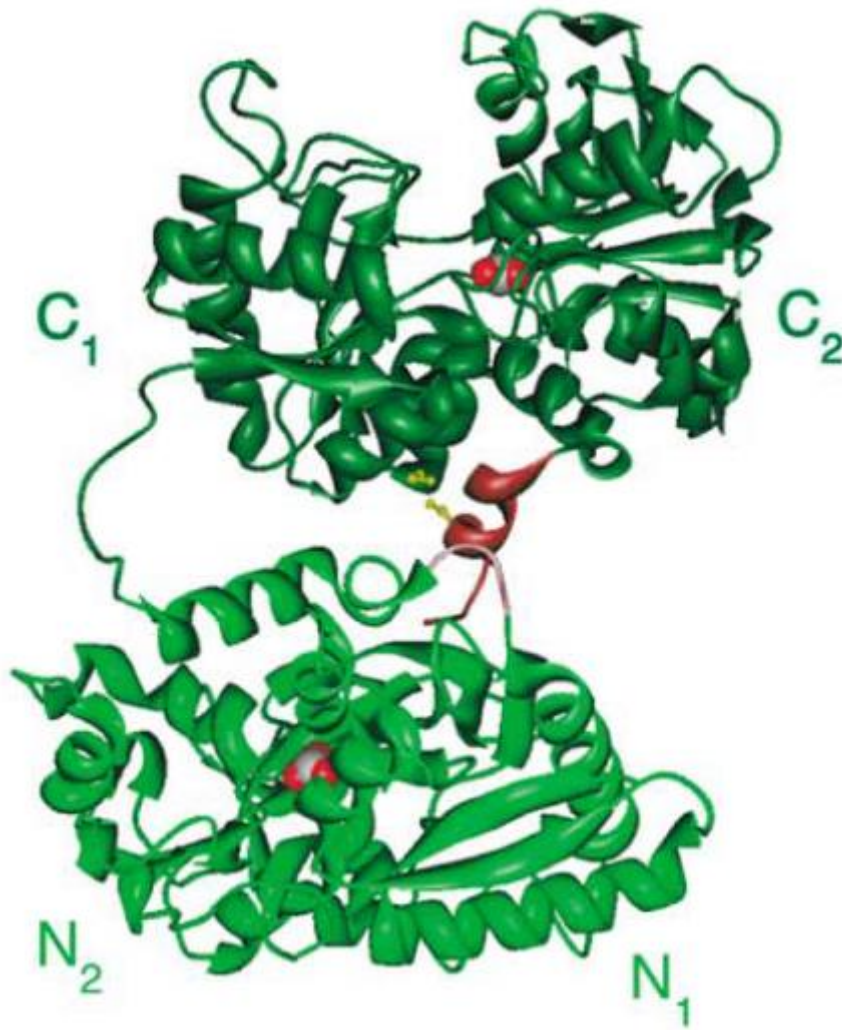


Immagine 13. Rappresentazione della struttura cristallografica della transferrina del coniglio (Hall et al., 2002), il dominio C è in verde scuro, l'N in verde chiaro, l' α elica del dominio CF terminale in rosso, quella del dominio N in rosa ed il ponte disolfuro che stabilizza il dominio C in giallo; modificata da (Cheng et al., 2004b)

1.5.3 Il metabolismo del ferro

Il ferro è un elemento fondamentale per le cellule dell'organismo data la sua indispensabile presenza in enzimi regolanti le funzioni principali della cellula come respirazione, sintesi di DNA e metabolismo energetico (Hoffbrand, Ganeshaguru, Hooton, & Tattersall, 1976).

Per favorire il trasporto del metallo all'interno dell'organismo in uno stato che impedisca la formazione di specie reattive dell'ossigeno nel corso dell'evoluzione si sono sviluppati vari meccanismi, tra cui nei vertebrati il legame con proteine *carrier* della superfamiglia delle transferrine (C. B. Laurell, 1947).

La maggior parte del ferro è assunto, sia nell'uomo che negli animali domestici, attraverso la dieta (Andrews, 2008) grazie all'intervento di una reduttasi come il citocromo B a livello duodenale che riduce il ferro dalla forma 3+ a quella 2+ (McKie et al., 2001) e la sua entrata negli enterociti è mediata dalla proteina DMT1 (Canonne-Hergaux, Gruenheid, Ponka, & Gros, 1999).

All'interno dell'enterocita parte del ferro rimane nella cellula per le sue esigenze metaboliche mentre il resto è trasportato attraverso la membrana basolaterale dalla ferroportina (Abboud & Haile, 2000; Donovan et al., 2000; Andrew T McKie et al., 2000) coadiuvata dalla ceruloplasmina che ne mantiene sede e stabilità (De Domenico, Ward, di Patti, et al., 2007).

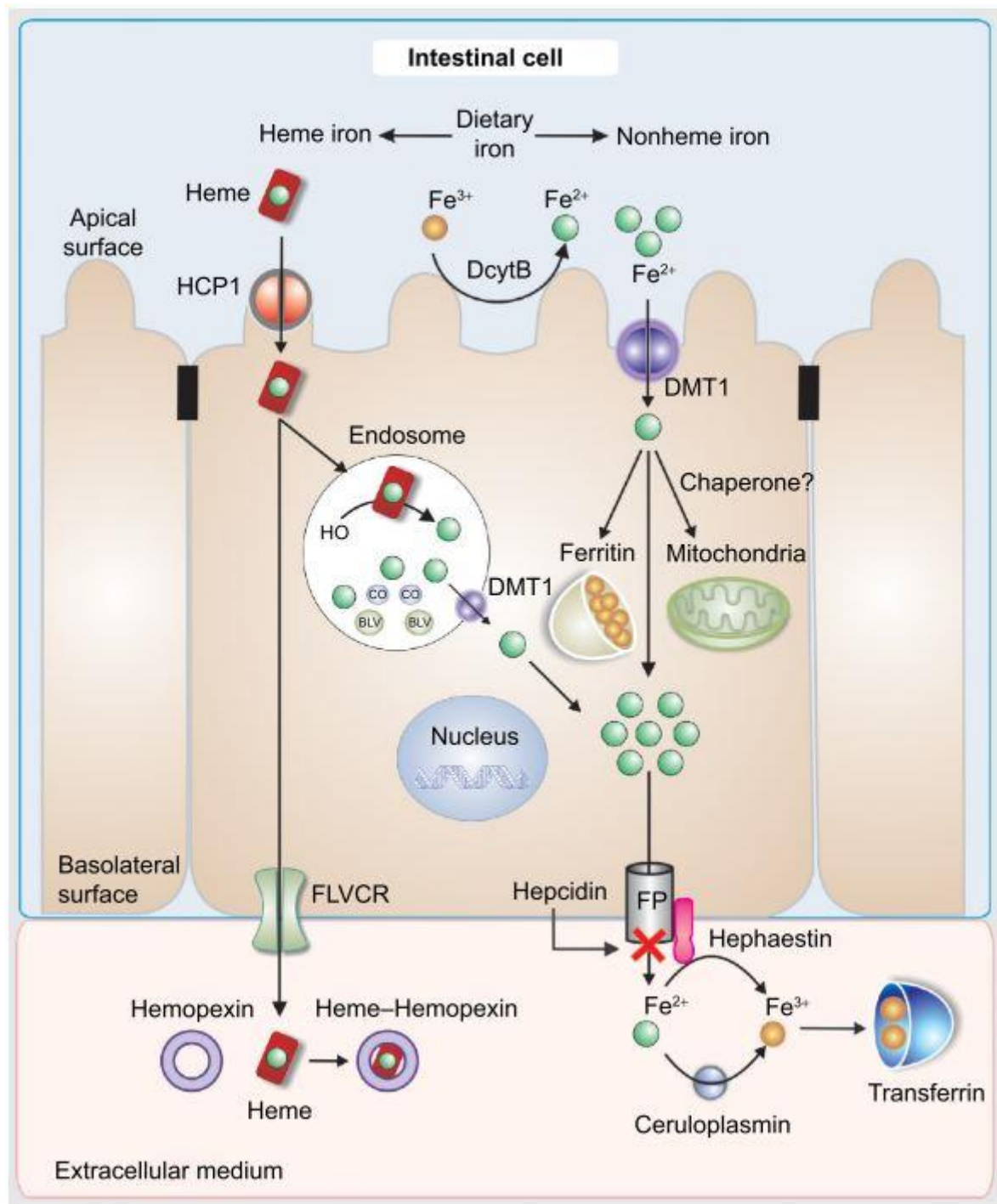


Immagine 14. Rappresentazione grafica dell'assorbimento di ferro sia organico (eme) che inorganico da parte dell'enterocita tramite i trasportatori raffigurati, le abbreviazioni usate sono: BLV = biliverdina, DcytB = citocromo B, DMT1 = trasportatore divalente di metalli tipo 1, FP = ferroportina ed HCP1 = proteina *carrier* dell'eme tipo 1; modificata da (Toblli & Angerosa, 2014).

L'ormone che regola la disponibilità di ferro rendendola coerente con le richieste dell'organismo è l'epcidina, prodotta nel fegato (Krause et al., 2000; Park, Valore, Waring, & Ganz, 2001), essa agisce legandosi alla ferroportina fosforilandola e favorendo la sua degradazione a livello lisosomiale, bloccando così l'*uptake* intestinale di ferro (De Domenico, Ward, Langelier, et al., 2007; Nemeth et al., 2004).

Essa è finemente regolata nella sua espressione da un gran numero di altre molecole sempre implicate nella regolazione del metabolismo del ferro a livello cellulare, le più importanti sono HIF1 α che funge da inibitore della stessa (Peyssonnaud et al., 2007) e la via di segnalazione dipendente da SMAD/BMP (*bone morphogenetic protein*) ed emojuvelina che funge da attivatore dell'epcidina (Babitt et al., 2006; R.-H. Wang et al., 2005).

Una via chiave per la regolazione dell'epcidina è quella che vede coinvolte la proteina HFE ed il TfR.

Come già esaminato in precedenza, HFE si può legare sia al TfR1 che al TfR2 (Feder et al., 1997; Goswami & Andrews, 2006) e viene spiazzata dall'olotransferrina data l'affinità maggiore di quest'ultima per il sito legame con il TfR1 (Bennett et al., 2000).

IL TfR1 svolge perciò la funzione di sequestrare l'HFE fintanto che la transferrina non giunge a saturazione, spiazzando la precedente dal legame (Schmidt, Toran, Giannetti, Bjorkman, & Andrews, 2008) e favorendone l'interazione con il TfR2 che induce tramite l'emojuvelina l'espressione dell'epcidina (Nemeth, 2008).

Appare così chiaro che la regolazione del ferro circolante sia basata sulla richiesta cellulare e che la transferrina funga da segnalatore per modulare la cascata appena descritta (Cavill, Worwood, & Jacobs, 1975; M. R. H. Taylor & Gatenby, 1966).

Un ulteriore meccanismo regolatorio del ferro comprende il *signaling* delle proteine deputate al suo immagazzinamento a livello intracellulare, prima tra tutte la ferritina, che ha la doppia funzione di stoccare il ferro nella cellula e di conservarlo in una forma non tossica (Pauline M Harrison & Arosio, 1996).

Il ferro a livello intracellulare è diviso in un *pool* stabile legato alla ferritina ed uno labile che comprende il metallo coinvolto nei processi cellulari in atto (MacKenzie, Iwasaki, & Tsuji, 2008).

La ferritina ha una conformazione rotondeggiante con centro vuoto di diametro pari a circa 80 Å ed è data da una serie di catene di 24 polipeptidi capaci di stoccare 4500 molecole di ferro inorganico (Ford et al., 1984; P.M. Harrison et al., 1991).

I polipeptidi sono composti da due sub unità definite H ed L (Theil, 1987) di cui la prima è deputata a legare il ferro ed a ridurlo mentre la seconda ne favorisce lo stoccaggio ed accumulo nella proteina (Ford et al., 1984; Levi et al., 1988).

Oltre alla funzione intracellulare, esiste anche una forma circolante di ferritina (Jacobs & Worwood, 1975) anche se è stato riscontrato che solo la forma H riesce a legarsi al TfR1 per la sua internalizzazione (L. Li et al., 2010).

S'ipotizza però che a livello epatico possa esistere un recettore specifico in grado di legare anche la catena L della molecola (Moss et al., 1992).

Oltre al ferro, la molecola può legare con i suoi residui anche altri metalli come cadmio, zinco o calcio (Joshi & Zimmerman, 1988).

In condizioni di abbondanza di ferro disponibile varie ferritine condensano, soprattutto a livello di fegato e cellule del sistema reticolo endoteliale, dando origine ad un composto molto stabile detto emosiderina che funge da riserva a lento rilascio di ferro per la cellula (Wixom, Prutkin, & Munro, 1980).

La regolazione dei livelli di ferritina dipende direttamente da quelli del ferro ed avviene principalmente a livello post trascrizionale (H. Munro, 1993) grazie alla presenza di *iron responsive elements* (IRE) nel tratto 5' non codificante dell'mRNA (Maniatis, Goodbourn, & Fischer, 1987) con una modalità paragonabile a quella già descritta per il TfR1e che implica l'azione delle IRP (Henderson, Menotti, Bonnard, & Kühn, 1994).

Queste ultime agiscono però in maniera opposta durante la regolazione della ferritina rispetto a quanto visto per il TfR1 dovendo favorire il legame con il ferro

quando questo circola in abbondanza e lasciandolo libero quando questo è presente in basse concentrazioni (H. Munro, 1993; H. N. Munro, 1990).

La ferritina può anche essere sintetizzata in risposta a condizioni fisiologiche particolari e non dipendenti dal ferro come la flogosi (Hirayama et al., 1993; Rogers et al., 1990), la differenziazione cellulare (Chazenbalk, Wadsworth, Foti, & Rapoport, 1990) e negli stati ipossici (Qi & Dawson, 2002).

Come già accennato la ferritina con la sua componente circolante fa parte delle quattro vie di *uptake* del ferro indipendenti dal TfR (L. Li et al., 2010) e che agiscono in maniera integrata alla regolazione dei livelli di ferro assieme ai meccanismi precedentemente descritti.

Gli altri tre meccanismi di uptake sono due indipendenti da recettori (Chan, Ponka, & Schulman, 1992; Goto, Paterson, & Listowsky, 1983) mentre l'ultimo è mediato dalla lipocalina-2 (J. Yang et al., 2002).

Appare così evidente come i recettori per la transferrina, la transferrina stessa, la ferritina e svariati altri meccanismi in parte descritti concorrano con meccanismi a feedback a garantire la corretta omeostasi del ferro all'interno dell'organismo.

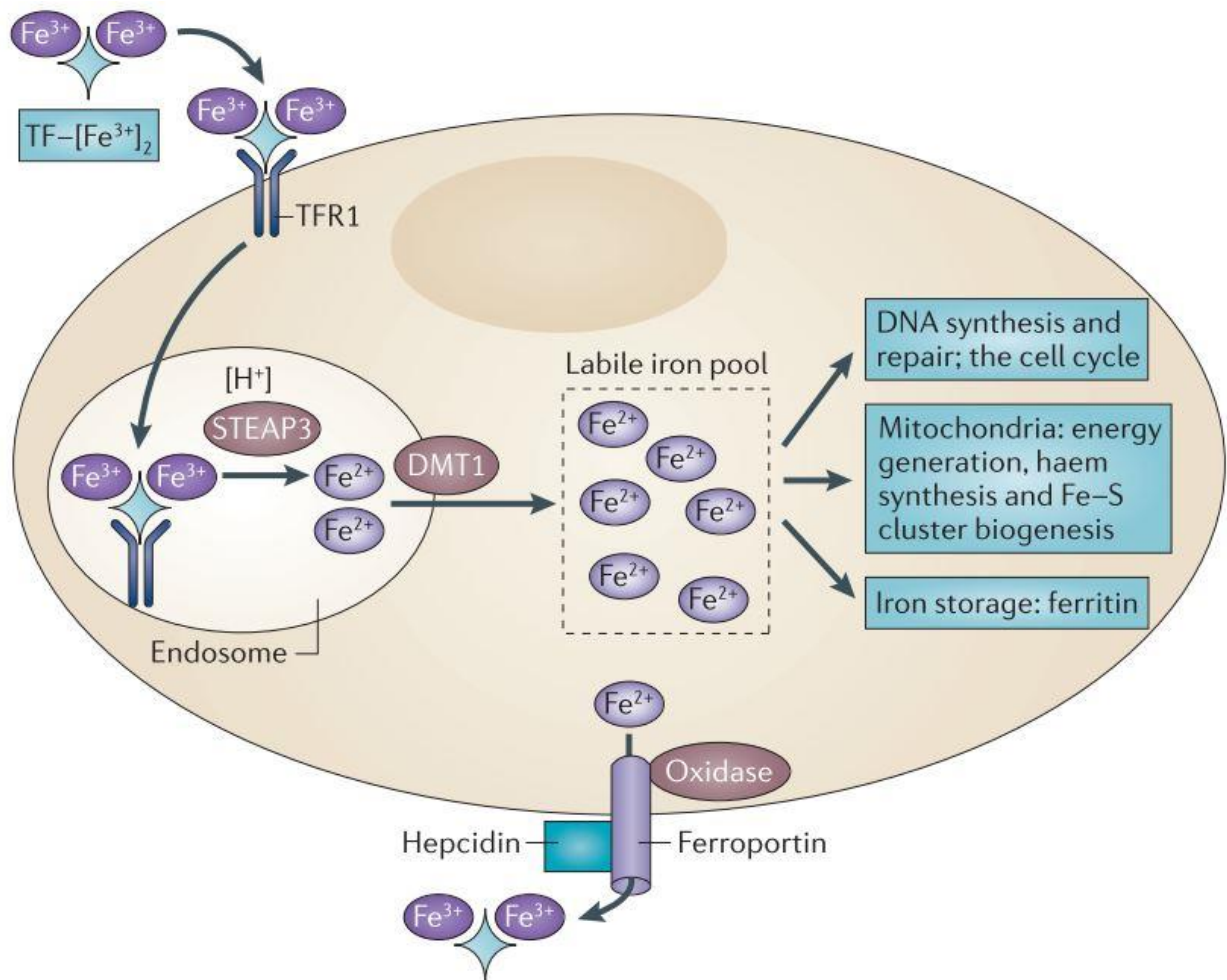


Immagine 15. Illustrazione grafica dell'utilizzo del ferro e del suo *trafficking* a livello intracellulare, da notare il meccanismo d'entrata TfR dipendente, quello d'uscita mediato dalla ferroportina ed il *pool* stabile dato dalla ferritina mentre quello labile è utilizzato nelle funzioni cellulari rappresentate; tratta da (Torti & Torti, 2013c).

1.5.4 Il ruolo del Transferrin receptor 1 nelle neoplasie umane

Il ferro è un elemento fondamentale per il metabolismo cellulare essendo implicato in varie funzioni come la respirazione cellulare e la sintesi degli acidi nucleici (Hoffbrand et al., 1976) e la riprogrammazione del suo metabolismo gioca un ruolo centrale nella sopravvivenza e moltiplicazione delle cellule tumorali (Torti & Torti, 2013c).

Le funzioni sia fisiologiche che dannose esercitate dal ferro possono in pari misura favorire lo sviluppo e la progressione della trasformazione neoplastica (Torti & Torti, 2013c) ad esempio aumentando il danno al DNA a causa dei radicali prodotti (Campbell, 1940; Richmond, 1959) o fornendo alla cellula tumorale il prezioso metallo per le sue aumentate esigenze metaboliche.

In questo processo una parte fondamentale dell'*uptake* di questo elemento all'interno della cellula è giocato dal TfR1.

Il recettore è infatti espresso maggiormente in molte tipologie di tessuti neoplastici se messi a confronto con la controparte sana e per alcuni di essi può fungere anche da fattore prognostico, un esempio può essere la neoplasia mammaria (D. C. Yang, Wang, Elliott, & Head, 2001), i tumori del sistema nervoso (Prior, Reifenberger, & Wechsler, 1990), leucemie e linfomi (Das Gupta & Shah, 1990), tumori polmonari (Kondo et al., 1990) e del tratto urinario (Seymour, Walsh, Lavin, Strutton, & Gardiner, 1987).

Fondamentale è anche il ruolo del recettore nella moltiplicazione cellulare essendo egli stesso regolato nell'espressione dal gene c-myc.

Quest'ultimo è uno dei geni più alterati nella trasformazione neoplastica di vari tessuti e da esso dipendono una vasta gamma di processi metabolici indispensabili per la cellula (Pelengaris, Khan, & Evan, 2002) tra cui la regolazione del ferro e dei processi da esso dipendenti all'interno della stessa (F. Li et al., 2005).

E' stato riconosciuto un ruolo chiave per questo recettore in svariati processi regolatori del metabolismo cellulare neoplastico sia per azione diretta che indiretta,

un esempio può essere la proliferazione cellulare (Gu et al., 2015), l'invasione (Ohkuma et al., 2012) e la metastasi (Meenakshi Singh et al., 2011a) o la crescita cellulare mediata dalla chinasi JNK (Senyilmaz et al., 2015).

Di particolare interesse è anche la funzione di induzione e sostegno della progressione neoplastica adoperato dal TfR1 grazie alla sua induzione tramite la sfingosina chinasi 1 (Pham et al., 2014).

Una funzione che sembra avere enorme importanza nella biologia tumorale gestita da c-myc è la regolazione dell'entrata di ferro all'interno della cellula neoplastica grazie all'influenza che quest'ultimo ha nell'aumentare l'espressione di proteine come IRP2, H ferritina (Wu, Polack, & Dalla-Favera, 1999) e soprattutto TfR1 (O'Donnell et al., 2006) e nel ridurre quella di proteine che favoriscono l'efflusso del metallo come NRAMP1 (Bowen et al., 2002).

La sovraespressione del TfR1 in particolare conferisce un vantaggio metabolico per la cellula tumorale in condizioni di aumentati fabbisogni data la rapida moltiplicazione e data la competizione per le risorse che s'instaura nel microambiente tumorale e favorisce ulteriormente la trasformazione neoplastica agevolando, dato l'aumento del ferro a livello intracellulare, un silenziamento per *feedback* di geni proapoptotici come p53 (O'Donnell et al., 2006).

Durante le condizioni di stress ossidativo in cui versa la cellula neoplastica è aumentata la trascrizione del gene TFRC codificante per il TfR1 grazie all'azione di fattori di trascrizione come CREB1 e c-jun che risultano aumentati nella cellula tumorale rispetto alla controparte sana (Roodman, 2009).

La condizione redox e la presenza di ferro all'interno della cellula sono regolati anche dal complesso mTOR che ha tra i fattori da esso controllati anche il TfR1 e che risulta alterato in varie tipologie di neoplasia (Bayeva et al., 2012).

Questa condizione favorisce l'accumulo di radicali che alterano il *signaling* cellulare andando ad inattivare la tirosin fosfatasi pRB e la proteina p21/cdk-n ed attivando tramite una via Akt dipendente delle chinasi che favoriscono la moltiplicazione

cellulare ed inibiscono i segnali normalmente deputati al suo controllo (Chirasani et al., 2009).

1.5.5 Il TfR1 nel tumore al seno

Nel tumore al seno il metabolismo del ferro è frequentemente alterato (Torti & Torti, 2013a) con le modalità e finalità già illustrate in precedenza e grazie anche alla capacità del minerale d'interagire con i metaboliti secondari degli estrogeni favorendo reazioni redox e conseguenti danni al DNA (Belous, Hachey, Dawling, Roodi, & Parl, 2007; Liehr & Roy, 1990).

Appare così evidente come sia gli estrogeni che il ferro fungano da facilitatori del processo di trasformazione neoplastica agendo in maniera sinergica nella sua promozione (Dai et al., 2008).

Il metallo agisce influenzando molteplici proteine implicate nell'afflusso, metabolizzazione ed efflusso dello stesso alterandone il metabolismo e favorendo le funzioni vantaggiose per lo sviluppo neoplastico, ne è un esempio la metastatizzazione mediata dalla lipocalina 2 che, oltre a permettere l'entrata di ferro tramite un *pathway* alternativo a quello del TfR (J. Yang et al., 2002), favorisce una volta sovraespressa anche la produzione di metallo proteinasi di membrana (in particolare quella di tipo 9; MMP9) che facilita la metastatizzazione della neoplasia (Leng, Wu, & Arlinghaus, 2011).

Paradossalmente sia un calo del minerale che un suo eccesso possono favorire la progressione neoplastica, nel primo caso favorendo l'angiogenesi tramite HIF1, nel secondo aumentando lo stress ossidativo e l'annesso danno agli acidi nucleici (Jian, Yang, Dai, et al., 2011) e portando ad una forma recentemente identificata di apoptosi detta ferroptosi (Fearnhead, Vandenabeele, & Vanden Berghe, 2017).

Nella donna il TfR1 è più espresso nel carcinoma mammario rispetto alla mammella sana (Shindelman et al., 1981) e funge anche da fattore prognostico negativo per la sopravvivenza dopo la diagnosi (Habashy et al., 2010).

Il recettore è anche fosforilato dalla proteina src e ciò contribuisce alla sopravvivenza della cellula neoplastica (Jian, Yang, & Huang, 2011).

Nel tumore al seno della donna il recettore sembra essere espresso in maniera maggiore grazie all'azione di IRP2 che risulta estremamente attiva nella cellula neoplastica e che favorisce perciò la traduzione del TfR1 ed un calo della ferritina H (W. Wang et al., 2014).

Il recettore nella specie umana pare anche correlato all'espressione dei recettori per l'estrogeno ed il progesterone secondo recenti studi (Buas et al., 2015) anche se in passato non sembrava vi fosse correlazione (Tonik, Shindelman, & Sussman, 1986).

Un ruolo fondamentale nello sviluppo e progressione della neoplasia mammaria sembra avere anche il microambiente che la circonda e nel quale è stata riscontrata un'alterazione dei geni regolatori del ferro, tra cui anche il TfR1, atta a creare un ambiente favorevole per la crescita della neoplasia stessa (Cairo, Recalcati, Mantovani, & Locati, 2011; Recalcati et al., 2010).

La proliferazione cellulare nel tumore mammario sembra essere mediata anche dal TfR1 non solo tramite le vie già elencate ma grazie anche alla regolazione effettuata da quest'ultimo sulla via di segnale WNT/ β catenina (Brookes et al., 2008; Torti & Torti, 2013b).

1.5.6 Il TfR1 negli animali domestici

Sono davvero pochi i lavori scientifici che vanno ad esaminare il ruolo del *Transferrin receptor 1* negli animali domestici.

In letteratura non sono presenti studi sulla sua espressione nel tumore mammario.

E' stata dimostrata la sua presenza nei linfomi canini, in particolare nel linfoma T ed in quello B a basso grado (Priest et al., 2011) e nei tumori cerebrali del cane e nelle loro metastasi (Olby *et al.*, 2000).

Il TfR1 è stato valutato ed è stata riportata la sua presenza anche nei melanomi e carcinomi squamosi in particolare con sede oro-nasale (Ploypetch et al., 2017).

Non esistono attualmente lavori che dimostrino la sua espressione nelle neoplasie del gatto anche se si sa per certo che è espresso nei tessuti per i quali il parvovirus sia canino che felino ha tropismo in quanto il recettore è la sua porta d'entrata all'interno della cellula (Parker et al., 2001).

1.5.7 Il TfR1 come target per terapie antineoplastiche innovative

Il *Transferrin receptor 1* si presta particolarmente all'utilizzo come *target* terapeutico dato le caratteristiche vantaggiose presentate da questo recettore:

- È espresso a livello di membrana cellulare ed è perciò accessibile ai farmaci provenienti dal circolo o presenti nell'interstizio
- È endocitato all'interno della cellula permettendo l'entrata di eventuali farmaci all'interno della stessa
- Riveste un ruolo essenziale nel metabolismo e nella proliferazione delle cellule neoplastiche
- È sovraespresso in una vasta gamma di neoplasie garantendo perciò la selettività del trattamento (Luria-Pérez, Helguera, & Rodríguez, 2016).

In medicina umana sono state sviluppate svariate tipologie di terapie aventi come target il TfR1, alcune delle quali hanno attualmente raggiunto il livello dei *Trials* pre clinici e clinici.

