



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

“Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“ Φυσικά μοντέλα ζώων για γενετικά νοσήματα του ανθρώπου με έμφαση στον καρκίνο του μαστού.”

Καλλιόπη Ρουμελιώτη

A.M.: 20200995

ΑΘΗΝΑ

Δεκέμβριος 2022



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

“Ιατρική Γενετική: Κλινική και Εργαστηριακή Κατεύθυνση”

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

“Φυσικά μοντέλα ζώων για γενετικά νοσήματα του ανθρώπου με έμφαση στον καρκίνο του μαστού.”

Καλλιόπη Ρουμελιώτη

A.M.: 20200995

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Τζέτη Μαρία (Επιβλέπων)

Καθηγήτρια Γενετικής, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Αναστάσιος Μητράκος

Βιολόγος, PhD, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

Μυρτώ Πούλου

Βιοεπιστήμονας, PhD, Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ

ΑΘΗΝΑ

Δεκέμβριος 2022



HELLENIC REPUBLIC
**National and Kapodistrian
University of Athens**

— EST. 1837 —

School of Health Sciences

Department of Medicine

MASTER PROGRAM IN

“Medical Genetics: Clinic & Laboratory Direction”

MASTER THESIS

**“Natural animal models for human genetic diseases, with an
emphasis on breast cancer”**

Kalliopi Roumelioti

Student ID Number: 2020099

Examining Board Members

Maria Tzetsis (Supervisor)

Professor, Medical Genetics, University of Athens

Anastasios Mitrakos

Phd, Medical Genetics, University of Athens

Mirto Poulou

Phd, Medical Genetics, University of Athens

Athens, December, 2022

© [2022]

Ιατρική Σχολή Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (ΕΚΠΑ)

[Ρουμελιώτη Καλλιόπη, Κτηνίατρος]

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία, η οποία εκπονήθηκε στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. “ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ: ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ” αποτελεί συνιδιοκτησία του ΕΚΠΑ και της φοιτήτριας, η καθεμία από τις οποίες έχει το δικαίωμα ανεξάρτητης χρήσης και αναπαραγωγής τους (στο σύνολο ή τμηματικά) για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, σε κάθε περίπτωση αναφέροντας τον τίτλο και την συγγραφέα και το ΕΚΠΑ όπου εκπονήθηκε η Διπλωματική Εργασία καθώς και τον Επιβλέποντα και την άλλα μέλη της Εξεταστικής Επιτροπής.



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

ΒΕΒΑΙΩΣΗ ΕΚΠΟΝΗΣΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

«Δηλώνω υπεύθυνα ότι η συγκεκριμένη Διπλωματική Εργασία με τίτλο:

[Φυσικά μοντέλλα ζώων για γενετικά νοσήματα του ανθρώπου με έμφαση στον καρκίνο του μαστού.]

για τη λήψη του μεταπτυχιακού τίτλου σπουδών του Π.Μ.Σ. “ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ:ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ”, της Ιατρικής Σχολής του ΕΚΠΑ, έχει συγγραφεί από εμένα προσωπικά και δεν έχει υποβληθεί ούτε έχει εγκριθεί στο πλαίσιο κάποιου άλλου μεταπτυχιακού ή προπτυχιακού τίτλου σπουδών, στην Ελλάδα ή στο εξωτερικό.

Η εργασία αυτή αντιπροσωπεύει τις προσωπικές μου απόψεις επί του θέματος.

Κατά τη συγγραφή, ακολούθησα την πρόπουσα ακαδημαϊκή δεοντολογία. Οι πηγές στις οποίες ανέτρεξα για την εκπόνηση της συγκεκριμένης διπλωματικής αναφέρονται στο σύνολό τους, δίνοντας πλήρεις αναφορές στους συγγραφείς, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Έχω επίσης αποφύγει οποιαδήποτε ενέργεια που συνιστά παράπτωμα λογοκλοπής. Γνωρίζω ότι η λογοκλοπή μπορεί να επισύρει ποινή ανάκλησης του πτυχίου μου.

Σε κάθε περίπτωση, αναληθούς ή ανακριβούς δηλώσεως, υπόκειμαι στις συνέπειες που προβλέπονται στον Κανονισμό Σπουδών του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών στην “ΙΑΤΡΙΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ:ΚΛΙΝΙΚΗ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ”, και στις διατάξεις που προβλέπει η Ελληνική και Κοινοτική Νομοθεσία περί πνευματικής ιδιοκτησίας».

Ο/Η ΔΗΛΩΝ/ΟΥΣΑ

Υπογραφή:

Όνοματεπώνυμο: Ρουμελιώτη Καλλιόπη

Αριθμός Μητρώου:20200995

***Στους γιούς μου Ανέστη και Γιάννη που η ευτυχία τους αποτελεί
τον υπέρτατο σκοπό της ζωής μου.***

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η συγγραφή της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι το αποτέλεσμα μιας διαδρομής που ξεκίνησε με την εισαγωγή μου στο πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών της Ιατρικής Γενετικής. Ολοκληρώνοντας αυτόν τον κύκλο σπουδών πιστεύω ότι είμαι σε θέση να προσφέρω επάξια τις υπηρεσίες μου στο πεδίο της κτηνιατρικής επιστήμης.

Από καρδιάς θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου:

Στην κ.Μαρία Τζέτη Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής του Ε.Κ.Π.Α, επιβλέπουσα μου, για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου με την ανάθεση του θέματος της συγκεκριμένης διπλωματικής. Η ουσιαστική της καθοδήγηση και οι πολύτιμες συμβουλές της ήταν απαραίτητες για την διεκπεραίωση και την ολοκλήρωση της συγκεκριμένης εργασίας.

Στην κ.Ιωάννα Traeger Συνοδινού, Καθηγήτρια Γενετικής και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής του Ε.Κ.Π.Α, για την έγκριση της συμμετοχής μου στο πρόγραμμα μεταπτυχιακών σπουδών, δίνοντας μου τη δυνατότητα να λάβω την επιστημονική κατάρτιση που επιθυμούσα.

Στον κ. Μαθιό Μυλωνάκη Καθηγητή Παθολογίας Ζώων Συντροφιάς της Κτηνιατρικής Σχολής ΑΠΘ, ο οποίος χαιρέτησε με ενθουσιασμό και στήριξε την συμμετοχή μου στις συγκεκριμένες μεταπτυχιακές σπουδές.

Στον κ. Αναστάσιο Μητράκος, Βιολόγο, Ph-D, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τις χρήσιμες και εποικοδομητικές διορθώσεις και τις εύστοχες παρατηρήσεις του.

Στην κ. Μυρτώ Πούλου, Μοριακή Βιολόγο, PhD, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για τη συνεργασία και την συμβολή της στην έγκαιρη ολοκλήρωση της εργασίας.

Στον κ. Περικλή Μακρυθανάση, Επίκουρο Καθηγητή της ιατρικής γενετικής και στο Επιστημονικό και Προσωπικό του εργαστηρίου Ιατρικής Γενετικής για την υποστήριξη και τη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια των σπουδών

Στον κ. Γιώργο Μαντζιάρα κτηνίατρο, PhD, στενό συνεργάτη μου στο Ιατρείο Αναπαραγωγής Μικρών Ζώων, για τις επιστημονικές του υποδείξεις και εποικοδομητικές συμβουλές του στη συγγραφή της διπλωματικής. Επίσης, τον ευχαριστώ για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση του κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

Στους κτηνιάτρους Θεόδωρο Καφάση, Χρύσα Φραγκούλη και Δήμητρα Εξάρχου, συνεργάτες μου στο Κτηνιατρικό Κέντρο Πολυγώνου, για τη βοήθεια και συμβολή τους στην διεκπεραίωση των επαγγελματικών μου υποχρεώσεων ώστε να είναι δυνατή η συγγραφή και ολοκλήρωση της διπλωματικής εργασίας.

Στον σύζυγό μου Ιωάννη Δημητρέλο, που υποστηρίζει κάθε προσπάθεια μου με υπομονή και αγάπη.

Περιεχόμενα

| | |
|--|----|
| ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ | 7 |
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ | 10 |
| ABSTRACT | 12 |
| ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ | 13 |
| ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ..... | 16 |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ..... | 18 |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ..... | 19 |
| 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ | 20 |
| 1.1.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ | 24 |
| 1.1.1 Τα επιτεύγματα των βιολογικών επιστημών | 24 |
| 1.1.2 Συγκριτική γονιδιωματική (Comparative Genomics) | 26 |
| 1.1.3 Η μοριακή εξέλιξη (molecular evolution)..... | 27 |
| 1.1.4 Συγκριτική ογκολογία | 28 |
| 1.1.5 Μέθοδοι εύρεσης γονιδίων υπεύθυνων για κοινές γενετικές ασθένειες ζώων και ανθρώπων..... | 29 |
| 1.1.5.1 Η ανάλυση σύνδεσης, η παλαιότερη μέθοδος γενετικής ανάλυσης..... | 30 |
| 1.1.5.2 Genome-wide association studies (Μελέτες συσχέτισης όλου του γενώματος)..... | 31 |
| 1.1.6.Μοντέλα ζώων που χρησιμοποιούνται στη μελέτη των γενετικών νοσημάτων του ανθρώπου. | 33 |
| 2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ..... | 37 |
| 3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ | 38 |
| 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ | 39 |
| 4.1. Ο σκύλος ως φυσικό μοντέλο στη μελέτη γενετικών νοσημάτων του ανθρώπου | 39 |
| 4.1.1 Η δημιουργία των φυλών και η σημασία τους στη γενετική..... | 39 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.2 Η σύγκριση του γενώματος του σκύλου και του ανθρώπου | 40 |
| 4.2 Η γάτα ως φυσικό μοντέλο στη μελέτη γενετικών νοσημάτων του ανθρώπου | 45 |
| 4.2.1 Η δημιουργία των φυλών και η σημασία τους στη γενετική..... | 45 |
| 4.2.2 Η σύγκριση του γενώματος της γάτας και του ανθρώπου | 46 |
| 4.3 Γονιδιακές θεραπείες σε γενετικές ασθένειες..... | 49 |
| 4.4 Ο σκύλος και η γάτα φυσικά μοντέλα μελέτης του καρκίνου του μαστού του ανθρώπου | 52 |
| 4.4.1 Ο καρκίνος του μαστού στη σύγχρονη εποχή | 52 |
| 4.4.2.Κριτήρια επιλογής του σκύλου και της γάτας ως φυσικά μοντέλα μελέτης του καρκίνου του μαστού | 54 |
| 4.4.2.1 Επιδημιολογικά στοιχεία εμφάνισης του καρκίνου του μαστού στα ζώα | 54 |
| 4.4.2.2 Σχετική ηλικία, φύλο και φυλή εμφάνισης του καρκίνου του μαστού. | 54 |
| 4.4.2.3 Διατροφή και περιβάλλον ως επιβαρυντικοί παράγοντες στην εμφάνιση του καρκίνου του μαστού | 56 |
| 4.4.2.4 Ο ρόλος των ορμονών στην δημιουργία του καρκίνου του μαστού | 57 |
| 4.4.2.4.1. Ανατομία και φυσιολογία των μαστικών αδένων των θηλαστικών. | 57 |
| 4.4.2.4.2 Φυσιολογία του αναπαραγωγικού συστήματος των θηλαστικών. | 60 |
| 4.4.2.4.3 η ορμονική εξάρτηση του καρκίνου του μαστού στα θηλαστικά | 63 |
| 4.4.2.5 Διάγνωση και σταδιοποίηση της νόσου..... | 64 |
| 4.4.2.5.1 Κλινική και ιστολογική ταξινόμηση του νοσήματος..... | 64 |
| 4.4.2.5.2 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού | 68 |
| 4.4.2.5.3 Η μελέτη των υποδοχέων, των γονιδίων, των αυξητικών παραγόντων και γενικότερα των μοριακών δεικτών στον καρκίνο των μαστικών αδένων του σκύλου και της γάτας..... | 76 |
| 4.5.Θεραπευτικές προσεγγίσεις του καρκίνου του μαστού. | 86 |
| 4.5.1 Ο σκύλος και η γάτα ως φυσικό μοντέλο μελέτης θεραπευτικών πρωτοκόλλων | 86 |
| 4.5.2 Οι σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις για τον καρκίνο των μαστικών αδένων του σκύλου και της γάτας | 89 |
| 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ | 92 |
| 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 103 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στη σύγχρονη εποχή, με την ανακάλυψη νέων τεχνικών μελέτης του γονιδιώματος του ανθρώπου, δίνεται η δυνατότητα διάγνωσης και σε κάποιες περιπτώσεις, ακόμη και θεραπείας γενετικών νοσημάτων, μεταξύ των οποίων ιδιαίτερη θέση κατέχει ο καρκίνος του μαστού, ασθένεια με υψηλό ποσοστό θνησιμότητας και νοσηρότητας. Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η υποστήριξη και η ενίσχυση του ρόλου των κατοικίδιων, σκύλος (*Canis Lupus Familiaris*) και γάτα (*Felis Catus*), ως φυσικά μοντέλα μελέτης που συμμετέχουν όλο και περισσότερο στα ερευνητικά προγράμματα που εκπονούνται παγκοσμίως προς αυτή την κατεύθυνση.

Οι πληροφορίες αντλούνται από τη σχετική βιβλιογραφία και αρθρογραφία αλλά και από το διαδίκτυο. Συγκεκριμένα, υφίσταται δυνατότητα ανοικτής ηλεκτρονικής πρόσβασης σε πλατφόρμες καταγραφής των αποτελεσμάτων ερευνητικών προγραμμάτων, καθώς και σε ενημερωτικές ιστοσελίδες που διαθέτουν διεθνείς οργανισμοί και πανεπιστημιακά ιδρύματα που ασχολούνται με τα γενετικά νοσήματα αλλά και με τον καρκίνο του μαστού. Η συγκριτική μελέτη των γενωμικών διαταραχών και των μοριακών μονοπατιών που οδηγούν στη γένεση και στην εξέλιξη των παραπάνω ασθενειών, η ανταπόκριση σε υπό δοκιμή θεραπευτικά σχήματα και η μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν τη ανταπόκριση στη θεραπεία, τεκμηριώνουν τη χρησιμότητα των αυθόρμητων προς μελέτη ζώων, σκύλος, γάτα.

Με βάση τα παραπάνω, η ιδιαίτερη αρχιτεκτονική του γενώματός τους, και η ομολογία που παρουσιάζει με τον άνθρωπο, διευκολύνει τη μελέτη γενετικών νοσημάτων (Stephen J. et.al 2002). Επίσης, η μελέτη των φαινοτυπικών εκδηλώσεων των ασθενειών σε πληθυσμούς οικογενειών ζώων με γενετική ομοιομορφία, οδήγησε στην ανακάλυψη υποψήφιων γενετικών τόπων που ενοχοποιούνται για τις υπεύθυνες για το νόσημα, παραλλαγές (Van Steenbeek FG et.al.2016).

Οι κοινές συνθήκες διαβίωσης και διατροφής μεταξύ του ανθρώπου και των κατοικίδιων διευρύνουν το πεδίο μελέτης συμπεριλαμβάνοντας και τον περιβαλλοντικό παράγοντα, επιτρέποντας την ολιστική προσέγγιση στο στάδιο της διάγνωσης, της πρόληψης και της θεραπείας. Επίσης οι μελέτες ασφάλειας και αποτελεσματικότητας των υπό έγκριση φαρμακευτικών ουσιών, με ενδιάμεσο αποδέκτη τον σκύλο και τη γάτα, έχουν ως αποτέλεσμα την ταχεία έγκρισή τους και διάθεσή τους στην αγορά (Shearin AL et al.2010).

Η συμμετοχή των κατοικίδιων ζώων που εμφανίζουν φυσικά την γενετική ασθένεια, είναι πλήρως εναρμονισμένη με την απαίτηση του κοινωνικού συνόλου για την ανακάλυψη των προγνωστικών εκείνων δεικτών, που έχουν ως αποτέλεσμα τον ολοκληρωμένο προγεννητικό έλεγχο, τη λήψη κατάλληλων προληπτικών μέτρων για μείωση της πιθανότητας μελλοντικής νόσησης και τέλος του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος. Οι έρευνες, για την επίτευξη του παραπάνω στόχου πραγματοποιούνται χωρίς να θίγεται η ευζωία τους, ενώ οι κτηνιατρικοί ασθενείς επωφελούνται αυξάνοντας την πιθανότητα επιβίωσης και βελτιώνοντας την ποιότητα ζωής τους.

Δήλωση επιστημονική περιοχής: Ιατρική γενετική

Λέξεις κλειδιά: γενετικά νοσήματα, ζώα, καρκίνος μαστού

ABSTRACT

Nowadays, with the discovery of new techniques for studying the human genome, it is possible to diagnose and, in some cases, even treat genetic diseases, among which breast cancer has a special importance, a disease with a high rate of mortality and morbidity. The object of this study is to support and enhance the role of pets, dog (*Canis Lupus Familiaris*) and cat (*Felis Catus*) as natural study models that are increasingly involved in research projects worldwide in this direction.

Information is extracted from the relevant literature and articles. In particular, there is the possibility of open electronic access to platforms that record the results of research programs, as well as information websites held by international organizations and universities dealing with genetic diseases and breast cancer. The comparative study of genomic lesions and molecular pathways leading to the genesis and progression of the above diseases, the response to experimental trial treatment regimens and the study of factors that affect the response to treatment, document the usefulness of studying the same disease process in animals such as dogs and cats.

Based on the above, the particular architecture of their genome, and the homology it presents with humans, facilitates the study of genetic diseases (Stephen J. et al.2002). Also, the study of the phenotypic manifestations of diseases in populations of families of animals with genetic uniformity led to the discovery of candidate genetic sites responsible for the disease mutations (Van Steenbeek FG et.al.2016).

Common living and feeding conditions between humans and pets broaden the scope of study by including the environmental factor, allowing for a holistic approach to the diagnosis, prevention, and treatment stage. In addition, studies on the safety and efficacy of authorized medicinal products, given to dogs and cats, have resulted in a more rapid approval. (Shearin AL et.al.2010).

The study of domestic animals naturally affected by genetic disease is fully in line with the societal demand for the discovery of prognostic markers, resulting in comprehensive testing, appropriate preventive measures to reduce the likelihood of future disease and finally the appropriate treatment regimen. In order to achieve the above objective, research is carried out without compromising their well-being, while veterinary patients benefit by increasing their chance of survival and improving their quality of life.

Scientific Field: Medical Genetic, Key Word: genetic diseases, animals' mammary tumors

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

| Ξενόγλωσσος όρος | Ελληνικός Όρος |
|---|--|
| Antibody-drug conjugates | Σύμπλεγμα αντισώματος- φαρμάκου |
| Candidate Gene Association Studies | Μελέτη συσχέτισης υποψήφιου γονιδίου |
| Canis lupus familiaris | Κύων ο Λύκος ο οικείος (Σκύλος) |
| Cell line-derived xenograft | Ξενομόσχευμα από κυτταρική γραμμή |
| Clinical Exome Sequencing | Αλληλούχιση όλων των εξονίων γονιδίων με γνωστή κλινική σημασία |
| Comparative Genomics | Συγκριτική γονιδιωματική |
| Comparative Oncology | Συγκριτική Ογκολογία |
| Copy number variants | Παραλλαγές αριθμού αντιγράφων |
| Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats associated protein 9 | Σύστημα συστάδων τακτικά διατεταγμένων βραχέων παλινδρομικών επαναληπτικών αλληλουχιών με συνδεόμενη την πρωτεΐνη Cas -9 |
| Disease free survival | Χρόνος επιβίωσης ελεύθερο νόσησης |
| Diversity | Γενετική ποικιλομορφία |
| Estrogen receptors | Υποδοχείς οιστρογόνου |
| Estrogen Growth Factor Receptor | Υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα οιστρογόνων |
| Federation of American Societies for Experimental Biology | Ομοσπονδία Αμερικάνικων Εταιρειών για τη Πειραματική Βιολογία |
| Food and Drug Administration | Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων |
| Felis catus | Αίλουρος, η Γαλή (Γάτα) |
| Gene editing | Μηχανική γονιδιώματος |
| Gene targeting | Γονιδιακή στόχευση |

| | |
|--|--|
| Genetically Engineered Mouse Model | Γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ποντικού |
| Genome Wide Association Studies | Μελέτες σύνδεσης σε όλο το γονιδίωμα |
| Growth Hormone Receptor | Υποδοχέας της αυξητικής ορμόνης |
| Heat-shock proteins | Πρωτεΐνες θερμικού σοκ |
| Inbreeding | Αναπαραγωγή μεταξύ ατόμων με στενή συγγενική σχέση |
| Insulin-like growth factor-I receptor | Υποδοχέας του παρόμοιου με την ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα I |
| Linkage equilibrium | Ισορροπία σύνδεσης |
| Linkage Disequilibrium | Ανισορροπία σύνδεσης |
| Lobular Carcinoma in Situ | Λοβιακό καρκίνωμα επί τόπου |
| Luminal | Αυλικός |
| Matrix metalloproteinases | Μεταλλοπρωτεϊνάση θεμέλιας ουσίας. |
| Molecular Evolution | Μοριακή εξέλιξη |
| MUC1 | Βλεννίνη 1 |
| National Cancer Institute's Center for Cancer Research | Εθνικό Κέντρο Έρευνας για τον καρκίνο |
| Next Generation Sequencing | Αλληλούχιση νέας γενιάς |
| One Health | Ενιαία Υγεία |
| Outbreeding | Αναπαραγωγή μεταξύ ατόμων με μη συγγενική σχέση |
| Overall survival | Ολικός χρόνος επιβίωσης |
| Patient derived xenograft | Ξενομόσχευμα προερχόμενο από ασθενή |
| Pedigree | Γενεαλογικοί χάρτες |
| Phosphatase and Tensin homolog | Ομόλογο στη Φωσφατάση και τη Τενσίνη |

| | |
|--|---|
| Polygenic Score | Πολυγονιδιακός Δείκτης |
| Proliferating Cell Nuclear Antigen | Πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων |
| Progesterone Receptors | Υποδοχείς προγεστερόνης |
| Referral Center for Animal Models of Human Genetic Disease | Κέντρο Παραπομπής, Παρακολούθησης Ζωικών Μοντέλων Για Ανθρώπινα Γενετικά Νοσήματα |
| Short Tandem Repeats | Μικρού μεγέθους τυχαίες επαναλήψεις |
| Transcription Activator-Like Effector Nuclease | Ενισχυτικοί παράγοντες προσομοίωσης μεταγραφής |
| Terminal duct lobular units | Λοβιακή μονάδα του τερματικού πόρου |
| Tumor-Infiltrating Lymphocytes | Λεμφοκύτταρα τα οποία διηθούν τη νεοπλασία |
| Vascular endothelial growth factor | Αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας |
| Whole Exome Sequencing | Αλληλούχιση όλων των εξονίων |
| Whole Genome Sequencing | Αλληλούχιση όλου του γονιδιώματος |
| World Health Organization | Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας |
| Zinc Finger Nucleases | Νουκλεάσες δακτύλων ψευδαργύρου |

ΠΙΝΑΚΑΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΩΝ

| Ξενογλωσσες συντομογραφίες | |
|-----------------------------------|--|
| ADC | Antibody-Drug Conjugates |
| AJCC | American Joint Committee on Cancer |
| CDX | Cell line-Derived Xenograft |
| COP | Comparative Oncology Program |
| COX-2 | Cyclo-oxygenase-2 |
| CRISPR Cas -9 | Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats associated protein 9 |
| DFS | Disease Free Survival |
| EGFR | Epidermal Growth Factor Receptor |
| E R | Estrogen receptor |
| FDA | Food and Drug Administration |
| GEMM | Genetically Engineered Mouse Model |
| GHR | Growth Hormone Receptor |
| GWAS | Genome Wide Association Studies |
| IGF-IR | Insulin-like growth factor-I receptor |
| LCIS | Lobular Carcinoma In Situ |
| LD | Linkage Disequilibrium |
| MMP | Matrix metalloproteinases |
| NCBI | National Center of Biotechnology Information |
| NGS | Next Generation Sequencing |
| OMIA | Online Mendelian Inheritance in Animals |
| OS | Overall Survival |
| PCNA | Proliferating Cell Nuclear Antigen |
| PDX | Patient derived xenograft |

| | |
|--------------|---|
| PR | Progesterone Receptors |
| PTEN | Phosphatase and tensin homolog |
| RCAM | Referral Center for Animal Models of Human Genetic Disease |
| SLx | Sialyl Lewis x |
| SNP | Single nucleotide polymorphism |
| SNV | Single nucleotide variants |
| STRs | Short tandem repeats |
| TALEN | Transcription Activator-Like Effector Nuclease |
| TDLU | Terminal duct lobular units |
| TILs | Tumor-Infiltrating Lymphocytes |
| VEGF | Vascular Endothelial Growth Factor |
| WES | Whole Exome Sequencing |
| WGS | Whole Genome Sequencing |
| ZFNs | Zinc Finger Nucleases |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

| | |
|---|----|
| Πίνακας 1.1 [Επισκόπηση των κύριων γονιδιωματικών προσεγγίσεων που χρησιμοποιούνται για τον εντοπισμό μιας παραλλαγής] | 30 |
| Πίνακας 4.1 [Συνοπτική στατιστική σύγκριση των γενωμάτων αναφοράς του σκύλου] | 42 |
| Πίνακας 4.2 [Συγκεντρωτικός αριθμός των γενετικών νοσημάτων των θηλαστικών] | 47 |
| Πίνακας.4.3.1 [Γενετικά νοσήματα σκύλου και της γάτας κοινά με του Ανθρώπου] | 48 |
| Πίνακας.4.3.2 [Γενετικά νοσήματα σκύλου και της γάτας κοινά με του Ανθρώπου] | 49 |
| Πίνακας.4.4 [Γονιδιακές θεραπείες στους σκύλους, σε γενετικά νοσήματα του ανθρώπου] | 51 |
| Πίνακας 4.5 [Αντιστοίχιση χρονολογικής ηλικίας σκύλου – ανθρώπου] | 55 |
| Πίνακας 4.6. [Σύστημα κλινικής κατηγοριοποίησης, του καρκίνου του μαστού στον σκύλο] | 65 |
| Πίνακας 4.7 [Σύστημα κλινικής κατηγοριοποίησης ταξινόμησης του καρκίνου του μαστού στη γάτα] | 65 |
| Πίνακας 4.8 [Ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού των κατοικίδιων ζώων] | 67 |
| Πίνακας 4.9 [Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο] | 73 |
| Πίνακας 4.10 [Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού στον σκύλο] | 74 |
| Πίνακας 4.11 [Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού στη γάτα] | 75 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

| | |
|---|----|
| Εικόνα 1.1 [Εκτιμώμενος αριθμός ατόμων νοσούντων, θανούντων από καρκίνο το 2022] | 23 |
| Εικόνα 1.2 [Χρονοδιάγραμμα της αλληλούχισης του γονιδιώματος των θηλαστικών] | 26 |
| Εικόνα 4.1 [Καρυότυπος του Σκύλου (Canis Lupus Familiaris)] | 41 |
| Εικόνα 4.2 [Σύγκριση της χαρτογράφησης των SNPs σε σκύλο και σε άνθρωπο] | 43 |
| Εικόνα 4.3 [Σχηματική απεικόνιση του μαστικού αδένου] | 58 |
| Εικόνα 4.4 [Ανατομική απεικόνιση των μαστικών αδένων των θηλαστικών και της ανάπτυξης των γαλακτοφόρων πόρων] | 59 |
| Εικόνα 4.5 [Απεικόνιση των κυτταρικών σειρών σε κάθε στάδιο ανάπτυξης του μαστικού αδένου στα θηλαστικά]. | 60 |
| Εικόνα 4.6 [Τα χαρακτηριστικά του καρκίνου Douglas Hanahan and Robert Weinberg,] | 70 |
| Εικόνα 4.7 [Το χρονικό διάστημα έγκρισης των φαρμακευτικών σκευασμάτων στον σκύλο είναι μικρότερο από του ανθρώπου] | 88 |
| Εικόνα 4.8 [Προτεινόμενη προσέγγιση στην ανάπτυξη στοχευμένων αντινεοπλασματικών θεραπευτικών πρωτοκόλλων, με τη χρήση αυθόρμητων ζωϊκών μοντέλων] | 89 |

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα γενετικά νοσήματα είναι ιδιαίτερα σπάνια και προκύπτουν ουσιαστικά από τη συνδυασμένη δράση των γονιδίων και του περιβάλλοντος, με τη γενετική συμβολή να είναι μικρότερη ή μεγαλύτερη. Ανάλογα με την συνεισφορά των γενετικών παραγόντων χωρίζονται σε χρωμοσωμικά, μονογονιδιακά και πολυγονιδιακά ή πολυπαραγοντικά. (Thompson et al.2016.) Τα γενετικά νοσήματα των δύο πρώτων κατηγοριών υπολογίζονται περί τα 7.000 σε αριθμό, με επιπολασμό μικρότερο από 1/500 ή 1/1000, υπάρχουν δηλαδή ασθένειες που αντιστοιχούν σε πολύ μικρό αριθμό νοσούντων στον πληθυσμό, με αποτέλεσμα οι ερευνητές να αντιμετωπίζουν σημαντικές δυσκολίες στη μελέτη τους. Αν λάβουμε υπόψιν μας ότι το 45% των σπάνιων γενετικών ασθενειών αφορούν παιδιά, 30% εκ των οποίων πεθαίνουν στα 5 πρώτα έτη της ζωής τους, ενώ τα γενετικά νοσήματα που εμφανίζονται στην ενήλικη ζωή έχουν δυσμενή πρόγνωση, αντιλαμβανόμαστε την κοινωνική ευθύνη για πρόληψη, θεραπεία και διαχείριση τους.

Πολυγονιδιακά νοσήματα τα οποία εμφανίζονται λόγω μοριακών διαταραχών σε περισσότερα του ενός γονίδια και την επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων αποτελούν την πλειοψηφία των γενετικών νοσημάτων. Αυτά δεν οφείλονται σε διαταραχή ενός μεμονωμένου γενετικού τόπου αλλά σε συνδυασμό πολλών παραγόντων, συμπεριλαμβανομένου και του περιβάλλοντος. Έτσι μια παραλλαγή μπορεί να προστατεύει ή να λειτουργεί σε συνέργεια με άλλες γενετικές παραλλαγές ή άλλους περιβαλλοντικούς παράγοντες με ή χωρίς κλινική εκδήλωση. Εκτιμάται ότι στο 5% του παιδιατρικού πληθυσμού τίθεται διάγνωση πολυγονιδιακού νοσήματος, ενώ στον γενικό πληθυσμό το ποσοστό αυτό ανέρχεται στο 60%.

Ένα από τα σημαντικότερα γενετικά νοσήματα που ανήκουν στην παραπάνω κατηγορία είναι ο καρκίνος. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, υπολογίζεται ότι το 2022 θα πεθάνουν από καρκίνο 609.360 άνθρωποι, ποσοστό που αναλογεί σε 1700 θανάτους την ημέρα και αποτελεί τη δεύτερη αιτία θανάτου (<https://www.cancer.org/annual-cancer-facts-and-figures/2022>). Στις γυναίκες ο καρκίνος του μαστού παρουσιάζει το μεγαλύτερο ποσοστό νοσηρότητας (με ετήσια αύξηση 0.5%) αλλά και θνησιμότητας μετά τον καρκίνο του πνεύμονα, σε ποσοστό 15% (**Εικόνα 1.1**). Αντιμετωπίζεται ως νόσημα με τεράστιο κοινωνικό κόστος με αποτέλεσμα η επιστημονική κοινότητα να εργάζεται με στόχο τη λήψη κατάλληλων μέτρων πρόληψης και παράλληλα την ανακάλυψη εξατομικευμένων θεραπευτικών ή “ανακουφιστικών” πρωτοκόλλων.

Στο παραπάνω πλαίσιο, η έρευνα στρέφεται στην αιτιολογική ανίχνευση, στην κατανόηση της παθοφυσιολογίας, στην μελέτη της κλινικής εκδήλωσης καθώς και στη διερεύνηση των μοριακών οδών πρόκλησης του καρκίνου του μαστού.