Una delle strategie utilizzate è quella di sfruttare il recettore per trasportare all'interno della cellula chemioterapici come ad esempio la doxorubicina coniugando la stessa con la transferrina grazie ad un legame labile sensibile al pH acido per favorirne il distacco all'interno degli endosomi (Mandip Singh, Atwal, & Micetich, 1998), si può coniugare il chemioterapico anche ad un anticorpo anti TfR1 sempre con legame acido sensibile (Braslawsky et al., 1991) o saturando il complesso Tf-doxorubicina con il gallio nitrato (altro antineoplastico che si sostituisce al ferro nel metabolismo cellulare andando a bloccare le vie da esso dipendenti) combinando le azioni dei due farmaci (Chitambar, 2004).

Similmente si possono legare alla transferrina anche altri tipi di farmaci come ad esempio il cisplatino, che si lega ai siti normalmente occupati dal ferro (Hoshino et al., 1995) o il Chlorambucil (Beyer et al., 1998), così come la mitomicina C (Tanaka, Shiramoto, Miyashita, Fujishima, & Kaneo, 2004), la gemcitabina (Piel & Tilton, 2017) e la danorubicina (Béjaoui, Pagé, & Noël, 1991).

Altra opzione terapeutica è l'unione della transferrina con tossina batteriche, vegetali o fungine creando quella che viene definita un'immunotossina (Salvatore, Beers, Margulies, Kreitman, & Pastan, 2002).

Alcune delle tossine più usate sono quella del ricino coniugata alla transferrina (Raso & Basala, 1984) o ad un anticorpo IgG1 anti TfR1 (Recht, Griffin, Raso, & Salimi, 1990).

Altre tossine derivate dalle piante possono essere la saporina, coniugabile sia alla transferrina (Cazzola et al., 1991) che ad un anticorpo IgA anti TfR1 (Scott, Goldmacher, Lambert, Jackson, & McIntyre, 1987), gelonina (Scott et al., 1987), la proteina antivirale della fitolacca americana, che agisce come antagonista delle basi puriniche (Ramakrishnan & Houston, 1984) o tossine dalla luffa (*Luffa aegyptiaca*) (Ramakrishnan, Enghlid, Bryant, & Xu, 1989).

Bisogna ricordare che gli anticorpi anti TfR1 possono essere letali per la cellula neoplastica anche di per sé (Lesley & Schulte, 1985; Ian S. Trowbridge, Lesley, & Schulte, 1982).

Tra le tossine fungine più importanti bisogna citare la restrictocina, coniugata con un anticorpo IgG1 anti TfR1 con legame acido sensibile (Dharmendar Rathore & Batra, 1996) e l' α sarcina che utilizza lo stesso vettore (D. Rathore, Nayak, & Batra, 1997).

Tra le tossine batteriche finora utilizzate si può annoverare l'esotossina del batterio *Pseudomonas aeruginosa* coniugata ad anticorpi monoclonali anti TfR1 (Pirker et al., 1985) o ad un anticorpo troncato a singola catena (scFv) tramite fusione genetica (Batra, Fitzgerald, Chaudhary, & Pastan, 1991).

È stata utilizzata anche la tossina difterica grazie alla sua unione con un anticorpo anti TfR1 (Rybak, Saxena, K, J Ackerman, & J Youle, 1991).

Il recettore funge anche porta d'entrata per numerose altre sostanze utilizzate per scopi di contrasto della neoplasia, come le ribonucleasi che vengono utilizzate sia coniugate alla Tf che ad anticorpi anti TfR1 di vario tipo (Rybak et al., 1991), compresi quelli a singola catena o sostanze dal grande peso molecolare come polimeri, liposomi o nano particelle.

In particolare sono stati utilizzati polimeri come la polietilenimmina usata come vettore assieme alla transferrina per portare geni con proprietà regolatorie antitumorali o radio nucleotidi all'interno della cellula neoplastica (Kim et al., 2004) o come il polietilglicole per inserire il gene codificante per il TNF α all'interno delle cellule tumorali (Kursa et al., 2003).

I liposomi sono utilizzati come *carrier* avendo alcuni vantaggi come la minor immunogenicità rispetto ai vettori virali, potendo contenere varie tipologie di sostanze al loro interno e potendo esprimere sulla superficie delle molecole che possono renderli selettivi come ad esempio la transferrina (T. M. Allen, 1998).

Le molecole finora sperimentate come antineoplastici e portati alla cellula grazie a liposomi sono ad esempio il Mastoparan (un derivato del veleno di vespa) (Ishida et al., 2001), doxorubicina (Lopez-Barcons, Polo, Llorens, Reig, & Fabra, 2005), cisplatino (Iinuma et al., 2002), nucleotidi antisenso (S.-J. Chiu, Liu, Perrotti, Marcucci, & Lee, 2006), geni specifici come p53 (Xu et al., 2002) o nella terapia foto sensibilizzante (Derycke et al., 2004).

Ai liposomi oltre alla transferrina si possono legare in superficie anche anticorpi anti TfR1 a catena singola per rendere gli stessi selettivi verso le cellule che esprimono maggiormente il recettore (Yu et al., 2004).

Altro vettore estremamente interessante sono le nanoparticelle, usate per portare all'interno della cellula tumorale dei frammenti utili di DNA o degli enzimi degradanti (Pun et al., 2004).

In particolare sono state utilizzate nano particelle coniugate alla ferritina per portare il paclitaxel all'interno di cellule prostatiche tumorali sfruttando il *transferrin receptor 1* come porta d'entrata (Sahoo, Ma, & Labhasetwar, 2004).

Appare così evidente la necessità di ricercare, anche in medicina veterinaria, validi farmaci e vettori per poter utilizzare questo recettore come *target* per la terapia antitumorale negli animali domestici.

Importanti infine anche alcuni farmaci antitumorali che agiscono più in generale sul metabolismo del ferro nella cellula neoplastica per espletare il loro effetto, come le statine (Kanugula et al., 2014).

2. SCOPO DELLA TESI

Lo scopo della tesi consiste nel dimostrare la possibilità anche in campo medico veterinario di estrarre da campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina (*formalin fixed paraffin embedded- FFPE*) acidi nucleici (*i.e.* DNA) utilizzabili poi per numerose analisi di biologia molecolare tra cui il *Whole Exome Sequencing* al fine di sviluppare queste metodiche innovative anche nello studio dei tumori in ambito veterinario ed in particolar modo per quanto concerne il tumore mammario felino.

Lo scopo è aprire la strada allo sviluppo di nuove tecniche diagnostiche, prognostiche e terapeutiche per la medicina veterinaria ed approfondire lo studio del genoma tumorale nel gatto e delle sue variazioni a seconda della progressione tumorale (neoplasia primaria, emboli metastatici e metastasi linfonodale). Nello specifico, l'obiettivo preliminare di questo lavoro di tesi è dimostrare di poter ottenere DNA adeguato sia dal punto di vista qualitativo sia quantitativo per permettere l'applicazione del *Whole Exome Sequencing*.

Tale tecnica verrà applicata in uno studio successivo al fine di valutare le differenze genetiche, in termini di polimorfismi a singolo nucleotide (*single nucleotide polymorphisms-SNP*) e variazioni del numero di copie (*copy number variations-CNVs*) tra tessuto sano, tumore primario e metastasi linfonodali non solo per gli scopi precedentemente elencati ma anche data la valenza del tumore mammario felino come modello animale per la neoplasia mammaria della donna.

Un secondo obiettivo è quello di far luce in particolare sull'espressione del *transferrin receptor 1* sulle cellule di carcinoma mammario felino e le differenze della stessa tra mammella sana e neoplastica con le varie sottocategorie già elencate al fine di poter valutare il TfR1 come possibile target terapeutico futuro per il carcinoma mammario felino.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Selezione ed estrazione dei campioni FFPE

I campioni sono stati estratti utilizzando un kit apposito, quantificati tramite spettrofotometro e successivamente si è provveduto a costruire le *library* per il successivo sequenziamento secondo *Whole Exome Sequencing*.

I campioni selezionati (31 in tutto) provengono dal servizio diagnostico d'istopatologia dell'Università di Padova, di Bologna e di Torino e constano di tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina prelevato durante gli interventi di rimozione delle suddette neoplasie e dei relativi vetrini colorati con ematossilina eosina.

Sono stati inclusi nello studio i seguenti casi:

- Tessuto mammario sano o, laddove non presente, cute sana di animali che hanno sviluppato tumore mammario non metastatico
- Tessuto mammario sano o, laddove non presente, cute sana di animali che hanno sviluppato tumore mammario metastatico
- Tessuto proveniente dalla massa tumorale mammaria primaria dei suddetti animali
- Tessuto neoplastico proveniente da metastasi linfonodale dei suddetti animali

Si è provveduto a visionare caso per caso ogni vetrino presente per selezionare i campioni più idonei per il progetto e per poter dare un grado ed una classificazione alle neoplasie osservate.

Gli osservatori constavano nel sottoscritto, uno dei due Correlatori e nella Relatrice di questo progetto coadiuvati a seconda delle necessità anche da una terza patologa veterinaria.

Sono stati selezionati carcinomi semplici, cioè neoplasie con proliferazione della sola componente epiteliale, sulla base della diagnosi morfologica.

Ne i casi con morfologia dubbi, è stata eseguita colorazione immunohistochimica per confermare o smentire l'origine epiteliale del tumore.

In particolar modo gli anticorpi utilizzati sono stati: calponina, un filamento contrattile tipico delle cellule mioepiteliali; p63, marcatore nucleare sempre per lo stesso tipo di cellule; vimentina, per distinguere i tessuti di origine mesenchimale e pancitocheratine per distinguere i tessuti epiteliali.

Essi sono anticorpi monoclonali umani con reattività crociata per i tessuti animali ampiamente descritta in letteratura (Vos JH et al., 1993).

Per la colorazione è stato utilizzato l'immunocoloratore automatico in dotazione presso il laboratorio d'immunohistochimica del Dipartimento BCA dell'Università di Padova (BenchMark XT, Ventana Medical Systems) ed i protocolli utilizzati per preparare i vetrini sono riportati nell'appendice finale.

Una volta selezionati i campioni che soddisfavano le caratteristiche e categorie sopra esposte si è provveduto all'estrazione del materiale genetico dagli stessi tramite il kit Allprep DNA/RNA FFPE (Qiagen cat.no 80234) seguendo il protocollo in seguito riportato e provvedendo ad estrarre sia il DNA che l'RNA ed estraendo in esperimenti separati i campioni di tessuto sano o malato e quelli di metastasi linfonodale.

Il protocollo utilizzato è il seguente:

Con un microtomo, eliminare l'eccesso di paraffina dal blocchetto.

1. Tagliare sezioni di 10-20 μm di spessore. Non usare più di quattro sezioni di 10 μm di spessore e 150 mm^2 di superficie o due da 20 μm e 150 mm^2 . Se la superficie del campione è stata esposta all'aria, elimino le prime due o tre sezioni.
2. Porre immediatamente le sezioni in una Eppendorf da 1,5 ml.
3. Deparaffinizzazione usando l'eptano:
 - a. Aggiungere 500 μl di eptano, mescolare usando il *vortex* vigorosamente per 10 s, ed incubare per 10 min a temperatura ambiente.

- b. Aggiungere 25 μ l di metanolo, mescolare usando il *vortex* vigorosamente per 10 s, e centrifugare per 2 min a 9,000 x g.
 - c. Rimuovere con cautela il surnatante pipettando senza disturbare il precipitato. Rimuovere con cautela ogni residuo di eptano/metanolo usando un puntale sottile.
 - d. Aggiungere 1 ml di etanolo (96-100%) al precipitato, mescolare usando il *vortex* (15 sec), e centrifugare a velocità massima per 2 min.
 - e. Rimuovere con cautela il surnatante pipettando senza disturbare il precipitato. Rimuovere con cautela ogni residuo di etanolo usando un puntale sottile.
 - f. Lasciare il tappo aperto ed incubare a temperature ambiente o fino a 37°C per 10 min o fino a che tutto l'etanolo residuo non sia evaporato.
4. Risospendere il precipitato aggiungendo 150 μ l di *Buffer* PKD e picchiettare il microtubo per risospendere e staccare il precipitato. Aggiungere 10 μ l di proteinasi K e mescolare usando il *vortex* (15 sec).
 5. Incubare a 56°C per 15 min. (Nota: a seconda del campione, questo potrebbe non essere lisato del tutto. Ciò non influenza la procedura.)
 6. Incubare in ghiaccio per 3 min.
 7. Centrifugare per 15 minuti a 20,000 x g.
 8. Trasferire con cautela il surnatante, senza disturbare il precipitato, in un nuovo microtubo da 2 ml per la purificazione dell' RNA. Conserva il precipitato per la purificazione del DNA. Il precipitato contenente il DNA può essere conservato per 2 h a temperature ambiente, fino ad un giorno a 2-8°C, o da -15 a -30°C per periodi più lunghi.

Purificazione dell'RNA

9. Incubare il surnatante ottenuto al punto 9 a 80°C per 15 min. (Nota: nel corso di questa incubazione, inizia la purificazione dell' RNA genomico).
10. Centrifugare brevemente il microtubo per eliminare eventuali gocce presenti sul tappo.

11. Aggiungere 320 μ l di *Buffer* RLT e mescolare usando il *vortex* (30 sec) o pipettando.
12. Aggiungere 1120 μ l di etanolo (96-100%) e mescolare accuratamente usando il *vortex* (20 sec) o pipettando.
13. Trasferire 700 μ l del campione, inclusi i precipitati che potrebbero essersi formati, in una colonnina RNeasy MinElute spin posta in un microtubo da 2 ml. Chiudere il tappo con delicatezza e centrifugare per 15 s a $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Eliminare il liquido raccolto nel microtubo.
14. Ripetere il punto 14 fino a quando tutto il campione non sarà passato attraverso la colonnina RNeasy MinElute spin.
15. Aggiungere 350 μ l di *Buffer* FRN sulla colonnina RNeasy MinElute spin. Chiudere il tappo delicatamente e centrifugare per 15 s a $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Eliminare il liquido raccolto nel microtubo.
16. Aggiungere 10 μ l di DNase I *stock solution* a 70 μ l di *Buffer* RDD. Mescolare delicatamente capovolgendo il microtubo e centrifugare brevemente per raccogliere eventuale liquido dai lati del microtubo.
17. Aggiungere la DNase I *incubation mix* (80 μ l) direttamente sulla membrana della colonnina RNeasy MinElute spin e lasciare sul bancone (20-30°C) per 15 min.
18. Aggiungere 500 μ l di *Buffer* FRN sulla colonnina RNeasy MinElute spin . Chiudere il tappo delicatamente e centrifugare per 15 s a $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Conservare il liquido depositatosi nel microtubo per il punto 20.
19. Porre la colonnina RNeasy MinELute spin in un nuovo microtubo da 2 ml (fornito). Porre il liquido conservato nel punto 19 sulla colonnina. Chiudere il tappo delicatamente e centrifugare per 15 s a $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Eliminare il liquido raccolto nel microtubo.

20. Aggiungere 500 µl di *Buffer* RPE sulla colonnina RNeasy MinElute spin. Chiudere il tappo delicatamente e centrifugare per 15 s a $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Eliminare il liquido raccolto nel microtubo.
21. Aggiungere 500 µl di *Buffer* RPE sulla colonnina RNeasy MinElute spin . Chiudere il tappo delicatamente e centrifugare per 15 s a $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Eliminare il microtubo ed il liquido contenuto al suo interno.
22. Porre la colonnina RNeasy MinElute spin in un nuovo microtubulo da 2 ml (fornito). Aprire il tappo della colonnina e centrifugare a massima velocità per 5 min. Eliminare il microtubo ed il liquido contenuto al suo interno.
23. Porre la colonnina RNeasy MinElute spin in un nuovo microtubo da 1.5 ml. Aggiungere 14-30 µl di acqua RNase-free direttamente sulla membrana della colonnina. Chiudere delicatamente il tappo ed incubare per 1 min a temperatura ambiente. Centrifugare a $100 \times g$ per 1 min. Centrifugare a velocità massima per 1 min per eluire l'RNA.

Purificazione del DNA genomico

24. Risospendere il precipitato del punto 9 in 180 µl di *Buffer* ATL, aggiungere 40 µl di proteinasi K e mescolare usando il *vortex* (20 sec).
25. Incubare a 56°C per 1 h.
26. Incubare a 90°C per 2 h senza agitare.
27. Centrifugare brevemente il microtubo per rimuovere eventuali gocce da sotto il tappo.
 - a. Opzionale: Se è richiesto DNA privo di RNA genomico, lasciare che il campione ritorni a temperatura ambiente ed aggiungere poi 4 µl di RNasi A (100 mg/ml). Incubare per 2 min a temperatura ambiente prima di procedere con il punto 29.
28. Aggiungere 200 µl di *Buffer* AL e mescolare completamente usando il *vortex*. Aggiungere poi 200 µl di etanolo (96-100%) e mescolare completamente di nuovo usando il *vortex* o pipettando. (Nota: il *Buffer* AL e l'etanolo possono

- essere mescolati assieme e poi essere aggiunti così in un solo passaggio per risparmiare tempo quando si stanno processando molti campioni.)
29. Trasferire l'intero campione su di una colonnina QIAamp MinElute spin posta in un microtubo da 2 ml (fornito). Chiudere il tappo delicatamente e centrifugare per 1 min a $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Eliminare il microtubo ed il liquido contenuto al suo interno. (Nota: se il campione non è passato completamente attraverso la membrana dopo la centrifugazione, centrifugare nuovamente a velocità maggiore fino a che la colonnina QIAamp MinElute spin non sarà vuota.)
 30. Porre la colonnina QIAamp MinElute spin in un nuovo microtubo da 2 ml (fornito). Aggiungere 700 μ l di *Buffer AW1* sulla colonnina. Chiudere il tappo delicatamente e centrifugare per 15 s a $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Eliminare il liquido raccolto nel microtubo.
 31. Aggiungere 700 μ l di *Buffer AW2* sulla colonnina QIAamp MinElute spin. Chiudere il tappo delicatamente e centrifugare per 15 s a $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Eliminare il liquido raccolto nel microtubo.
 32. Aggiungere 700 μ l di etanolo (96-100%) sulla colonnina QIAamp MinElute spin. Chiudere il tappo delicatamente e centrifugare per 15 s a $\geq 8,000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Eliminare il microtubo ed il liquido contenuto al suo interno.
 33. Porre la colonnina QIAamp MinElute spin in un nuovo microtubo da 2 ml (fornito). Aprire il tappo della colonnina e centrifugare a velocità massima per 5 min. Eliminare il microtubo ed il liquido contenuto al suo interno.
 34. Porre la colonnina QIAamp MinElute spin in un nuovo microtubo da 1.5 ml. Aggiungere 30-100 μ l di *Buffer ATE* direttamente sulla membrana della colonnina. Chiudere il tappo delicatamente ed incubare da 1 a 5 min a temperatura ambiente. Centrifugare a $100 \times g$ per 1 min. Centrifugare a velocità massima per 1 min per eluire il DNA.

Una volta estratti, i campioni sono stati quantificati usando il Nanodrop (ThermoFisher Scientific) e successivamente stoccati a -20°C per quanto riguarda il DNA ed a -80°C per l'RNA.

ID	classificazione	diagnosi morfologica	quantificazione RNA (ng/μl)	quantificazione DNA (ng/μl)
1	H+PM sullo stesso campione	carcinoma tubulare semplice grado 2	H=23,9 PM=69,3	H=165,7 PM= 217,2
2	PNM	carcinoma cistico papillare grado 2	84,1	47,4
3	H		13,5	28,9
4	H+PNM sullo stesso campione	carcinoma semplice tubulo papillare grado 2	H=4,2 PNM=57,1	H=16,9 PNM=164,4
5	H+PNM sullo stesso campione	carcinoma cribriforme grado 2	H=24,1 PNM=90,7	H=13,1 PNM= 173,6
6	H+PNM sullo stesso campione	carcinoma tubulo solido	H=39,8 PNM=114,1	H=45,9 PNM= 255
7	HM		47,4	59,7
8	PM	carcinoma tubulare semplice grado 2	51,9	199,4
9	PM	carcinoma cribriforme	292,8	946,6
10	HM		102,8	93,3
11	PM+HM	carcinoma tubulare	HM=15,8 PM=38,1	H=21,5 PM=188,6
12	PNM+H sullo stesso campione	carcinoma duttale grado 1	25,8	H=44,2 PNM=339,3
13	H		45,8	vedi sopra per sano
14	H+PNM sullo stesso campione	carcinoma duttale grado 2	H=18 PNM=175,2	H=13,3 PNM=177,8
15	PNM	carcinoma cribriforme grado 2	71,4	90,7
16	H		9,3	32,6
17	PNM	carcinoma tubulo papillare grado 3	59,1	321,2
18	H		12,6	38,6
19	HM		HM=176,4	HM=18,1
20	PM	carcinoma adenosquamoso	PM=876,2	PM=1053,5
21	PM	carcinoma tubulare semplice	68,5	141,9
22	HM		36,3	10,8
23	PM	carcinoma cribriforme	47,5	133,5
24	HM		59,8	60,9
25	LM		53,6	107,9
26	LM		904,4	789,9
27	LM		133,1	292,7
28	LM		63,8	117,3
29	LM		43,4	185
30	LM		239,3	194,1
31	LM		456,4	167,5

Immagine 16. Tabella che descrive la classificazione secondo la diagnosi morfologica ed evidenzia la quantificazione del DNA e dell'RNA dopo l'estrazione, i campioni sono classificati come H (mammella sana), HM (porzione di mammella sana su paziente con carcinoma mammario), PNM (carcinoma mammario) e PM (carcinoma mammario metastatico)

3.1.1 Purificazione in etanolo

In caso il picco dell'acido nucleico non risultasse netto o non risultasse univoco, si è utilizzata la tecnica della purificazione in etanolo del materiale genetico per migliorarne la purezza.

Questa tecnica sfrutta la proprietà del glicogeno di fungere da *carrier* per gli acidi nucleici e di essere insolubile in alcool, favorendo così la cattura e la purificazione degli stessi.

Il protocollo della suddetta procedura è il seguente:

1. Aggiungere 0.5 μ l di glicogeno PCR *grade* (= 10 μ g) (Invitrogen #10814010) all' RNA.
2. Aggiungere 1/10 del volume (i.e., 3 μ l se la soluzione eluita contenente l'RNA è di 30 μ l) di sodio acetato 3M a pH 5.2 e mescolare bene.
3. Aggiungere 2.5 volte il volume (i.e., 75 μ l se il volume della soluzione di partenza è di 30 μ l) di etanolo 99.5% appena estratto dal ghiaccio, mescolare bene e trasferire in un nuovo microtubo da 0.6 ml ed incubare 1 ora a -20°C (in alternativa: lasciare per tutta la notte a -20°C)
4. Accendere il termoblocco ed impostarlo a 70°C
5. Mettere il tubo da 0.6 mL dentro ad un tubo da 2 mL o da 1.5 ml (perché il tubo da 0.6mL potrebbe distruggersi durante la centrifuga ad alta velocità). Centrifugare il campione a 15,000g per 25 minuti a 4°C (centrifuga nella stanza PCR).
6. Rimuovere con cautela il surnatante (si può lasciare un pò di soluzione sotto al *pellet* per essere certi di non staccarlo o smuoverlo). (ricentrifugare poi a 4°C)
7. Aggiungere 500 μ l di etanolo 70% appena estratto dal ghiaccio per lavare via il sale in eccesso. Mescolare bene. (Si può eseguire questo passaggio due volte se I livelli di contaminanti nel campione rimangono alti).
8. Centrifugare il campione a 15,000g per 25 minuti a 4°C.
9. Rimuovere con cautela il surnatante cercando di rimuoverne il più possibile.

10. Asciugare all'aria il *pellet* dentro alla cappa (tenere i tappi dei tubi aperti).
Opzionale: portare un termoblocco pulito e portato a 70°C all'interno della cappa ed asciugare il *pellet* per 10 minuti (dipende da quanto etanolo è stato lasciato). Asciugare completamente ma non esagerare con il tempo d'esposizione al calore.
11. Aggiungere 12.5/20 µl di acqua *nuclease-free*. Non pipettare il campione (l'RNA potrebbe rimanere dentro alla pipetta). Aggiungere acqua per prima cosa, lasciare riposare per 1 minuto. Pipettare solo in seguito e lasciar riposare per 1 minuto. Pipettare cercando di grattare l'area del *pellet* per risospenderlo.

3.1.2 Elettroforesi su gel di agarosio del materiale genetico estratto da campioni FFPE

Eseguita come descritto la quantificazione degli acidi nucleici tramite Nanodrop, si è proceduto anche ad applicare la tecnica dell' elettroforesi su gel di agarosio per poter determinare la qualità del materiale ottenuto.

Si sono disciolti in 150ml di *buffer* TAE (tris-acetate-EDTA) 3 grammi d'agarosio per ottenere una soluzione finale al 2%.

Essa è stata poi portata ad ebollizione grazie ad un forno a microonde e, una volta che la soluzione è diventata trasparente, lasciata raffreddare aggiungendo nel mentre 15µl di GelRed® (Biotium), un agente intercalante necessario per la visualizzazione dei frammenti di DNA o RNA ottenuti.

Una volta raffreddata la soluzione è stata versata su di un apposito supporto orizzontale per elettroforesi dotato di pettini per lo stampo dei pozzetti.

Dopo circa 40 minuti il gel ottenuto è solidificato e pronto all'uso.

Il protocollo per l'esecuzione dell'elettroforesi è il seguente:

1. Porre il gel ottenuto nella vaschetta riempita con soluzione *buffer* TAE 1X e rimuovere i pettini per ottenere i pozzetti di caricamento

2. Depositare 5µl di Orange G (Merck) e 10µl di campione per un totale di 15µl di soluzione per ogni pozzetto utilizzato
3. Nell'ultimo pozzetto depositare 8µl di Ladder, un marcatore di peso molecolare (100bp+3K Ladder, SMOBIO)
4. Collegare gli elettrodi del generatore alla vaschetta con il gel ed impostare un voltaggio di 110V per 45-60 minuti
5. Interrompere l'erogazione di corrente quando il colorante del marcatore oltrepassa la metà della lunghezza del gel
6. Osservare il gel al transilluminatore (GelDoc™ XR+ System, Bio Rad)

3.2 Analisi d'espressione del TfR1 tramite colorazione immunoistochimica

Per l'analisi d'espressione del TfR1 sono stati adoperati gli stessi tessuti precedentemente utilizzati per l'estrazione del materiale genetico.

Sono state tagliate sezioni da 4µm e sono state montate su vetrini TOMO® (Matsunami) a carica positiva.

Le sezioni hanno sostato in stufa a 37°C per 30 minuti prima dell'inizio della corsa di colorazione.

È stato seguito poi il protocollo riportato in appendice utilizzando un immunocoloratore automatizzato (BenchMark XT, Ventana Medical Systems).

Il macchinario può processare contemporaneamente fino a 30 vetrini con protocolli indipendenti grazie al riconoscimento automatico degli stessi tramite sistema di codici a barre e l'utilizzo di piastre singole riscaldanti.

Esso svolge ognuno dei passaggi della colorazione immunoistochimica (deparaffinatura, smascheramento, incubazione, rivelazione e controcolorazione) in maniera automatica, fatta eccezione per la sola aggiunta dell'anticorpo che deve essere svolta manualmente.

Ogni altro reagente è aggiunto dalla macchina e mescolato sul vetrino tramite getti di aria; l'evaporazione è impedita dalla stesura di una pellicola oleosa sopra alla sezione stessa.

È stato utilizzato un anticorpo monoclonale murino anti TfR1 umano clone H68.4 (ThermoFisher Scientific) ad una concentrazione di 1:25 la cui reattività è stata dimostrata verso il TfR1 dell'uomo, del cane e del gatto.

Come rivelatore si è adoperato l'ultraView™ Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems), kit composto da cinque reagenti (DAB Inhibitor, HRP Multimer, DAB Chromogen, DAB H₂O₂ e DAB Copper) basato su un multimer biotina-free che coniuga su uno scheletro polimerico anticorpo secondario e perossidasi Horseradish adatto per la rilevazione indiretta di anticorpi primari di coniglio e di topo.

La positività si rivela quindi come una colorazione marrone.

Ad ogni corsa dell'immunocoloratore sono stati aggiunti un campione la cui funzione era quella di fungere da controllo positivo (tonsilla umana) ed un campione su cui è stata applicata soluzione tampone e non anticorpo primario anti TfR1.