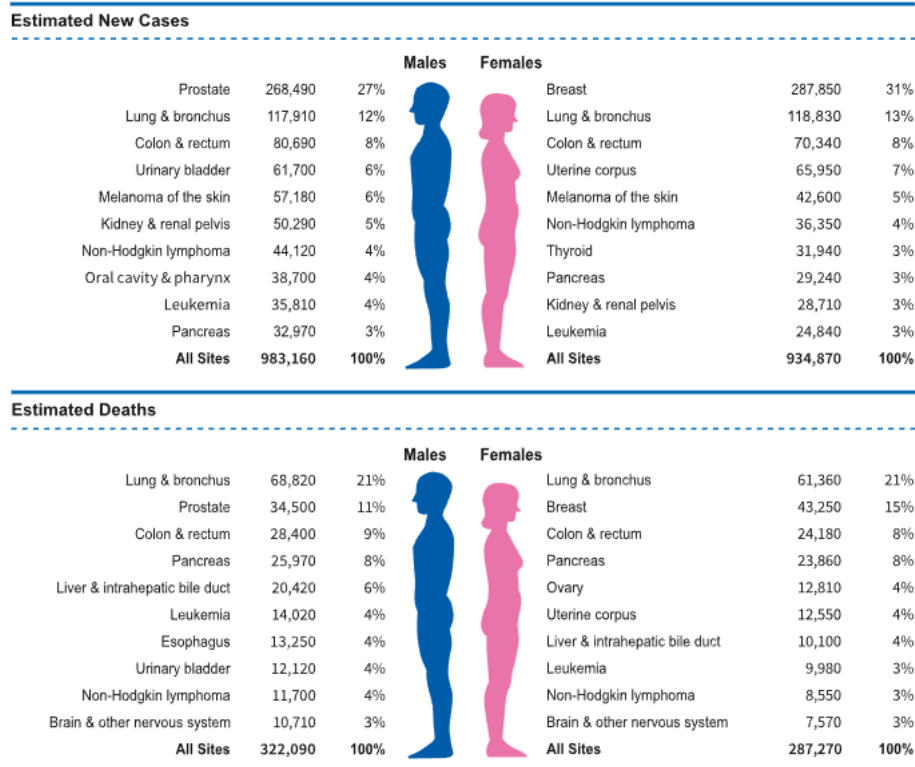
Η συνεχής ανάπτυξη στον τομέα της μοριακής βιολογίας ανέδειξε την καρκινογένεση ως μια εξαιρετικά πολύπλοκη διαδικασία με διαδοχικές παραλλαγές στο γενετικό υλικό σωματικών ή και γαμετικών κυττάρων. Οι παραλλαγές αφορούν κυρίως ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια και γονίδια επιδιόρθωσης βλαβών του DNA. Το 1% του ανθρώπινου γονιδιώματος εμπλέκεται στην προδιάθεση και στην ανάπτυξη του καρκίνου.

Με άξονα το γενετικό υπόβαθρο του καρκίνου, δημιουργούνται καινούργια θεραπευτικά πρωτόκολλα με τη χρήση φαρμάκων όπως είναι οι αναστολείς της τυροσινικής κινάσης, τα μονοκλωνικά αντισώματα και ειδικά συμπλέγματα αντισώματος-φαρμάκου (antibody-drug conjugates). Στόχος είναι η μείωση της επέκτασης της βλάβης σε υγιές ιστούς, η μείωση της διάρκειας νόσησης και η βελτίωση της ποιότητας ζωής του ασθενή. Δυστυχώς το ποσοστό επιτυχίας από το προκλινικό στο κλινικό στάδιο είναι πολύ χαμηλό της τάξης του 3.4%. (Heem et al. 2019; Mak IWY et al. 2014). Αυτό μπορεί να αιτιολογηθεί εν μέρει, από την αδυναμία των εργαστηριακών μοντέλων ζώων να αναπαράγουν νοσήματα όπως ο καρκίνος. Έτσι οι έρευνητες στρέφονται προς την ανεύρεση καταλληλότερων μοντέλων ζώων. Τα φυσικά μοντέλα ζώων είναι εκείνα τα οποία θα εμφανίσουν αυθόρμητα την ασθένεια με την έως τώρα συμβολή τους στη μελέτη των νοσημάτων του ανθρώπου να είναι αδιαμφισβήτητη.

Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται σημαντική αύξηση της νόσησης και θνησιμότητας των κατοικίδιων ζώων που διαγνώσκονται με καρκίνο, με ορισμένες φυλές να παρουσιάζουν μεγαλύτερο επιπολασμό. (Withrow SJ, et al. 2007). Η αύξηση αυτή προκύπτει ως αποτέλεσμα είτε της πραγματικής αύξησης της συχνότητας του καρκίνου, είτε της εφαρμογής σε επίπεδο ρουτίνας εξελιγμένων απεικονιστικών τεχνικών και χρήσης προγνωστικών δεικτών. Παράλληλα, η αύξηση της ευαισθητοποίησης των ιδιοκτητών των κατοικίδιων ζώων και του ενδιαφέροντος για τις διαγνωστικές και θεραπευτικές επιλογές που παρέχει η κτηνιατρική επιστήμη, έδωσε την δυνατότητα μελέτης νεοπλασιών με υψηλή νοσηρότητα στα ζώα, όπως είναι το οστεοσάρκωμα, ο καρκίνος του μαστού και του προστάτη, το non-Hodgkin's λέμφωμα, το μελάνωμα, το σάρκωμα των μαλακών μορίων, ο καρκίνος του εγκεφάλου και του λαιμού, τα ιογενή λεμφώματα κ.α.

Το 1996 μια ομάδα κτηνιάτρων, ιατρών και άλλων επιστημόνων εκκίνησαν την εκπόνηση ενός ερευνητικού προγράμματος υπό την αιγίδα του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (World Health Organization, με κύριο σκοπό 'να αναδείξει ομοιότητες και διαφορές μεταξύ των όγκων σε οικόσιτα ζώα και ανθρώπους, παρέχοντας μια υγιή βάση για έρευνα στη συγκριτική ογκολογία γενικότερα και να ενισχύσει την σύγχρονη κτηνιατρική παθολογία'' (Beveridge and Sobin et.al 1974). Το 2003 το Εθνικό Κέντρο Έρευνας για τον καρκίνο (National Institute's Center for Cancer Research) προχώρησε στη δημιουργία ερευνητικού προγράμματος με αντικείμενο τη συγκριτική ογκολογία [Comparative Oncology Program (COP)] δηλαδή τη μελέτη αυθόρμητα αναπτυσσόμενων νεοπλασιών στα ζώα, με σκοπό να βοηθήσει τους ερευνητές να κατανοήσουν τη βιολογία του καρκίνου και να βελτιώσουν την αξιολόγηση της εφαρμογής καινούργιων αντικαρκινικών θεραπειών.

Με βάση τα παραπάνω και την πεποίθηση ότι για κάθε νόσημα αντιστοιχεί και ένα ιδανικό μοντέλο μελέτης "If we look carefully enough we will eventually find an ideal animal model for every disease" (Leader et.al,1969) Federation of American Societies for Experimental Biology», θα υποστηριχτεί στην παρούσα διπλωματική η χρησιμότητα του σκύλου και της γάτας ως φυσικά μοντέλα μελέτης για τα γενετικά νοσήματα και ιδιαίτερα για τον καρκίνο του μαστού, ασθένεια με αδιαμφισβήτητο γενετικό υπόβαθρο και κοινωνική βαρύτητα. Επιπρόσθετα θα αναδειχθεί η σημασία της συνεργασίας της γενετικής, ογκολογίας και κτηνιατρικής επιστήμης αναγνωρίζοντας τη σπουδαιότητα της «Ενιαίας Υγείας – One Health » και επιβεβαιώνοντας τα οφέλη που προκύπτουν τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα κατοικίδια σκύλος – γάτα.



Εικόνα 1.1 Εκτιμώμενος αριθμός ατόμων νοσούντων - θανόντων από καρκίνο το έτος 2022.

(<https://www.cancer.org/annual-cancer-facts-and-figures/2022>)

1.1.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Κρίνεται απαραίτητη η αναφορά στα επιτεύγματα των βιολογικών επιστημών, στη συγκριτική γενωμική και στον κλάδο της μοριακής εξέλιξης, σύντομη περιγραφή της μεθοδολογίας που ακολουθείται για τον εντοπισμό ενός γενετικού τόπου, η αναφορά στα πρότυπα μοντέλα ζώων που χρησιμοποιούνται για την έρευνα των γενετικών νοσημάτων και ιδιαιτέρως του καρκίνου του μαστού.

1.1.1 Τα επιτεύγματα των βιολογικών επιστημών

Σημαντικό ρόλο στην μελέτη των γενετικών νοσημάτων έχει προσφέρει η εφεύρεση τεχνολογιών υψηλής απόδοσης, με αποτέλεσμα να είναι πιο οικονομικά εφικτή και ταχεία η ανακάλυψη και ταυτοποίηση ομόλογων γονιδίων μεταξύ των ειδών.

Η πιο απλή και κλασσική εργαστηριακή μέθοδος διάγνωσης χρωμοσωμικών ανωμαλιών είναι ο *κλασσικός καρυότυπος*, κατά τον οποίο ανιχνεύονται αλλαγές στη δομή ή τον αριθμό των χρωμοσωμάτων. Η εφεύρεση του *Μοριακού Καρυότυπου* δίνει τη δυνατότητα ανάλυσης του γονιδιώματος σε μεγαλύτερη κλίμακα από τον κλασσικό καρυότυπο < 5-10 Mb, δίνοντας περισσότερες γενετικές πληροφορίες που ενδέχεται να συνδέονται με αρκετά νοσήματα.

Η αλληλούχιση νέας γενιάς, Next Generation Sequencing, σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα, δίνει τη δυνατότητα αλληλούχισης συγκεκριμένων εξωνίων, WES (Whole Exome Sequencing), ομάδα γονιδίων (gene panel sequencing), ανάλυσης συγκεκριμένων γονιδίων συνδεόμενων με το νόσημα (Clinical Exome Sequencing) (Behjati S, et al. 2013).

Επίσης, δίνεται η δυνατότητα αλληλούχισης ολόκληρου του γονιδιώματος WGS (Whole Genome Sequencing), συμπεριλαμβανομένων και των ιντρονίων, καθώς και η ανίχνευση πολυμορφισμών που μπορεί να μην σχετίζονται άμεσα με το νόσημα αλλά να δώσουν σημαντικά στοιχεία για την διερεύνηση της γενετικής ποικιλομορφίας.

Εξίσου σημαντική είναι και η πρόοδος στην βιοστατιστική και την βιοπληροφορική, επιστήμες οι οποίες είναι απαραίτητες για την σύνδεση συγκεκριμένου γενετικού τόπου με την φαινοτυπική εκδήλωση ενός νοσήματος. Έτσι εφαρμόζονται προγράμματα μελέτης συσχέτισης υποψήφιων γονιδίων (Candidate Gene Association Studies) και επιδημιολογικές μελέτες σύνδεσης που επεκτείνονται σε όλο το γονιδίωμα (Genome Wide Association Studies).

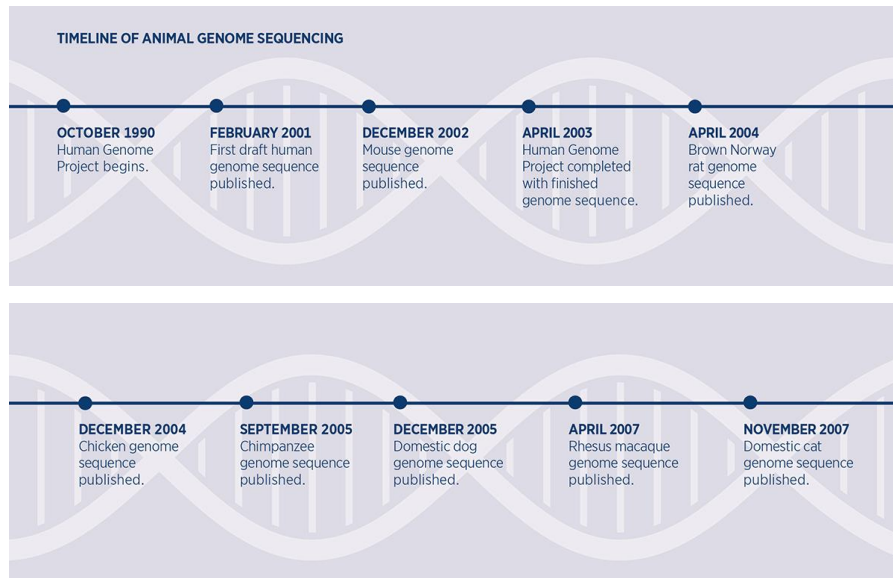
Συνεπώς, στις μέρες μας δίνεται η δυνατότητα να υλοποιηθούν γρήγορα και με χαμηλό σχετικά κόστος, πολλά προγράμματα ευρείας κλίμακας γενωμικής έρευνας που αφορούν τη μελέτη σπάνιων γενετικών

νοσημάτων. Έτσι το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας [National Institutes of Health (NIH)] τον Μάιο του 2008, στο πλαίσιο του προγράμματος “The Undiagnosed Diseases Program”, πραγματοποίησε την αλληλούχηση στο γονιδίωμα ασθενών οι οποίοι φέρουν μη διαγνωσμένα γενετικά νοσήματα, με αποτέλεσμα την επιτυχή διάγνωση 39 ασθενών στα πρώτα 2 χρόνια της ζωής τους. (Ashish R. Pinnareddy et al. 2015). Με τη χαρτογράφηση του γενώματος όλο και περισσότερων ατόμων είναι δυνατή η εφαρμογή και η αξιολόγηση των polygenic scores τα οποία, μέσω της γονοτύπησης σειράς μονονουκλεοτιδικών αλλαγών (SNPs), έχουν στόχο να δώσουν πληροφορίες για τα ποσοστά κινδύνου εμφάνισης ή κληρονομικής προδιάθεσης μια ασθένειας. Όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού το Εθνικό Ινστιτούτο για τον καρκίνο (National Cancer Institute) μεταξύ των άλλων πραγματοποιεί και ερευνητικά προγράμματα που αφορούν τη γενωμική ανάλυση των νεοπλασιών μεταξύ των οποίων και εκείνων που αφορούν τον μαστό.

Στο παραπάνω πλαίσιο, είναι δυνατή η χαρτογράφηση του γενετικού υλικού των οργανισμών και η επισήμανση ομοιοτήτων και διαφορών μεταξύ των ειδών, εμπλουτίζοντας τις γνώσεις μας για το ρόλο του στη φυσιοπαθολογία των γενετικών νοσημάτων .

Έτσι μετά την αλληλούχηση του ανθρώπινου γονιδιώματος, σταδιακά ακολούθησε η αλληλούχηση του γονιδιώματος του ποντικού (2002), του Brown Norway Rat (2004), της όρνιθας (2004), του χιμπαντζή (2005), του σκύλου (2005), του Rhesus macaque (2007), της κατοικίδιας γάτας (2007), της οικόσιτης αγελάδας (2009), του ίππου (2009), της οικόσιτης γαλοπούλας (2010), του ουρακοτάγκου (2011), του χοίρου (2012), και της οικόσιτης αίγας (2017) (<https://avmajournals.avma.org/>) (εικ.1.2)

Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται για αλληλούχηση συλλέγονται από πληθυσμούς διαφορετικών φυλών, ο αριθμός των οποίων πρέπει να είναι επαρκής ώστε να παρέχουν δείγματα αναφοράς για ανάλυση. Λαμβάνοντας υπόψη τη γενετική ποικιλομορφία, η συλλογή των δειγμάτων είναι μια δυναμική διαδικασία. Τα γονιδιώματα αναφοράς είναι για τον σκύλο το Dog10k_Boxer_Tasha_1.0 και για τη γάτα το Felis catus (assembly F.catus_Fca126_mat1.0) National Center of Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/?taxon=9615>).



Εικ.1.2 Χρονοδιάγραμμα της αλληλούχισης του γονιδιώματος των θηλαστικών. (American Veterinary Medical Association)

1.1.2 Συγκριτική γονιδιωματική (Comparative Genomics)

Όλοι οι οργανισμοί, τόσο αυτοί που ζουν σήμερα όσο και αυτοί που έζησαν κατά το παρελθόν, έχουν έναν κοινό πρόγονο που έζησε πριν από 4 δισεκατομμύρια χρόνια περίπου. Η συγκριτική γονιδιωματική (Comparative Genomics) περιλαμβάνει τις συγκρίσεις ανάμεσα στις αλληλουχίες ολόκληρων γονιδιωμάτων διαφορετικών ειδών, με σκοπό την ανακάλυψη ομοιοτήτων οι οποίες θα μας βοηθήσουν να κατανοήσουμε τη λειτουργία τους. Έτσι διαπιστώθηκε ότι οι αλληλουχίες με τη μεγαλύτερη λειτουργική σημασία για τον οργανισμό εξελίσσονται με βραδύτερο ρυθμό. Επομένως τα διαφορετικά τμήματα γονιδίων εξελίσσονται με πολύ διαφορετικούς ρυθμούς που αντανακλούν το βαθμό στον οποίο το καθένα από αυτά υπόκειται στην επίδραση της φυσικής επιλογής. Συνεπώς η ανακάλυψη ενός τμήματος του γονιδιώματος το οποίο εμφανίζει σημαντική ομοιότητα ανάμεσα σε δύο είδη με μακρινή συγγένεια μεταξύ τους, είναι ένδειξη της μεγάλης λειτουργικής του αξίας (Kerstin Lindblad-Toh et al. 2020).

Εκτός από τον διαφορετικό ρυθμό εξέλιξης που παρατηρείται μεταξύ γονιδιακών περιοχών σημαντική είναι η διαφορά εξέλιξης μεταξύ διαφορετικών γονιδίων ακόμα και εκείνων που ανήκουν στο ίδιο είδος. Η παραπάνω διαφορά μάλλον οφείλεται στη διαφορά της συχνότητας δημιουργίας παραλλαγών ή στον βαθμό που επηρεάζεται ο γενετικός τόπος από τη φυσική επιλογή. Η παραπάνω αιτιολογική διάκριση γίνεται μετά από επιστάμενες στατιστικές αναλύσεις. Έτσι η φυσική επιλογή ευνοεί την αύξηση του ρυθμού των μη συνώνυμων παραλλαγών για να υπάρχει και κάποιο εξελικτικό αποτέλεσμα. Συνεπώς η ποικιλότητα του ρυθμού αντικατάστασης θα πρέπει να οφείλεται σε μεγάλο βαθμό στη διαφορετική ένταση της πίεσης της φυσικής επιλογής (Leroy G, et.al 2009).

1.1.3 Η μοριακή εξέλιξη (molecular evolution)

Η μοριακή εξέλιξη είναι το γνωστικό πεδίο που αφορά τη μελέτη της εξέλιξης στο μοριακό επίπεδο, δηλαδή στο επίπεδο της αλληλουχίας του DNA και των πρωτεϊνών. Ως εκ τούτου η μοριακή εξέλιξη μελετά τα πολύ μεγάλα χρονικά διαστήματα που σχετίζονται με την γένεση των ειδών χρησιμοποιώντας γνώσεις και δεδομένα από το χώρο της οικολογίας, της γενετικής της εξελικτικής βιολογίας, της στατιστικής και της επιστήμης των υπολογιστών. Ο ρυθμός της μοριακής εξέλιξης μπορεί να μετρηθεί με τη σύγκριση αλληλουχιών DNA. Ο ρυθμός με τον οποίο μεταβάλλεται η νουκλεοτιδική αλληλουχία ποικίλει τόσο ανάμεσα στις διάφορες περιοχές ενός γονιδίου όσο και από γονίδιο σε γονίδιο. Έτσι διαπιστώθηκε ότι οι μηχανισμοί της εξέλιξης μπορούν να ενεργούν σε εκπληκτικά μικρή κλίμακα (Peter J.Russell et al., 2009).

Ένα τυπικό γονίδιο αποτελείται από τα εξόνια, περιοχές που κωδικοποιούν την αμινοξική αλληλουχία μιας πρωτεΐνης και από άλλα νουκλεοτίδια που δεν κωδικοποιούν αμινοξέα (μη κωδικές περιοχές). Στις μη κωδικές περιοχές περιλαμβάνονται τα ιντρόνια, οι περιοχές του υποκινητή, οι μη μεταφραζόμενες περιοχές στο 5' και 3' άκρο των γονιδίων (οι οποίες μεταγράφονται και δεν μεταφράζονται). Άλλες μη κωδικές αλληλουχίες στο γονιδίωμα είναι τα ψευδογονίδια, τα οποία είναι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που δεν παράγουν πια λειτουργική πρωτεΐνη λόγω απόκτησης πλήθους μοριακών διαταραχών. Ο ρυθμός μεταβολής διαφορετικών τμημάτων των γονιδίων των θηλαστικών είναι διαφορετικός.

Παρατηρήθηκε ότι στις κωδικές περιοχές των λειτουργικών γονιδίων που αντιστοιχούν σε συνώνυμες αλλαγές, ο ρυθμός μεταβολής τους είναι πέντε φορές μεγαλύτερος από ότι ο παρατηρούμενος αριθμός μη συνώνυμων αλλαγών.

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι συνώνυμες αλλαγές δεν επηρεάζουν την αμινοξική σύνθεση μιας πρωτεΐνης άρα και τη λειτουργικότητα της, ο υψηλός ρυθμός εξελικτικής αλλαγής τους είναι αναμενόμενος. Υψηλός αριθμός αντικαταστάσεων παρατηρείται και στα ιντρόνια αλλά σαφώς χαμηλότερος από εκείνος των προηγούμενων θέσεων. Αυτό συμβαίνει γιατί ενώ τα ιντρόνια δεν οδηγούν στη σύνθεση πρωτεΐνης, ορισμένες θέσεις είναι απαραίτητες για το σωστό μάτισμα. Επίσης το εναλλακτικό μάτισμα που προκαλείται από αλλαγές στην περιοχή των ιντρονίων μπορεί να οδηγήσει σε παραγωγή τροποποιημένων λειτουργικά πρωτεϊνών.

Χαμηλότεροι ρυθμοί εξελικτικής αλλαγής παρατηρούνται στην 5' με μεταφραζόμενη περιοχή ενός γονιδίου. Η περιοχή αυτή είναι σημαντική διότι περιέχει τον υποκινητή ενός γονιδίου και άλλα ρυθμιστικά στοιχεία της γονιδιακής έκφρασης. Ο χαμηλότερος ρυθμός αντικατάστασης νουκλεοτιδίων κατά την εξέλιξη παρατηρείται στις κωδικές αλληλουχίες και ειδικότερα σε θέσεις που προκαλούν μη συνώνυμες αντικαταστάσεις και οδηγούν σε αλλαγή στη δομή και στη λειτουργία μιας πρωτεΐνης. Ο υψηλότερος ρυθμός αντικατάστασης νουκλεοτιδίων αντιστοιχεί στα μη λειτουργικά ψευδογονίδια και οφείλεται στο γεγονός ότι πλέον δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Έτσι οποιαδήποτε αλλαγή στα γονίδια αυτά δεν προκαλεί αλλαγές στην προσαρμοστικότητα του οργανισμού και ως εκ τούτου δεν εξαλείφονται από τη φυσική επιλογή.

Συμπεραίνουμε λοιπόν ότι όσο πιο σημαντική είναι η λειτουργία ενός τμήματος ή και ολόκληρου του μακρομορίου, τόσο πιο αργός είναι ο ρυθμός εξέλιξης του, αφού οποιαδήποτε αλλαγή που επηρεάζει τη λειτουργικότητα του θα δέχεται την αρνητική πίεση της φυσικής επιλογής (P J.Russell et al. 2009).

1.1.4 Συγκριτική ογκολογία

Η συγκριτική ογκολογία και συγκεκριμένα η ογκογενωμική έχει στη διάθεση της τα εργαλεία εκείνα με τα οποία αξιολογείται και επιλέγεται το κατάλληλο μοντέλο ζώου για κάθε είδος καρκίνου. Οι πληροφορίες από την κλινικοπαθολογία αλλά και από την αλληλούχιση του γονιδιώματος, την ανάλυση της έκφρασης του mRNA έως και την ανάλυση της λειτουργίας, της ποσότητας και της μορφολογίας των πρωτεϊνών ενδο - και εξωκυτταρικά, χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό και την ανάλυση συγκεκριμένων γενετικών μοτίβων που είναι κοινά μεταξύ των οργανισμών. (Melissa C. Paoloni et al.2007).

1.1.5 Μέθοδοι εύρεσης γονιδίων υπεύθυνων για κοινές γενετικές ασθένειες ζώων και ανθρώπων.

Ο εντοπισμός παθολογικών διαταραχών σε μια συγκεκριμένη γενωμική περιοχή, συνδεδεμένης με την ασθένεια είναι αντικείμενο γενετικών μελετών. Όταν ένα γενετικό νόσημα σε ζώο χαρακτηρίζεται φαινοτυπικά και εμφανίζει παθοφυσιολογικές ομοιότητες με προηγούμενη ασθένεια του ανθρώπου, τότε το γονίδιο που έχει εντοπιστεί στον άνθρωπο χαρακτηρίζεται ως υποψήφιο γονίδιο. Εξαιτίας της προς το παρόν έλλειψης της αλληλούχισης του γενώματος αρκετών θηλαστικών, συντηρημένες αλληλουχίες του υποψήφιου γονιδίου χρησιμοποιούνται στα θηλαστικά για τον σχεδιασμό εκκινητών, (μικρός αριθμός νουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται για τον πολλαπλασιασμό του DNA). Αν και η μέθοδος έχει αποτελέσματα, δεν μπορεί να μην ληφθούν υπόψιν οι κίνδυνοι από μια τέτοια προσέγγιση. Η φαινοτυπική εκδήλωση μιας γενετικής ασθένειας σε διαφορετικά είδη θηλαστικών με κοινό βιοχημικό μονοπάτι, ενδεχομένως οφείλεται σε παραλλαγές διαφορετικών γονιδίων, με αποτέλεσμα να είναι πιθανή η επιλογή λάθος υποψήφιου προς ανάλυση γονιδίου.

Επιπλέον σε πολλές περιπτώσεις οι ασθένειες στους ανθρώπους δεν είναι αντίστοιχες με εκείνες των ζώων, όπως για παράδειγμα η περίπτωση της υποκαλιαϊμικής πολυμυοπάθειας της γάτας Βιρμανίας με ομοιότητες με την περιοδική υποκαλιαϊμική παράλυση του ανθρώπου. Στον **Πίνακα 1.1** γίνεται συνοπτική επισκόπηση των κύριων γονιδιωματικών προσεγγίσεων για τον εντοπισμό παραλλαγής (Barbara Gandolfi et al.2015)

Πίνακας 1.1 Επισκόπηση των κύριων γονιδιωματικών προσεγγίσεων για τον εντοπισμό μιας παραλλαγής (Barbara Gandolfi et al. 2015).

| Μέθοδος | Πλεονεκτήματα | Μειονεκτήματα |
|--------------------------------|--|--|
| Αλληλούχιση υποψήφιου γονιδίου | Γρήγορο, φθινό | Απαιτούνται προηγούμενες μελέτες στις οποίες η λειτουργία των γονιδίων και οι φαινότυποι έχουν περιγραφεί |
| Ανάλυση σύνδεσης | Ταυτοποιεί μεγάλες περιοχές σε σύνδεση με την απουσία γνωστών υποψηφίων γονιδίων | Χρειάζονται καλά χαρακτηρισμένα ως προς το νόσημα οικογενειακά δένδρα πολλών γενεών και αποτελέσματα σε μεγάλες περιοχές συσχέτισης. Μετά την ταυτοποίηση μιας περιοχής, ακολουθεί η ταυτοποίηση και αλληλούχιση του υποψήφιου γονιδίου. |
| Genome Wide association | Ταχεία ανάλυση. Περιοχή σύνδεσης για ασθένειες, εύρους 500 Kb έως 10 Mb | Ακριβή και χρονοβόρος διαδικασία. Απαιτεί επαρκή αριθμό δειγμάτων ασθενών και δειγμάτων αναφοράς για την έρευνα. Η λεπτομερής χαρτογράφηση μπορεί να είναι απαραίτητη και ακολουθείται από την αλληλούχιση υποψηφίων γονιδίων. |
| Genome Wide Sequencing | Ταυτοποίηση της υπεύθυνης παραλλαγής | Εξαιρετικά ακριβή. Χρειάζεται χώρος αποθήκευσης δεδομένων και γνώσεις βιοπληροφορικής. Μελέτη trio (γονείς και πάσχοντα μέλη) ώστε να αποκλειστούν οι μη παθογόνοι πολυμορφισμοί. |

1.1.5.1 Η ανάλυση σύνδεσης, η παλαιότερη μέθοδος γενετικής ανάλυσης.

Οι χάρτες γενετικού ανασυνδυασμού του γενώματος των θηλαστικών προσφέρουν βελτίωση της ανάλυσης, με πλεονέκτημα την ανακάλυψη συγκεκριμένων γονιδίων καθώς και τη μεταξύ τους απόσταση στο χρωμόσωμα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί την πληροφορία που βρίσκεται στο γενεαλογικό δέντρο επιλέγοντας διαφορετικούς δείκτες κατά μήκος του γενώματος, DNA μικροδορυφόρους (Short Tandem Repeats STRs), οι οποίοι παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό ποικιλομορφία μεταξύ των ατόμων. Αρχικά επιτυγχάνεται η ταυτοποίηση των δεικτών και

ακολουθεί η προσεκτική ανάλυση των κληρονομικών προτύπων των δεικτών σε μια εκτεταμένη γενωμική περιοχή. Οι δείκτες οι οποίοι εδράζονται σε διαφορετικά χρωμοσώματα μπορεί να κληρονομούνται αυτόνομα, (διαχωρισμός και ανεξάρτητη κληρονόμηση), ενώ η κληρονομικότητα εκείνων που βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα, εξαρτάται από την πιθανότητα του ανασυνδυασμού. Οι δείκτες οι οποίοι βρίσκονται σε μεγαλύτερη απόσταση μεταξύ τους εμφανίζουν μεγαλύτερες πιθανότητες να υπόκεινται στο φαινόμενο του ανασυνδυασμού από ότι εκείνοι που βρίσκονται πολύ κοντά ο ένας με τον άλλον.

Για να μελετηθεί μια συγκεκριμένη ασθένεια ή φαινότυπος χρησιμοποιώντας την ανάλυση σύνδεσης, τα μέλη από ένα διευρυμένο γενεαλογικό δέντρο πρέπει να γονοτυπηθούν πάνω σε έναν ήδη σχεδιασμένο γενετικό χάρτη. Το γενεαλογικό δέντρο προσφέρει τις απαραίτητες πληροφορίες που αφορούν την κληρονομικότητα του φαινοτύπου και τη συγγένεια μεταξύ των ατόμων. Με τα αποτελέσματα της γονοτύπησης θα αποδειχθεί ή θα απορριφθεί η υπό μελέτη συνκληρονομικότητα των δεικτών με το φαινότυπο. Η γενετική απόσταση μεταξύ των υπεύθυνων για τον φαινότυπο γονιδίων και των κοντινότερων δεικτών πρέπει να εκτιμηθεί. Η ανίχνευση μιας περιοχής σύνδεσης ακολουθείται από την προσέγγιση ενός υποψήφιου γονιδίου το οποίο βρίσκεται κοντά σε πιθανά εμπλεκόμενες περιοχές. Ως γενωμικό εργαλείο, η ανάλυση σύνδεσης έχει αρκετούς περιορισμούς όπως η απαραίτητη ύπαρξη εκτεταμένου γενεαλογικού δέντρου και η απαραίτητη ποικιλομορφία των δεικτών μεταξύ των συμμετεχόντων ατόμων. Στις περιπτώσεις που οι περιοχές που ταυτοποιούνται μέσω της ανάλυσης σύνδεσης είναι μεγάλες, τότε υπάρχει η πιθανότητα να υποκρύπτονται πολλά υποψήφια γονίδια.

1.1.5.2 Genome-wide association studies (Μελέτες συσχέτισης όλου του γενώματος)

Η προσέγγιση του εννοιολογικού πλαισίου της GWAS βασίζεται στην ιδέα ότι το υποψήφιο γονίδιο συνδέεται με την παρουσία πολυμορφισμών ως απλότυπος σε μια εκτεταμένη γενωμική περιοχή. Με τη χρήση των SNPs υπάρχει η δυνατότητα επισκόπησης ολόκληρου του γονιδιώματος σε εκατοντάδες άτομα, με αποτέλεσμα οι μελέτες να βασίζονται σε πληθυσμούς και όχι σε αναλύσεις που περιορίζονται σε pedigree. Με την πάροδο των χρόνων και εξαιτίας του τυχαίου ζευγαρώματος μεταξύ ασθενών και υγιών ατόμων, το μοναδικό γενετικό υπόβαθρο των ασθενών ατόμων ενσωματώνεται με εκείνο των υγιών εκτός από εκείνες τις περιοχές που βρίσκονται γύρω από τη

περιοχή των παθολογικών απλοτύπων. Επομένως πολυμορφισμοί που βρίσκονται κοντά σε παραλλαγές υπεύθυνες για την πρόκληση των ασθενειών, θα μπορούσαν να συνδέονται μη τυχαία με αυτές, λόγω της έλλειψης του μεταξύ τους ανασυνδυασμού (οι δείκτες βρίσκονται σε linkage disequilibrium με την περιοχή της παραλλαγής). Από τα συγκρινόμενα περιστατικά, μεταξύ ασθενών και υγείων ατόμων, εκείνα τα οποία “κρύβουν” μια παραλλαγή, αποκαλύπτουν στατιστικά μεμονωμένους γενετικούς δείκτες μόνο κοντά στη θέση της παραλλαγής και πουθενά αλλού στο γένωμα. Έτσι όταν εντοπιστούν οι συσχετιζόμενοι δείκτες, ταυτοποιείται μια χρωμοσωμική περιοχή και με τη χρήση του γονιδιώματος αναφοράς, τελείται έρευνα για το υποψήφιο γονίδιο (Visscher PM et al. 2012).