3.2.1 conta manuale delle cellule e valutazione tramite *software Image J*

È stata eseguita poi una conta manuale per ogni vetrino andando a prendere in esame 10 campi significativi a 40x (HPF o *high power field*) e contando 100 cellule per ogni campo, classificando le stesse a seconda della presenza o meno della colorazione marrone e della sua intensità in negative, debolmente positive, mediamente positive ed altamente positive.

Si è ottenuto perciò un numero totale di 1000 cellule contate per ogni vetrino e l'intensità media di colorazione dello stesso.

L'analisi statistica sul conteggio e valutazione dell'intensità della colorazione dell'immunoistochimica per TfR1 è stata eseguita con il programma Prism 8 (GraphPad).

Per confrontare e confermare i dati raccolti manualmente sono state analizzate tramite il software Image J le foto dei vetrini acquisite tramite microscopio digitale D-sight (Menarini Diagnostics) utilizzando il *plugin* IHC profiler.

Esso permette di separare nell'immagine i tre colori fondamentali acquisiti dalla fotocamera (rosso, blu e verde) e di isolare in questo modo i pixel corrispondenti alla lunghezza d'onda del marrone, quantificando perciò la colorazione DAB e fornendo il numero totale di pixel contati e la percentuale di quelli negativi, lievemente positivi, positivi ed altamente positivi (Varghese, Bukhari, Malhotra, & De, 2014a).

Si è applicato questo protocollo di analisi computerizzata su ogni vetrino analizzando per ognuno di essi 5 campi significativi a 20x come effettuato in un lavoro a tema TfR1 nel linfoma canino (Priest et al., 2011).

caso	classificazione	campioni totali divisi per categoria
1	H	H=7
3	H	HM= 2
4	H+PNM	PNM=7
5	H+PNM	PM= 7
6	H+PNM	LM= 7
7	H	
8	PM	
09;10	PM+LM	
11	PM	
12	H+PNM	
14	PNM	
15	PNM	
17;18	PNM	
19	HM	
20	PM	
21	PM	
22	LM	
23	PM	
24	HM+LM+ PM	
25	LM	
27	LM	
29	LM	
31	LM	

Immagine 17. Elenco dei casi e relative tipologie tissutali utilizzate per l'esecuzione della colorazione immunoistochimica per rilevare il Tfr1 felino e relativa numerosità dei campioni divisa per categorie; la classificazione è divisa in tessuto sano (H), tessuto sano da campione con tumore che ha dato metastasi (HM), tumore primario (PNM), tumore primario che ha dato metastasi (PM) e linfonodo metastatico (LM)

3.3 Analisi d'espressione del Tfr1 su linee cellulari

3.3.1 Immunofluorescenza

Per dimostrare l'espressione del recettore, è stata inoltre eseguita un'immunofluorescenza su linee cellulari di gatto, donna e cane.

Le suddette linee sono FMCp, FMCm, MDA-MB231, MCF7, CYPp, CYPm, CF-33 e CMT-Da.

La prima e la seconda sono derivate rispettivamente da un carcinoma mammario felino primario e da metastasi sempre della stessa tipologia di neoplasia; la terza e quarta rappresentano rispettivamente linee commerciali di carcinoma mammario triplo negativo di donna e di tumore mammario di donna che esprime recettori per estrogeni, progesterone e glucocorticoidi.

La quinta, sesta e settima rappresentano delle cellule di carcinoma mammario primario e metastatico canino, l'ultima è una linea sempre di carcinoma mammario canino, precedentemente isolata presso il dipartimento BCA e proveniente da un campione prelevato presso l'Ospedale Veterinario Universitario Didattico di Legnaro e diagnosticato come carcinoma solido di 3° grado.

Il protocollo utilizzato per l'immunofluorescenza è il seguente:

1. Rimuovere il *medium* delle cellule
2. Eseguire un lavaggio rapido con 500µl di PBS
3. Fissazione: Aggiungere 200 µl di paraformaldeide al 4% a temperatura ambiente per 10
4. Lavare le cellule con 3 veloci risciacqui con 500 µl PBS (in alternativa lavare per 5 minuti per ogni risciacquo)
5. Preparare una camera umidificata
6. Permeabilizzazione: aggiungere 200µl di Triton X-100 allo 0.1% nel PBS a temperatura ambiente, lasciar riposare per 10 minuti

7. Lavare le cellule con 3 veloci risciacqui con 500 µl PBS (in alternativa lavare per 5 minuti per ogni risciacquo)
8. *Blocking*: Aggiungere 200 µl di BSA all' 1% nel PBS a temperatura ambiente, lasciar riposare per 1 ora a temperatura ambiente
9. Lavare le cellule con 3 veloci risciacqui con 500 µl PBS (in alternativa lavare per 5 minuti per ogni risciacquo)
10. Aggiungere l'anticorpo primario H68.4 per il recettore della transferrina di tipo 1 diluito 1:250 in BSA 0.1% ed incubare per 3 ore a temperatura ambiente; usare 200 µl per pozzetto
11. Lavare le cellule per 4 volte con 500 µl di PBS (5-10 minuti per ogni risciacquo)
12. Aggiungere l'anticorpo secondario di capra anti IgG murina (H+L) Superclonal™ coniugato con il fluoroforo AlexaFluor® 455: diluire 1: 2000 in 0.1% BSA ed incubare al buio per 45 minuti a temperatura ambiente, usare 200 µl per pozzetto
Lavare le cellule per 4 volte con 500 µl di PBS (5-10 minuti per ogni risciacquo)
13. Porre una goccia di SlowFade® Gold Antifade Mountant con DAPI per colorare i nuclei

Visualizzare il risultato tramite un microscopio a fluorescenza.

3.3.2 Estrazione degli acidi nucleici dalle linee cellulari

In seguito sono stati estratti gli acidi nucleici dalle cellule appartenenti alle linee cellulari sopra descritte tramite il *kit RNeasy Micro kit* (Quiagen) con il seguente protocollo:

1. Per lisare le membrane cellulari sono stati aggiunti al *pellet* di cellule ottenuto per centrifugazione 600µl di *buffer* RLT addizionato con mercaptoetanolo (inibitore dell'RNAsi)

2. Vortexare della soluzione
3. Prelevare 700µl di ciascuna soluzione (incluso del precipitato eventualmente formato) ed inserirla all'interno di una colonnina d'affinità posta all'interno di una Eppendorf sterile.
4. Centrifugare 1 minuto a velocità massima
5. Aggiungere 700µl di buffer RW1 per lavare la membrana della colonnina.
6. Centrifugare a più di 8000g per 15 secondi.
7. Mettere la colonnina in un nuovo tubo da 2ml ed aggiungere 500µl di *buffer* RPE per lavare la membrana della colonnina.
8. Centrifugare a più di 8000g per 2 minuti.
9. Aggiungere 500µl di buffer RPE.
10. Centrifugare a più di 8000g per 2 minuti.
11. Centrifugare per 1 minuto.
12. Mettere la colonnina in un nuovo tubo da 2ml ed aggiungere al centro della membrana 20µl di *RNAse free water*.
13. Centrifugare per 1 minuto a massima velocità.
14. Ripetere gli ultimi due passaggi

L'RNA così estratto è stato quantificato tramite il Nanodrop (ThermoFisher Scientific)

3.3.4 Retrotrascrizione dell'RNA ottenuto dalle linee cellulari

In seguito l'RNA ottenuto dalle linee cellulari è stato retrotrascritto con l'utilizzo del *kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (ThermoFisher Scientific) applicando il seguente protocollo:

Preparare la mix aggiungendo nell'ordine i seguenti reagenti in tubini sterili e *nucleasi-free*:

- *Template RNA* 11µl
- *Random Primers* 1µl

Eseguire sulla mix parziale così ottenuta un passaggio in termociclatore a 65°C per 5 minuti

- *Reaction Buffer 5X* 4µl
- *Riboblock* RNAsi inibitore (20U/µl) 1µl
- 10mM dNTPs Mix 2µl
- *RevertAid* RT (200U/µl) 1µl

La mix finale così ottenuta per ogni tubino ammonta a 20µl e va posta in un termociclatore con i seguenti parametri:

- 25°C per 5 minuti
- 42°C per 60 minuti
- 70°C per 5 minuti
- 4°C fino a conservazione in congelatore

Il cDNA così ottenuto va conservato a -20°C se usato entro 7 giorni, a -70°C fino al suo utilizzo se dopo la settimana dalla sintesi.

3.3.3 Disegno dei *primers* per la *real-time* PCR

Dopo aver estratto il materiale genetico sono stati disegnati dei *primers* specifici per il TfR1 felino, canino ed umano utilizzando il *software Primer Blast* del *National Institute of Health* statunitense.

Le sequenze ottenute sono state fornite dalla ditta BMR Genetics e sono le seguenti:

- Gatto: *forward* GCTGTTGGTGCCACTGAATG, *reverse* TGCTGGTACCAAGAACAGCTT disegnati alla giunzione tra l'esone 12 e 13 e con prodotto della lunghezza di 100 paia di basi, denominata coppia di *primers* TFRC F4; *forward* TTCAGGTCAAAGGCAGTGCT, *reverse* ATGCCACATAGCCCTCTGGA disegnati nella giunzione tra l'esone 4 e 5 e con prodotto della lunghezza di 96 paia di basi, denominati TFRC F3; *forward* TGGAGGTAGAGGGAACCGAA, *reverse* TTCATTCAGCTGCCTGATGGT disegnati nella giunzione tra l'esone 3 e 4

e con prodotto della lunghezza di 146 paia di basi, denominati TFRC F2;
forward TGAGAACCGATTCCGTGAGC, *reverse*

CACTGAGTTTGAAGCACTGCC disegnati nella giunzione tra l'esone 4 e 5
e con prodotto della lunghezza di 94 paia di basi, denominati TFRC F1

- Cane: *forward* CTTTGGACATGCTCACCTGG, *reverse*
TATGCTGGGCAATCCTGACG disegnati nella giunzione tra l'esone 7 e l'8,
con prodotto della lunghezza di 106 paia di basi, denominati coppia di
primers TFRC C1; *forward* GGTCAAAAGCAGCAATGCTCA, *reverse*
CCGGTAACTGTCGTTGCCTT disegnati nella giunzione tra l'esone 4 e 5 e
con prodotto della lunghezza di 120 paia di basi, denominato TFRC C2
- Donna: *forward* AGGACGCGCTAGTGTTCTTC, *reverse*
CCAGGCTGAACCGGGTATATG disegnati nella giunzione tra l'esone 1 e
2, prodotto della lunghezza di 112 paia di basi, denominata coppia di *primers*
TFRC H1; *forward* GGACGCGCTAGTGTTCTTCT, *reverse*
CATCTACTTGCCGAGCCAGG disegnati nella giunzione tra l'esone 1 e 2 e
con prodotto della lunghezza di 112 paia di basi, denominati TFRC H2
- Come geni *housekeeping* (gene la cui espressione non cambia a seconda del
tipo o della condizione cellulare e grazie al quale si può evidenziare la corretta
riuscita della procedura) sono stati utilizzati la Bactina (proteina contrattile
cellulare) ed il GAPDH (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi, implicata nella
glicolisi principalmente) : Bactina *forward* TGGCACCCACACCTTCTACAA,
reverse CCAGAGGCGTACAGGGATAG; GAPDH *forward*
AACATCATCCCTGCCTCTACTG e *reverse* CTCCGACGCCTGCTTCAC.

3.3.5 Real-Time PCR

È stata eseguita una *real time* PCR sull' RNA estratto da queste cellule e retro
trascritto a cDNA.

La PCR real-time (qPCR) è un metodo che simultaneamente amplifica (reazione a catena della polimerasi o PCR) e quantifica il DNA.

Il DNA è amplificato da reazioni a catena della DNA-polimerasi e dopo ogni ciclo di amplificazione esso è quantificato.

La quantificazione è stata eseguita tramite l'uso di una colorazione fluorescente che intercala il DNA doppio filamento (ds).

La PCR real-time è stata eseguita dopo quella retrotrascrizionale (RT-PCR) per quantificare i livelli di espressione di specifici RNA: la retro-trascrizione (o trascrizione inversa) produce del DNA complementare a singolo filamento detto cDNA (*complementary DNA*) mantenendo inalterati i rapporti relativi di concentrazione delle diverse specie degli RNA. In questo modo è possibile, ad esempio, misurare l'espressione relativa di un gene ad un tempo particolare, o in una cellula o in un tipo particolare di tessuto. La combinazione di queste due tecniche è spesso denominata RT-PCR quantitativa.

Il kit utilizzato per eseguire la qPCR è il *PowerUp™SYBR™ Green Master Mix* (Applied Biosystems) ed il protocollo è il seguente:

- 1) Vortexare e centrifugare brevemente i componenti del kit per poi riporli in ghiaccio
- 2) Aggiungere ad una piastra a 96 pozzetti sterile e nucleasi free tenuta su supporto congelato per ogni pozzetto nell'ordine:
 - a) SYBRGreen Mastermix 10 µl
 - b) *Primer Forward* 1µl
 - c) *Primer Reverse* 1µl
 - d) H₂O da biologia molecolare 6µl
 - e) cDNA diluito 1:5 2µl

I tubini contenenti i 20µl totali vanno pipettati per mescolarne il contenuto e centrifugati a 2000 rpm per 2 minuti, assicurandosi poi che tutto il materiale sia sul fondo dei tubini e che non vi siano bolle.

La piastra va quindi posta in un termociclatore con protocollo differente a seconda dei *primers* e linee cellulari usate:

- Per le linee di cane e donna, con i relativi *primers*, e per le linee di gatto con *primers* TFRC F1,F2 ed F3 il ciclo è il seguente:

- a) 50°C per 2 minuti
 - b) 95°C per 2 minuti
 - c) 95°C per 15 secondi
 - d) 60°C per 1 minuto
 - e) 95°C per 15 secondi
 - f) 60°C per 1 minuto
 - g) 95°C per 15 secondi
- } 40 cicli

- Per le linee di gatto con il *primer* TFRC F4:

- a) 50°C per 2 minuti
 - b) 95°C per 2 minuti
 - c) 95°C per 15 secondi
 - d) 59°C per 15 secondi
 - e) 72°C per 1 minuto
 - f) 95°C per 15 secondi
 - g) 60°C per 1 minuto
 - h) 95°C per 15 secondi
- } 40 cicli

3.3.6 Elettroforesi su gel di agarosio dell'amplificato ottenuto da RT-PCR

Dopo l'amplificazione tramite la *real time* PCR è stato eseguito un gel con unica differenza rispetto al protocollo illustrato precedentemente relativa alla quantità di campione caricato e pari a 5µl di amplificato e 5µl di Orange.

L'elettroforesi è stata eseguita per controllare che la banda del prodotto ottenuto corrispondesse con le aspettative date dal numero di basi della lunghezza del *primer* ed è stato mandato a sequenziare il prodotto di PCR presso la ditta BMR Genomics,

spin-off dell'Università di Padova, per controllare che l'amplificato fosse effettivamente compatibile con la sequenza del TfR1 e quindi che fosse effettivamente il recettore stesso.

3.3.7 Preparazione dell'amplificato per il sequenziamento

Il protocollo per preparare i campioni prima dell'invio per il sequenziamento è il seguente e si avvale del *kit* ExoSAP-IT™ PCR *Product Cleanup*:

- Stimare la concentrazione dell'amplificato ottenuto basandosi sull'intensità della sua banda confrontata con quella del Ladder
- Utilizzando il precedente dato, stimare grazie ai valori riportati nel sito BMR *Genomics* la quantità in ng di materiale genetico da inviare
- Aggiungere ad un tubino sterile ed RNAsi *free* 2µl di ExoSap ed i microlitri necessari di campione per arrivare alla quantità richiesta dalla ditta che esegue il sequenziamento, portare eventualmente al volume totale di 7µl con H₂O per biologia molecolare (eseguire in doppio questo passaggio)
- In un termociclatore incubare prima a 37°C per 15 minuti e poi ad 80°C per 15 minuti per inattivare l'enzima ExoSap
- Aggiungere 0.64 ul di *primer forward* in un tubicino e 0.64 ul di *primer reverse* nell'altro dei campioni preparati in doppio
- Essiccare in termociclatore a 37° C per circa 30 minuti o fino a completo essiccamento

TABELLE PER IL CALCOLO DELLE QUANTITA'

QUANTITA' DI PRIMER			
Tipo di DNA	1x	2x	4x
PCR, DNA ss e ds	3,2 pmoli	6,4 pmoli	12,8 pmoli
Cosmidi, BAC, PAC e fagi con inserti grandi	30 pmoli	60 pmoli	120 pmoli

Il Sequencing Core può eventualmente **fornire gratuitamente alcuni primer universali** (vedi la [tabella](#))

QUANTITA' CONSIGLIATE DI DNA (1X) su cui calcolare il 2x	
Tipo di DNA	Quantità di DNA
DNA ds: plasmide + inserto	
fino a 3000 basi	200 ng
da 3000 a 5000 basi	200-250 ng
da 5000 a 10000 basi	250-350 ng
da 10000 a 15000 basi	350-450 ng
oltre 15000 basi	500 ng
DNA ss	50-100 ng
Cosmidi, BAC, PAC e fagi con inserti grandi	0,70-1,0 ug
Prodotti di PCR:	1-2 ng/100 basi

Immagine 18. Tabella che riporta le quantità consigliate di campioni e *primers* da inviare secondo il sito BMR Genetics; tratta dal sito della ditta stessa

4. RISULTATI

4.1 Estrazione degli acidi nucleici da tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina

Come si può vedere dall' immagine 16 le quantificazioni degli acidi nucleici eseguite tramite il Nanodrop hanno dimostrato che da tutti i campioni è stato possibile estrarre sia il DNA che l'RNA con livelli variabili tra un minimo di 4,2 nanogrammi per microlitro fino ad un massimo di 1053,5.

Il valore medio di RNA estratto si attesta a 171 ng/ μ l mentre per il DNA a 118,8 ng/ μ l .

Nelle immagini 19 e 20 si può vedere come i picchi ottenuti tramite l'analisi sempre con Nanodrop siano tutti corrispondenti ai 260 nm, lunghezza d'onda degli acidi nucleici.

Non sono presenti altri picchi, suggerendo l'assenza di contaminanti provenienti dal protocollo di estrazione

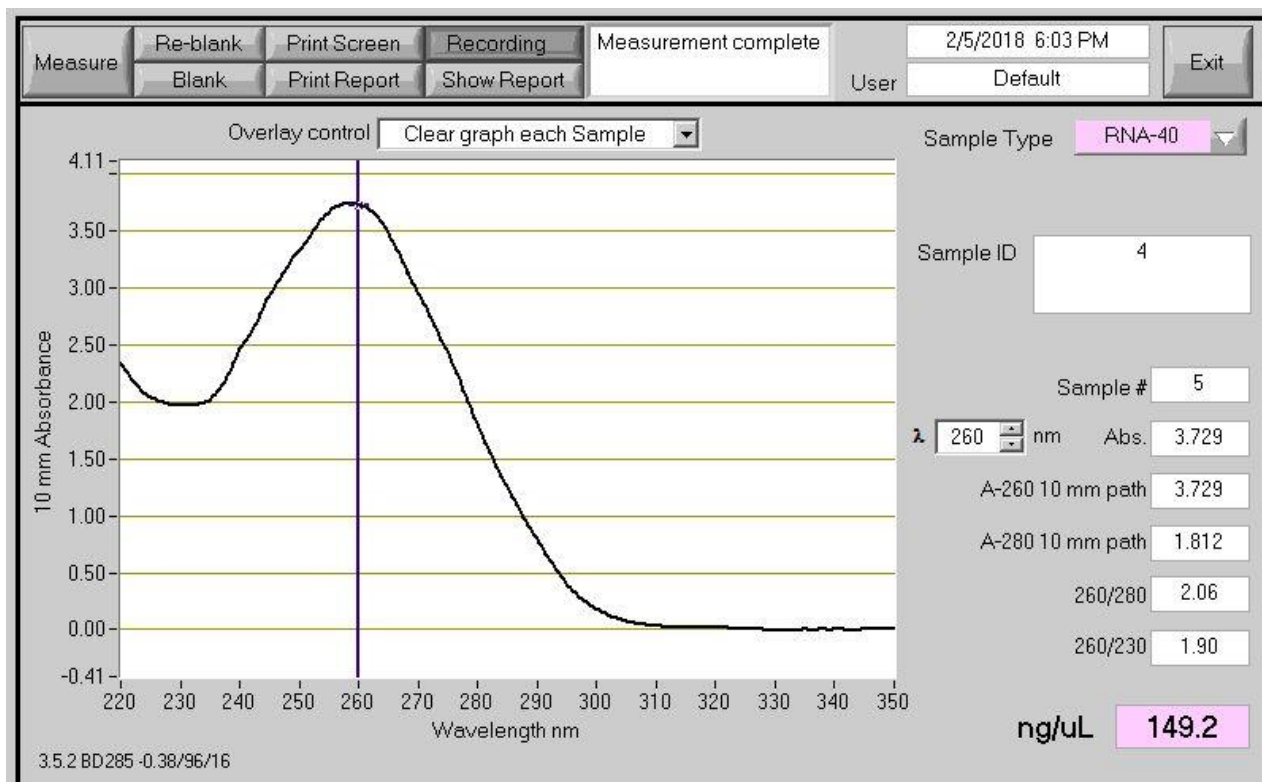


Immagine 19. Curva di quantificazione tramite Nanodrop della purezza e concentrazione di un campione di RNA estratto da paraffinato

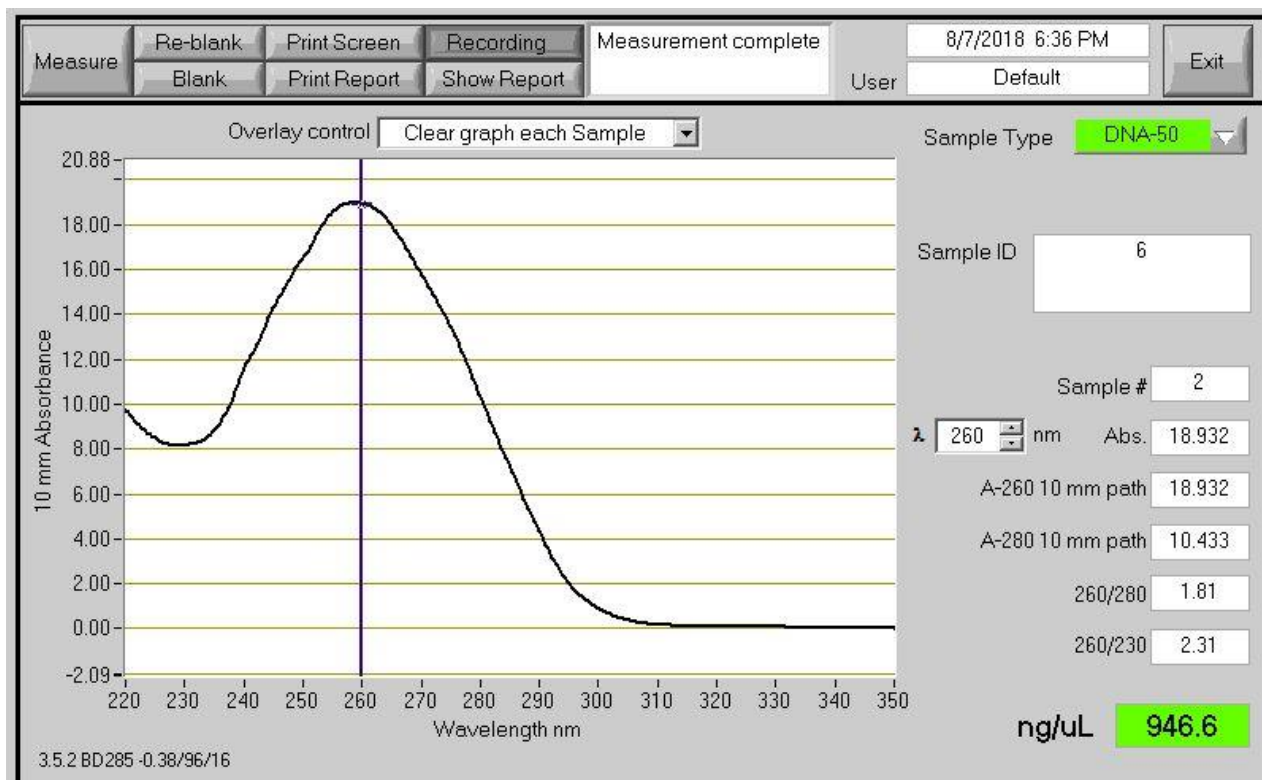


Immagine 20. Curva di quantificazione tramite Nanodrop della purezza e concentrazione di un campione di DNA estratto da paraffinato

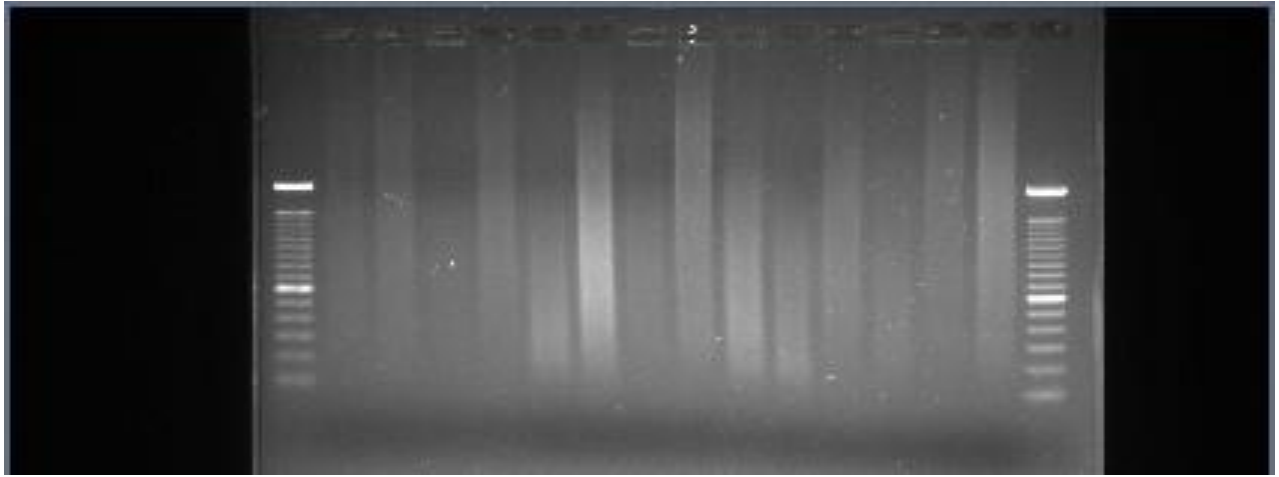


Immagine 21. Elettroforesi su gel di agarosio utilizzata per analizzare la grandezza dei frammenti di acidi nucleici estratti da tessuto FFPE

Nell'immagine 21 si può apprezzare l'elettroforesi su gel di agarosio eseguita per verificare la qualità del materiale genetico estratto.

Come si può notare non è presente una banda unica ma una colorazione diffusa a tutta la corsa del pozzetto, evidenziando quindi la presenza di DNA frammentato, di vario peso e conseguentemente lunghezza.

4.2 Analisi dell'espressione del TfR1 sulle linee cellulari di gatto, cane e donna

4.2.1 Risultati dell'immunofluorescenza

L'immagine 22 mostra il risultato dell'esperimento d'immunofluorescenza eseguito sulle linee cellulari FMCp, MDA-MB231, MCF7, CYPp, CYPm e CF-33.

Si può notare una positività citoplasmatica e di membrana, che non interessa il nucleo.

L'evidenziazione del recettore è palese per tutte le linee cellulari prese in esame e conferma la presenza e l'espressione del TfR1 sia nelle cellule di carcinoma mammario umano che in quello animale, canino e felino per la precisione.

4.2.2 Risultati dell'analisi molecolare

E' stata dimostrata la presenza del recettore e la sua espressione anche con l'uso di tecniche di biologia molecolare come la *real-time* PCR evidenziando il recettore stesso e la sua diversa espressione tra le varie linee cellulari prese in esame.

La presenza del recettore è stata rilevata durante due fasi di sperimentazione diverse tramite la tecnica della *real-time* PCR ed utilizzando i *primers* denominati TFRC1 e TFRH1 per cane e donna nella prima fase ed il TFRC4 per il gatto nella seconda, utilizzando i protocolli diversi già riportati.

L'espressione del recettore risulta doppia nelle cellule derivate da linee metastatiche rispetto a quelle primarie di cane come si può evincere dall'istogramma dell'immagine 23 utilizzando il metodo del doppio delta ct per il calcolo.