Παρόλο που η πυκνότητα των δεικτών στην πρώτη γενεά illumina 63K SNP ήταν εξαιρετικά χαμηλή, πολλές επιτυχημένες μελέτες έχουν αναφερθεί με διαφορετικούς αριθμούς περιστατικών και ατόμων αναφοράς, στηριζόμενα στο τύπο της κληρονομικότητας και στο υπό διερεύνηση χαρακτηριστικό.

Συγκρινόμενος με τις μελέτες συσχέτισης, ο αριθμός των περιστατικών και των μαρτύρων είναι σαφώς μικρότερος από τον απαιτούμενο αριθμό που χρειάζονται για να ολοκληρωθούν οι μελέτες σύνδεσης. Χωρίς αμφιβολία το GWAS έδωσε την ευκαιρία στους ερευνητές να ξεπεράσουν τους περιορισμούς που προκύπτουν από τη χρήση των μεθόδων όπως είναι οι συνδέσεις ανάλυσης που βασίζονται στα γενεαλογικά δέντρα.

Τα αποτελέσματα από τη μέθοδο GWAS επηρεάζονται από τους ακόλουθους παράγοντες:

- Ο αριθμός των απαιτούμενων, για μια επιτυχημένη ανάλυση δειγμάτων εξαρτάται από την πίεση της φυσικής επιλογής που υπόκειται το προς μελέτη χαρακτηριστικό. Η πίεση της φυσικής επιλογής είναι οι εξωτερικοί παράγοντες εκείνοι οι οποίοι δρουν θετικά ή αρνητικά στην επιλογή ενός χαρακτηριστικού σε έναν οργανισμό. Έτσι λιγότερα περιστατικά απαιτούνται για τη μελέτη ενός χαρακτηριστικού που βρίσκεται υπό θετική πίεση επιλογής (όπως είναι το χρώμα του τριχώματος και το είδος), σε αντίθεση με τον εντοπισμό και ταυτοποίηση γενετικών τόπων τα οποία βρίσκονται γενικά υπό αρνητική πίεση επιλογής, η οποία απαιτεί τη μελέτη περισσότερου αριθμού δειγμάτων.
- Ο αριθμός των δειγμάτων που απαιτούνται εξαρτάται και από τον τύπο κληρονομικότητας του προς μελέτη δείγματος (επικρατή, υπολειπόμενο, φυλοσύνδετο, πολυγονιδιακό). Ως εκ τούτου λιγότερα δείγματα απαιτούνται για τη μελέτη υπολειπόμενων χαρακτηριστικών ενώ

πολύ περισσότερα χρειάζονται για επικρατή ή πολυγονιδιακά νοσήματα με σχετικό κίνδυνο (Gandolfi B, et al. 2013).

- Οι στρατηγικές αναπαραγωγής οι οποίες εφαρμόζονται στον πληθυσμό (inbreeding – outbreeding) είναι πιθανό να επηρεάζουν τον αριθμό των δειγμάτων που απαιτούνται. Έτσι λιγότερα δείγματα απαιτούνται σε περιπτώσεις που εφαρμόζεται το inbreeding ενώ μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων είναι απαραίτητος όταν έχουμε εκτός συγγένειας διασταυρώσεις ή σε πληθυσμούς που διασταυρώνονται τυχαία. Συνεπώς λιγότερος αριθμός δειγμάτων χρειάζεται αν υπάρχει ένα κοινό γενετικό υπόβαθρο μέσα στη φυλή (υψηλό Linkage Disequilibrium). Επιπλέον η χρήση των περιστατικών μιας μελέτης μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν μοντέλο για άλλες ασθένειες ή χαρακτηριστικά μεταξύ των ατόμων της ίδιας φυλής, μειώνοντας το κόστος της μελέτης και των αριθμό των δειγμάτων.

1.1.6. Μοντέλα ζώων που χρησιμοποιούνται στη μελέτη των γενετικών νοσημάτων του ανθρώπου.

Η ομολογία αρκετών γονιδίων μεταξύ των ατόμων του ζωικού βασιλείου κάνει εφικτή τη δυνατότητα “χρησιμοποίησης” μοντέλων ζώων για τη μελέτη των γενετικών νοσημάτων του ανθρώπου. Η μελέτη ενός γενετικού νοσήματος σκοπό έχει την κατανόηση της παθοφυσιολογίας του, της κλινικής του εκδήλωσης, τη διερεύνηση των μοριακών διαταραχών πρόκλησης νοσημάτων καθώς και την προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδων θεραπείας του.

Τα τελευταία χρόνια οι τεχνολογίες επεξεργασίας του γονιδιώματος έχουν βελτιωθεί με αποτέλεσμα την εκτεταμένη χρήση τους στη βιοϊατρική έρευνα. Έτσι με τη γενετική μηχανική οι επιστήμονες είναι σε θέση να τροποποιήσουν το γενετικό υλικό των θηλαστικών με στόχο τη μελέτη των ανθρώπινων κληρονομικών διαταραχών, παρέχοντας έτσι νέες βιολογικές και μεταφραστικές γνώσεις. Επίσης δίνεται η δυνατότητα θεραπευτικής τροποποίησης του γονιδιώματος απομακρύνοντας ή διορθώνοντας επιβλαβείς παραλλαγές ή εισάγοντας προστατευτικές παραλλαγές.

Τα πιο διαδεδομένα για γενετικές μελέτες ζωικά μοντέλα είναι οι μύες και οι επίμυες με το ψάρι ζέβρα (zebrafish), τη δροσόφιλα και τους νηματώδεις σκώληκες να ακολουθούν. Σε μικρότερο βαθμό χρησιμοποιούνται ερευνητικά οι κόνικλοι, οι βάτραχοι πτηνά και μη ανθρώπινα πρωτεύοντα. Η

αποτυχία της πλήρους κατανόησης των μηχανισμών που οδηγούν στην εκδήλωση των γενετικών νοσημάτων καθώς και πολλών θεραπευτικών δοκιμών, οδηγεί την επιστημονική έρευνα προς την εύρεση φυσικών προτύπων ζώων που να εκδηλώνουν αυθόρμητα την ασθένεια.

Οι μύες για πολλά χρόνια αποτελούν το ιδανικό ζωικό πρότυπο για την μελέτη νοσημάτων του ανθρώπου. Πλεονεκτήματα της χρησιμοποίησής τους είναι το μικρό τους μέγεθος, ο σύντομος αναπαραγωγικός τους κύκλος και η ευκολία στην διαχείριση των απογόνων, με αποτέλεσμα τη δημιουργία καθαρών γονιδιακά στελεχών. Η ομολογία του γονιδιώματος τους με τον άνθρωπο είναι σημαντική, της τάξης του 95%. Τα πιο σημαντικά μειονεκτήματα της χρήσης των ζωικών μοντέλων είναι τα ηθικά ζητήματα για τα δικαιώματα και τη μεταχείριση των ζώων, το κόστος απόκτησης και συντήρησης εργαστηριακών ζώων καθώς και η αδυναμία μελέτης νοσημάτων τα οποία δεν παρουσιάζουν ομολογία. Επίσης το μικρό μέγεθος τους, η έλλειψη γενετικής ποικιλότητας, καθώς και η διαβίωση σε εργαστηριακές συνθήκες αποτελούν αρνητικούς παράγοντες στην μελέτη των γενετικών νοσημάτων του ανθρώπου και στην εφαρμογή θεραπευτικών πρωτοκόλλων.

Διαγονιδιακά ζωικά πρότυπα είναι τα ζώα στα οποία είτε γίνεται εισαγωγή συγκεκριμένων γονιδίων στον προπύρρηνα γονιμοποιημένου ωαρίου, είτε χρήση ιικών φορέων στα έμβρυα πριν την εμφύτευση. Έτσι με τη δημιουργία knock out ζώων, (αντικατάσταση φυσιολογικού με μεταλλαγμένο γονίδιο ή απενεργοποίηση τμήματος ή όλου του γονιδίου) knock in (ενσωμάτωση στο γονιδίωμα του ζώου ενός εξωγενούς γονιδίου αναφοράς) έχουν τη δυνατότητα οι ερευνητές να μελετήσουν τη λειτουργία ενός γονιδίου, τις γονιδιακές παραλλαγές που σχετίζονται με νοσήματα και τέλος να δοκιμάσουν την αποτελεσματικότητα θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Αν και η χρησιμότητα των διαγονιδιακών τρωκτικών είναι αδιαμφισβήτητη, θεωρείται ότι πρόσθετες πληροφορίες σχετικές με τη φυσιοπαθολογία νοσημάτων θα μπορούσαν να ληφθούν από άλλα φυσικά μη διαγονιδιακά πρότυπα (Selkoe et al. 2011).

Η πλειοψηφία των μέχρι τώρα ερευνών όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού πραγματοποιούνταν αποκλειστικά σε in vitro συνθήκες και σε ζώα εργαστηρίου και σε ξενομοσχεύματα. Ξενομοσχεύματα είναι κύτταρα, ιστοί ή όργανα τα οποία έχουν μεταμοσχευθεί από ένα είδος σε ένα άλλο. Τα συνήθως χρησιμοποιούμενα μοντέλα ποντικού περιλαμβάνουν χημικά επαγόμενο ξενομόσχευμα που προέρχεται από κυτταρική καλλιέργεια Cell line-Derived Xenograft (CDX), ξενομόσχευμα προερχόμενο από ασθενή Patient Derived Xenograft (PDX), ανθρωποποιημένα CDX και PDX και γενετικά τροποποιημένα μοντέλα ποντικού Genetically Engineered Mouse Model (GEMM). (Park, M.K et al. 2018).

Τα τελευταία χρόνια με τη χρήση των εργαλείων της γενετικής μηχανικής είναι δυνατή η δημιουργία μιας ποικιλίας γενετικά τροποποιημένων μεγάλων ζώων συμπεριλαμβανομένου του χοίρου, της αγελάδας, του σκύλου, του πρόβατου και της αίγας. Έτσι με τη χρήση των ενισχυτικών παραγόντων προσομοίωσης μεταγραφής, (TALEN -Transcription Activator-Like Effector Nuclease), των νουκλεασών δακτύλων ψευδαργύρου (ZFNs -Zinc finger nucleases) και τέλος του σύστηματος συστάδων τακτικά διατεταγμένων βραχέων παλινδρομικών επαναληπτικών αλληλουχιών με συνδεδεμένη την πρωτεΐνη Cas 9 (CRISPR Cas -9 - Clustered Regularly Interspersed Short Palindromic Repeats associated protein 9) έγινε δυνατός ο σχεδιασμός και η εφαρμογή ερευνητικών προγραμμάτων με στόχο την μελέτη και θεραπεία γενετικών νοσημάτων του ανθρώπου που αφορούν κυρίως το νευρογενετικό, καρδιαγγειακό μεταβολικό ανοσοποιητικό και αναπαραγωγικό σύστημα.

Το ανατομικό προφίλ, το μέγεθος των οργάνων και η φυσιολογία των μεγάλων ζώων παρουσιάζει μεγαλύτερες ομοιότητες με τον άνθρωπο σε σχέση με τα μικρού μεγέθους ζώα. (Jing Zhang et al. 2022). Θεραπείες σε γενετικά νοσήματα του ανθρώπου όπως η θαλασσαιμία, η μυϊκή δυστροφία Duchenne, η κυστική ίνωση βασίζονται εκτός άλλων και σε ερευνητικά προγράμματα με τη συμμετοχή γενετικά τροποποιημένων μεγάλων ζώων.

Τα φυσικά μοντέλα ζώων είναι τα ζώα στα οποία αυθόρμητα εμφανίζεται το γενετικό νόσημα χωρίς την ανθρώπινη παρέμβαση, με πιο διαδεδομένα το χοίρο, το πρόβατο, και τα κατοικίδια σκύλος και γάτα. Ο χοίρος αποτελεί ένα υποσχόμενο φυσικό μοντέλο μελέτης γενετικών νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου του μαστού. Η γενετική ομολογία με τον άνθρωπο και η κοινή φαρμακοκινητική συμπεριφορά είναι ισχυρά κριτήρια για την επιλογή του ως φυσικό μοντέλο μελέτης. (Mondal P et al. 2022). Τα πρόβατα, ανήκουν στην κατηγορία των θηλαστικών που λόγω της αυθόρμητης εμφάνισης κοινών με τον άνθρωπο γενετικών νοσημάτων που αφορούν το νευρογενετικό, αναπαραγωγικό, μυοσκελετικό, καρδιαγγειακό και μεταβολικό σύστημα, έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε σχετικές μελέτες

Όσον αφορά τα κατοικίδια ζώα σκύλος και γάτα, είναι τα πιο διαδεδομένα φυσικά μοντέλα μελέτης των γενετικών νοσημάτων. Συνέπεια των αυστηρών αναπαραγωγικών προγραμμάτων και των περιοδικών πληθυσμιακών γενετικών στενωπών, για παράδειγμα εξαιτίας των παγκοσμίων πολέμων πολλές φυλές σκύλων και γατών εμφανίζουν υψηλά ποσοστά συγκεκριμένων νοσημάτων συμπεριλαμβανομένων καρκίνου, τύφλωσης, καρδιολογικών νοσημάτων, καταρράκτη, επιληψίας, δυσπλασίας του ισχίου, κώφωσης. Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης ειδικών ασθενειών σε συγκεκριμένες φυλές υποδεικνύουν τον περιορισμένο αριθμό γενετικών τόπων που συνδέονται με την

κάθε ασθένεια, καθιστώντας την γενετική τους χαρτογράφηση περισσότερο ανιχνεύσιμη από εκείνη των ανθρώπων. Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότεροι εκτροφείς και ιδιοκτήτες διενεργούν προληπτικά στοχευμένες για κάθε φυλή γενετικές εξετάσεις στα κατοικίδια τους, με αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας διάγνωσης και διερεύνησης των αντίστοιχων ασθενειών.

Τα κοινά γενετικά νοσήματα μεταξύ ανθρώπου και κατοικίδιων οφείλονται συνήθως σε παραλλαγές σε ορθόλογα γονίδια και συνοδεύονται από μοριακή, βιοχημική, παθολογική και κλινική ομοιότητα. Η στενή σχέση και συμβίωση μεταξύ τους διευκολύνει, κάνοντας πιο εύκολη την παρατήρηση της επίδρασης των περιβαλλοντικών συνθηκών στην γένεση και εκδήλωση των νοσημάτων (Marjo K et al.2016).

Η επιλογή των κατοικίδιων ζώων ως αυθόρμητα μοντέλα για την μελέτη του καρκίνου, παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα και βασίζεται στο γεγονός ότι τα ζώα κι ο άνθρωπος εμφανίζουν όγκους με τα ίδια βιολογικά χαρακτηριστικά και μοιράζονται κοινούς περιβαλλοντικούς παράγοντες επικινδυνότητας. Επίσης το σωματικό μέγεθος τους, ο επαρκής επιπολασμός του καρκίνου στα κατοικίδια και η έλλειψη εδραιωμένων θεραπειών, διευκολύνει την ταχεία έναρξη, εξέλιξη και ολοκλήρωση νέων θεραπευτικών πρωτοκόλλων.

2. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ

Στη συγκεκριμένη διπλωματική το αντικείμενο της μελέτης είναι η ανάδειξη της δυνατότητας των κατοικίδιων ζώων (*Canis Lupus Familiaris* και *Felis Catus*) να λειτουργήσουν ως αυθόρμητα μοντέλα μελέτης των γενετικών νοσημάτων του ανθρώπου και η προβολή της χρησιμότητας της συμμετοχής τους στην ιατρική αλλά και στην κτηνιατρική επιστήμη, οδηγώντας στην εφαρμογή θεραπευτικών ή ανακουφιστικών πρωτόκολλων.

Ο καρκίνος του μαστού αποτέλεσε το νόσημα εκείνο στο οποίο τεκμηριώθηκε και αξιολογήθηκε η συμμετοχή των προαναφερθέντων ζώων ως αυθόρμητων μοντέλων για τη μελέτη της κλινικοπαθολογίας του νοσήματος, την ταυτοποίηση προγνωστικών δεικτών και την εφαρμογή θεραπευτικών πρωτοκόλλων. Στη βιβλιογραφική αναφορά κρίθηκε απαραίτητη η αναφορά στα γενωμικά και γενετικά εργαλεία που χρησιμοποιούνται στην μελέτη της συγκριτικής γενετικής, ογκολογίας και μοριακής εξέλιξης με σκοπό την κατανόηση και αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Ο σκύλος λόγω της γενωμικής ιδιαιτερότητας που παρουσιάζει και της μοναδικής αναπαραγωγικής του ιστορίας, κρίθηκε σκόπιμο να αναλυθεί σε μεγαλύτερη έκταση, σε σχέση με τη γάτα ως αυθόρμητο μοντέλο μελέτης των γενετικών νοσημάτων και ιδιαιτέρως του καρκίνου του μαστού του ανθρώπου.