Dal grafico appena citato si può notare anche un'espressione maggiore del recettore nella linea cellulare MDA-MB231 rispetto alla linea MCF-7 per quanto riguarda la donna.

La valutazione dell'espressione del recettore non risulta fattibile nel confronto tra FMCp ed FMCm a causa dei troppo elevati cicli di amplificazione presentati dai geni *housekeeping* utilizzati, GAPDH e β actina, negli esperimenti dove sono state utilizzate le suddette linee cellulari feline.

Inizialmente i *primers* utilizzati per le linee cellulari di carcinoma mammario felino sono stati il TFRC-F1 e F2, con i quali però si è riscontrata una mancanza di amplificazione del gene nella linea cellulare FMCp.

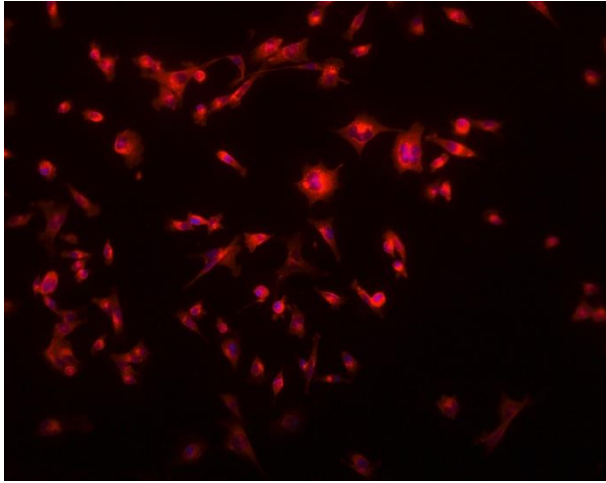
Si è dunque provato a cambiare la temperatura di *annealing* portandola a 58°C, in modo da avvicinarla alla temperatura di *melting* prevista per i *primers* ed utilizzando perciò la stessa tipologia di protocollo in seguito utilizzato per i *primers* TFRC-F4, ma senza sortire risultati.

Infine è stata disegnata la coppia di *primers* TFRC4 che si è rivelata l'unica in grado di amplificare la linea cellulare FMCp e richiede una temperatura di *annealing* più bassa degli altri *primers*.

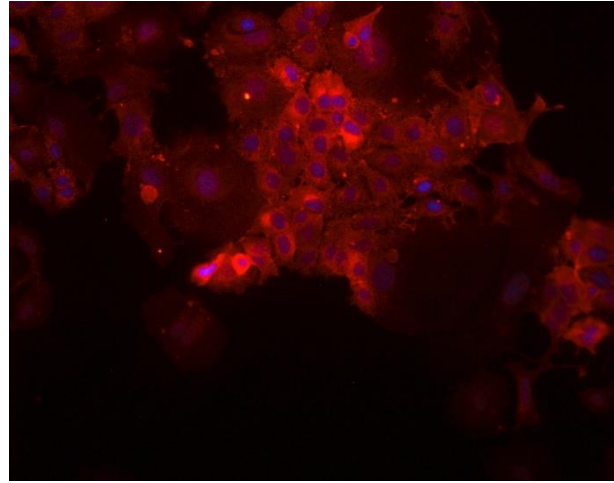
Il prodotto di PCR così ottenuto è stato valutato tramite elettroforesi su gel di agarosio e successivo sequenziamento, confermando il fatto che si trattasse del gene codificante per il TfR1.

Si è proceduto poi a disegnare una nuova coppia di *primers*, denominata TFRC-F3 e disegnata in un tratto compreso tra quello su cui sono stati disegnati i *primers* TFRC-F1 e F2 (esoni 3-4 e 4-5) e quello in cui è stata disegnata la coppia di *primers* TFRC-F4 (esoni 12 e 13).

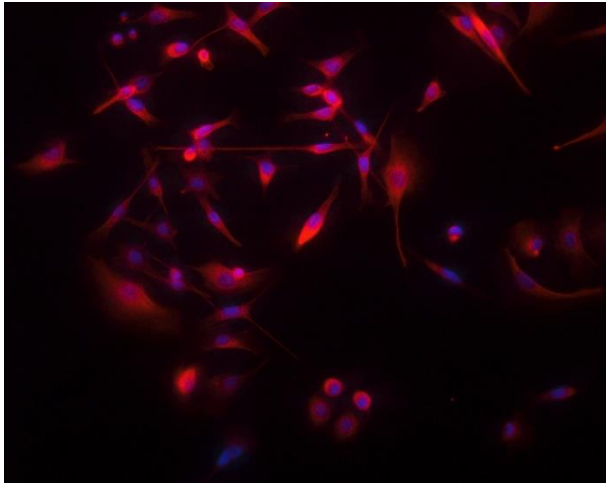
I *primers* TFRC-F3 non hanno prodotto alcun amplificato.



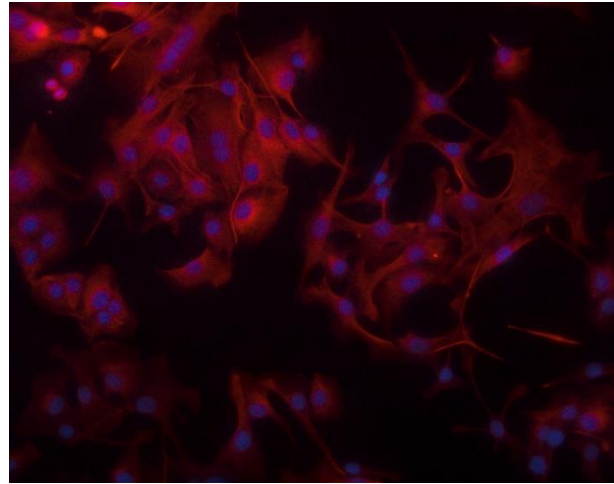
MDA-MB231 TFR + DAPI 20X



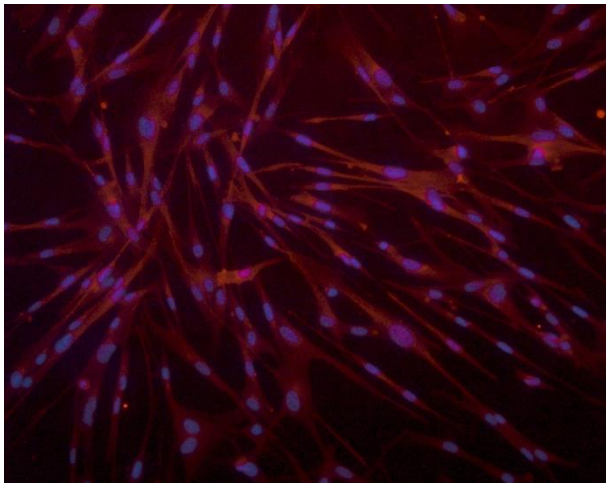
MCF-7 TFR + DAPI 20X



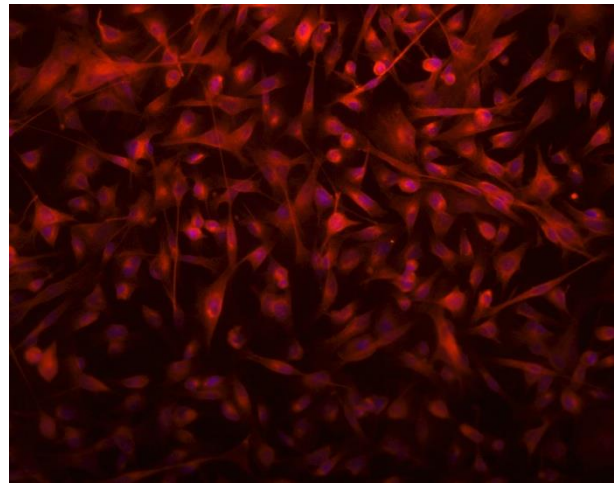
CYPp TFR + DAPI 20X



FMCp TFR + DAPI 20X



CF-33 TFR + DAPI 20X



CYPm TFR + DAPI 20X

Immagine 22, immunofluorescenza eseguita sulle linee cellulari FMCp,MDA-MB231, MCF7,CYPp,CYPm e CF-33, colorazione citoplasmatica e di membrana data da anticorpi marcati anti-Tfr1 (rosso) e colorazione nucleare data dal DAPI (blu)

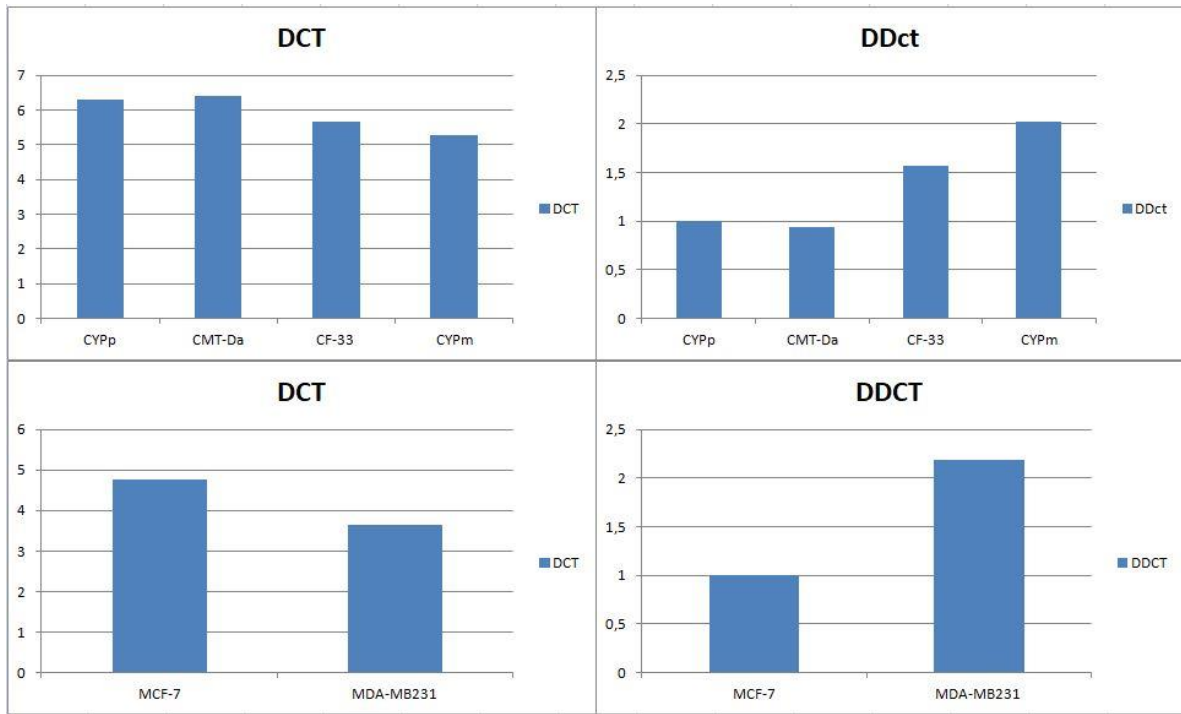


Immagine 23. Istogramma rappresentante I valori di espressione normalizzati sul gene *housekeeping* β actina e confrontanti l'espressione del TfR1 tra cellule di carcinoma mammario primario e cellule metastatiche sempre di carcinoma mammario di donna e cane, viene riportato il delta CT, indice dell'espressione del genen rispetto agli *housekeeping* ed il delta delta ct, indice dell' espressione tra le diverse linee cellulari

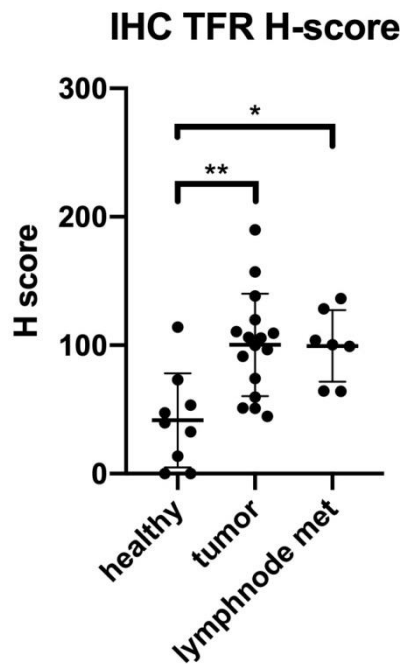


Immagine 24. Grafico indicativo dell'analisi ANOVA eseguita per l'interpretazione della conta e valutazione cellulare manuale su vetrini marcati tramite tecnica immunohistochemica per rivelare la presenza del TfR1; *P<0,05; **P<0,01

4.3 Indagine di espressione del TfR1 da campioni sottoposti ad immunohistochimica

4.3.1 Risultati della colorazione immunohistochimica

L'espressione del TfR1 sui campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina è stata eseguita mediante colorazione immunohistochimica con le modalità già descritte.

Dopo il conteggio manuale delle cellule e la loro divisione per intensità è stata calcolata la percentuale di cellule presenti in ogni categoria ed è stata applicato l'*H score* per assegnare un valore ad ogni campione e permetterne il confronto con gli altri.

L' *H score* consta di un metodo di valutazione istochimico basato sulla somma tra la percentuale di cellule debolmente positive, la percentuale di cellule mediamente positive moltiplicata per due e la percentuale di cellule altamente positive moltiplicata per 3, dando così valori per ogni campione compresi tra 0 e 300.

Come si può vedere dall'immagine 24 il grafico confronta gli *H score* ottenuti da ogni campione e si nota una maggior espressione del recettore in carcinomi e nelle metastasi linfonodali rispetto al tessuto sano.

Il *p value* presente nel confronto tra tessuto tumorale e tessuto sano è pari a 0,0018 mentre quello tra il linfonodo colpito da metastasi ed il tessuto sano è di 0,0108.

Non vi sono differenze significative invece tra l'espressione del TfR1 nei carcinomi rispetto a quella delle metastasi linfonodali.

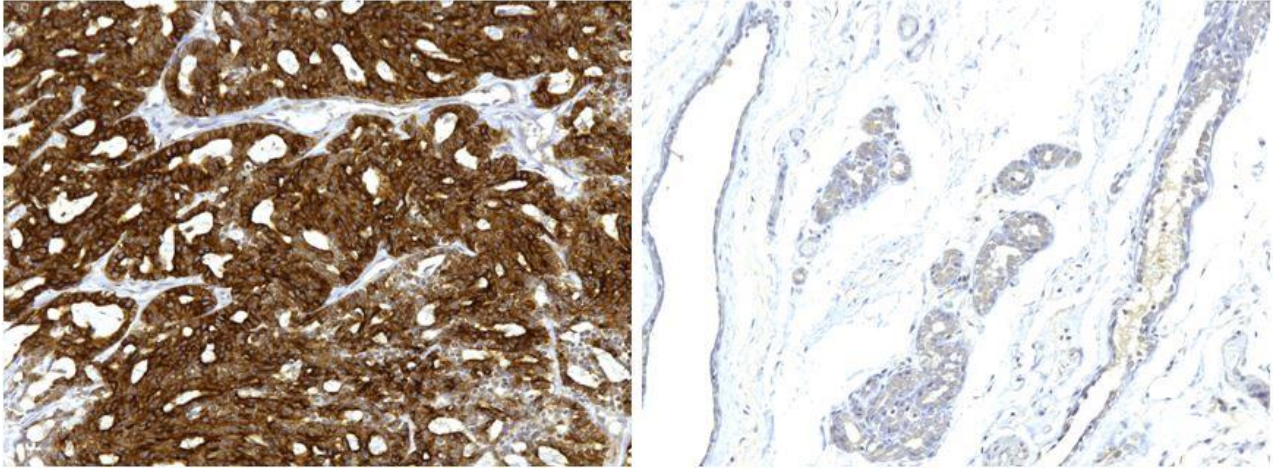


Immagine 25, a sinistra si può vedere una foto eseguita a 20x tramite D-Sight di uno dei campioni di carcinoma mammario felino dopo colorazione immunohistochimica per rilevare la presenza del TFR1, a destra una foto analoga ma contenente mammella sana

Oltre al conteggio manuale è stata eseguita una valutazione degli stessi campioni tramite il *software Image J*.

Sono stati raccolti i dati relativi alle percentuali di pixel positivi e negativi per ogni immagine ed i pixel positivi sono stati divisi in debolmente positivi, mediamente positivi ed altamente positivi dando poi un valore medio per il campione in toto.

I risultati così ottenuti sono stati però esclusi dallo studio in quanto, data la conformazione disomogenea dei tumori mammari con presenza di lume duttale e stroma, sono stati conteggiati dal programma come negativi anche i pixel appartenenti in realtà agli spazi vuoti o non rappresentativi appena elencati.

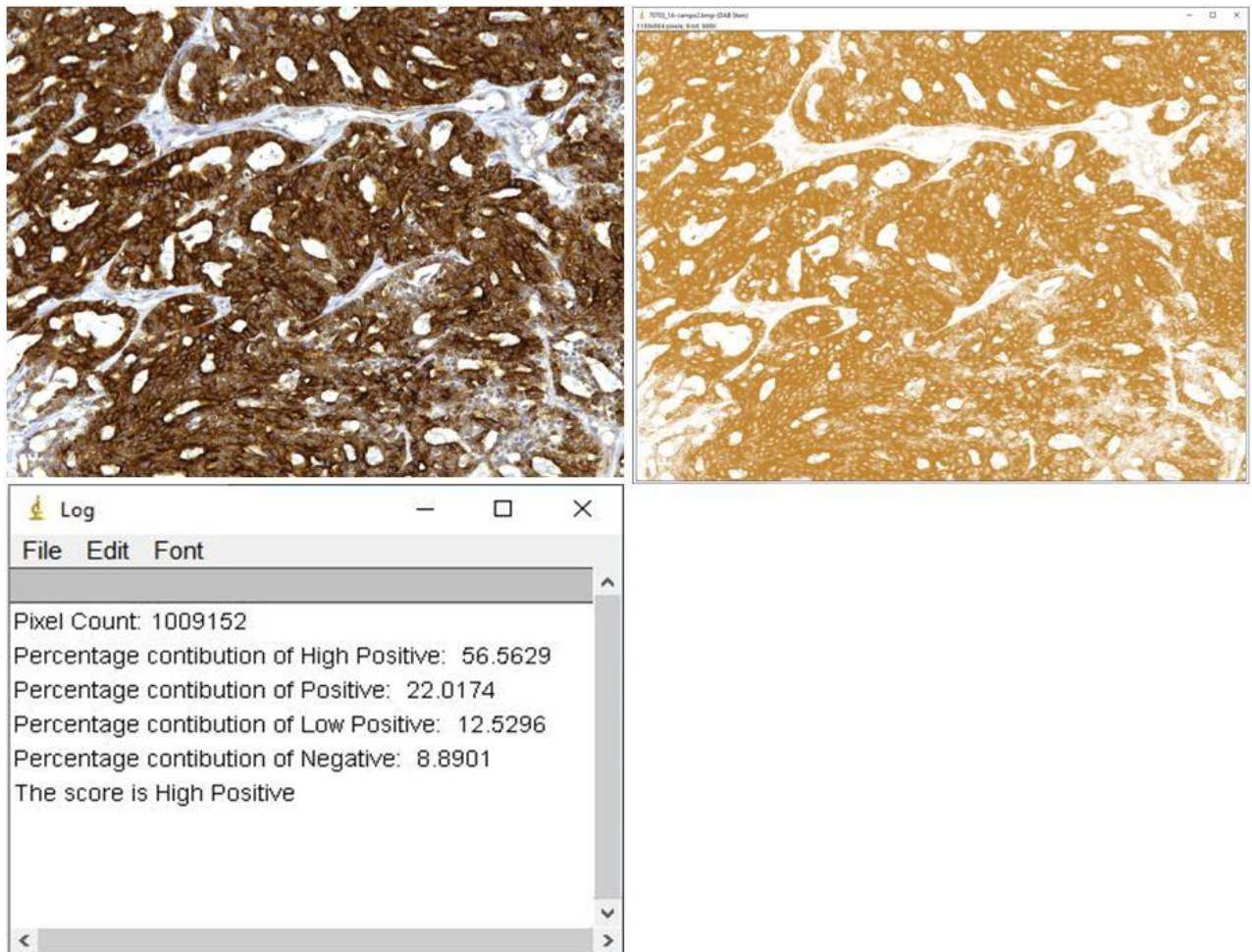


Immagine 26, fotografia di uno dei campioni a 20x sottoposta ad analisi con Image J, si può notare a destra la visuale dopo separazione dei colori ed isolamento della lunghezza d'onda corrispondente alla colorazione del DAB ed in basso la conta automatica effettuata dal programma

5. DISCUSSIONE

Le tecniche di biologia molecolare innovative sviluppate dal 2005 in poi e definite di *Next Generation Sequencing* hanno rappresentato un passo in avanti fondamentale per lo studio dell'intero genoma in un solo esperimento (Morozova & Marra, 2008), consentendo la classificazione di numerose alterazioni del codice genetico spesso causa di patologie o predisponenti alle stesse (Reis-Filho, 2009).

Pochi sono gli studi in campo medico veterinario che applicano queste tecniche, in particolare per quanto riguarda l'utilizzo di campioni archiviati inclusi in paraffina (FFPE).

In medicina umana le tecniche di NGS sono già da anni studiate ed impiegate nella clinica e nella ricerca, in particolare in campo oncologico, ed alcuni studi hanno cominciato di recente a verificare la possibilità di utilizzo di materiale estratto da campioni paraffinati con risultati soddisfacenti (Van Allen et al., 2014).

Il primo scopo di questo lavoro è stato pertanto valutare l'efficienza dell'estrazione da campioni FFPE di DNA utilizzabile poi per eseguire il sequenziamento di tutto l'esoma nel tessuto sano e nel carcinoma mammario del gatto domestico.

Un unico lavoro attualmente riportato in letteratura in cui è stata applicata una tecnica di NGS alla specie felina ha applicato la tecnica di *Whole Genome Sequencing* da campioni ematici per identificare le mutazioni genetiche scatenanti l'amaurosi congenita di Leber, malattia genetica che causa cecità e di cui il gatto Persiano è un modello animale (Lyons et al., 2016).

Per quanto riguarda l'utilizzo di campioni FFPE in Medicina Veterinaria vi sono ad oggi solo alcuni studi nel cane.

In tali studi tuttavia vengono applicate tecniche di biologia molecolare classiche (*e.g.* PCR e RT-PCR) e non di NGS (Granato et al., 2014; Kaneko et al., 2009; Lüder Ripoli et al., 2016).

Similmente, gli unici lavori ad ora presenti riguardanti l'utilizzo di materiale estratto da FFPE nel gatto sono stati eseguiti per identificare un nuovo adenovirus felino

tramite PCR e sequenziamento classico (Lakatos et al., 2017) e per identificare funghi patogeni presenti nei tessuti felini (Meason-Smith et al., 2017).

I risultati ottenuti durante questo lavoro di tesi riguardanti l'estrazione di acidi nucleici da tessuto felino fissato in formalina ed incluso in paraffina dimostrano come la quantità di DNA ed RNA estratta sia nella maggioranza dei casi sufficiente per permettere delle successive analisi, in particolar modo di WES per quanto riguarda il DNA.

Si è potuto notare come il DNA estratto superi a volte anche abbondantemente i 10ng riportati in letteratura come limite minimo attualmente utilizzato nell'uomo per eseguire poi la costruzione di *library*, l'uso di un eventuale *array CGH analysis* ed il sequenziamento del materiale genetico (Zhang et al., 2017).

È stato deciso di concentrarsi sul DNA poiché risulta essere più stabile e meno degradato a causa del processo di fissazione in formalina ed inclusione in paraffina (Zhang et al., 2017).

Solo due campioni sul totale degli estratti hanno raggiunto una quantità di acido nucleico inferiore ai 10 ng/μl da noi considerata come limite minimo accettabile.

Essi all'istologia risultavano essere quelli con maggiore presenza di aree necrotiche nel campione.

Tutti i campioni sono stati conservati a temperatura ambiente ed il più vecchio risale al 2016.

Si ritiene pertanto che il protocollo utilizzato possa permettere ampi studi a livello genomico da campioni FFPE presenti in numerosa quantità negli archivi di diversi laboratori.

Per quanto riguarda la purezza del materiale genetico ottenuto, si può notare dalle curve del Nanodrop e dal rapporto tra assorbanza a 280 ed a 260 nm ed in quello tra 260 e 230 nm, che il materiale genetico è privo d'impurità.

L'assorbanza secondo la legge di Beer-Lambert è direttamente correlata alla concentrazione del materiale genetico (Huss, Festl, & Schleifer, 1983) ed a 260 nm è determinata dalla struttura dei residui aromatici delle basi azotate.

A 280 l'assorbanza è data dalle proteine e dai composti fenolici mentre a 230 è data da contaminanti vari come sali, fenoli o residui organici.

In letteratura si usano i due rapporti, 260/280 e 260/230 per valutare la purezza degli acidi nucleici ed essa è tanto maggiore quanto più è compresa tra 1,8 e 2,1 per il primo rapporto e maggiore di 1,8 per il secondo (Glasel, 1995).

Tutti i campioni ottenuti durante il lavoro di tesi, direttamente dopo l'estrazione o in caso dopo precipitazione in etanolo, rispettano questi intervalli e possono perciò essere considerati puri ed utilizzabili per la costruzione di librerie di WES (R. Chen, Im, & Snyder, 2015).

Dall'elettroforesi su gel di agarosio effettuata sui campioni ottenuti è identificata la presenza di uno striscio e non di una banda singola che indica una notevole frammentazione dei frammenti, risultando essi distribuiti perciò in un ampio intervallo di lunghezze e conseguentemente di pesi molecolari.

Questo non influenza la costruzione delle librerie di WES ed il successivo sequenziamento poiché per la prima sono richiesti frammenti piccoli di DNA, compresi tra le 250 e le 450 paia di basi ed il protocollo stesso prevede una fase di frammentazione dell'acido nucleico perché possa risultare conforme a questa richiesta (R. Chen et al., 2015).

Risulta perciò evidente come il DNA estratto sia sufficientemente puro e nella maggior parte dei casi abbastanza concentrato da poter essere utilizzati nelle tecniche di NGS tra cui il WES.

Presso il laboratorio dove è stato svolto questo lavoro di tesi, si sta procedendo con la costruzione delle librerie di WES.

Successivamente i campioni verranno sequenziati e dopo analisi bioinformatica, i risultati daranno informazioni come ad esempio l'eventuale presenza di polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs).

Queste informazioni sono utili per approfondire e studiare a livello genetico eventuali differenze che si riscontrano tra tessuto mammario sano, tessuto mammario tumorale primario e metastasi linfonodale.

Essendo il gatto considerato un buon modello animale spontaneo per il tumore al seno della donna (Brunetti et al., 2013; Caliari et al., 2014; Maria et al., 2005), queste informazioni possono essere utili non solo per approfondire la conoscenza del tumore mammario felino, ma anche a supporto delle informazioni già presenti nell'ambito del tumore al seno della donna.

Il *Transferrin Receptor 1* è visto da anni con molto interesse in medicina umana per il suo potenziale utilizzo come obiettivo terapeutico nella lotta contro il cancro (Daniels et al., 2012) e più in generale per contrastare le alterazioni del metabolismo del ferro che vanno a favorire la proliferazione neoplastica (Kwok & Richardson, 2002), pertanto si è pensato in questo studio di tesi d'indagare la sua espressione anche nei tessuti felini .

Tra le varie neoplasie, il tumore mammario nella donna è una di quelle in cui è dimostrata l'espressione del recettore per la transferrina ed in maniera maggiore rispetto al tessuto sano (Shindelman et al., 1981; Meenakshi Singh et al., 2011b).

Attualmente in letteratura per quanto riguarda la medicina veterinaria gli articoli che prendono in esame il ruolo del TfR1 nelle neoplasie animali sono unicamente due e si concentrano sul linfoma canino (Priest et al., 2011) e sui tumori oro-nasali sempre del cane (Ploypetch et al., 2017).

In letteratura non sono ad oggi presenti articoli che vadano ad indagare la presenza ed il ruolo del TfR1 nel carcinoma mammario negli animali domestici ed in particolare nel gatto.

Il lavoro di tesi svolto ha avuto perciò come secondo obiettivo la dimostrazione dell'espressione del TfR1 nel carcinoma mammario felino sia su tessuti FFPE sia in vitro su linee cellulari.

In quest'ultimo caso anche comparando la specie umana e canina con quella felina.