Στη συνέχεια έγινε προσπάθεια συγκριτικής μελέτης όλων εκείνων των ιδιαίτερων συνθηκών που οδηγούν στην γένεση του καρκίνου των μαστικών αδένων και στα τρία είδη. Η συγκριτική μελέτη μεταξύ των ειδών είναι προσφιλής μέθοδος στην κτηνιατρική επιστήμη και με σεβασμό στην ανθρώπινη υπόσταση εκτιμάται ότι βοήθησε στην ανάδειξη τεκμηριωμένων συμπερασμάτων. Η ανατομία των μαστικών αδένων, η κλινικοπαθοφυσιολογία της νόσου, τα ιστοπαθολογικά στοιχεία, η γενετική ετερογένεια και οι στοχαστικοί παράγοντες που επιδρούν στην εκδήλωση του νοσήματος αναλύονται χωριστά. Η ανάλυση των προγνωστικών δεικτών και η πληροφόρηση για τη δυνατότητα εφαρμογής θεραπευτικών πρωτοκόλλων θα αναφερθούν στη συνέχεια.

Η συγγραφή της συγκεκριμένης εργασίας και η επιλογή των συγγραμμάτων που χρησιμοποιήθηκαν, έγινε με γνώμονα την τήρηση των κανόνων που διέπουν την ευζωία των ζώων και σε καμία περίπτωση

τη χρησιμοποίησή τους με οποιοδήποτε τρόπο για ανθρώπινο όφελος, θέτοντας σε κίνδυνο την υγεία τους ή την δυνατότητα τους για κτηνιατρική φροντίδα.

3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Τα επιστημονικά άρθρα που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρονται σε εργασίες που έχουν διεξαχθεί τα τελευταία 15 χρόνια. Η έρευνα που διεξάγεται όσον αφορά τα γενετικά νοσήματα και τον καρκίνο του μαστού είναι εντατική και η αρθρογραφία εμπλουτίζεται συνεχώς με καινούργια στοιχεία. Η πλειοψηφία των άρθρων είναι βιβλιογραφικές ανασκοπήσεις ώστε να είναι εφικτή μια συνολική εικόνα της προόδου που σημειώθηκε στον συγκεκριμένο τομέα. Άρθρα τα οποία αναφέρονται σε συγκεκριμένα γενετικά νοσήματα δεν συμπεριλαμβάνονται λόγω του μεγάλου τους όγκου. Ένα πολύ σημαντικό κριτήριο επιλογής των άρθρων είναι να μην συμπεριλαμβάνουν οποιαδήποτε εργασία η οποία διεξάγεται σε ζώα υπό συνθήκες εργαστηρίου. Τέλος οποιαδήποτε αναφορά πρέπει να συμφωνεί με τους κανόνες της βιοηθικής, σεβασμού και προστασίας των ζώων.

Οι μηχανές αναζήτησης που χρησιμοποιήθηκαν είναι: *PubMed, Google, Google Scholar wikipedia*.

Τα βιβλία είναι: “Peter J.Russell, i **Genetics Μια Μενδελιανή Προσέγγιση 1st edition**”, “Thompson and Thompson **Genetics in Medicine**, Eighth Edition 2016,” “**Rubin’s Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine**, 7th edition, David S. Strayer, Emanuel Rubin, Jeffrey E. Saffitz, Alan L. Schiller” “**Pathways to Pregnancy and Parturition**” 3rd Edition P.L. Senger” “**Γενική Παθολογική Ανατομική-Νεοπλασία**,. Γεράσιμος Κανακούδης, Ελένη Κουταλιανού” “**Φυσιολογία**” Αθ.Σμοκοβίτη, 8^η Έκδοση, 2014 “ **Κλινική ανατομική σκύλου και γάτας.** ” J.S.Boyd 2nd Edition, “**Κτηνιατρική Φυσιολογία**” Bradley G.Klein 5th edition 2018 “**Σύγχρονη κλινική Γενετική**, A.Read,E.Καναβάκη,2010,”

Οι ιστοσελίδες επιστημονικού ενδιαφέροντος ήταν.

<https://avmajournals.avma.org/>,<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/?taxon=9615>,

<https://www.cancer.net>, <https://www.cancer.org/annual-cancer-facts-and-figures/2022>

,<https://omia.org> <https://www.nih.gov> www.vet.upenn.edu/rcam

<https://dnascience.plos.org/2021/08/12/cats-genomes-make-them-good-models-for-human-disease>

<https://www.fda.gov/> Simon R, J Natl Cancer Inst

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. Ο σκύλος ως φυσικό μοντέλο στη μελέτη γενετικών νοσημάτων του ανθρώπου

4.1.1 Η δημιουργία των φυλών και η σημασία τους στη γενετική

Ο σκύλος *Canis Lupus Familiaris* θεωρείται ως το πρώτο από τον άνθρωπο εξημερωμένο ζώο. Κοινός πρόγονος όλων είναι ο γκρίζος λύκος *Canis Lupus Lupus*, ο οποίος πιθανολογείται ότι κατάγεται από τη Νοτιοανατολική Ασία χωρίς να είναι οριοθετημένη χρονικά και τοπικά η εξελικτική μετάβαση. Ο σκύλος εξελίχθηκε μέσα από μια επωφελή σχέση με τους ανθρώπους, συμβιώνοντας στο ίδιο περιβάλλον, μοιραζόμενοι κοινές πηγές τροφής. Στα πρόσφατα χρόνια οι άνθρωποι αναπαρήγαγαν επιλεκτικά άτομα τα οποία διακρίνονταν στο κυνήγι, στη φύλαξη των ποιμνίων, διαθέτοντας ταυτόχρονα πειθαρχία, υπακοή και άλλα ιδιοσυγκρασιακά χαρακτηριστικά. Προς αυτή την κατεύθυνση δημιούργησαν φυλές με ιδιοσυγκρασιακά γνωρίσματα που μιμούνται εκείνα των ανθρώπων και με μορφολογικά κριτήρια όπως είναι το μέγεθος και το σχήμα του σώματος και της κεφαλής, τον τύπο και το χρώμα του τριχώματος. Έτσι εκτρέφονται σκύλοι με οριοθετημένα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Με την αποκρυπτογράφηση της αλληλουχίας του γενώματος και την μελέτη μοτίβων ανισορροπίας σύνδεσης (LD= linkage disequilibrium) αποδείχθηκε και γενετικά η ύπαρξη δύο γενετικών φαινομένων (γενετική στενωπός). (Marc P. Hoerrner et.al 2014). Το πρώτο προκλήθηκε από φυσικά φαινόμενα που ακολούθησαν την εξημέρωση 15,000–30,000 χρόνια πριν, και το δεύτερο σχετικά πρόσφατο, 50 - 250 χρόνια πριν, με αποτέλεσμα τη μείωση της γενετικής ποικιλομορφίας και τη διαμόρφωση φυλών. Κάθε φυλή αντιπροσωπεύει έναν απομονωμένο αναπαραγωγικό πληθυσμό με υψηλά επίπεδα φαινοτυπικής ομοιογένειας (κοινά μορφολογικά και ιδιοσυγκρασιακά χαρακτηριστικά), μειωμένη γενετική ποικιλομορφία και σύνδεση με συγκεκριμένα γενετικά νοσήματα. Πόλεμοι, φυσικές και οικονομικές καταστροφές, καθώς και η επιλεκτική αναπαραγωγή, είχαν ως αποτέλεσμα την χρησιμοποίηση μικρού αριθμού γεννητόρων, με κοινή

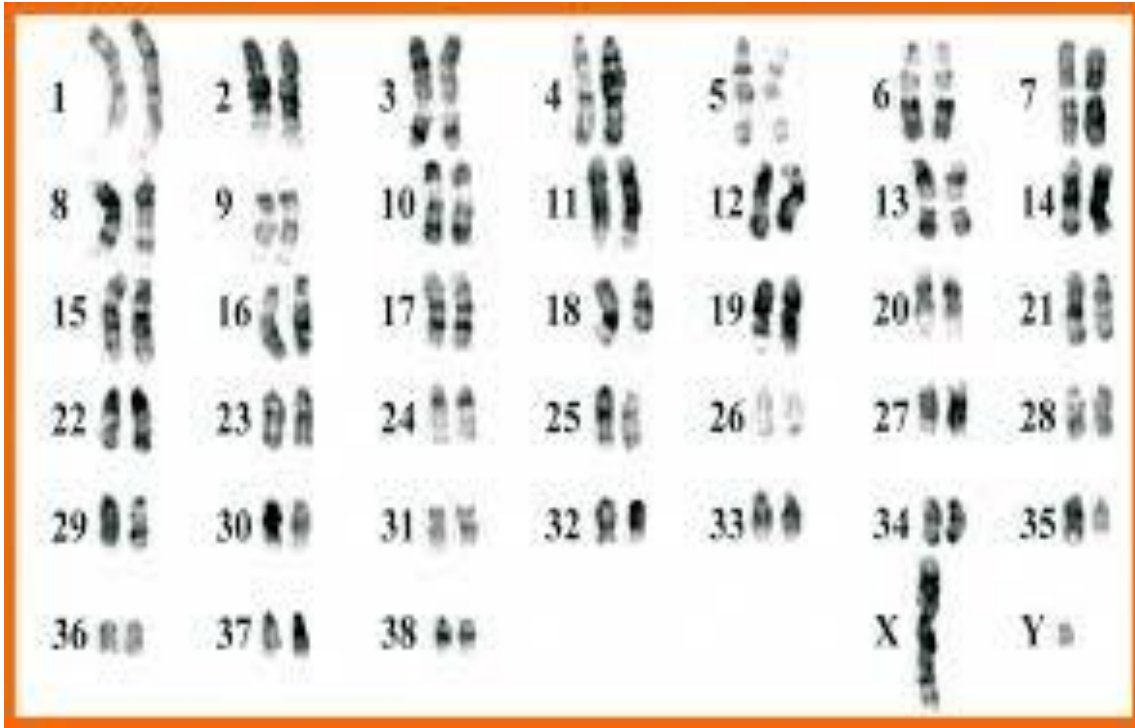
πρακτική τη χρήση ενός δημοφιλούς επιβήτορα. Η ανάγκη σταθεροποίησης των χαρακτηριστικών γνωρισμάτων μιας φυλής οδήγησε στη δημιουργία βιβλίων καταγραφής φυλετικών προτύπων και στην συνέχεια καταχωρήσεων σκύλων σε βιβλία γενεαλογικών δέντρων.

Σταδιακά έγινε εφικτή η δημιουργία παγκόσμιων γενεαλογικών χαρτών (pedigree) τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στη καταγραφή και μελέτη των γενετικών νοσημάτων. Η επιλεκτική αναπαραγωγή και η διασταύρωση ατόμων συγγενικών μεταξύ τους (inbreeding), είχε ως αποτέλεσμα την μεταβίβαση σπάνιων παραλλαγών στα άτομα της ίδιας φυλής, τα οποία πολλές φορές συνδέονται με συγκεκριμένα νοσήματα (Kerstin Lindblad-Toh et al. 2005).

4.1.2 Η σύγκριση του γενώματος του σκύλου και του ανθρώπου.

Το 2005, δημοσιεύτηκε το πρώτο υψηλής ποιότητας γονιδίωμα αναφοράς (7.5x) του οικόσιτου σκύλου (*Canis Lupus Familiaris*). Το γένωμα που επιλέχτηκε για αλληλούχιση και δημιουργία γενετικού χάρτη αναφοράς, ανήκει σε σκύλο της φυλής Boxer. Με τη μελέτη του γονιδιώματος αναφοράς έγινε εφικτή η ανακάλυψη μονονουκλεοτιδικών παραλλαγών (SNVs), ελλείψεων, ενθέσεων, ρυθμιστικών αλληλουχιών, μεγάλων ανασυνδυασμών, παραλλαγών αριθμού αντιγράφων (copy number variants) και γενωμικών πολυμορφισμών.

Το πιο σύγχρονο γονιδίωμα αναφοράς του σκύλου είναι το Dog10k_Boxer_Tasha_1.0 το οποίο ακολούθησε το προηγούμενο CanFam 3.1. (Vidhya Jagannathan et.al, 2021) Από τη μελέτη του καρυότυπου του σκύλου προκύπτει ότι το γενετικό υλικό είναι οργανωμένο σε 38 ζεύγη αυτοσωμικών και 2 φυλετικά Χ,Υ χρωμοσώματα. **Εικ.4.1, Πιν.4.1** .



Εικ.4.1 Καρυότυπος του Σκύλου (*canis lupus familiaris*)

Πιν.4.1 Συνοπτική Στατιστική Σύγκριση των γενωμάτων αναφοράς του σκύλου

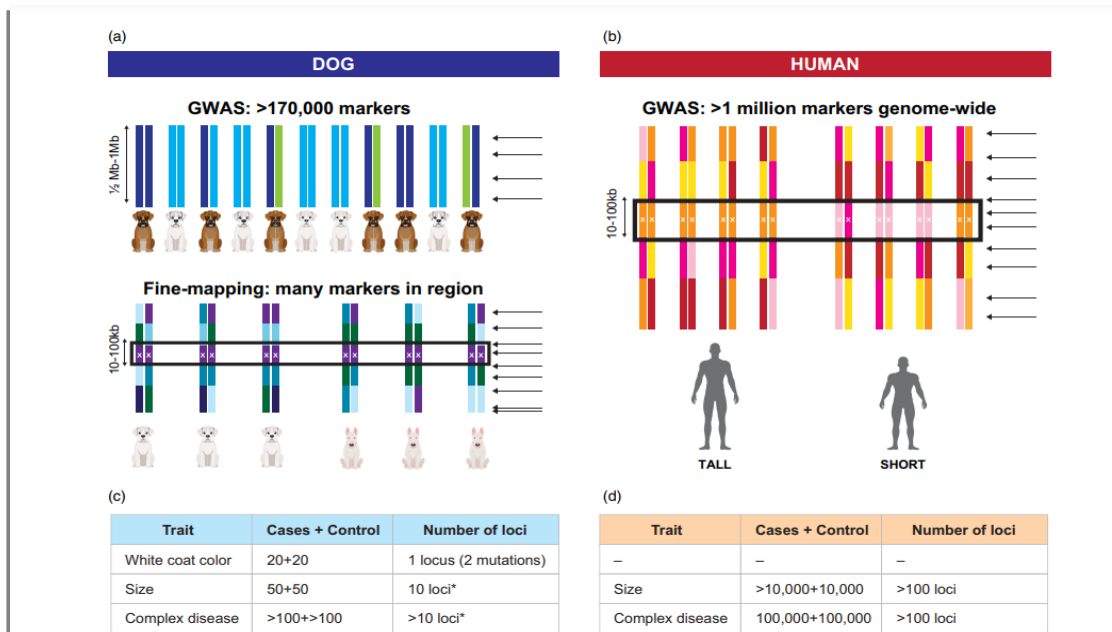
Table 1. Summary statistics for the Dog10K_Boxer_Tasha_1.0 genome assembly and comparison with current dog reference genome CanFam3.1.

| Statistic | CanFam3.1 | Dog10K_Boxer_Tasha_1.0 |
|---------------------------|---------------|------------------------|
| Total sequence length | 2,410,976,875 | 2,312,802,206 |
| Total ungapped length | 2,392,715,236 | 2,312,743,367 |
| No. of scaffolds | 3310 | 147 |
| No. of unplaced scaffolds | 3228 | 107 |
| Scaffold N50 | 45,876,610 | 63,738,581 |
| Scaffold L50 | 20 | 14 |
| No. of unspanned gaps | 80 | 399 |
| No. of spanned gaps | 23,796 | 621 |
| No. of contigs | 27,106 | 1162 |
| Contig N50 | 267,478 | 27,487,084 |
| Contig L50 | 2436 | 31 |
| No. of chromosomes | 39 | 39 |

Από την ανάλυση του γονιδιώματος του Boxer και 6% του γονιδιώματος δέκα επιπλέον φυλών αποδείχθηκε ότι η αδυναμία σύνδεσης (LD) (Slatkin et al. 2008) στα άτομα της ίδιας φυλής, εκτείνεται σε απόσταση μερικών μεγαβάσεων, ενώ το LD μεταξύ των ατόμων διαφορετικών φυλών εκτείνεται μόνο σε δεκάδες κιλοβάσεις. Το γεγονός αυτό, οδήγησε τη μεταβίβαση παθογόνων πολυμορφισμών στον πληθυσμό της ίδιας φυλής. Το LD (Linkage Disequilibrium, ανισορροπία σύνδεσης) αποτελεί ισχυρό εργαλείο για την κατασκευή γενετικών χαρτών και για τον εντοπισμό γενετικών τόπων. Μέχρι τώρα μελετούσαμε πώς επηρεάζουν οι εξελικτικές δυνάμεις έναν μεμονωμένο γενετικό τόπο, κάνοντας την υπόθεση ότι οι γενετικοί τόποι κληρονομούνται ανεξάρτητα, δηλαδή ότι βρίσκονται σε ισορροπία σύνδεσης (Linkage Equilibrium). Όπως είναι γνωστό όμως, πολλοί γενετικοί τόποι πάνω στο γονιδίωμα δεν κληρονομούνται ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο. Τότε λέμε πως οι γενετικοί

τόποι είναι συνδεδεμένοι και βρίσκονται σε ανισορροπία σύνδεσης. Το γένωμα του σκύλου είναι μικρότερο από εκείνο του ανθρώπου, (334 Mb σε σχέση με τα 3200 Mb) βασιζόμενο στο μικρότερο αριθμό αλληλουχιών επαναλήψεων, ειδικών για την γενεολογία (Lindblad-Toh K et al.2005).