Come dimostrato dall'esperimento d'immunofluorescenza, le linee cellulari di carcinoma mammario in tutte e tre le specie esaminate hanno dimostrato la presenza, e dunque l'espressione, a livello citoplasmatico e di membrana, del recettore

coerentemente con la collocazione riportata dalla letteratura (Dautry-varsat et al., 1983) e dalla biologia stessa del TfR1.

La positività è stata riscontrata in tutte le linee cellulari prese in esame, quindi in due sottotipologie di HBC (*Human Breast Carcinoma*) ed in linee sia primarie che metastatiche feline e canine.

Si è successivamente indagata la presenza e l'espressione del TfR1 da parte dei campioni di carcinoma mammario felino FFPE.

Per far ciò è stata effettuata una colorazione immunohistochimica per evidenziare la presenza del recettore.

Una volta appurato che tutti i campioni esprimessero, se pur in maniera variabile, il recettore grazie alla colorazione marrone rilevata, si è proceduto a differenziare e quantificare quest'espressione con metodo semiquantitativo detto *H score*.

È stato scelto questo metodo di valutazione in quanto esso risulta uno dei più utilizzati in letteratura in ambito veterinario (Peña et al., 2014) ed anche l'unico che riporti in modo chiaro ed univoco come calcolare le somme di valori che possano descrivere l'espressione sia in termine di quantità sia d'intensità della positività.

Esso infatti consiste nella somma tra la percentuale di cellule debolmente positive, la percentuale di cellule mediamente positive moltiplicata per due e la percentuale di cellule altamente positive moltiplicata per tre, dando così valori per ogni campione compresi tra 0 e 300 ($P1+(2 \times P2)+(3 \times P3)$) (Barnes, Dublin, Fisher, Levison, & Millis, 1993).

Gli altri due indici di valutazione più utilizzati sono il *Quick score* e l'*Allred score*.

Il primo si basa sulla somma dei punteggi rispettivamente assegnati alle percentuali di cellule positive (con valori che vanno da 0 (nessuna positiva) a 5 (dal 66 al 100% positive) ed all'intensità delle stesse classificata da 0 (assente) a 3 (forte) (Detre, Saccani Jotti, & Dowsett, 1995).

Il secondo si basa sulla somma tra un punteggio assegnato in base alla percentuale di cellule positive presenti nel campione (con 0 = nessuna cellula positiva e 4 = dal 76

al 100% di cellule positive) ed uno assegnato per l'intensità della positività (con 0 = assente e 3 = forte) (Allred, Harvey, Berardo, & Clark, 1998).

Né il *Quick score* né l'*Allred score* presentano una metodologia univoca di considerare la percentuale di cellule positive con però differente intensità di colorazione nel conteggio del punteggio da assegnare al campione (Beffagna et al., 2016).

Il limite dei due metodi valutativi appena citati, unito al fatto che l'*Allred score* sia basato su una valutazione funzionale poi alla quantificazione dell'espressione del recettore per gli estrogeni nella donna al fine d'impostare una conseguente terapia (Allred et al., 1998), ha fatto sì che la scelta sullo *scoring system* da adottare in questo studio ricadesse sull'*H score*.

I risultati ottenuti con questo sistema d'assegnazione del punteggio mostrano una differenza statisticamente significativa tra tessuto mammario felino sano e sia tessuto mammario neoplastico sia metastasi linfonodali di carcinoma mammario.

Non vi sono invece differenze statisticamente significative tra l'espressione nel tessuto mammario neoplastico e le metastasi linfonodali.

Il risultato appare coerente con i lavori presenti in letteratura riguardanti il cancro al seno nella medicina umana dove l'espressione del recettore da parte delle cellule neoplastiche a livello mammario appare più alta rispetto alla controparte sana (Shindelman et al., 1981; Meenakshi Singh et al., 2011b).

Si è eseguita un'analisi anche con il programma *Image J* per evitare le possibili influenze dovute alla valutazione in parte soggettiva dell'intensità del colore delle cellule esprimenti il Tfr1 e rivelato dal cromogeno DAB (Meyerholz, Tintle, & Beck, 2018).

Il *plug-in* dell'applicativo utilizzato permette di separare le lunghezze d'onda dei tre colori principali (operazione definita deconvoluzione dei colori) che compongono l'immagine nelle comuni fotocamere RGB (*red, green and blue*) per poter isolare solo quella corrispondente al marrone del DAB ed analizzare conseguentemente solo i pixel che presentino un colore di quel tipo specifico (Ruifrok & Johnston, 2001).

Viene poi isolata dal programma, tramite il *plug-in IHC profiler* la visuale in DAB ed eseguito il conteggio dei pixel negativi e positivi con le varie intensità (Varghese, Bukhari, Malhotra, & De, 2014b).

In letteratura è già stato riportato l'utilizzo di questo specifico *plug-in* in supporto all'analisi dell'espressione del Tfr1 nel linfoma canino (Priest et al., 2011) e nel secondo l'espressione del recettore da parte dei melanomi e carcinomi squamosi canini della zona oro-nasale (Ploypetch et al., 2017).

Le neoplasie già citate però, essendo tipicamente solide ed omogenee, non hanno presentato delle difficoltà come la lettura da parte del programma di pixel categorizzati come negativi ma appartenenti a lume duttale e stroma.

Questi limiti hanno portato ad escludere le analisi eseguite con questa metodica dallo studio.

Oltre all'indagine immunoistochimica è stata eseguita un'indagine molecolare tramite *real time* PCR per valutare le differenze di espressione del Tfr1 tra varie linee cellulari di cane, donna e gatto, sia primarie che metastatiche e le stesse sono state confrontate grazie all'applicazione del metodo del delta delta Ct (Livak & Schmittgen, 2001).

Le linee CYPm e CF-33 hanno dimostrato un'espressione del recettore rispetto alle CYPp ed alle CMT-Da quantificabile intorno all'1,5 volte maggiore.

Nella donna la linea MDA-MB231, che deriva da una neoplasia triplo-negativa, ha dimostrato un'espressione del Tfr1 circa doppia rispetto all'MCF-7, che deriva da una neoplasia positiva al recettore estrogenico.

Appare quindi evidente una tendenza alla maggior espressione del recettore nelle linee cellulari con maggior tendenza alla malignità ed all'invasività tissutale con annessa tendenza a metastatizzare.

Nel caso delle linee canine infatti appare evidente una maggior espressione nelle linee cellulari metastatiche rispetto a linee di tumore primario, mentre nella donna appare palese la maggior espressione nella linea cellulare modello del tumore mammario triplo negativo della donna (la tipologia di neoplasia più aggressiva e con

la prognosi peggiore) rispetto alla linea esprime i recettori per estrogeni e progesterone.

Ciò appare in accordo con la letteratura presente in medicina umana dove è stato riscontrato che la presenza del recettore tende ad aumentare progressivamente all'aumentare della malignità ed invasività del carcinoma mammario (Meenakshi Singh et al., 2011a) e dove all'aumentare dello stesso si ha una contemporanea diminuzione del recettore per gli estrogeni (Tonik et al., 1986).

Una simile valutazione non è stata possibile nelle linee cellulari del gatto, poiché i cicli di amplificazione dei geni *housekeeping* scelti inizialmente (β actina e GAPDH) erano superiori al 35° e perciò da ritenere non attendibili come da convenzione largamente accettata dalla comunità scientifica.

Per gene *housekeeping* o gene costitutivo s'intende un gene che dovrebbe essere espresso senza sostanziali variazioni da ogni tipologia cellulare, poiché implicato in vie metaboliche o funzioni basilari per la vita di ogni tipologia di cellula (Lewin, 1975; Velculescu et al., 1999).

Per evitare ogni possibile errore, sono stati utilizzati due geni costitutivi diversi ed ampiamente documentati per il loro utilizzo in letteratura, cioè il GAPDH (Petersen, Rapaport, Henry, Huseman, & Moore, 1990) e la β actina (J. K. Choi et al., 1991).

Essi però non si sono dimostrati appropriati per eseguire le valutazioni descritte in precedenza durante il loro utilizzo come geni di referenza per le linee cellulari di carcinoma mammario di gatto.

È stato escluso l'errore sperimentale poiché essi si sono rivelati perfettamente funzionali ed attendibili durante le qPCR in cui sono state utilizzate linee cellulari di donna e cane.

Ha preso così sempre più piede l'ipotesi che quelli convenzionalmente definiti come geni costitutivi possano, in particolar modo nel metabolismo tumorale, subire alterazioni anche nette pregiudicandone la funzione di referenza durante gli esperimenti di biologia molecolare.

In letteratura il dibattito è aperto, in quanto in alcuni lavori è stato dimostrato come quelli che convenzionalmente sono definiti come geni *housekeeping* siano in realtà influenzati da innumerevoli condizioni, come l'eventuale ipossia (Zhong & Simons, 1999), il metabolismo tumorale e le relative condizioni di crescita e proliferazione spinte (Kunth, Höfler, & Atkinson, 1994) o semplicemente le modalità e condizioni stesse con cui viene effettuato l'esperimento (Thellin et al., 1999).

Con il progredire delle scoperte in ambito di genetica e regolazione dell'espressione dei geni stessi si è scoperto che quelli che venivano una volta considerati come geni aventi una semplice funzione strutturale o metabolica sono in realtà inseriti in un *pathway* cellulare che implica la loro influenza anche in svariate altre funzioni (Thellin et al., 1999).

Appare sempre più necessario dunque valutare e validare dei geni come costitutivi esaminando solo alcuni particolari tessuti o alcune particolari patologie per essere più precisi possibile nell'individuare tra i possibili candidati quelli che in quelle particolari condizioni metaboliche mostrano un'espressione costante e ripetibile (de Kok et al., 2005).

Supportati dalla letteratura, che attesta come in particolari condizioni o patologie (tra cui spicca in primis proprio il tumore mammario (Tilli, Castro, Tuszyński, & Carels, 2016)) sia il GAPDH (Yamada, Chen, Monstein, & Håkanson, 1997) che la β actina (Marten, Burke, Hayden, & Straus, 1994) non siano considerati come geni costitutivi, si è optato dunque per la ricerca di nuovi geni che la letteratura riporta come più stabili per l'analisi del materiale genetico derivate da cellule di carcinoma mammario, al fine di esaminare se le considerazioni fatte dagli Autori possano essere valide anche in medicina veterinaria.

I geni così individuati sono RPS 18 (Thellin et al., 1999) e PUM1 (Tilli et al., 2016) e sono attualmente in costruzione le sequenze per i *primers* specifici per la specie felina da essi ottenuti.

La mancanza di amplificazione da parte di tutti i *primers* disegnati per il TfR1 felino, ad eccezione del TFRC-F4, entrava in contrasto con le osservazioni raccolte durante l'esperimento d'immunofluorescenza e d'immunoistochimica.

È stata allora avanzata l'ipotesi che possa esistere un'isoforma non ancora annotata del recettore stesso, analogamente a quanto avviene con il recettore per gli estrogeni felino (Cardazzo et al., 2005), espressa solo da questa linea cellulare e nata da *splicing* alternativo.

Per testare quest'ipotesi è stata progettata la coppia di *primers* TFRC-F4, disegnata su una sequenza esonica più a valle rispetto a quella su cui erano stati disegnati i *primers* TFRC-F1 ed F2.

Si è riscontrata in questo caso l'amplificazione di un prodotto di PCR che è stato in seguito valutato tramite elettroforesi su gel di agarosio e tramite successivo sequenziamento, confermando il fatto che si trattasse del gene codificante per il TfR1.

Si è proceduto poi a testare il *primer* TFRC-F3 che secondo le previsioni, poi confermate, non si sarebbe dovuto legare dando amplificato essendo disegnato anch'esso sull'ipotetico esone eliminato durante lo *splicing*.

È tutt'ora in corso l'amplificazione utilizzando il *primer* TFRC-F4 *reverse* ed un *primer forward* disegnato a monte dell'esone ipoteticamente non presente nella forma di *splicing* alternativo espressa dalla linea FMCp per vedere e confermare, con successivo sequenziamento, l'ipotesi formulata.

Non è riportata in letteratura la presenza nell'uomo di isoforme del TfR1.

6. CONCLUSIONI

In conclusione, appare evidente come la procedura d'estrazione di DNA da tessuto FFPE sia possibile ed avvenga in maniera efficace anche da tessuti felini, permettendo dunque l'uso degli stessi per indagini di biologia molecolare classica ed innovativa e dando la possibilità di gettare nuova luce e raccogliere nuove informazioni di carattere epidemiologico e genetico sui casi finora esaminabili solo con tecniche istologiche ed affini.

In aggiunta, visti i dati raccolti, si può affermare che nel gatto l'espressione del recettore TfR1 è maggiore nel tessuto neoplastico e nel tessuto metastatico presente in sede linfonodale rispetto al tessuto mammario sano e che nelle linee cellulari vi è una tendenza all'espressione del recettore in maniera maggiore nelle linee di donna e di cane con maggiore tendenza biologica all'aggressività, oltre che una conferma, per le linee di gatto, di espressione del TfR1.

I passi successivi dovranno gettare luce sulla probabile presenza nel gatto di isoforme del recettore non ancora annotate e sul loro ruolo biologico in vitro ed in vivo e sulla concreta possibilità di utilizzare il recettore come obiettivo per l'entrata nella cellula di farmaci chemioterapici specifici.

Appendice

Protocollo di analisi immunoistochimica con anticorpo anti citocheratine effettuato su immunocoloratore automatico BenchMark XT (Ventana Medical Systems):

Codice a barre 40 : PanCK 1:100 gx (26/04/2016)

Procedura: BMK ultraView DAB Par

Modulo BenchMark IHC/ISH

Callus (26/04/2016)

Tappa	Operazione eseguita
1	***** Selezionare EZ Prep *****
2	***** Inizio tappe cronometrate *****
3	***** Miscelatori disattivati *****
4	Riscaldare i vetrini a 75°C, e incubare per 4 minuti
5	Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)
6	Incubare per 4 minuti
7	Risciacquare il vetrino +
8	Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)
9	Incubare per 4 minuti
10	Risciacquare il vetrino +
11	Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)
12	Dispensare Coverslip
13	Riscaldare i vetrini a 76°C, e incubare per 4 minuti
14	Risciacquare il vetrino +
15	Aggiustare il volume di sparaffinatura
16	Dispensare Coverslip
17	Disattivare il riscaldamento dei vetrini
18	***** Miscelatori attivati *****
19	[Breve - Cell Conditioning 8 minuti]
20	Risciacquare il vetrino +
21	Dispensare Cell Conditioner medio 1
22	Dispensare Coverslip per CC lungo
23	Riscaldare i vetrini a 95°C, e incubare per 8 minuti
24	[Ridotto - Cell Conditioning 30 minuti]
25	Dispensare Cell Conditioner medio 1
26	Dispensare Coverslip
27	Riscaldare i vetrini a 100°C, e incubare per 4 minuti
28	Dispensare Coverslip
29	Dispensare Cell Conditioner 1
30	Incubare per 4 minuti
31	Dispensare Coverslip
32	Dispensare EZ Prep e aggiustare il volume CC
33	Incubare per 4 minuti
34	Dispensare Coverslip
35	Dispensare Cell Conditioner medio 1
36	Incubare per 4 minuti
37	Dispensare Coverslip
38	Dispensare Cell Conditioner 1
39	Incubare per 4 minuti
40	Disattivare il riscaldamento dei vetrini
41	Incubare per 8 minuti
42	Risciacquare il vetrino +
43	Aggiustare il volume sul vetrino
44	Dispensare Coverslip
45	*****Selezionare Reaction Buffer *****

- 46 Riscaldare i vetrini a 37°C, e incubare per 2 minuti
- 47 Risciacquare il vetrino +
- 48 Aggiustare il volume sul vetrino
- 49 Dispensare una aliquota di UV INHIBITOR, aggiungere Coverslip e incubare per 4 minuti
- 50 Risciacquare il vetrino +
- 51 Aggiustare il volume sul vetrino
- 52 Dispensare Coverslip
- 53 ***** Applicare manualmente (Anticorpo primario) e incubare per [28 minuti] *****
- 54 Risciacquare il vetrino +
- 55 Dispensare 200 µl + VA di Buffer di Lavaggio
- 56 Dispensare una aliquota di UV HRP UNIV MULT, aggiungere Coverslip e incubare per 8 minuti
- 57 Risciacquare il vetrino +
- 58 Aggiustare il volume sul vetrino
- 59 Dispensare Coverslip
- 60 Risciacquare il vetrino +
- 61 Aggiustare il volume sul vetrino
- 62 Dispensare Coverslip
- 63 Risciacquare il vetrino +
- 64 Aggiustare il volume sul vetrino
- 65 Dispensare una aliquota di UV DAB e una aliquota di UV DAB H2O2, aggiungere Coverslip e incubare per 8 minuti
- 66 Risciacquare il vetrino +
- 67 Aggiustare il volume sul vetrino
- 68 Dispensare una aliquota di UV COPPER, aggiungere Coverslip e incubare per 4 minuti
- 69 Risciacquare il vetrino +
- 70 Aggiustare il volume sul vetrino
- 71 Dispensare Coverslip
- 72 ***** Inizio tappe cronometrate *****
- 73 Risciacquare il vetrino +
- 74 Aggiustare il volume sul vetrino
- 75 Dispensare una aliquota di [HEMATOXYLIN] (Controcolorazione), aggiungere Coverslip e incubare per [8 minuti]
- 76 Risciacquare il vetrino +

Protocollo di analisi immunoistochimica con anticorpo anti P63 effettuato su immunocoloratore automatico BenchMark XT (Ventana Medical Systems):

Codice a barre 201 : P63 1:200 gx (26/04/2016)

Procedura: BMK ultraView DAB Par

Modulo BenchMark IHC/ISH

Tappa	Operazione eseguita
1	***** Selezionare EZ Prep *****
2	***** Inizio tappe cronometrate *****
3	***** Miscelatori disattivati *****
4	Riscaldare i vetrini a 75°C, e incubare per 4 minuti
5	Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)
6	Incubare per 4 minuti
7	Risciacquare il vetrino +
8	Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)
9	Incubare per 4 minuti
10	Risciacquare il vetrino +
11	Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)
12	Dispensare Coverslip
13	Riscaldare i vetrini a 76°C, e incubare per 4 minuti
14	Risciacquare il vetrino +
15	Aggiustare il volume di sparaffinatura
16	Dispensare Coverslip
17	Disattivare il riscaldamento dei vetrini
18	***** Miscelatori attivati *****
19	[Breve - Cell Conditioning 8 minuti]
20	Risciacquare il vetrino +
21	Dispensare Cell Conditioner medio 1
22	Dispensare Coverslip per CC lungo
23	Riscaldare i vetrini a 95°C, e incubare per 8 minuti
24	[Ridotto - Cell Conditioning 30 minuti]
25	Dispensare Cell Conditioner medio 1
26	Dispensare Coverslip
27	Riscaldare i vetrini a 100°C, e incubare per 4 minuti
28	Dispensare Coverslip
29	Dispensare Cell Conditioner 1
30	Incubare per 4 minuti
31	Dispensare Coverslip
32	Dispensare EZ Prep e aggiustare il volume CC
33	Incubare per 4 minuti
34	Dispensare Coverslip
35	Dispensare Cell Conditioner medio 1
36	Incubare per 4 minuti
37	Dispensare Coverslip
38	Dispensare Cell Conditioner 1
39	Incubare per 4 minuti
40	Disattivare il riscaldamento dei vetrini
41	Incubare per 8 minuti
42	Risciacquare il vetrino +
43	Aggiustare il volume sul vetrino
44	Dispensare Coverslip
45	*****Selezionare Reaction Buffer *****

- 46 Riscaldare i vetrini a 37°C, e incubare per 2 minuti
- 47 Risciacquare il vetrino +
- 48 Aggiustare il volume sul vetrino
- 49 Dispensare una aliquota di UV INHIBITOR, aggiungere Coverslip e incubare per 4 minuti
- 50 Risciacquare il vetrino +
- 51 Aggiustare il volume sul vetrino
- 52 Dispensare Coverslip
- 53 ***** Applicare manualmente (Anticorpo primario) e incubare per [32 minuti] *****
- 54 Risciacquare il vetrino +
- 55 Dispensare 200 µl + VA di Buffer di Lavaggio
- 56 Dispensare una aliquota di UV HRP UNIV MULT, aggiungere Coverslip e incubare per 8 minuti
- 57 Risciacquare il vetrino +
- 58 Aggiustare il volume sul vetrino
- 59 Dispensare Coverslip
- 60 Risciacquare il vetrino +
- 61 Aggiustare il volume sul vetrino
- 62 Dispensare Coverslip
- 63 Risciacquare il vetrino +
- 64 Aggiustare il volume sul vetrino
- 65 Dispensare una aliquota di UV DAB e una aliquota di UV DAB H2O2, aggiungere Coverslip e incubare per 8 minuti
- 66 Risciacquare il vetrino +
- 67 Aggiustare il volume sul vetrino
- 68 Dispensare una aliquota di UV COPPER, aggiungere Coverslip e incubare per 4 minuti
- 69 Risciacquare il vetrino +
- 70 Aggiustare il volume sul vetrino
- 71 Dispensare Coverslip
- 72 ***** Inizio tappe cronometrate *****
- 73 Risciacquare il vetrino +
- 74 Aggiustare il volume sul vetrino
- 75 Dispensare una aliquota di [HEMATOXYLIN] (Controcolorazione), aggiungere Coverslip e incubare per [8 minuti]
- 76 Risciacquare il vetrino +

Protocollo di analisi immunoistochimica con anticorpo anti Calponina effettuato su immunocoloratore automatico BenchMark XT (Ventana Medical Systems):

Codice a barre 22 : CALP 1:200 gx (26/04/2016)

Procedura: BMK ultraView DAB Par

Modulo BenchMark IHC/ISH

* Cattura rettangolare

Tappa	Operazione eseguita
1	***** Selezionare EZ Prep *****
2	***** Inizio tappe cronometrate *****
3	***** Miscelatori disattivati *****
4	Riscaldare i vetrini a 75°C, e incubare per 4 minuti
5	Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)
6	Incubare per 4 minuti
7	Risciacquare il vetrino +
8	Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)
9	Incubare per 4 minuti
10	Risciacquare il vetrino +
11	Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)
12	Dispensare Coverslip
13	Riscaldare i vetrini a 76°C, e incubare per 4 minuti
14	Risciacquare il vetrino +
15	Aggiustare il volume di sparaffinatura
16	Dispensare Coverslip
17	Disattivare il riscaldamento dei vetrini
18	***** Miscelatori attivati *****
19	[Breve - Cell Conditioning 8 minuti]
20	Risciacquare il vetrino +
21	Dispensare Cell Conditioner medio 1
22	Dispensare Coverslip per CC lungo
23	Riscaldare i vetrini a 95°C, e incubare per 8 minuti
24	[Ridotto - Cell Conditioning 30 minuti]
25	Dispensare Cell Conditioner medio 1
26	Dispensare Coverslip
27	Riscaldare i vetrini a 100°C, e incubare per 4 minuti
28	Dispensare Coverslip
29	Dispensare Cell Conditioner 1
30	Incubare per 4 minuti
31	Dispensare Coverslip
32	Dispensare EZ Prep e aggiustare il volume CC
33	Incubare per 4 minuti
34	Dispensare Coverslip
35	Dispensare Cell Conditioner medio 1
36	Incubare per 4 minuti
37	Dispensare Coverslip
38	Dispensare Cell Conditioner 1
39	Incubare per 4 minuti
40	Disattivare il riscaldamento dei vetrini
41	Incubare per 8 minuti
42	Risciacquare il vetrino +
43	Aggiustare il volume sul vetrino
44	Dispensare Coverslip
45	*****Selezionare Reaction Buffer *****

-
- 46 Riscaldare i vetrini a 37°C, e incubare per 2 minuti
 - 47 Risciacquare il vetrino +
 - 48 Aggiustare il volume sul vetrino
 - 49 Dispensare una aliquota di UV INHIBITOR, aggiungere Coverslip e incubare per 4 minuti
 - 50 Risciacquare il vetrino +
 - 51 Aggiustare il volume sul vetrino
 - 52 Dispensare Coverslip
 - 53 ***** Applicare manualmente (Anticorpo primario) e incubare per [12 minuti] *****
 - 54 Risciacquare il vetrino +
 - 55 Dispensare 200 µl + VA di Buffer di Lavaggio
 - 56 Dispensare una aliquota di UV HRP UNIV MULT, aggiungere Coverslip e incubare per 8 minuti
 - 57 Risciacquare il vetrino +
 - 58 Aggiustare il volume sul vetrino
 - 59 Dispensare Coverslip
 - 60 Risciacquare il vetrino +
 - 61 Aggiustare il volume sul vetrino
 - 62 Dispensare Coverslip
 - 63 Risciacquare il vetrino +
 - 64 Aggiustare il volume sul vetrino
 - 65 Dispensare una aliquota di UV DAB e una aliquota di UV DAB H2O2, aggiungere Coverslip e incubare per 8 minuti
 - 66 Risciacquare il vetrino +
 - 67 Aggiustare il volume sul vetrino
 - 68 Dispensare una aliquota di UV COPPER, aggiungere Coverslip e incubare per 4 minuti
 - 69 Risciacquare il vetrino +
 - 70 Aggiustare il volume sul vetrino
 - 71 Dispensare Coverslip
 - 72 ***** Inizio tappe cronometrate *****
 - 73 Risciacquare il vetrino +
 - 74 Aggiustare il volume sul vetrino
 - 75 Dispensare una aliquota di [HEMATOXYLIN] (Controcromazione), aggiungere Coverslip e incubare per [8 minuti]
 - 76 Risciacquare il vetrino +

Protocollo di analisi immunoistochimica con anticorpo anti Vimentina effettuato su immunocoloratore automatico BenchMark XT (Ventana Medical Systems):

Codice a barre 32 : VIM 1:150 gx (26/04/2016)

Procedura: BMK ultraView DAB Par

Modulo BenchMark IHC/ISH

Tappa	Operazione eseguita
1	***** Selezionare EZ Prep *****
2	***** Inizio tappe cronometrate *****
3	***** Miscelatori disattivati *****
4	Riscaldare i vetrini a 75°C, e incubare per 4 minuti
5	Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)
6	Incubare per 4 minuti
7	Risciacquare il vetrino +
8	Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)
9	Incubare per 4 minuti
10	Risciacquare il vetrino +
11	Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)
12	Dispensare Coverslip
13	Riscaldare i vetrini a 78°C, e incubare per 4 minuti
14	Risciacquare il vetrino +
15	Aggiustare il volume di sparaffinatura
16	Dispensare Coverslip
17	Disattivare il riscaldamento dei vetrini
18	***** Miscelatori attivati *****
19	[Breve - Cell Conditioning 8 minuti]
20	Risciacquare il vetrino +
21	Dispensare Cell Conditioner medio 1
22	Dispensare Coverslip per CC lungo
23	Riscaldare i vetrini a 95°C, e incubare per 8 minuti
24	[Ridotto - Cell Conditioning 30 minuti]
25	Dispensare Cell Conditioner medio 1
26	Dispensare Coverslip
27	Riscaldare i vetrini a 100°C, e incubare per 4 minuti
28	Dispensare Coverslip
29	Dispensare Cell Conditioner 1
30	Incubare per 4 minuti
31	Dispensare Coverslip
32	Dispensare EZ Prep e aggiustare il volume CC
33	Incubare per 4 minuti
34	Dispensare Coverslip
35	Dispensare Cell Conditioner medio 1
36	Incubare per 4 minuti
37	Dispensare Coverslip
38	Dispensare Cell Conditioner 1
39	Incubare per 4 minuti
40	Disattivare il riscaldamento dei vetrini
41	Incubare per 8 minuti
42	Risciacquare il vetrino +
43	Aggiustare il volume sul vetrino
44	Dispensare Coverslip
45	*****Selezionare Reaction Buffer *****

- 46 Riscaldare i vetrini a 37°C, e incubare per 2 minuti
- 47 Risciacquare il vetrino +
- 48 Aggiustare il volume sul vetrino
- 49 Dispensare una aliquota di UV INHIBITOR, aggiungere Coverslip e incubare per 4 minuti
- 50 Risciacquare il vetrino +
- 51 Aggiustare il volume sul vetrino
- 52 Dispensare Coverslip
- 53 ***** Applicare manualmente (Anticorpo primario) e incubare per [28 minuti] *****
- 54 Risciacquare il vetrino +
- 55 Dispensare 200 µl + VA di Buffer di Lavaggio
- 56 Dispensare una aliquota di UV HRP UNIV MULT, aggiungere Coverslip e incubare per 8 minuti
- 57 Risciacquare il vetrino +
- 58 Aggiustare il volume sul vetrino
- 59 Dispensare Coverslip
- 60 Risciacquare il vetrino +
- 61 Aggiustare il volume sul vetrino
- 62 Dispensare Coverslip
- 63 Risciacquare il vetrino +
- 64 Aggiustare il volume sul vetrino
- 65 Dispensare una aliquota di UV DAB e una aliquota di UV DAB H2O2, aggiungere Coverslip e incubare per 8 minuti
- 66 Risciacquare il vetrino +
- 67 Aggiustare il volume sul vetrino
- 68 Dispensare una aliquota di UV COPPER, aggiungere Coverslip e incubare per 4 minuti
- 69 Risciacquare il vetrino +
- 70 Aggiustare il volume sul vetrino
- 71 Dispensare Coverslip
- 72 ***** Inizio tappe cronometrate *****
- 73 Risciacquare il vetrino +
- 74 Aggiustare il volume sul vetrino
- 75 Dispensare una aliquota di [HEMATOXYLIN] (Controcolorazione), aggiungere Coverslip e incubare per [8 minuti]
- 76 Risciacquare il vetrino +

Protocollo di analisi immunoistochimica con anticorpo anti TfR1 effettuato su immunocoloratore automatico BenchMark XT (Ventana Medical Systems):

Codice a barre 77 : TFR-1 block (30/11/2018)

Procedura: BMK ultraView DAB Par

Modulo BenchMark IHC/ISH

Tappa	Operazione eseguita
1	***** Selezionare EZ Prep *****
2	***** Inizio tappe cronometrate *****
3	***** Miscelatori disattivati *****
4	Riscaldare i vetrini a 75°C, e incubare per 4 minuti
5	Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)
6	Incubare per 4 minuti
7	Risciacquare il vetrino +
8	Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)
9	Incubare per 4 minuti
10	Risciacquare il vetrino +
11	Aggiustare il volume di EZ Prep (Discovery)
12	Dispensare Coverslip
13	Riscaldare i vetrini a 78°C, e incubare per 4 minuti
14	Risciacquare il vetrino +
15	Aggiustare il volume di sparaffinatura
16	Dispensare Coverslip
17	Disattivare il riscaldamento dei vetrini
18	***** Miscelatori attivati *****
19	[Breve - Cell Conditioning 8 minuti]
20	Risciacquare il vetrino +
21	Dispensare Cell Conditioner medio 1
22	Dispensare Coverslip per CC lungo
23	Riscaldare i vetrini a 95°C, e incubare per 8 minuti
24	[Ridotto - Cell Conditioning 30 minuti]
25	Dispensare Cell Conditioner medio 1
26	Dispensare Coverslip
27	Riscaldare i vetrini a 100°C, e incubare per 4 minuti
28	Dispensare Coverslip
29	Dispensare Cell Conditioner 1
30	Incubare per 4 minuti
31	Dispensare Coverslip
32	Dispensare EZ Prep e aggiustare il volume CC
33	Incubare per 4 minuti
34	Dispensare Coverslip
35	Dispensare Cell Conditioner medio 1
36	Incubare per 4 minuti
37	Dispensare Coverslip
38	Dispensare Cell Conditioner 1
39	Incubare per 4 minuti
40	Disattivare il riscaldamento dei vetrini
41	Incubare per 8 minuti
42	Risciacquare il vetrino +
43	Aggiustare il volume sul vetrino
44	Dispensare Coverslip
45	*****Selezionare Reaction Buffer *****

Tappa	Operazione eseguita
-------	---------------------

- | | |
|----|---|
| 46 | Riscaldare i vetrini a 37°C, e incubare per 2 minuti |
| 47 | Risciacquare il vetrino + |
| 48 | Aggiustare il volume sul vetrino |
| 49 | Dispensare una aliquota di UV INHIBITOR, aggiungere Coverslip e incubare per 4 minuti |
| 50 | Risciacquare il vetrino + |
| 51 | Aggiustare il volume sul vetrino |
| 52 | Dispensare Coverslip |
| 53 | ***** Applicare manualmente (Anticorpo primario) e incubare per [32 minuti] ***** |
| 54 | Risciacquare il vetrino + |
| 55 | Dispensare 200 µl + VA di Buffer di Lavaggio |
| 56 | Dispensare una aliquota di UV HRP UNIV MULT, aggiungere Coverslip e incubare per 8 minuti |
| 57 | Risciacquare il vetrino + |
| 58 | Aggiustare il volume sul vetrino |
| 59 | Dispensare Coverslip |
| 60 | Risciacquare il vetrino + |
| 61 | Aggiustare il volume sul vetrino |
| 62 | Dispensare Coverslip |
| 63 | Risciacquare il vetrino + |
| 64 | Aggiustare il volume sul vetrino |
| 65 | Dispensare una aliquota di UV DAB e una aliquota di UV DAB H2O2, aggiungere Coverslip e incubare per 8 minuti |
| 66 | Risciacquare il vetrino + |
| 67 | Aggiustare il volume sul vetrino |
| 68 | Dispensare una aliquota di UV COPPER, aggiungere Coverslip e incubare per 4 minuti |
| 69 | Risciacquare il vetrino + |
| 70 | Aggiustare il volume sul vetrino |
| 71 | Dispensare Coverslip |
| 72 | ***** Inizio tappe cronometrate ***** |
| 73 | Risciacquare il vetrino + |
| 74 | Aggiustare il volume sul vetrino |
| 75 | Dispensare una aliquota di [HEMATOXYLIN] (Controcolorazione), aggiungere Coverslip e incubare per [8 minuti] |
| 76 | Risciacquare il vetrino + |

Bibliografia

- Abboud, S., & Haile, D. J. (2000). A novel mammalian iron-regulated protein involved in intracellular iron metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 275(26), 19906–19912.
- ACMG. (2015). American College of Medical Genetics and Genomics. *Choosing Wisely*, 1–3.
- Adega, F., Borges, A., & Chaves, R. (2016). Cat Mammary Tumors: Genetic Models for the Human Counterpart. *Veterinary Sciences*, 3(3), 17.
- Aisen, P. (1978). Stoichiometric Iron to Human and Site Characteristics Transferrin. *Journal of Biological Chemistry*, 253(6), 1930–1937.
- Aisen, P. (2004). Transferrin receptor 1. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(11), 2137–2143.
- Allen, T. M. (1998). Liposomal Drug Formulations. *Drugs*, 56(5), 747–756.
- Allred, D. C., Harvey, J. M., Berardo, M., & Clark, G. M. (1998). Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 11(2), 155–168.
- Alvarez, E., Gironi, N., & Davis, R. J. (1990). Inhibition of the Receptor-mediated Endocytosis of Diferric Transferrin Is Associated with the Covalent Modification of the Transferrin Receptor with Palmitic Acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(27), 16644–16655.

- Andrews, N. C. (2008). Forging a field: The golden age of iron biology. *Blood*, *112*(2), 219–230.
- Babitt, J. L., Huang, F. W., Wrighting, D. M., Xia, Y., Sidis, Y., Samad, T. A., & Lin, H. Y. (2006). Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nature Genetics*, *38*(5), 531–539.
- Baggiolini, M., C, D., PL, M., & Heremans, J. (1970). Association of lactoferrin with specific granules in rabbit heterophil leukocytes. *Journal of Experimental Medicine*, *131*, 559–570.
- Bainbridge, M. N., Warren, R. L., Hirst, M., Romanuik, T., Zeng, T., Go, A., ... Jones, S. J. (2006). Analysis of the prostate cancer cell line LNCaP transcriptome using a sequencing-by-synthesis approach. *BMC Genomics*, *7*(1), 246.
- Barnes, D. M., Dublin, E. A., Fisher, C. J., Levison, D. A., & Millis, R. R. (1993). Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma: An important new independent indicator of prognosis? *Human Pathology*, *24*(5), 469–476.
- Batra, J. K., Fitzgerald, D. J., Chaudhary, V. K., & Pastan, I. (1991). Single-Chain Immunotoxins Directed at the Human Transferrin Receptor Containing Pseudomonas Exotoxin A or Diphtheria Toxin: Anti-TFR(Fv)-PE40 and DT388-Anti-TFR(Fv). *Molecular cellular biology*, *11*(4), 2200-2205.
- Bayeva, M., Khechaduri, A., Puig, S., Chang, H.-C., Patial, S., Blackshear, P. J., & Ardehali, H. (2012). mTOR regulates cellular iron homeostasis through tristetraprolin. *Cell Metabolism*, *16*(5), 645–657.

- Beffagna, G., Sacchetto, R., Cavicchioli, L., Sammarco, A., Mainenti, M., Ferro, S., Trez, D., Zulpo, M., Michieletto, S., Cecchinato, A., Goldschmidt, M., Zappulli, V. (2016). A preliminary investigation of the role of the transcription co-activators YAP/TAZ of the Hippo signalling pathway in canine and feline mammary tumours. *Veterinary Journal*, *207*, 105–111.
- Beha, G., Muscatello, L. V., Brunetti, B., Asproni, P., Millanta, F., Poli, A., ... Sarli, G. (2014). Molecular Phenotype of Primary Mammary Tumours and Distant Metastases in Female Dogs and Cats. *Journal of Comparative Pathology*, *150*(2–3), 194–197.
- Béjaoui, N., Pagé, M., & Noël, C. (1991). Cytotoxicity of transferrin-daunorubicin conjugates on small cell carcinoma of the lung (SCCL) cell line NCI-H69. *Anticancer Research*, *11*(6), 2211–2213.
- Belous, A. R., Hachey, D. L., Dawling, S., Roodi, N., & Parl, F. F. (2007). Cytochrome P450 1B1-mediated estrogen metabolism results in estrogen-deoxyribonucleoside adduct formation. *Cancer Research*, *67*(2), 812–817.
- Bennett, M. J., Lebrón, J. A., & Bjorkman, P. J. (2000). Crystal structure of the hereditary haemochromatosis protein HFE complexed with transferrin receptor. *Nature*, *403*(6765), 46–53.
- Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., Smith, G.P., Milton, J., Brown, C.G., Hall, K.P., Evers, D.J., Barnes, C.L., Bignell, H.R., Boutell, J.M., Bryant, J., Carter, R.J., Keira Cheetham, R., Cox, A.J., Ellis, D.J., Flatbush, M.R., Gormley, N.A., Humphray, S.J., Irving, L.J., Karbelashvili, M.S., Kirk, S.M., Li, H., Liu, X., Maisinger, K.S., Murray, L.J., Obradovic, B., Ost, T., Parkinson, M.L., Pratt, M.R., Rasolonjatovo, I.M., Reed, M.T., Rigatti, R.,

Rodighiero, C., Ross, M.T., Sabot, A., Sankar, S.V., Scally, A., Schroth, G.P., Smith, M.E., Smith, V.P., Spiridou, A., Torrance, P.E., Tzonev, S.S., Vermaas, E.H., Walter, K., Wu, X., Zhang, L., Alam, M.D., Anastasi, C., Aniebo, I.C., Bailey, D.M., Bancarz, I.R., Banerjee, S., Barbour, S.G., Baybayan, P.A., Benoit, V.A., Benson, K.F., Bevis, C., Black, P.J., Boodhun, A., Brennan, J.S., Bridgham, J.A., Brown, R.C., Brown, A.A., Buermann, D.H., Bundu, A.A., Burrows, J.C., Carter, N.P., Castillo, N., Chiara, E., Catenazzi, M., Chang, S., Neil Cooley, R., Crake, N.R., Dada, O.O., Diakoumakos, K.D., Dominguez-Fernandez, B., Earnshaw, D.J., Egbujor, U.C., Elmore, D.W., Etchin, S.S., Ewan, M.R., Fedurco, M., Fraser, L.J., Fuentes Fajardo, K.V., Scott Furey, W., George, D., Gietzen, K.J., Goddard, C.P., Golda, G.S., Granieri, P.A., Green, D.E., Gustafson, D.L., Hansen, N.F., Harnish, K., Haudenschild, C.D., Heyer, N.I., Hims, M.M., Ho, J.T., Horgan, A.M., Hoschler, K., Hurwitz, S., Ivanov, D.V., Johnson, M.Q., James, T., Huw Jones, T.A., Kang, G.D., Kerelska, T.H., Kersey, A.D., Khrebtukova, I., Kindwall, A.P., Kingsbury, Z., Kokko-Gonzales, P.I., Kumar, A., Laurent, M.A., Lawley, C.T., Lee, S.E., Lee, X., Liao, A.K., Loch, J.A., Lok, M., Luo, S., Mammen, R.M., Martin, J.W., McCauley, P.G., McNitt, P., Mehta, P., Moon, K.W., Mullens, J.W., Newington, T., Ning, Z., Ling Ng, B., Novo, S.M., O'Neill, M.J., Osborne, M.A., Osnowski, A., Ostadan, O., Paraschos, L.L., Pickering, L., Pike, A.C., Pike, A.C., Chris Pinkard, D., Pliskin, D.P., Podhasky, J., Quijano, V.J., Raczy, C., Rae, V.H., Rawlings, S.R., Chiva Rodriguez, A., Roe, P.M., Rogers, J., Rogert Bacigalupo, M.C., Romanov, N., Romieu, A., Roth, R.K., Rourke, N.J., Ruediger, S.T., Rusman, E., Sanches-Kuiper, R.M., Schenker, M.R., Seoane, J.M., Shaw, R.J., Shiver, M.K., Short, S.W., Sizto, N.L., Sluis, J.P., Smith, M.A., Ernest Sohna Sohna, J., Spence, E.J., Stevens, K., Sutton, N., Szajkowski, L., Tregidgo, C.L., Turcatti, G., Vandevondele, S., Verhovskiy, Y., Virk, S.M., Wakelin, S., Walcott, G.C., Wang, J., Worsley, G.J., Yan, J., Yau, L., Zuerlein, M., Rogers, J., Mullikin, J.C., Hurles, M.E., McCooke, N.J., West, J.S., Oaks, F.L., Lundberg, P.L.,

- Klenerman, D., Durbin, R. & Smith AJ. (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456(7218), 53–59.
- Berezikov, E., Thuemmler, F., van Laake, L. W., Kondova, I., Bontrop, R., Cuppen, E., & Plasterk, R. H. A. (2006). Diversity of microRNAs in human and chimpanzee brain. *Nature Genetics*, 38(12), 1375–1377.
- Beyer, U., Roth, T., Schumacher, P., Maier, G., Unold, A., Frahm, A. W., ... Kratz, F. (1998). Synthesis and in vitro efficacy of transferrin conjugates of the anticancer drug chlorambucil. *Journal of Medicinal Chemistry*, 41(15), 2701–2708
- Bianchi, L., Tacchini, L., & Cairo, G. (1999). HIF-1-mediated activation of transferrin receptor gene transcription by iron chelation. *Nucleic Acids Research*, 27(21), 4223–4227.
- Bleil, J. D., & Bretscher, M. S. (1982). Transferrin receptor and its recycling in HeLa cells. *Embo J*, 1(3), 351–355.
- Borges, A., Adegá, F., & Chaves, R. (2016). Establishment and characterization of a new feline mammary cancer cell line, FkMTp. *Cytotechnology*, 68(4), 1529–1543.
- Bostock, D. E. (1986). Neoplasms of the skin and subcutaneous tissues in dogs and cats. *British Veterinary Journal*, 142(1), 1–19.
- Bowen, H., Biggs, T. E., Baker, S. T., Phillips, E., Perry, V. H., Mann, D. A., & Barton, C. H. (2002). c-Myc represses the murine Nramp1 promoter. *Biochemical Society Transactions*, 30(4), 774–777.

- Braslavsky, I., Hebert, B., Kartalov, E., & Quake, S. R. (2003). Sequence information can be obtained from single DNA molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(7), 3960–3964.
- Braslavsky, G. R., Kadow, K., Knipe, J., McGoff, K., Edson, M., Kaneko, T., & Greenfield, R. S. (1991). Adriamycin(hydrazone)-antibody conjugates require internalization and intracellular acid hydrolysis for antitumor activity. *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII*, 33(6), 367–374.
- Brent, M. R. (2008). Steady progress and recent breakthroughs in the accuracy of automated genome annotation. *Nature Reviews Genetics*, 9(1), 62–73.
- Broeckx, B. J. G., Derrien, T., Mottier, S., Wucher, V., Cadieu, E., Hédan, B. & Hitte, C. (2017). An exome sequencing based approach for genome-wide association studies in the dog. *Scientific Reports*, 7(1), 15680.
- Brookes, M. J., Boulton, J. K. R., Roberts, K. J., Hotchin, N. A., Brookes, M. J., Boulton, J., ... Tselepis, C. (2008). A role for iron in Wnt signaling Mass-spectrometry and Proteomics View project Family planning and inflammatory bowel disease View project A role for iron in Wnt signalling. *Oncogene*, 27, 966–975.
- Brunetti, B., Asproni, P., Beha, G., Muscatello, L. V., Millanta, F., Poli, A. & Sarli, G. (2013). Molecular Phenotype in Mammary Tumours of Queens: Correlation between Primary Tumour and Lymph Node Metastasis. *Journal of Comparative Pathology*, 148(2–3), 206–213.
- Buas, M. F., Rho, J., Chai, X., Zhang, Y., Lampe, P. D., & Li, C. I. (2015). Candidate early detection protein biomarkers for ER+/PR+ invasive ductal

breast carcinoma identified using pre-clinical plasma from the WHI observational study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 153(2), 445–454.

Bunn, H. F., & Poyton, R. O. (1996). Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiological Reviews*, 76(3), 839–885.

Bzdega, T., Turi, T., Wroblewska, B., She, D. W., Chung, H. S., Kim, H., & Neale, J. H. (1997). Molecular cloning of a peptidase against N-acetylaspartylglutamate from a rat hippocampal cDNA library. *Journal of Neurochemistry*, 69(6), 2270–2277.

Cairo, G., Recalcati, S., Mantovani, A., & Locati, M. (2011). Iron trafficking and metabolism in macrophages: contribution to the polarized phenotype. *Trends in Immunology*, 32(6), 241–247.

Caliari, D., Zappulli, V., Rasotto, R., Cardazzo, B., Frassinetti, F., Goldschmidt, M. H., & Castagnaro, M. (2014). Triple-negative vimentin-positive heterogeneous feline mammary carcinomas as a potential comparative model for breast cancer. *BMC Veterinary Research*, 10(1), 185.

Campbell, J. A. (1940). Effects of precipitated silica and of iron oxide on the incidence of primary lung tumours in mice. *British Medical Journal*, 4156(2), 275–280.

Cano, E., Pizarro, A., Redondo, J. M., Sánchez-Madrid, F., Bernabeu, C., & Fresno, M. (1990). Induction of T cell activation by monoclonal antibodies specific for the transferrin receptor. *European Journal of Immunology*, 20(4), 765–770.

Canonne-Hergaux, F., Gruenheid, S., Ponka, P., & Gros, P. (1999). Cellular and

subcellular localization of the Nramp2 iron transporter in the intestinal brush border and regulation by dietary iron. *Blood*, 93(12), 4406–4417.

Cardazzo, B., Zappulli, V., Frassinetti, F., Patarnello, T., Castagnaro, M., & Bargelloni, L. (2005). Full-length sequence and expression analysis of estrogen receptor α mRNA in feline mammary tumors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 96(2), 109–118.

Cavill, I., Worwood, M., & Jacobs, A. (1975). Internal regulation of iron absorption. *Nature*, 256(5515), 328–329.

Cazzola, M., Bergamaschi, G., Dezza, L., D’Uva, R., Ponchio, L., Rosti, V., & Ascari, K. (1991). Cytotoxic Activity of an Anti-Transferrin Receptor Immunotoxin on Normal and Leukemic Human Hematopoietic Progenitors. *Cancer Research*, 51(2), 536–541.

Cekanova, M., & Rathore, K. (2014). Animal models and therapeutic molecular targets of cancer: utility and limitations. *Drug Design, Development and Therapy*, 8, 1911–1921.

Chan, R. Y. Y., Ponka, P., & Schulman, H. M. (1992). Transferrin-receptor-independent but iron-dependent proliferation of variant Chinese hamster ovary cells. *Experimental Cell Research*, 202(2), 326–336.

Chazenbalk, G. D., Wadsworth, H. L., Foti, D., & Rapoport, B. (1990). Thyrotropin and adenosine 3',5'-monophosphate stimulate the activity of the ferritin-H promoter. *Mol Endocrinol*, 4(8), 1117–1124.

Chen, J., & Enns, C. A. (2015). CD81 promotes both the degradation of transferrin

receptor 2 (TfR2) and the Tfr2-mediated maintenance of hepcidin expression. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(12), 7841–7850.

Chen, R., Im, H., & Snyder, M. (2015). Whole-Exome Enrichment with the Roche NimbleGen SeqCap EZ Exome Library SR Platform. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2015(7), 634–641.

Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S. C., & Walz, T. (2004). Structure of the Human Transferrin Receptor-Transferrin Complex. *Cell*, 116(4), 565–576.

Chirasani, S. R., Markovic, D. S., Synowitz, M., Eichler, S. A., Wisniewski, P., Kaminska, B. & Glass, R. (2009). Transferrin-receptor-mediated iron accumulation controls proliferation and glutamate release in glioma cells. *Journal of Molecular Medicine*, 87(2), 153–167.

Chitambar, C. R. (2004). Gallium compounds as antineoplastic agents. *Current Opinion in Oncology*, 16(6), 547–552.

Chiu, R. W. K., Chan, K. C. A., Gao, Y., Lau, V. Y. M., Zheng, W., Leung, T. Y. & Lo, Y. M. D. (2008). Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(51), 20458–20463.

Chiu, S.-J., Liu, S., Perrotti, D., Marcucci, G., & Lee, R. J. (2006). Efficient delivery of a Bcl-2-specific antisense oligodeoxyribonucleotide (G3139) via transferrin receptor-targeted liposomes. *Journal of Controlled Release*, 112(2), 199–207.

Choi, J. K., Holtzer, S., Chacko, S. A., Lin, Z. X., Hoffman, R. K., & Holtzer, H. (1991). Phorbol esters selectively and reversibly inhibit a subset of myofibrillar

genes responsible for the ongoing differentiation program of chick skeletal myotubes. *Molecular and Cellular Biology*, 11(9), 4473–4482.

Choi, M., Scholl, U. I., Ji, W., Liu, T., Tikhonova, I. R., Zumbo, P. & Lifton, R. P. (2009). Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), 19096–19101.

Christova, T., & Templeton, D. M. (2007). Effect of hypoxia on the binding and subcellular distribution of iron regulatory proteins. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 301(1–2), 21–32.

Chung, J.-Y., Braunschweig, T., & Hewitt, S. M. (1992). *Diagnostic molecular pathology: the American journal of surgical pathology, part B. Diagnostic Molecular Pathology*, 15(4), 229-236.

Collawn, J. F., Lai, A., Domingo, D., Fitch, M., Hatton, S., & Trowbridge, I. S. (1993). YTRF is the conserved internalization signal of the transferrin receptor, and a second YTRF signal at position 31-34 enhances endocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 268(29), 21686–21692.

Conner, S. D., & Schmid, S. L. (2003). Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *The Journal of Cell Biology JCB The Journal of Cell Biology*, 162(5), 773–779.

D’Alessio, F., Hentze, M. W., & Muckenthaler, M. U. (2012). The hemochromatosis proteins HFE, TfR2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation. *Journal of Hepatology*, 57(5), 1052–1060.

- Dai, J., Jian, J., Bosland, M., Frenkel, K., Bernhardt, G., & Huang, X. (2008). Roles of hormone replacement therapy and iron in proliferation of breast epithelial cells with different estrogen and progesterone receptor status. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, *17*(2), 172–179.
- Daniels, T. R., Bernabeu, E., Rodríguez, J. A., Patel, S., Kozman, M., Chiappetta, D. A., ... Penichet, M. L. (2012). The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, *1820*(3), 291–317.
- Daniels, T. R., Delgado, T., Rodriguez, J. A., Helguera, G., & Penichet, M. L. (2006). The transferrin receptor part I: Biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer. *Clinical Immunology*, *121*(2), 144–158.
- Das Gupta, A., & Shah, V. I. (1990). Correlation of transferrin receptor expression with histologic grade and immunophenotype in chronic lymphocytic leukemia and non-Hodgkin's lymphoma. *Hematologic Pathology*, *4*(1), 37–41.
- Daugaard, I., Kjeldsen, T. E., Hager, H., Hansen, L. L., & Wojdacz, T. K. (2015). The influence of DNA degradation in formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue on locus-specific methylation assessment by MS-HRM. *Experimental and Molecular Pathology*, *99*(3), 632–640.
- Dautry-varsat, alic, Ciechanover, A., & F.Lodish, H. (1983). mediated endocytosis pH and the recycling of transferrin during receptor-. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *80*(April), 2258–2262.
- Davies, P. S., Zhang, A. S., Anderson, E. L., Roy, C. N., Lampson, M. A., McGraw, T. E., & Enns, C. A. (2003). Evidence for the interaction of the hereditary

haemochromatosis protein, HFE, with the transferrin receptor in endocytic compartments. *Biochem J*, 373(Pt 1), 145–153.

De Domenico, I., Ward, D. M., di Patti, M. C. B., Jeong, S. Y., David, S., Musci, G., & Kaplan, J. (2007). Ferroxidase activity is required for the stability of cell surface ferroportin in cells expressing GPI-ceruloplasmin. *The EMBO Journal*, 26(12), 2823–2831.

De Domenico, I., Ward, D. M., Langelier, C., Vaughn, M. B., Nemeth, E., Sundquist, W. I. & Kaplan, J. (2007). The molecular mechanism of hepcidin-mediated ferroportin down-regulation. *Molecular Biology of the Cell*, 18(7), 2569–2578.

de Kok, J. B., Roelofs, R. W., Giesendorf, B. A., Pennings, J. L., Waas, E. T., Feuth, T. & Span, P. N. (2005). Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Laboratory Investigation*, 85(1), 154–159.

Debnam, E., & Srai, S. (1997). Intestinal iron absorption: Cellular mechanism and regulation. *Physiology*, 12(4).

Derycke, A. S. L., Kamuhabwa, A., Gijssens, A., Roskams, T., De Vos, D., Kasran, A. & de Witte, P. A. M. (2004). Transferrin-Conjugated Liposome Targeting of Photosensitizer ALPcS4 to Rat Bladder Carcinoma Cells. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 96(21), 1620–1630.

Detre, S., Sacconi Jotti, G., & Dowsett, M. (1995). A “quickscore” method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *Clin Pathol*, 48, 876–879.

- Donovan, A., Brownlie, A., Zhou, Y., Shepard, J., Pratt, S. J., Moynihan, J. & Zon, L. I. (2000). Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature*, *403*(6771), 776–781.
- Egenvall, A., Bonnett, B. N., Häggström, J., Ström Holst, B., Möller, L., & Nødtvedt, A. (2010). Morbidity of insured Swedish cats during 1999-2006 by age, breed, sex, and diagnosis. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *12*(12), 948–959.
- Fearnhead, H. O., Vandenabeele, P., & Vanden Berghe, T. (2017). How do we fit ferroptosis in the family of regulated cell death? *Cell Death and Differentiation*, *24*(12), 1991–1998.
- Feder, J. N., Gnirke, A., Thomas, W., Tsuchihashi, Z., Ruddy, D. A., Basava, A., ... Wolff, R. K. (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nature Genetics*, *13*(4), 399–408.
- Feder, J. N., Tsuchihashi, Z., Irrinki, A., Lee, V. K., Mapa, F. A., Morikang, E., ... Schatzman, R. C. (1997). The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(22), 14025–14028.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., & Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Reviews Genetics*, *9*(2), 102–114.
- Fleming, M. D., Romano, M. A., Su, M. A., Garrick, L. M., Garrick, M. D., & Andrews, N. C. (1998). Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: Evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. *Proceedings of the*

National Academy of Sciences, 95(3), 1148–1153.

Fleming, R. E., Migas, M. C., Holden, C. C., Waheed, A., Britton, R. S., Tomatsu, S. & Sly, W. S. (2000). Transferrin receptor 2: continued expression in mouse liver in the face of iron overload and in hereditary haemochromatosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(5), 2214–2219.

Fokstuen, S., Lyle, R., Munoz, A., Gehrig, C., Lerch, R., Perrot, A., ... Blouin, J. L. (2008). A DNA resequencing array for pathogenic mutation detection in hypertrophic cardiomyopathy. *Human Mutation*, 29(6), 879–885.