Ο αριθμός των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες όσον αφορά τον άνθρωπο, τον σκύλο, το ποντίκι τον αρουραίο υπολογίζεται στα 20.000 γονίδια με μικρές αριθμητικές αποκλίσεις μεταξύ των ειδών, εκ των οποίων υπολογίζονται ότι τα 14,000 είναι ορθόλογα 1:1:1 (άνθρωπος, ποντίκι και σκύλος). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι οι επιστήμονες έχουν τη δυνατότητα να σχεδιάσουν στρατηγικές μελέτες προσδιορισμού γενετικών τόπων αρχικά σε φυλές οι οποίες έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να αναπτύξουν το νόσημα και στη συνέχεια σε άλλες φυλές. Όσον αφορά τις μελέτες GWAS στους σκύλους τα μονογονιδιακά γνωρίσματα μπορούν να χαρτογραφηθούν απαιτώντας λιγότερα SNP δεικτών και συνεπώς τη συμμετοχή λιγότερων ζώων σε σχέση με αυτές των ανθρώπων. Έτσι στις μελέτες GWAS, χρησιμοποιούνται αρχικά μέλη που ανήκουν στην ίδια φυλή (μεγάλης έκτασης LD μέσα στις φυλές των σκύλων) και στη συνέχεια μέλη διαφορετικών φυλών με φαινοτυπική ομοιότητα. Στον άνθρωπο το LD είναι περιορισμένο απαιτώντας τη χρησιμοποίηση πολλών SNP δεικτών σε αντίστοιχες μελέτες.(Kerstin Lindblad-Toh et al.2020). **Εικ.4.2**



Εικ.4.2 Σύγκριση της χαρτογράφησης των SNPs σε Σκύλο και Άνθρωπο. (Kerstin Lindblad-Toh et al. 2020)

Σύμφωνα με την βάση δεδομένων (OMIA – Online Mendelian Inheritance in Animals) στην οποία βρίσκονται καταγεγραμμένες όλες οι γενετικές ασθένειες που ακολουθούν τη μενδελινική κληρονομικότητα, φαίνεται ότι στον σκύλο έχουν καταχωρηθεί συνολικά 847 νοσήματα εκ των οποίων τα 546 είναι αντίστοιχα γενετικών νοσημάτων του ανθρώπου. **Πιν.4.2**

Το πρώτο ομόλογο με τον άνθρωπο γονίδιο που γονοτυπήθηκε στον σκύλο ήταν το 1989 και αφορούσε το F9 υπεύθυνο για την Haemophilia B. Πολλές φυλές σκύλων (400) εμφανίζουν υψηλά ποσοστά εμφάνισης νοσημάτων κοινών με εκείνα του ανθρώπου όπως είναι διάφορα νευρογενετικά νοσήματα, μυοπάθειες, μεταβολικά, οφθαλμολογικά και καρδιολογικά νοσήματα. Η υψηλή συχνότητα εμφάνισης ειδικών ασθενειών σε συγκεκριμένες φυλές υποδεικνύουν τον περιορισμένο αριθμό γενετικών τόπων που συνδέονται με την κάθε ασθένεια, καθιστώντας την γενετική τους χαρτογράφηση περισσότερο ανιχνεύσιμη απ' ό,τι εκείνη των ανθρώπων. Ενισχυτικός παράγοντας της μελέτης των γενετικών νοσημάτων αποτελεί η στενή σχέση και η συμβίωση ανθρώπων και σκύλων, κάνοντας πιο εύκολη την παρατήρηση της επίδρασης των περιβαλλοντικών συνθηκών στην παθοφυσιολογία των πολυπαραγοντικών νοσημάτων. (Hayward, J. J. et al.2016) Επίσης τα διαθέσιμα γενεολογικά αρχεία και η δυνατότητα χρησιμοποίησης κτηνιατρικών ιατρικών δεδομένων είναι πολύτιμα εργαλεία μελέτης και οργάνωσης θεραπευτικών δοκιμών στα οποία θα συμμετέχει ως φυσικό μοντέλο μελέτης ο σκύλος (Marjo K. Hytonen et al.2016).

4.2 Η γάτα ως φυσικό μοντέλο στη μελέτη γενετικών νοσημάτων του ανθρώπου

4.2.1 Η δημιουργία των φυλών και η σημασία τους στη γενετική

Η επιστημονική ονομασία είναι *Felis silvestris catus*, ένα υποείδος το οποίο ανήκει σε ένα από τα 38 είδη της οικογένειας Felidae. Οι οικόσιτες γάτες και αυτές που ζούν ελεύθερες κοντά σε οικισμούς αναφέρονται γενικά ως "κατοικίδιες" γάτες. Αυτά τα υποείδη πιθανόν εξημερώθηκαν από την γάτα *Felis silvestris lybica*. Ο άνθρωπος, 10.000 έτη πριν με την εντατικοποίηση της γεωργίας, εγκαταστάθηκε σε περιοχές όπου λόγω της πληθώρας τροφών φυτικής προέλευσης, οργάνωσε αποθήκες οι οποίες προσέλκυσαν μεγάλο αριθμό τρωκτικών τα οποία με τη σειρά τους οδήγησαν άγριες γάτες να πλησιάσουν τους ανθρώπινους οικισμούς και να συμβιώσουν μαζί τους για μεγάλο χρονικό διάστημα γεγονός το οποίο οδήγησε στην εξημέρωσή τους. Με την πάροδο των χρόνων καθιερώθηκαν οι φυλές της οικόσιτης γάτας. Η εξέλιξη όμως της εξημέρωσης της γάτας δεν έγινε με τον ίδιο τρόπο όπως στα άλλα ζωικά είδη.

Οι φυλές των γατιών είναι σχετικά νέες μεταξύ 20 με 200 ετών, με αποτέλεσμα να είναι μειωμένος ο χρόνος της εξασφάλισης γενετικής ποικιλομορφίας, με συνέπεια την δημιουργία αυθόρμητων παραλλαγών και ανασυνδυασμού (O'Brien SJ et al. 2002).

Ορισμένες καθαρόαιμες φυλές γατιών έχουν κοινό προγονικό απόγονο με αποτέλεσμα να ανήκουν στην ίδια οικογενειακή ομάδα. Η εντατική εκτροφή τους για την διαμόρφωση των φυλών στηρίχτηκε σε μοναδικά εξωτερικά γνωρίσματα. Οι φυλές γατιών με πιστοποιητικά καθαροαιμίας προέρχονται από κάποιες ιδρυτικές φυλές όπως για παράδειγμα οι γάτες της περσικής φυλής με κύριο χαρακτηριστικό το μακρύ τρίχωμα και τον σκελετικό σχηματισμό βραχυκεφαλικού τύπου. Σε πρόσφατες γενετικές μελέτες διαπιστώθηκε ότι οι γάτες που ανήκουν στις φυλές Βρετανική κοντότριχη και Scottish Fold, διαφέρουν από τον κοινό πρόγονο τους, γάτα της φυλής Persian, κατά ένα μορφολογικό χαρακτηριστικό, το φυσιολογικό μήκος τριχώματος και τα διπλωμένα αυτιά αντίστοιχα. Επιπλέον, μοιράζονται κοινά γενετικά προβλήματα. Έτσι η παραλλαγή που προκαλεί την πολυκυστική νόσο των νεφρών βρίσκεται σε υψηλή συχνότητα σε φυλές με κοινό πρόγονο τη γάτα της φυλής Persian. Παρόλο που οι εκτεταμένες προγονικές περιοχές είναι ένδειξη inbreeding, η παρουσία τους

διευκολύνει τις γενετικές αναλύσεις στον εντοπισμό ενός γνωρίσματος ή μιας ασθένειας, εξαιτίας του αυστηρού inbreeding με στόχο την διατήρηση των μορφολογικών χαρακτηριστικών της φυλής. Ως εκ τούτου υπάρχουν ασθένειες κοινές στην ιδρυτική και στις μεταγενέστερες φυλές.

Οι οικόσιτες μικτής φυλής γάτες, οι οποίες αποτελούν την πλειοψηφία στον πληθυσμό της γάτας παγκοσμίως, δεν είναι προϊόν επιλεκτικής αναπαραγωγής για κάποιο συγκεκριμένο γνώρισμα, αλλά φυσικής επιλογής βάση του ισχυρού ανατομικού αλλά και ανοσολογικού τους προφίλ. Οι γάτες αυτές θεωρούνται ‘αρχαίας ηλικίας’ 10.000 ετών με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν στενό LD και μικρές ομάδες απλότυπων. Αυτά τα χαρακτηριστικά, κοινά σε όλα τα μικτής φυλής άτομα μπορούν να επηρεάσουν την επιλογή των κατάλληλων γενετικών εργαλείων που θα χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση ενός χαρακτηριστικού (Barbara Gandolfi et al, 2015).

4.2.2 Η σύγκριση του γένωματος της γάτας και του ανθρώπου

Οι πρώτες μελέτες που αφορούν το γενετικό υλικό της γάτας πραγματοποιήθηκαν τη δεκαετία του 1970 με την χαρτογράφηση του καρυότυπου. Το γενετικό υλικό είναι οργανωμένο σε 18 ζεύγη αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων και 1 ζεύγος φυλετικών XY. Η κυτταρογενετική μελέτη των χρωμοσωμάτων κατέδειξε τρία μεγάλα μετακεντρικά χρωμοσώματα (A1, A2, A3), τέσσερα μεγάλα υπομετακεντρικά (B1, B2, B3, B4), δύο μεσαίου μεγέθους μετακεντρικά (C1 και C2), τέσσερα μικρά υπομετακεντρικά (D1, D2, D3, D4), τρία μικρά μετακεντρικά (E1, E2, E3), και δύο μικρά ακροκεντρικά (F1 και F2). Το X χρωμόσωμα είναι μεσαίου μεγέθους και υπομετακεντρικό και όμοιο με το B4. Με τη μέθοδο του Φθορίζων *in situ* υβριδισμού είναι δυνατή η μελέτη, ταυτοποίηση και σύγκριση αλληλουχιών στο γένωμα της γάτας και του ανθρώπου. Για παράδειγμα τμήμα από το χρωμόσωμα 13 του ανθρώπου σημάνθηκε με φθορίζουσα χρωστική και εν συνεχεία υβριδοποιήθηκε σε χρωμοσώματα, στη φάση της μίτωσης, στη γάτα. Το γενετικό υλικό από το χρωμόσωμα 13 του ανθρώπου εντοπίστηκε στο βραχύ άκρο του χρωμοσώματος της γάτας A1p. Με αυτή τη συγκριτική προσέγγιση είναι δυνατός ο εντοπισμός ενός γονιδίου που είναι γνωστό ότι βρίσκεται στο χρωμόσωμα 13 και αναμένεται η παρουσία του στο A1p γάτας. Είναι σαφές ότι είναι δυνατή και η αντίστροφη διαδικασία. (Lyons LA et al. 2011)

Από τις μετέπειτα μελέτες διαπιστώθηκε μεγαλύτερη ομοιότητα μεταξύ του γενώματος του ανθρώπου και της γάτας σε σχέση με τον σκύλο και τον ποντικό. Από τα 20.000 γονίδια που είναι υπεύθυνα για την κωδικοποίηση πρωτεϊνών, τα 16.000 είναι πανομοιότυπα μεταξύ της γάτας και του ανθρώπου.

Η γενετική ποικιλομορφία του γονιδιώματος της γάτας είναι πολύ μεγαλύτερη από εκείνη του ανθρώπου (10 εκ. SNPs και 4-5 εκ. SNPs αντίστοιχα). Επίσης πολλά γενετικά νοσήματα στη γάτα σχετίζονται με μη κωδικές περιοχές του γονιδιώματος, γεγονός που επιτρέπει τη μελέτη αυτών των περιοχών και σε αντίστοιχα νοσήματα του ανθρώπου. Ένα σχετικό παράδειγμα είναι το γονίδιο KIT το οποίο είναι υπεύθυνο για τις λευκές κηλίδες και την κώφωση στη γάτα ενώ το ανθρώπινο ομόλογο είναι ογκογονίδιο, η υπερέκφραση του οποίου ενοχοποιείται για τη δημιουργία καρκίνου (<https://dnascience.plos.org/2021/08/12/cats-genomes-make-them-good-models-for-human-disease/>).

Στη βάση δεδομένων <https://omia.org/home/> είναι καταγεγραμμένα συνολικά 496 γενετικά νοσήματα της γάτας εκ των οποίων τα 261 είναι υποψήφια μελέτης αντίστοιχων γενετικών νοσημάτων του ανθρώπου (Πιν.4.2).

Πιν.4.2 Συγκεντρικός αριθμός των γενετικών νοσημάτων των θηλαστικών
(<https://omia.org/home/>)

Summary

| | dog | cattle | cat | pig | sheep | horse | chicken | rabbit | goat | Other | TOTAL |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------------|
| TOTAL TRAITS/DISORDERS | 847 | 621 | 396 | 345 | 295 | 255 | 236 | 118 | 101 | 910 | 4224 |
| Mendelian trait/disorder | 391 | 292 | 133 | 129 | 116 | 61 | 135 | 72 | 23 | 330 | 1749 |
| Mendelian trait/disorder; likely causal variant(s) known | 332 | 199 | 101 | 61 | 53 | 48 | 56 | 13 | 17 | 178 | 1075 |
| Likely causal variants | 483 | 263 | 168 | 69 | 86 | 105 | 71 | 15 | 30 | 147 | 1456 |
| Potential models for human traits | 546 | 317 | 261 | 195 | 127 | 146 | 82 | 70 | 49 | 525 | 2365 |

Στους πίνακες(Πιν.4.3 1., 4.3.2) γίνεται παράθεση σημαντικών γενετικών νοσημάτων τα οποία είναι αντικείμενο μελέτης στο RCAM με την συμμετοχή του σκύλου και της γάτας ως αυθόρμητα μοντέλα μελέτης.

Πιν.4.3.1.Γενετικά νοσήματα σκύλου και της γάτας κοινά με του Ανθρώπου (RCAM)

| Disease* | Defective gene | OMIM | Species | Mutation |
|--|----------------|--------|-------------------|---------------------------------------|
| <i>Lysosomal storage disease</i> | | | | |
| Alpha-mannosidosis* | MAN2B1 | 248500 | feline | c.1748delCCAG [129] |
| Fucosidosis* | FUCA1 | 230000 | canine | c.379_392del14bp [130] |
| Globoid cell leukodystrophy* | GALC | 245200 | canine | c.473A>C [131] |
| Mucopolipidosis II | GNPTAB | 252500 | feline | unpublished |
| Mucopolysaccharidosis I* | IDUA | 607014 | canine, feline | c.155+1G>A [132] c.1107-1109 del [21] |
| Mucopolysaccharidosis IIIA | SGSH | 252900 | canine | c.708-709insA [133] |
| Mucopolysaccharidosis IIIB* | NAGLU | 252920 | canine | unpublished |
| Mucopolysaccharidosis VI* | ARSB | 253200 | canine, feline | unpublished c.1427T>C [134] |
| Mucopolysaccharidosis VII* | GUSB | 253220 | canine, feline | c.559G>A [135] c.1074G>A [136] |
| Niemann Pick Type C1* | NPC1 | 257220 | feline | c.2864G>C [137] |
| <i>Dermatologic diseases</i> | | | | |
| Ectodermal dysplasia/Skin fragility syndrome | PKP1 | 604536 | canine | c.202+1G>C [138] |
| X-linked ectodermal dysplasia, hypohidrotic* | EDA | 305100 | canine | c.910-1G>A [95] |
| Epidermolysis bullosa | PLEC1 | 601975 | canine | c.3823G>A [139] |
| Exfoliative cutaneous lupus erythematosus | SIPA1 | 602180 | canine | unpublished |
| Ichthyosis | NIPAL4 | 175800 | canine | g.52737379delC [140] |
| Lethal acrodermatitis | unknown | 201100 | canine | unknown |
| <i>Cardiovascular diseases</i> | | | | |
| Juvenile dilated cardiomyopathy* | MTHFD1 | n/a | canine | unknown |
| Tricuspid valve dysplasia | unknown | 224700 | canine | unknown |
| <i>Nervous/muscular system diseases</i> | | | | |
| Epilepsy | ANK4 | 600699 | canine | unknown |
| Glycogenosis type VII | PFKM | 232800 | canine | c.222G>A; c.550C>T [141] |
| Glycogen storage disease IV | GBE1 | 232500 | feline | 334bpins;6.2kdel [142] |
| X-linked muscular dystrophy* | DMD | 310200 | canine | A>G intron 6 [143] |
| Fetal-onset neuroaxonal dystrophy | MFN2 | 608507 | canine | c.1617_19delGGA [144] |
| Myotonia congenita | CLCN1 | 118425 | canine | c.803C>T [145] |
| Non-syndromic neuroepithelial deafness | CHD23 | 601386 | canine | unpublished |
| <i>Hematological/immunological system diseases</i> | | | | |
| Erythrocytic pyruvate kinase deficiency | PKLR | 266200 | canine | c.693+304G>A [146] |
| Factor VII deficiency | F7 | 227500 | canine | c.407G>A [147] |
| Factor VIII deficiency | F8 | 306700 | canine | c.98G>A [148] |

Πιν.4.3.1.2 .Γενετικά νοσήματα σκύλου και της γάτας κοινά με του Ανθρώπου (RCAM)

| 420 | | | | |
|---|--------------------------------|------------------|-------------------|----------------------------------|
| Gurda et al.: Canine and feline models of human disease | | | | |
| Factor IX deficiency | <i>F9</i> | 306900 | canine | <i>unknown</i> |
| Factor XI deficiency | <i>FXI</i> | 264900 | canine | <i>unpublished</i> |
| Iron-refractory iron-deficiency anemia | <i>TMPRSS6</i> | 206200 | canine | <i>unknown</i> |
| Leukocyte adhesion deficiency | <i>ITGB2</i> | 116920 | feline | <i>unknown</i> |
| Porphyrias | <i>HMBS</i> | 263700 176000 | feline | c.189insT; c.842_844delGAG [149] |
| X-linked severe combined immunodeficiency* | <i>IL2RG</i> | 300400 | canine | c.582_583insC [120] |
| <i>Additional diseases</i> | | | | |
| Congenital hypothyroidism | <i>TPO</i> | 274500 | canine, feline | <i>unknown</i> <i>unknown</i> |
| Cystinuria | <i>SLC3A1</i> <i>SLC7A9</i> | 220100 | canine | <i>unknown</i> |
| Fibrodysplasia ossificans progressiva | <i>ACVR1</i> | 102576 | feline | <i>unpublished</i> |
| Multiple midline defect syndrome | <i>unknown</i> | <i>unknown</i> | feline | <i>unknown</i> |
| Primary ciliary dyskinesia | <i>unknown</i> | 215518 | canine | <i>unknown</i> |

4.3 Γονιδιακές θεραπείες σε γενετικές ασθένειες

Τα τελευταία 30 χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί 2600 θεραπευτικές δοκιμές γενετικών θεραπειών σε σκύλους που αφορούν νοσήματα με γενετικό υπόβαθρο, συμπεριλαμβανομένων περιστατικών καρκίνου και μονογονιδιακών νοσημάτων. (Ginn et al. 2018). Η πρώτη επιτυχημένη γενετική θεραπεία σε σκύλο πραγματοποιήθηκε το 1993 και αφορούσε την Αιμοροφιλία τύπου Β. Έκτοτε πολυάριθμες μελέτες οδήγησαν σε επιτυχημένες γενετικές θεραπείες μονογονιδιακών νοσημάτων, με αποτέλεσμα να ανοίξει ο δρόμος για κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους.

Η πιο αξιοσημείωτη γενετική θεραπεία σε σκύλο αφορά τη μεταφορά συμπληρωματικής αλληλουχίας στο γονίδιο *RPE65* μέσω αδενοσχετιζόμενου ιού (AAV-RPE65) (Acland et al. 2001). Η παραλλαγή στο γονίδιο αυτό είναι υπεύθυνη για τη συγγενή στατική νυχτερινή τύφλωση ή νυκταλωπία (έλλειψη νυχτερινής όρασης) στον σκύλο και την αντίστοιχη συγγενή αμαύρωση Leber τύπου-2 (Leber's LCA2) στον άνθρωπο. Η υπό τον αμφιβληστροειδή έγχυση του γονιδιακού σκευάσματος είχε θεραπευτικό αποτέλεσμα σε συνολικά 18 σκύλους, με πλήρη ανάκτηση της όρασης για σταθερό διάστημα 3 ετών (Acland et al. 2005).

Οι πρώτες κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους για την αντίστοιχη θεραπεία πραγματοποιήθηκε σε 3 ενήλικους ασθενείς (Maguire et al. 2008). Τελικά ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων [Food and Drug Administration (FDA)] ενέκρινε τη γονιδιακή θεραπεία του φαρμάκου τον Δεκέμβριο του 2017 (<https://www.fda.gov/media/109487/download>). Αυτή ήταν η πρώτη γονιδιακή θεραπεία για μονογονιδιακό νόσημα που πήρε έγκριση στις ΗΠΑ.

Στο στάδιο I, II, III των κλινικών δοκιμών βρίσκεται η γονιδιακή θεραπεία για τη φυλοσύνδετου τύπου μελαγχρωστική αμφιβληστροειδοπάθεια του ανθρώπου (X-linked retinitis pigmentosa) (Cehajic Karetanovic et al. 2019).

Ταυτόχρονες παραλλαγές σε αρκετά γονίδια ενοχοποιούνται για την αχρωματοψία του ανθρώπου συμπεριλαμβανομένου του γονιδίου *CNGB3*. Διαφορετικές παραλλαγές στο συγκεκριμένο γονίδιο ανιχνεύτηκαν στις φυλές Alaskan Malamute, German Shorthaired Pointers, Miniature Australian Shepherd, Siberian Husky, and Alaskan Sled Dog, δύο εκ των οποίων επιδιορθώθηκαν με τη χρήση μεταφορέα AAV (Komáromy et al. 2010). Νοσήματα τα οποία είναι εξαιρετικά σπάνια στον ανθρώπινο πληθυσμό όπως είναι οι ασθένειες λυσοσωματικής αποθήκευσης (lysosomal storage diseases (LSD) με επιπολασμό 1 in 5000 (Platt et al. 2018) βρίσκονται σε στάδιο κλινικών δοκιμών, τα αποτελέσματα των οποίων δεν είναι ικανοποιητικά ώστε να επιτρέψουν τη μετάβαση στο επόμενο στάδιο. Στην παραπάνω κατηγορία ανήκουν η βλεννοπολυσακχαριδώσεις [mucopolysaccharidoses (MPS)], και η Νευρωνική Κηροειδή Λιποφουσκίνωση [neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs)] ,νοσήματα που συναντιούνται σε αρκετές φυλές σκύλων. (Marek Switonsk et.al 2020).

Μια πολύ σημαντική νόσος για τον άνθρωπο η μυϊκή δυστροφία Duchenne (DMD), με επιπολασμό 1:5000 νεογέννητων αρρένων (Yiu and Kornberg 2015) οφείλεται σε παραλλαγές του γονιδίου της δυστροφίνης. Το νόσημα διαγνώστηκε σε σκύλους που ανήκουν στις φυλές Golden Retriever, Labrador Retriever, German Shorthaired Pointer, Rottweiler, Cavalier King Charles Spaniel, Pembroke Welsh Corgi, Cocker Spaniel, και Tibetan Terrier (Kornegay et al. 2012). Η εφαρμογή της τεχνολογίας του CRISPR/Cas9 ανοίγει το δρόμο για πρώτη φορά της θεραπείας της νόσου σε σκύλους (Amoasii et al. 2018), και ενώ τα πρώτα αποτελέσματα είναι ενθαρρυντικά, χρειάζεται μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για την τελική αξιολόγηση (Wasala et al. 2019)).

Στον πίνακα.4.4 αναφέρονται οι γονιδιακές θεραπείες στους σκύλους οι οποίες άνοιξαν το δρόμο για τις κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους.(Switonski M.et al.2020)

Πιν.4.4 Γονιδιακές θεραπείες στους σκύλους σε γενετικά νοσήματα του ανθρώπου.
(Switonski M.et al.2020)

| Year | Gene therapy in dogs | | | Reference | Human counterpart disease |
|------|--|---------------------|---------|---------------------------|--|
| | Disease | Corrected gene | Vector* | | |
| 1993 | Hemophilia B | <i>FIX</i> | RV | Kay et al. 1993 | Hemophilia B |
| 1996 | Hemophilia A | <i>FVIII</i> | AV | Connelly et al. 1996 | Hemophilia A |
| 1998 | Muscular dystrophy | <i>DMD</i> | AV | Howell et al. 1998 | Duchenne muscular dystrophy |
| 2001 | Congenital stationary night blindness (CSNB) | <i>RPE65</i> | AAV | Acland et al. 2001 | Leber amaurosis type 2 (LCA-2) |
| 2002 | Mucopolysaccharidosis VII (MPSVII) | <i>GUSB</i> | RV | Ponder et al. 2002 | Mucopolysaccharidosis VII |
| 2006 | X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) | <i>IL2RG</i> | RV | Ting-De Ravin et al. 2006 | X-linked Severe Combined Immunodeficiency (X-SCID) |
| 2008 | Canine leukocyte adhesion deficiency (CLAD) | <i>ITGB2 (CD18)</i> | FV | Bauer et al. 2008 | Leukocyte Adhesion Deficiency 1 (LAD-1) |
| 2010 | Achromatopsia | <i>CNGB3</i> | AAV | Komáromy et al. 2010 | Achromatopsia |
| 2012 | X-linked retinitis pigmentosa | <i>RPGR</i> | AAV | Beltran et al. 2012 | X-linked retinitis pigmentosa |

*AV adenovirus, AAV adeno-associated virus, RV retrovirus, LV lentivirus, FM foamy virus

4.4 Ο σκύλος και η γάτα φυσικά μοντέλα μελέτης του καρκίνου του μαστού του ανθρώπου

4.4.1 Ο καρκίνος του μαστού στη σύγχρονη εποχή

Ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το νόσημα με την υψηλότερη συχνότητα διάγνωσης και θνησιμότητας λόγω νεοπλασματικής νόσου στις γυναίκες παγκοσμίως. (Ghoncheh M et al.2016).Σύμφωνα με το Διεθνή Οργανισμό Υγείας (World Health Organization) το έτος 2018 καταγράφηκαν 2 εκ. θετικά περιστατικά με καρκίνο του μαστού σε γυναίκες, εκ των οποίων κατέληξε το 30%. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής το 2017, το 12.9% των γυναικών παρουσίασαν αυξημένη πιθανότητα νόσησης από καρκίνο του μαστού. (Howlader N,et.al 2020). Η δυνατότητα της πρώιμης διάγνωσης, της εξέλιξης των χειρουργικών μεθόδων και της χρήσης στοχευμένων θεραπευτικών σχημάτων οδήγησαν σε αύξηση των ποσοστών επιβίωσης. Έτσι έχει υπολογιστεί ότι 5 έτη μετά τη διάγνωση, τα ποσοστά επιβίωσης είναι 97% για το στάδιο I, 88% για το στάδιο II και 70% για το στάδιο III (επιβεβαιωμένη διάγνωση στον μαστικό ιστό ή στους επιχώριους λεμφαδένες). Παρά ταύτα, η επιβίωση για τα μεταστατικά στάδια της νόσου IV (εντοπισμός σε απομακρυσμένα όργανα και λεμφαδένες) παραμένει φτωχή της τάξης του 25%, ενώ μεγαλύτερο ποσοστό από το 50% των ορμονοεξαρτώμενων ασθενών εμφανίζουν αντίσταση στη θεραπεία, το 20% δεν ανταποκρίνονται σε θεραπείες πρώτης γραμμής. Επιπρόσθετα, οι αδρανείς όγκοι είναι δυνατόν να επαναενεργοποιηθούν και να προκαλέσουν νόσηση, ενώ είναι πιθανή και η υποτροπή ασθενών μετά από θεραπεία (Zhang XH et al.2013). Από τα παραπάνω, διαφαίνεται η ανάγκη για περαιτέρω έρευνα με σκοπό την αποτελεσματική αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο.

Εξαιτίας της έλλειψης δειγμάτων ανθρώπινων ιστών και τα ηθικά θέματα τα οποία σχετίζονται με τις έρευνες σε ανθρώπους, οι ερευνητές καταφεύγουν σε in vivo και in vitro μοντέλα μελέτης του καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο (Ghoncheh et al. 2016). Η μελέτη κυτταρικών σειρών, με την ανάπτυξη προσφάτως της καλλιέργειας οργανοειδών, αποτελεί το πιο διαδεδομένο in vivo μοντέλο με ευρεία χρήση στην προκλινική έρευνα, χωρίς όμως να είναι δυνατή η μελέτη της "συμπεριφοράς" του καρκίνου σε φυσικές συνθήκες. Στα in vivo μοντέλα συμπεριλαμβάνονται τα ξενομοσχεύματα, συγγενικά και γενετικά τροποποιημένα ποντίκια, μεγάλα θηλαστικά (Holen I, et al. 2017).

Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα από τη χρήση των τελευταίων στην ιατρική του καρκίνου του μαστού με σκοπό την επιλογή του καταλληλότερου μοντέλου μελέτης διατυπώθηκαν από πολλούς ερευνητές (Mondal Pinaki et al. 2022).

Εκτός από την μεγαλύτερη ομοιότητα συγκριτικά με τα άλλα μοντέλα μελέτης των ζώων αυτών με τον άνθρωπο, σε επίπεδο ανατομίας, φυσιολογίας, κλινικοπαθολογίας και φαρμακοκινητικής, διαπιστώνεται και ανάλογη αντιστοίχιση με τα χαρακτηριστικά του συγκεκριμένου καρκίνου, όπως είναι το μέγεθος, η διαστρωμάτωση, η αγγείωση και η γονοτυπική του συμπεριφορά. Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι είναι δυνατή στα μεγάλα θηλαστικά η διεξαγωγή φλεβοτομής και χειρουργικών επεμβάσεων διάσωσης, η χρήση ιατρικών συσκευών που χρησιμοποιούνται στην ιατρική του ανθρώπου (ενδοσκόπηση, ακτινοσκόπηση, ιατρικά εργαλεία) και τέλος η χρήση κυτταρικών και μοριακών εργαλείων τα οποία έχουν πρώτα χρησιμοποιηθεί σε ποντίκια. Στα μειονεκτήματα της χρήσης τους είναι το κόστος συντήρησης και στέγασης που είναι υψηλότερο σε σχέση με εκείνο των ποντικών, ενώ πρέπει να ληφθούν σοβαρά υπόψιν οι κανόνες διαχείρισης των μεγάλων θηλαστικών οι οποίοι είναι αυστηρότεροι και πλαισιώνονται από την κοινωνική ευαισθησία και τους ηθικούς περιορισμούς της σύγχρονης κοινωνίας.

Πρόσφατες δημοσιεύσεις προτείνουν το σκύλο και τη γάτα ως πρότυπα μοντέλα μελέτης του καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο εξαιτίας των αρκετών ομοιοτήτων των παραπάνω ειδών μεταξύ τους, όπως είναι η σχετική ηλικία εμφάνισης, οι παράγοντες κινδύνου, η βιολογική συμπεριφορά, τα μοτίβα μετάστασης, τα ιστοπαθολογικά- μοριακά χαρακτηριστικά και η ανταπόκριση στη θεραπεία (Pang and Argyle, et al. 2009; Una et al. 2009). Λαμβάνοντας υπόψιν τις έως τώρα μελέτες και με βάση τις παραπάνω ομοιότητες θα αποδειχθεί ότι κυρίως ο σκύλος και δευτερευόντως η γάτα αποτελούν το ιδανικό μοντέλο μελέτης του καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο.

4.4.2.Κριτήρια επιλογής του σκύλου και της γάτας ως φυσικά μοντέλα μελέτης του καρκίνου του μαστού

4.4.2.1 Επιδημιολογικά στοιχεία εμφάνισης του καρκίνου του μαστού στα ζώα

Ο καρκίνος του μαστού είναι από τους πιο συνήθεις όγκους σε θηλυκούς σκύλους και γάτες με ετήσια συχνότητα εμφάνισης 192 περιστατικά ανά 100.000 σκύλους και 230 περιστατικά ανά 100.000 γάτες, Το 80–90% είναι κακοήθης (