Ford, G. C., Harrison, P. M., Rice, D. W., Smith, J. M., Treffry, A., White, J. L., & Yariv, J. (1984). Ferritin: design and formation of an iron-storage molecule. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 304(1121), 551–565.

Fuchs, H., Lücken, U., Tauber, R., Engel, A., & Geßner, R. (1998). Structural model of phospholipid-reconstituted human transferrin receptor derived by electron microscopy. *Structure*, 6(10), 1235–1243.

Glasel, J. A. (1995). Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios. *BioTechniques*, 18(1), 62–63.

Goswami, T., & Andrews, N. C. (2006). Hereditary hemochromatosis protein, HFE, interaction with transferrin receptor 2 suggests a molecular mechanism for mammalian iron sensing. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(39), 28494–28498.

- Goto, Y., Paterson, M., & Listowsky, I. (1983). Iron uptake and regulation of ferritin synthesis by hepatoma cells in hormone-supplemented serum-free media. *Journal of Biological Chemistry*, 258(8), 5248–5255.
- Gowda, M., Li, H., Alessi, J., Chen, F., Pratt, R., & Wang, G.-L. (2006). Robust analysis of 5'-transcript ends (5'-RATE): a novel technique for transcriptome analysis and genome annotation. *Nucleic Acids Research*, 34(19), 126.
- Graf, R., Grüntzig, K., Boo, G., Hässig, M., Axhausen, K. W., Fabrikant, S. & Pospischil, A. (2016). Swiss Feline Cancer Registry 1965–2008: the Influence of Sex, Breed and Age on Tumour Types and Tumour Locations. *Journal of Comparative Pathology*, 154(2–3), 195–210.
- Granato, A., Giantin, M., Ariani, P., Carminato, A., Baratto, C., Zorzan, E., ... Mutinelli, F. (2014). DNA and RNA isolation from canine oncologic formalin-fixed, paraffin-embedded tissues for downstream “-omic” analyses: Possible or not? *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(1), 117–124.
- Gross, C. N., Irrinki, A., Feder, J. N., & Enns, C. A. (1998). Co-trafficking of HFE, a nonclassical major histocompatibility complex class I protein, with the transferrin receptor implies a role in intracellular iron regulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(34), 22068–22074.
- Gu, Z., Wang, H., Xia, J., Yang, Y., Jin, Z., Xu, H. & Zhan, F. (2015). Decreased ferroportin promotes myeloma cell growth and osteoclast differentiation. *Cancer Research*, 75(11), 2211–2221.
- Guo, Y., Wu, J., Zhao, S., Ye, F., Su, Y., Clark, T. & Cai, Q. (2016). RNA Sequencing of Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Specimens for Gene Expression Quantification and Data Mining. *International Journal of Genomics*,

2016.

- Habashy, H. O., Powe, D. G., Staka, C. M., Rakha, E. A., Ball, G., Green, A. R. & Gee, J. M. W. (2010). Transferrin receptor (CD71) is a marker of poor prognosis in breast cancer and can predict response to tamoxifen. *Breast Cancer Research and Treatment*, 119(2), 283–293.
- Hall, D. R., Hadden, J. M., Leonard, G. A., Bailey, S., Neu, M., Winn, M. & IUCr. (2002). The crystal and molecular structures of diferric porcine and rabbit serum transferrins at resolutions of 2.15 and 2.60 Å, respectively. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 58(1), 70–80.
- Hanson, E. S., & Leibold, E. A. (1998). Regulation of iron regulatory protein 1 during hypoxia and hypoxia/reoxygenation. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(13), 7588–7593.
- Harrison, P. M., Andrews, S. C., Artymiuk, P. J., Ford, G. C., Guest, J. R., Hirzmann, J. & Yewdall, S. J. (1991). Probing Structure-Function Relations In Ferritin And Bacterioferritin. *Advances in Inorganic Chemistry*, 36, 449–486.
- Harrison, P. M., & Arosio, P. (1996). The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1275(3), 161-203.
- Hayes, G. R., Williams, A. M., Lucas, J. J., & Enns, C. A. (1997). Structure of human transferrin receptor oligosaccharides: Conservation of site-specific processing. *Biochemistry*, 36(17), 5276–5284.
- Hayes, H. M., Milne, K. L., & Mandell, C. P. (1981). Epidemiological features of

feline mammary carcinoma. *The Veterinary Record*, 108(22), 476–479.

Hémadi, M., Ha-Duong, N. T., & El Hage Chahine, J. M. (2006). The Mechanism of Iron Release from the Transferrin-Receptor 1 Adduct. *Journal of Molecular Biology*, 358(4), 1125–1136.

Henderson, B. R., Menotti, E., Bonnard, C., & Kühn, L. C. (1994). Optimal sequence and structure of iron-responsive elements: Selection of RNA Stem-loops with high affinity for iron regulatory factor. *Journal of Biological Chemistry*, 269(26), 17481–17489.

Hensel, A., Malorny, B., & Borowiak, M. (2017). Recent Developments and Experiences with Next Generation Sequencing. Retrieved from https://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/event/AF171205-p11.3_DE_WGS_WholeGenomeNextGenerationSequencing_BfR.PDF

Hentze, M. W., & Kühn, L. C. (1996). Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(16), 8175–8182.

Herbison, C. E., Thorstensen, K., Chua, A. C. G., Graham, R. M., Leedman, P., Olynyk, J. K., & Trinder, D. (2009). The role of transferrin receptor 1 and 2 in transferrin-bound iron uptake in human hepatoma cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 297(6), C1567–C1575.

Hirayama, M., Kohgo, Y., Kondo, H., Shintani, N., Fujikawa, K., Sasaki, K. & Nhtsu, Y. (1993). Regulation of iron metabolism in HepG2 cells: A possible role for cytokines in the hepatic deposition of iron. *Hepatology*, 18(4), 874–880.

- Hoffbrand, A. V., Ganeshaguru, K., Hooton, J. W. L., & Tattersall, M. H. N. (1976). Effect of Iron Deficiency and Desferrioxamine on DNA Synthesis in Human Cells. *British Journal of Haematology*, 33(4), 517–526.
- Hofmann, W. K., Tong, X. J., Ajioka, R. S., Kushner, J. P., & Koeffler, H. P. (2002, July 18). Mutation analysis of transferrin-receptor 2 in patients with atypical hemochromatosis [5]. *Blood*. American Society of Hematology, 100(3), 1099–1100
- Holmberg, C. G., & Laurell, C. B. (1947). Investigations in serum copper; nature of serum copper and its relation to the iron-binding protein in human serum. *Acta Chemica Scandinavica*, 1(10), 944–950.
- Hoshino, T., Misaki, M., Yamamoto, M., Shimizu, H., Ogawa, Y., & Toguchi, H. (1995). In Vitro Cytotoxicities and In Vivo Distribution of Transferrin–Platinum(II) Complex. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 84(2), 216–221.
- Hueffer, K., Parker, J. S. L., Weichert, W. S., Geisel, R. E., Sgro, J.-Y., & Parrish, C. R. (2003). The Natural Host Range Shift and Subsequent Evolution of Canine Parvovirus Resulted from Virus-Specific Binding to the Canine Transferrin Receptor. *Journal of Virology*, 77(3), 1718–1726.
- Huss, V. A. R., Festl, H., & Schleifer, K. H. (1983). Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *Systematic and Applied Microbiology*, 4(2), 184–192.
- Iinuma, H., Maruyama, K., Okinaga, K., Sasaki, K., Sekine, T., Ishida, O. & Yonemura, Y. (2002). Intracellular targeting therapy of cisplatin-encapsulated transferrin-polyethylene glycol liposome on peritoneal dissemination of gastric

cancer. *International Journal of Cancer*, 99(1), 130–137.

Ishida, O., Maruyama, K., Tanahashi, H., Iwatsuru, M., Sasaki, K., Eriguchi, M., & Yanagie, H. (2001). Liposomes bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin with intracellular targeting property to the solid tumors in vivo. *Pharmaceutical Research*, 18(7), 1042–1048.

Iyer, S., & Lönnnerdal, B. (1993). Lactoferrin, lactoferrin receptors and iron metabolism. *European Journal of Clinical Nutrition*, 47(4), 232–241.

Jacobs, A., & Worwood, M. (1975). Ferritin in Serum. *New England Journal of Medicine*, 292(18), 951–956.

Jameson, G. B., Anderson, B. F., Norris, G. E., Thomas, D. H., & Baker, E. N. (1999). Structure of human apolactoferrin at 2.0 Å resolution. Refinement and analysis of ligand-induced conformational change. Addendum. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 55(5), 1108–1108.

Jandl, H. ., Inman, J. ., Simmons, R. ., & Allen, D. (1959). TRANSFER OF IRON FROM SERUM IRON-BINDING PROTEIN TO HUMAN RETICULOCYTES. *The Journal of Clinical Investigations*, 38(1), 161–185.

Jeltsch, J., & Chambon, P. (1982). The Complete Nucleotide Sequence of the Chicken Ovotransferrin mRNA. *European Journal of Biochemistry*, 122(2), 291–295.

Jian, J., Yang, Q., Dai, J., Eckard, J., Axelrod, D., Axelrod, D. & Huang, X. (2011). Effects of iron deficiency and iron overload on angiogenesis and oxidative stress-a potential dual role for iron in breast cancer. *Free Radical Biology &*

Medicine, 50(7), 841–847.

Jian, J., Yang, Q., & Huang, X. (2011). Src regulates Tyr20phosphorylation of transferrin receptor-1 and potentiates breast cancer cell survival. *Journal of Biological Chemistry*, 286(41), 35708–35715.

Jing, S. Q., & Trowbridge, I. S. (1987). Identification of the intermolecular disulfide bonds of the human transferrin receptor and its lipid-attachment site. *Embo J*, 6(2), 327–331.

Johnson, B. M., & Enns, A. C. (2004). Diferric transferrin regulates transferrin receptor 2 protein stability. *Blood*, 104(13), 4287–4293.

Johnson, D. S., Mortazavi, A., Myers, R. M., & Wold, B. (2007). Genome-Wide Mapping of in Vivo Protein-DNA Interactions. *Science*, 316(5830), 1497–1502.

Joshi, J. G., & Zimmerman, A. (1988). Ferritin: An expanded role in metabolic regulation. *Toxicology*, 48(1), 21–29.

Kaneko, N., Tanimoto, T., Morimoto, M., Hayashi, T., Shimokawa Miyama, T., Hiraoka, H. & Okuda, M. (2009). Use of formalin-fixed paraffin-embedded tissue and single-strand conformation polymorphism analysis for polymerase chain reaction of antigen receptor rearrangements in dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 71(4), 535–538.

Kanugula, A. K., Gollavilli, P. N., Vasamsetti, S. B., Karnewar, S., Gopaju, R., Ummanni, R., & Kotamraju, S. (2014). Statin-induced inhibition of breast cancer proliferation and invasion involves attenuation of iron transport: Intermediacy of nitric oxide and antioxidant defence mechanisms. *FEBS*

Journal, 281(16), 3719–3738.

Katz, J. H. (1961). Iron and protein kinetics by means of doubly labeled human crystalline transferrin. *Journal of Clinical Investigations*, 40, 2143–2152.

Kawabata, H., Germain, R. S., Ikezoe, T., Tong, X., Green, E. M., Gombart, A. F., & Koeffler, H. P. (2001). Regulation of expression of murine transferrin receptor 2. *Blood*, 98(6), 1949–1954.

Kawabata, H., Germain, R. S., Vuong, P. T., Nakamaki, T., Said, J. W., & Koeffler, H. P. (2000). Transferrin receptor 2-alpha supports cell growth both in iron-chelated cultured cells and in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(22), 16618–16625.

Kawabata, H., Nakamaki, T., Ikonomi, P., Smith, R. D., Germain, R. S., & Koeffler, H. P. (2001). Expression of transferrin receptor 2 in normal and neoplastic hematopoietic cells. *Blood*, 98(9), 2714–2719.

Kawabata, H., Yang, R., HIRAMA, T., Vuong, P. T., Kawano, S., Gombart, A. F., & Koeffler, H. P. (1999). Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(30), 20826–20832.

Keijser, B. J. F., Zaura, E., Huse, S. M., van der Vossen, J. M. B. M., Schuren, F. H. J., Montijn, R. C. & Crielaard, W. (2008). Pyrosequencing analysis of the Oral Microflora of healthy adults. *Journal of Dental Research*, 87(11), 1016–1020.

Kennecke, H., Yerushalmi, R., Woods, R., Cheang, M. C. U., Voduc, D., Speers, C. H. & Gelmon, K. (2010). Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *Journal*

of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, 28(20), 3271–3277.

Kim, E. M., Jeong, H. J., Heo, Y. J., Moon, H. B., Bom, H. S., & Kim, C. G. (2004). Intratumoral injection of 188Re labeled cationic polyethylenimine conjugates: A preliminary report. *Journal of Korean Medical Science*, 19(5), 647–651.

Kleven, M. D., Jue, S., & Enns, C. A. (2018). Transferrin Receptors TfR1 and TfR2 Bind Transferrin through Differing Mechanisms. *Biochemistry*, 57(9), 1552–1559.

Kondo, K., Noguchi, M., Mukai, K., Matsuno, Y., Sato, Y., Shimosato, Y., & Monden, Y. (1990). Transferrin Receptor Expression in Adenocarcinoma of the Lung as a Histopathologic Indicator of Prognosis. *Chest*, 97(6), 1367–1371.

Korshunova, Y., Maloney, R. K., Lakey, N., Citek, R. W., Bacher, B., Budiman, A. & McPherson, J. D. (2008). Massively parallel bisulphite pyrosequencing reveals the molecular complexity of breast cancer-associated cytosine-methylation patterns obtained from tissue and serum DNA. *Genome Research*, 18(1), 19–29.

Krause, A., Neitz, S., Mägert, H.-J., Schulz, A., Forssmann, W.-G., Schulz-Knappe, P., & Adermann, K. (2000). LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Letters*, 480(2–3), 147–150.

Kunth, K., Höfler, H., & Atkinson, M. J. (1994). Quantification of messenger RNA expression in tumors: which standard should be used for best RNA normalization?. *Verhandlungen Der Deutschen Gesellschaft Fur Pathologie*, 78, 226–230.

- Kursa, M., Walker, G. F., Roessler, V., Ogris, M., Roedl, W., Kircheis, R., & Wagner, E. (2003). Novel Shielded Transferrin-Polyethylene Glycol-Polyethylenimine/ DNA Complexes for Systemic Tumor-Targeted Gene Transfer. *Blood*, 100(14), 222–231.
- Kwok, J. C., & Richardson, D. R. (2002). The iron metabolism of neoplastic cells: alterations that facilitate proliferation? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42(1), 65–78.
- Lakatos, B., Hornyák, Á., Demeter, Z., Forgách, P., Kennedy, F., & Rusvai, M. (2017). Detection of a putative novel adenovirus by PCR amplification, sequencing and phylogenetic characterisation of two gene fragments from formalin-fixed paraffin-embedded tissues of a cat diagnosed with disseminated adenovirus disease. *Acta Veterinaria Hungarica*, 65(4), 574–584.
- Laurell, C.-B., & Ingleman, B. (1947). The Iron-Binding Protein of Swine Serum. *Acta Chemica Scandinavica*, 1(7), 770–776.
- Laurell, C. B. (1947). Studies on the transportation and metabolism of iron in the body with special reference to the iron-binding component in human plasma. *Acta Physiologica Scandinavica*, 14(Suppl. 46), 129.
- Lawrence, C.M., Ray, S., Babyonyshev, M., Galluser, R., Borhani, D. W., & Harrison, S. C. (1998). *Crystal Structure of the Ectodomain of Human Transferrin Receptor*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*, 286 (5440), 779-782.
- Lebrón, J. A., Bennett, M. J., Vaughn, D. E., Chirino, A. J., Snow, P. M., Mintier, G. A., & Bjorkman, P. J. (1998). Crystal Structure of the Hemochromatosis Protein HFE and Characterization of Its Interaction with Transferrin Receptor.

Cell, 93(1), 111–123.

Lebrón, J. A., West, A. P., & Bjorkman, P. J. (1999). The hemochromatosis protein HFE competes with transferrin for binding to the transferrin receptor. *Journal of Molecular Biology*, 294(1), 239–245.

Leibman, A., & Aisen, P. (1979). Distribution of iron between the binding sites of transferrin in serum: methods and results in normal human subjects. *Blood*, 53(6), 1058–1065.

Leng, X., Wu, Y., & Arlinghaus, R. B. (2011). Relationships of lipocalin 2 with breast tumorigenesis and metastasis. *Journal of Cellular Physiology*, 226(2), 309–314.

Lesley, J. F., & Schulte, R. J. (1985). *Inhibition of Cell Growth by Monoclonal Anti-Transferrin Receptor Antibodies*. *Molecular and cellular biology*, 5(8), 1814–1821.

Levi, S., Luzzago, A., Cesareni, G., Cozzi, A., Franceschinelli, F., Albertini, A., & Arosio, P. (1988). Mechanism of ferritin iron uptake: Activity of the H-chain and deletion mapping of the ferro-oxidase site. A study of iron uptake and ferro-oxidase activity of human liver, recombinant H-chain ferritins, and of two H-chain deletion mutants. *Journal of Biological Chemistry*, 263(34), 18086–18092.

Levy, J. E., Jin, O., Fujiwara, Y., Kuo, F., & Andrews, N. (1999). Transferrin receptor is necessary for development of erythrocytes and the nervous system. *Nature Genetics*, 21(4), 396–399.

Lewin, B. (1975). Units of transcription and translation: Sequence components of

heterogeneous nuclear RNA and messenger RNA. *Cell*, 4(2), 77–93.

Lewis, F., Maughan, N. J., Smith, V., Hillan, K., & Quirke, P. (2001). Unlocking the archive - gene expression in paraffin-embedded tissue. *The Journal of Pathology*, 195(1), 66–71.

Li, F., Wang, Y., Zeller, K. I., Potter, J. J., Wonsey, D. R., O'Donnell, K. A. & Dang, C. V. (2005). Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 25(14), 6225–6234.

Li, L., Fang, C. J., Ryan, J. C., Niemi, E. C., Lebron, J. A., Bjorkman, P. J. & Seaman, W. E. (2010). Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(8), 3505–3510.

Liehr, J. G., & Roy, D. (1990). Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(4), 415–423.

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4), 402–408.

Lopez-Barcons, L., Polo, D., Llorens, A., Reig, F., & Fabra, A. (2005). Targeted adriamycin delivery to MXT-B2 metastatic mammary carcinoma cells by transferrin liposomes: Effect of adriamycin ADR-to-lipid ratio. *Oncology Reports*, 14(5), 1337–1343.

Lüder Ripoli, F., Mohr, A., Conradine Hammer, S., Willenbrock, S., Hewicker-Trautwein, M., Hennecke, S. & Nolte, I. (2016). A Comparison of Fresh Frozen

vs. Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Specimens of Canine Mammary Tumors via Branched-DNA Assay. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(5).

Luria-Pérez, R., Helguera, G., & Rodríguez, J. A. (2016, November 1). Antibody-mediated targeting of the transferrin receptor in cancer cells. *Boletín Médico Del Hospital Infantil de México*, 73(6), 372-379.

Lyons, L. A., Creighton, E. K., Alhaddad, H., Beale, H. C., Grahn, R. A., Rah, H. & Gandolfi, B. (2016). Whole genome sequencing in cats, identifies new models for blindness in AIPL1 and somite segmentation in HES7. *BMC Genomics*, 17, 265.

Macewen, E. G. (1990). Spontaneous tumors in dogs and cats: Models for the study of cancer biology and treatment. *Cancer and Metastasis Reviews* ,9(2),125-136.

MacKenzie, E. L., Iwasaki, K., & Tsuji, Y. (2008). Intracellular iron transport and storage: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10(6), 997–1030.

MacVean, D. W., Monlux, A. W., Anderson, P. S., Silberg, S. L., & Roszel, J. F. (1978). Frequency of Canine and Feline Tumors in a Defined Population. *Veterinary Pathology*, 15(6), 700–715.

Manger, B., Weiss, A., Hardy, K. J., & Stobo, J. D. (1986). A transferrin receptor antibody represents one signal for the induction of IL 2 production by a human T cell line. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 136(2), 532–538.

Maniatis, T., Goodbourn, S., & Fischer, J. (1987). Identification of the iron-

responsive element for the translational regulation of human ferritin mRNA. *Science*, 236(4806), 1237–1245.

Maria, R. De, Olivero, M., Iussich, S., Nakaichi, M., Murata, T., Biolatti, B. & Renzo, D. (2005). Spontaneous Feline Mammary Carcinoma Is a Model of HER2 Overexpressing Poor Prognosis Human Breast Cancer, (3), 907–912.

Marten, N. W., Burke, E. J., Hayden, J. M., & Straus, D. S. (1994). Effect of amino acid limitation on the expression of 19 genes in rat hepatoma cells. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 8(8), 538–544.

Masuda, N., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Monden, M., & Okubo, K. (1999). Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic Acids Research*, 27(22), 4436–4443.

Maxwell, P. H., Wlesener, M. S., Chang, G. W., Clifford, S. C., Vaux, E. C., Cockman, M. E., ... Ratcliffe, P. J. (1999). The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399(6733), 271–275.

McKie, A. T., Barrow, D., Latunde-Dada, G. O., Rolfs, A., Sager, G., Mudaly, E. & Simpson, R. J. (2001). An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science (New York, N.Y.)*, 291(5509), 1755–1759.

McKie, A. T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D. & Simpson, R. J. (2000). A Novel Duodenal Iron-Regulated Transporter, IREG1, Implicated in the Basolateral Transfer of Iron to the Circulation. *Molecular Cell*,

5(2), 299–309.

Mckinney, M. D., Moon, S. J., Kulesh, D. A., Larsen, T., & Schoepp, R. J. (2009). Detection of viral RNA from paraffin-embedded tissues after prolonged formalin fixation. *Journal of Clinical Virology*, *44*, 39–42.

Meason-Smith, C., Edwards, E. E., Older, C. E., Branco, M., Bryan, L. K., Lawhon, S. D. & Hoffmann, A. R. (2017). Panfungal Polymerase Chain Reaction for Identification of Fungal Pathogens in Formalin-Fixed Animal Tissues. *Veterinary Pathology*, *54*(4), 640–648.

Merighi, A. (2005). *Anatomia applicata e topografia regionale veterinaria*. Piccin. Retrieved from <https://www.piccin.it/it/anatomia-degli-animali-domestici/1031-anatomia-applicata-e-topografia-regionale-veterinaria-9788829917778.html>

Metz-boutigue, M.-H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., & Jolles, P. (1984). Human lactotransferrin : amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur. J. Biochem.*, *145*, 659-676.

Meyerholz, D. K., Tintle, N. L., & Beck, A. P. (2018). Common Pitfalls in Analysis of Tissue Scores. *Veterinary Pathology*, *56*(1), 39–42.

Meyers, B. C., Souret, F. F., Lu, C., & Green, P. J. (2006). Sweating the small stuff: microRNA discovery in plants. *Current Opinion in Biotechnology*, *17*(2), 139–146.

Minke, J. M. H. M., Schuuring, E., Van Den Berghe, R., Stolwijk, J. A. M., Boonstra, J., Cornelisse, C. & Misdorp, W. (1991). Isolation of Two Distinct Epithelial Cell Lines from a Single Feline Mammary Carcinoma with Different Tumorigenic Potential in Nude Mice and Expressing Different Levels of Epidermal Growth Factor Receptors1. *Cancer Research*, *51*(15), 4028-4037.

- Misdorp, W., Armed Forces Institute of Pathology (U.S.), American Registry of Pathology., & WHO Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology. (1999). *Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat*. Washington D.C.: Armed Forces Institute of Pathology in cooperation with the American Registry of Pathology and the World Health Organization Collaborating Center for Worldwide Reference on Comparative Oncology. Retrieved from <http://www.worldcat.org/title/histological-classification-of-mammary-tumors-of-the-dog-and-the-cat/oclc/456520807>
- Misdorp, W., Romijn, A., & Hart, A. A. (1991). Feline mammary tumors: a case-control study of hormonal factors. *Anticancer Research*, *11*(5), 1793–1797.
- Morin, R. D., O'Connor, M. D., Griffith, M., Kuchenbauer, F., Delaney, A., Prabhu, A.-L. & Marra, M. A. (2008). Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Research*, *18*(4), 610–621.
- Morozova, O., & Marra, M. A. (2008). Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. *Genomics*, *92*(5), 255–264.
- Morwenna, S., & Ratcliffe, W. P. J. (1997). Mammalian oxygen sensing and hypoxia inducible factor-1. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *29*(7), 1419-1432.
- Moss, D., Powell, L. W., Halliday, J. W., Fargion, S., Cappellini, M. D., Fracanzani, A. L. & Arosio, P. (1992). Functional roles of the ferritin receptors of human liver, hepatoma, lymphoid and erythroid cells. *Journal of Inorganic Biochemistry*, *47*(1), 219–227.
- Moura, I. C., Centelles, M. N., Arcos-Fajardo, M., Malheiros, D. M., Collawn, J. F.,

Cooper, M. D., & Monteiro, R. C. (2001). Identification of the Transferrin Receptor as a Novel Immunoglobulin (Ig)α1 Receptor and Its Enhanced Expression on Mesangial Cells in Iga Nephropathy. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(4), 417–426.

Munchel, S., Hoang, Y., Zhao, Y., Cottrell, J., Klotzle, B., Godwin, A. K. & Chien, J. (2015). Targeted or whole genome sequencing of formalin fixed tissue samples: potential applications in cancer genomics. *Oncotarget*, 6(28), 25943–25961.

Munro, H. (1993, April 27). The Ferritin Genes: Their Response to Iron Status. *Nutrition Reviews*, 51(3), 65-73.

Munro, H. N. (1990). Iron regulation of ferritin gene expression. *Journal of Cellular Biochemistry*, 44(2), 107–115.

Ned, R. M., Swat, W., & Andrews, N. C. (2003). Transferrin receptor 1 is differentially required in lymphocyte development. *Blood*, 102(10), 3711–3718.

Nemeth, E. (2008). Iron regulation and erythropoiesis. *Current Opinion in Hematology*, 15(3), 169-175.

Nemeth, E., Tuttle, M. S., Powelson, J., Vaughn, M. B., Donovan, A., Ward, D. M. & Kaplan, J. (2004). Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science (New York, N.Y.)*, 306(5704), 2090–2093.

Nielsen, K. L., Høgh, A. L., & Emmersen, J. (2006). DeepSAGE--digital transcriptomics with high sensitivity, simple experimental protocol and

multiplexing of samples. *Nucleic Acids Research*, 34(19), e133.

Nyren, P., Pettersson, B., & Uhlen, M. (1993). Solid Phase DNA Minisequencing by an Enzymatic Luminometric Inorganic Pyrophosphate Detection Assay. *Analytical Biochemistry*, 208(1), 171–175.

O'Donnell, K. A., Yu, D., Zeller, K. I., Kim, J. -w., Racke, F., Thomas-Tikhonenko, A., & Dang, C. V. (2006). Activation of Transferrin Receptor 1 by c-Myc Enhances Cellular Proliferation and Tumorigenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 26(6), 2373–2386.

Ohkuma, M., Haraguchi, N., Ishii, H., Mimori, K., Tanaka, F., Kim, H. M., ... Mori, M. (2012). Absence of CD71 Transferrin Receptor Characterizes Human Gastric Adenosquamous Carcinoma Stem Cells. *Annals of Surgical Oncology*, 19(4), 1357–1364.

Olby, N.J., Munana, K.R., Sharp, N.J.H, Skeen, T, Hauck, M.L.: Transferrin receptor expression in canine brain tumors. Proceedings of the 18th American College of Veterinary Internal Medicine conference, Seattle, WA, 2000

Omary, M. B., Trowbridge, I. S., & Minowada, J. (1980). Human cell-surface glycoprotein with unusual properties. *Nature*, 286(5776), 888–891.

Orth, J. D., & McNiven, M. A. (2003). Dynamin at the actin–membrane interface. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(1), 31–39.

Overley, B., Shofer, F. S., Goldschmidt, M. H., Sherer, D., & Sorenmo, K. U. (2005). Association between Ovariectomy and Feline Mammary Carcinoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(4), 560–563.

- Owen, L. (1980). TNM Classification of tumours in domestic animals. *World Health Organisation*, 1–52. Retrieved from http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68618/VPH_CMO_80.20_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Palacios, G., Druce, J., Du, L., Tran, T., Birch, C., Briese, T. & Lipkin, W. I. (2008). A New Arenavirus in a Cluster of Fatal Transplant-Associated Diseases. *New England Journal of Medicine*, 358(10), 991–998.
- Pan, B. T., Teng, K., Wu, C., Adam, M., & Johnstone, R. M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *Journal of Cell Biology*, 101(3), 942–948.
- Park, C. H., Valore, E. V, Waring, A. J., & Ganz, T. (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 7806–7810.
- Parker, J. S. L., Murphy, W. J., Wang, D., Stephen, ‡, O'brien, J., Parrish, C. R. & Virol, J. (2001). Canine and Feline Parvoviruses Can Use Human or Feline Transferrin Receptors To Bind, Enter, and Infect Cells Canine parvovirus (CPV) enters and infects cells by a dynamin-dependent, clathrin-mediated endocytic pathway, and viral capsids colocalize with t. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 75(8), 3896–3902.
- Pearson, B. M., Gaskin, D. J. H., Segers, R. P. A. M., Wells, J. M., Nuijten, P. J. M., & van Vliet, A. H. M. (2007). The complete genome sequence of *Campylobacter jejuni* strain 81116 (NCTC11828). *Journal of Bacteriology*, 189(22), 8402–8403.

- Pelengaris, S., Khan, M., & Evan, G. I. (2002). Suppression of Myc-induced apoptosis in beta cells exposes multiple oncogenic properties of Myc and triggers carcinogenic progression. *Cell*, *109*(3), 321–334.
- Peña, L., Gama, A., Goldschmidt, M. H., Abadie, J., Benazzi, C., Castagnaro, M. & de las Mulas, J. M. (2014). 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), 127–145.
- Pérez-Alenza, M. D., Jiménez, A., Nieto, A. I., & Peña, L. (2004). First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. *Breast Cancer Research : BCR*, *6*(4), R300-7.
- Petersen, B. H., Rapaport, R., Henry, D. P., Huseman, C., & Moore, W. V. (1990). Effect of Treatment with Biosynthetic Human Growth Hormone (GH) on Peripheral Blood Lymphocyte Populations and Function in Growth Hormone-Deficient Children. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *70*(6), 1756–1760.
- Peyssonnaud, C., Zinkernagel, A. S., Schuepbach, R. A., Rankin, E., Vaultont, S., Haase, V. H. & Johnson, R. S. (2007). Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *The Journal of Clinical Investigation*, *117*(7), 1926–1932.
- Pham, D. H., Powell, J. A., Gliddon, B. L., Moretti, P. A. B., Tsykin, A., Van der Hoek, M., ... Pitson, S. M. (2014). Enhanced expression of transferrin receptor 1 contributes to oncogenic signalling by sphingosine kinase 1. *Oncogene*,

33(48), 5559–5568.

Piel, B. P., & Tilton, M. (2017). Transferrin Conjugated Polymeric Nanomedicine for Targeting Pancreatic Cancer using Paclitaxel and Gemcitabine, (January).

Pirker, R., FitzGerald, D. J., Hamilton, T. C., Ozols, R. F., Willingham, M. C., & Pastan, I. (1985). Anti-transferrin receptor antibody linked to Pseudomonas exotoxin as a model immunotoxin in human ovarian carcinoma cell lines. *Cancer Research*, 45(2), 751–757.

Ploypetch, S., Rungsipipat, A., Piyaviriyakul, P., Choisunirachon, N., Makoom, P., & Kalpravidh, C. (2017). Relationships between transferrin and transferrin receptor (TfR) expression in dogs with malignant oronasal tumors. *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 47(1), 61–70.

Ponka, P., & Lok, C. N. (1999). The transferrin receptor: role in health and disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31(10), 1111–1137.

Pontius, J. U., Mullikin, J. C., Smith, D. R., Green, P., Pontius, J. U., Mullikin, J. C., & Roca, A. L. (2007). Initial sequence and comparative analysis of the cat genome Initial sequence and comparative analysis of the cat genome, *Genome research*, 17(11),1675-89.

Praefcke, G. J. K., & McMahon, H. T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(2), 133–147.

Priest, H., McDonough, S., Erb, H., Daddona, J., & Stokol, T. (2011). Transferrin receptor expression in canine lymphoma. *Veterinary Pathology*, 48(2), 466–474.

- Prior, R., Reifenberger, G., & Wechsler, W. (1990). Transferrin receptor expression in tumours of the human nervous system: relation to tumour type, grading and tumour growth fraction. *Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology*, 416(6), 491–496.
- Pun, S. H., Tack, F., Bellocq, N. C., Cheng, J., Grubbs, B. H., Jensen, G. S., ... Bakker, A. (2004). Targeted delivery of RNA-cleaving DNA enzyme (DNAzyme) to tumor tissue by transferrin-modified, cyclodextrin-based particles. *Cancer Biology & Therapy*, 3(7), 641–650.
- Qi, Y., & Dawson, G. (2002). Hypoxia Specifically and Reversibly Induces the Synthesis of Ferritin in Oligodendrocytes and Human Oligodendrogliomas. *Journal of Neurochemistry*, 63(4), 1485–1490.
- Ramakrishnan, S., Enghlid, J. J., Bryant, H. L., & Xu, F.-J. (1989). Characterization of a translation inhibitory protein from *Luffa aegyptiaca*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 160(2), 509–516.
- Ramakrishnan, S., & Houston, L. L. (1984). Inhibition of human acute lymphoblastic leukemia cells by immunotoxins: potentiation by chloroquine. *Science*, 223(4631), 58-61.
- Raso, V., & Basala, M. (1984). A Highly Cytotoxic Human Transferrin-Ricin A Chain Conjugate Used to Select Receptor-modified Cells. *The Journal of biological chemistry*, 259(2), 1143-1149.
- Rathore, D., & Batra, J. K. (1996). Generation of Active Immunotoxins Containing Recombinant Restrictocin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 222(1), 58–63.

- Rathore, D., Nayak, S. K., & Batra, J. K. (1997). Overproduction of fungal ribotoxin alpha-sarcin in *Escherichia coli*: generation of an active immunotoxin. *Gene*, *30*, 31–35.
- Recalcati, S., Locati, M., Marini, A., Santambrogio, P., Zaninotto, F., De Pizzol, M., & Cairo, G. (2010). Differential regulation of iron homeostasis during human macrophage polarized activation. *European Journal of Immunology*, *40*(3), 824–835.
- Recht, L. D., Griffin, T. W., Raso, V., & Salimi, A. R. (1990). *Potent Cytotoxicity of an Antihuman Transferrin Receptor-Ricin A-Chain Immunotoxin on Human Glioma Cells in Vitro*. *Cancer Research*, *50*, 6696-6700.
- Reis-Filho, J. S. (2009). Next Generation Sequencing. *Breast Cancer Research : BCR*, *11*(12),501-503.
- Richardson, D. R., & Baker, E. (1994). Two saturable mechanisms of iron uptake from transferrin in human melanoma cells: The effect of transferrin concentration, chelators, and metabolic probes on transferrin and iron uptake. *Journal of Cellular Physiology*, *161*(1), 160–168.
- Richardson, D. R., & Ponka, P. (1997, March 14). The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes*, *1331*(1),1-40.
- Richmond, H. G. (1959). Induction of sarcoma in the rat by iron-dextran complex. *British Medical Journal*, *1*(5127), 947–950.
- Robb, A. D., Ericsson, M., & Wessling-Resnick, M. (2004). Transferrin receptor 2 mediates a biphasic pattern of transferrin uptake associated with ligand delivery to multivesicular bodies. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*,

287(6), C1769–C1775.

- Robb, A., & Wessling-Resnick, M. (2004). Regulation of transferrin receptor 2 protein levels by transferrin. *Blood*, *104*(13), 4294–4299.
- Rogers, J. T., Bridges, K. R., Durmowicz, G. P., Glass, J., Auron, P. E., & Munro, H. N. (1990). Translational control during the acute phase response. Ferritin synthesis in response to interleukin-1. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(24), 14572–14578.
- Roh, T., Ngau, W. C., Cui, K., Landsman, D., & Zhao, K. (2004). High-resolution genome-wide mapping of histone modifications. *Nature Biotechnology*, *22*(8), 1013–1016.
- Rolfs, A., Kvietikova, I., Gassmann, M., & Wenger, R. H. (1997). Oxygen-regulated transferrin expression is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*(32), 20055–20062.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., & Nyren, P. (1996). Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Analytical Biochemistry*, *242*(1), 84–89.
- Roodman, G. D. (2009). Osteoclasts pump iron. *Cell Metabolism*, *9*(5), 405–406.
- Rose, T. M., Plowman, G. D., Teplow, D. B., Dreyer, W. J., Hellstrom, K. E., & Brown, J. P. (1986). Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence (tumor-associated antigen/amino acid sequence/transferrin superfamily). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *83*(5), 1261–1265.
- Rothenberger, S., Iacopetta, B. J., & Kühn, L. C. (1987). Endocytosis of the

transferrin receptor requires the cytoplasmic domain but not its phosphorylation site. *Cell*, 49(3), 423–431.

Roy, C. N., Penny, D. M., Feder, J. N., & Enns, C. A. (1999). The hereditary hemochromatosis protein, HFE, specifically regulates transferrin-mediated iron uptake in HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274(13), 9022–9028.

Ruan, Y., Ooi, H. S., Choo, S. W., Chiu, K. P., Zhao, X. D., Srinivasan, K. G. & Wei, C.-L. (2007). Fusion transcripts and transcribed retrotransposed loci discovered through comprehensive transcriptome analysis using Paired-End diTags (PETs). *Genome Research*, 17(6), 828–838.

Ruifrok, A. C., & Johnston, D. A. (2001). Quantification of Histochemical Staining by Color Deconvolution. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology*, 23, 291–299.

Rybak, M., Saxena, S. & K, S., J Ackerman, E., & J Youle, R. (1991). Cytotoxic potential of ribonuclease and ribonuclease hybrid proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 266(21), 202–207.

Sahoo, S. K., Ma, W., & Labhasetwar, V. (2004). Efficacy of transferrin-conjugated paclitaxel-loaded nanoparticles in a murine model of prostate cancer. *International Journal of Cancer*, 112(2), 335–340.

Salvatore, G., Beers, R., Margulies, I., Kreitman, R. J., & Pastan, I. (2002). Improved cytotoxic activity toward cell lines and fresh leukemia cells of a mutant anti-CD22 immunotoxin obtained by antibody phage display. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 8(4), 995–1002.

- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, 94(3), 441–448.
- Schmidt, P. J., Toran, P. T., Giannetti, A. M., Bjorkman, P. J., & Andrews, N. C. (2008). The Transferrin Receptor Modulates Hfe-Dependent Regulation of Hepcidin Expression. *Cell Metabolism*, 7(3), 205–214.
- Schneider, B. D., & Leibold, E. A. (2003). Effects of iron regulatory protein regulation on iron homeostasis during hypoxia. *Blood*, 102(9), 3404–3411.
- Scott, C. F., Goldmacher, V. S., Lambert, J. M., Jackson, J. V., & McIntyre, G. D. (1987). An immunotoxin composed of a monoclonal antitransferrin receptor antibody linked by a disulfide bond to the ribosome-inactivating protein gelonin: potent in vitro and in vivo effects against human tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 79(5), 1163–1172.
- Seixas, F., Palmeira, C., Pires, M. A., & Lopes, C. (2008). Are complex carcinoma of the feline mammary gland and other invasive mammary carcinoma identical tumours? Comparison of clinicopathologic features, DNA ploidy and follow up. *Research in Veterinary Science*, 84(3), 428–433.
- Semenza, G. L. (1998). Hypoxia-inducible factor 1 and the molecular physiology of oxygen homeostasis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 131(3), 207–214.
- Senyilmaz, D., Virtue, S., Xu, X., Tan, C. Y., Griffin, J. L., Miller, A. K. & Teleman, A. A. (2015). Regulation of mitochondrial morphology and function by stearoylation of TFR1. *Nature*, 525(7567), 124–128.

- Seymour, G. J., Walsh, M. D., Lavin, M. F., Strutton, G., & Gardiner, R. A. (1987). Transferrin receptor expression by human bladder transitional cell carcinomas. *Urological Research*, *15*(6), 341–344.
- Shimoda, Y., Nagashima, T., Urakami, K., Tanabe, T., Saito, J., Naruoka, A. & Yamaguchi, K. (2016). Integrated next-generation sequencing analysis of whole exome and 409 cancer-related genes. *Biomedical Research*, *37*(6), 367–379.
- Shindelman, J. E., Ortmeyer, A. E., & Sussman, H. H. (1981). Demonstration of the transferrin receptor in human breast cancer tissue. Potential marker for identifying dividing cells. *International Journal of Cancer*, *27*(3), 329–334.
- Singh, B. (2017). *Dyce, Sack, and Wensing's Textbook of Veterinary Anatomy*. Retrieved from <https://www.libriecortinamilano.it/scheda-libro/baljit-singh/dyce-sack-and-wensing-s-textbook-of-veterinary-anatomy-9780323442640-145047.html>
- Singh, M., Atwal, H., & Micetich, R. (1998). Transferrin directed delivery of adriamycin to human cells. *Anticancer Research*, *18*(3 A), 1423–1427.
- Singh, M., Mugler, K., Hailoo, D. W., Burke, S., Nemesure, B., Torkko, K., & Shroyer, K. R. (2011a). Differential expression of transferrin receptor (TfR) in a spectrum of normal to malignant breast tissues: implications for in situ and invasive carcinoma. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology : AIMM*, *19*(5), 417–423.
- Singh, M., Mugler, K., Hailoo, D. W., Burke, S., Nemesure, B., Torkko, K., & Shroyer, K. R. (2011b). 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), 417–423.

Smith, D. R., Quinlan, A. R., Peckham, H. E., Makowsky, K., Tao, W., Woolf, B., & Richardson, P. M. (2008). Rapid whole-genome mutational profiling using next-generation sequencing technologies. *Genome Research*, 18(10), 1638–1642.

Song, B. D., & Schmid, S. L. (2003). A molecular motor or a regulator? Dynamin's in a class of its own. *Biochemistry*, 42(6), 1369–1376.

Sorkin, A. (2004). Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: a team effort. *Current Opinion in Cell Biology*, 16(4), 392–399.

Srinivasan, M., Sedmak, D., & Jewell, S. (2002). Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *The American Journal of Pathology*, 161(6), 1961–1971.

Sutherland, R., Delia, D., Schneider, C., Newman, R., Kemshead, J., & Greaves, M. (1981). Ubiquitous cell-surface glycoprotein on tumor cells is proliferation-associated receptor for transferrin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(7), 4515–4519.

Taboada, E. N., Graham, M. R., Carriço, J. A., & Van Domselaar, G. (2017). Food Safety in the Age of Next Generation Sequencing, Bioinformatics, and Open Data Access. *Frontiers in Microbiology*, 8, 909.

Tacchini, L., Bianchi, L., Bernelli-Zazzera, A., & Cairo, G. (1999). Transferrin receptor induction by hypoxia. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(34),

24142–24146.

Tamazian, G., Simonov, S., Dobrynin, P., Makunin, A., Logachev, A., Komissarov, A. & O'Brien, S. J. (2014). Annotated features of domestic cat - *Felis catus* genome. *GigaScience*, 3(1).

Tanaka, T., Shiramoto, S., Miyashita, M., Fujishima, Y., & Kaneo, Y. (2004). Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME). *International Journal of Pharmaceutics*, 277(1–2), 39–61.

Tawfik, D. S., & Griffiths, A. D. (1998). Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nature Biotechnology*, 16(7), 652–656.

Taylor, K. H., Kramer, R. S., Davis, J. W., Guo, J., Duff, D. J., Xu, D. & Shi, H. (2007). Ultradeep Bisulfite Sequencing Analysis of DNA Methylation Patterns in Multiple Gene Promoters by 454 Sequencing. *Cancer Research*, 67(18), 8511–8518.

Taylor, M. R. H., & Gatenby, P. B. B. (1966). Iron Absorption in Relation to Transferrin Saturation and Other Factors. *British Journal of Haematology*, 12(6), 747–753.

Theil, E. C. (1987). Ferritin: Structure, Gene Regulation, and Cellular Function in Animals, Plants, and Microorganisms. *Annual Review of Biochemistry*, 56(1), 289–315.

Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G. & Heinen, E. (1999). Housekeeping genes as internal standards: use and limits.

Journal of Biotechnology, 75(2–3), 291–295.

Tilli, T. M., Castro, C. da S., Tuszynski, J. A., & Carels, N. (2016). A strategy to identify housekeeping genes suitable for analysis in breast cancer diseases. *BMC Genomics*, 17(1).

Toblli, J. E., & Angerosa, M. (2014, December 11). Optimizing iron delivery in the management of anemia: Patient considerations and the role of ferric carboxymaltose. *Drug Design, Development and Therapy*, 8, 2463-2473.

Tonik, S. E., Shindelman, J. E., & Sussman, H. H. (1986). Transferrin receptor is inversely correlated with estrogen receptor in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 7(2), 71–76.

Torti, S. V., & Torti, F. M. (2013a). Cellular Iron Metabolism in Prognosis and Therapy of Breast Cancer. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 18(5), 435–448.

Torti, S. V., & Torti, F. M. (2013b). Cellular Iron Metabolism in Prognosis and Therapy of Breast Cancer. *Critical Reviews in Oncogenesis*, 18(5), 435–448.

Torti, S. V., & Torti, F. M. (2013c, May 18). Iron and cancer: More ore to be mined. *Nature Reviews Cancer*, 13(5), 342-355.

Tosoni, D., Puri, C., Confalonieri, S., Salcini, A. E., De Camilli, P., Tacchetti, C., & Di Fiore, P. P. (2005). TTP specifically regulates the internalization of the transferrin receptor. *Cell*, 123(5), 875–888.

Townsend, A., & Drakesmith, H. (2002). Role of HFE in iron metabolism, hereditary haemochromatosis, anaemia of chronic disease, and secondary iron

overload. *The Lancet*, 359(9308), 786–790.

Traub, L. M. (2003). Sorting it out: AP-2 and alternate clathrin adaptors in endocytic cargo selection. *The Journal of Cell Biology*, 163(2), 203–208.

Trowbridge, I. S. (1988). Transferrin receptor as a potential therapeutic target. *Progress in Allergy*, 45, 121–146.

Trowbridge, I. S., Lesley, J., & Schulte, R. (1982). Murine cell surface transferrin receptor: Studies with an anti-receptor monoclonal antibody. *Journal of Cellular Physiology*, 112(3), 403–410.

Turkewitz, A. P., Schwartz, A. L., & Harrison, S. C. (1988). A pH-dependent reversible conformational transition of the human transferrin receptor leads to self-association. *Journal of Biological Chemistry*, 263(31), 16309–16315.

Tuzun, E., Sharp, A. J., Bailey, J. A., Kaul, R., Morrison, V. A., Pertz, L. M. & Eichler, E. E. (2005). Fine-scale structural variation of the human genome. *Nature Genetics*, 37(7), 727–732.

Vail, D. M., & Macewen, E. G. (2000). Spontaneously Occurring Tumors of Companion Animals as Models for Human Cancer. *Cancer Investigation*, 18(8), 781–792.

Van Allen, E. M., Wagle, N., Stojanov, P., Perrin, D. L., Cibulskis, K., Marlow, S., & Garraway, L. A. (2014). Whole-exome sequencing and clinical interpretation of formalin-fixed, paraffin-embedded tumor samples to guide precision cancer medicine.

Varghese, F., Bukhari, A. B., Malhotra, R., & De, A. (2014). IHC Profiler: an open

source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PloS One*, 9(5), e96801.

Vascellari, M., Baioni, E., Ru, G., Carminato, A., & Mutinelli, F. (2009). Animal tumour registry of two provinces in northern Italy: incidence of spontaneous tumours in dogs and cats. *BMC Veterinary Research*, 5.

Velculescu, V. E., Madden, S. L., Zhang, L., Lash, A. E., Yu, J., Rago, C. & Kinzler, K. W. (1999). Analysis of human transcriptomes. *Nature Genetics*, 23(4), 387-388.

Vera, J. C., Wheat, C. W., Fescemyer, H. W., Frilander, M. J., Crawford, D. L., Hanski, I., & Marden, J. H. (2008). Rapid transcriptome characterization for a nonmodel organism using 454 pyrosequencing. *Molecular Ecology*, 17(7), 1636–1647.

Voelkerding, K. V, Dames, S. A., & Durtschi, J. D. (2009). Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical Chemistry*, 55(4), 641–658.

Vos, J.H., van den Ingh, T.S-, Misdorp, W., Molenbeek, R.F., van Mil, F.N., Rutteman, G.R., Ivanyi, D., Ramaekers, F.C. (1993). Immunohistochemistry with keratin, vimentin, desmin, and alpha-smooth muscle actin monoclonal antibodies in canine mammary gland: malignant mammary tumours. *Veterinary Quarterly*, 15(3), 96-102.

Wang, C., Mitsuya, Y., Gharizadeh, B., Ronaghi, M., & Shafer, R. W. (2007). Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: Application to HIV-1 drug resistance. *Genome Research*, 17(8), 1195–1201.

- Wang, G., & Semenza, G. (1992). A Nuclear Factor Induced by Hypoxia via De Novo Protein Synthesis Binds to the Human Erythropoietin Gene Enhancer at a Site Required for Transcriptional Activation. *Molecular and Cellular Biology*, *12*(12), 5447–5454.
- Wang, R.-H., Li, C., Xu, X., Zheng, Y., Xiao, C., Zerfas, P. & Deng, C.-X. (2005). A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metabolism*, *2*(6), 399–409.
- Wang, W., Deng, Z., Hatcher, H., Miller, L. D., Di, X., Tesfay, L. & Torti, S. V. (2014). IRP2 regulates breast tumor growth. *Cancer Research*, *74*(2), 497–507.
- Wang, Z., Gerstein, M., & Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews. Genetics*, *10*(1), 57–63.
- Warren, R. A., Green, F. A., Stenberg, P. E., & Enns, C. A. (1998). Distinct saturable pathways for the endocytosis of different tyrosine motifs. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(27), 17056–17063.
- West, A. P., Bennett, M. J., Sellers, V. M., Andrews, N. C., Enns, C. A., & Bjorkman, P. J. (2000). Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*(49), 38135–38138.
- West, A. P., Giannetti, A. M., Herr, A. B., Bennett, M. J., Nangiana, J. S., Pierce, J. R., ... Bjorkman, P. J. (2001). Mutational analysis of the transferrin receptor reveals overlapping HFE and transferrin binding sites. *Journal of Molecular Biology*, *313*(2), 385–397.

- Wheeler, D. A., Srinivasan, M., Egholm, M., Shen, Y., Chen, L., McGuire, A. & Rothberg, J. M. (2008). The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing. *Nature*, 452(7189), 872–876.
- Williams, C., Pontén, F., Moberg, C., Söderkvist, P., Uhlén, M., Pontén, J. & Lundeberg, J. (1999). A High Frequency of Sequence Alterations Is Due to Formalin Fixation of Archival Specimens. *The American Journal of Pathology*, 155(5), 1467–1471.
- Williams, J., Elleman, T. C., Kingston, I. B., Wilkins, A. G., & Kuhn, K. A. (1982). The Primary Structure of Hen Ovotransferrin. *Eur. J. Biochem*, 122, 297-303 .
- Withrow, S. J., Vail, D. M., & Page, R. L. (2013). *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology*. Elsevier/Saunders.
- Wixom, R. L., Prutkin, L., & Munro, H. N. (1980). Hemosiderin: nature, formation, and significance. *International Review of Experimental Pathology*, 22, 193–225.
- Wu, K. J., Polack, A., & Dalla-Favera, R. (1999). Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science (New York, N.Y.)*, 283(5402), 676–679.
- Xu, L., Frederik, P., Pirollo, K. F., Tang, W.-H., Rait, A., Xiang, L.-M. & Chang, E. H. (2002). Self-Assembly of a Virus-Mimicking Nanostructure System for Efficient Tumor-Targeted Gene Delivery. *Human Gene Therapy*, 13(3), 469–481.
- Yamada, H., Chen, D., Monstein, H.-J., & Håkanson, R. (1997). Effects of Fasting on the Expression of Gastrin, Cholecystokinin, and Somatostatin Genes and of

Various Housekeeping Genes in the Pancreas and Upper Digestive Tract of Rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 231(3), 835–838.

Yang, D. C., Wang, F., Elliott, R. L., & Head, J. F. (2001). Expression of transferrin receptor and ferritin H-chain mRNA are associated with clinical and histopathological prognostic indicators in breast cancer. *Anticancer Research*, 21(1B), 541–549.

Yang, J., Goetz, D., Li, J.-Y., Wang, W., Mori, K., Setlik, D. & Barasch, J. (2002). An Iron Delivery Pathway Mediated by a Lipocalin. *Molecular Cell*, 10(5), 1045–1056.

Young, S. P., Bomford, A., & Williams, R. (1984). *The effect of the iron saturation of transferrin on its binding and uptake by rabbit reticulocytes*. *Biochem. J*, 219, 505-510.

Yu, W., Pirollo, K., Rait, A., Yu, B., Xiang, L., Huang, W. & Chang, E. (2004). A sterically stabilized immunolipoplex for systemic administration of a therapeutic gene. *Gene Therapy*, 11(19), 1434–1440.

Zak, O., & Aisen, P. (2003). Iron Release from Transferrin, Its C-Lobe, and Their Complexes with Transferrin Receptor: Presence of N-Lobe Accelerates Release from C-Lobe at Endosomal pH . *Biochemistry*, 42(42), 12330-12334.

Zappulli, V., Caliarì, D., Rasotto, R., Ferro, S., Castagnaro, M., & Goldschmidt, M. (2013). Proposed Classification of the Feline “Complex” Mammary Tumors as Ductal and Intraductal Papillary Mammary Tumors. *Veterinary Pathology*, 50(6), 1070–1077.

- Zappulli, V., De Zan, G., Cardazzo, B., Bargelloni, L., & Castagnaro, M. (2005). Feline mammary tumours in comparative oncology. *Journal of Dairy Research*, 72(S1), 98.
- Zappulli, V., Rasotto, R., Caliari, D., Mainenti, M., Peñ, L., Goldschmidt, M. H. & Zappulli, V. (2015). Prognostic Evaluation of Feline Mammary Carcinomas: A Review of the Literature. *Veterinary Pathology*, 5(1), 46–60.
- Zhang, P., Lehmann, B. D., Shyr, Y., & Guo, Y. (2017). The Utilization of Formalin Fixed-Paraffin-Embedded Specimens in High Throughput Genomic Studies. *International Journal of Genomics*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/1926304>
- Zhong, H., & Simons, J. W. (1999). Direct Comparison of GAPDH, β -Actin, Cyclophilin, and 28S rRNA as Internal Standards for Quantifying RNA Levels under Hypoxia. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 259(3), 523–526.
- Zolta`n Arany, Z., Huang, L. E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M. A. & Livingston, D. M. (1996). An essential role for p300CBP in the cellular response to hypoxia. *Cell Biology*, 93, 12969-12973 .

Ringraziamenti

Desidero ringraziare la Prof.ssa Zappulli per avermi fatto scoprire la passione per l'anatomia patologica veterinaria nei suoi vari aspetti e per avermi concesso numerose opportunità di ampliare le mie conoscenze su quest'ambito durante il percorso di studi e di tesi.

Un ringraziamento particolare va al Dr. Sammarco per avermi pazientemente seguito durante la realizzazione di questo lavoro e per i preziosi insegnamenti che mi ha trasmesso.

Un sentito ringraziamento va al Dr. Rensi per avermi insegnato ad usare le tecniche basilari di biologia molecolare e per avermi seguito e supportato durante l'ultima parte del progetto.

Un enorme grazie a tutto il gruppo di anatomia patologica del Dipartimento BCA, con particolar menzione della Prof.ssa Cavicchioli e dei tecnici Rossella, Enrico e Davide, senza i quali non sarei mai riuscito a completare tutto il lavoro svolto.

Un grazie a tutti gli amici che ho incontrato durante questi cinque anni frequentando il corso di Medicina Veterinaria, siete stati i migliori colleghi che potessero capitarmi.

Infine il ringraziamento più grande va ai miei genitori ed a mio fratello, siete le persone più preziose e senza di voi non sarei diventato chi sono ora.

Alessandro

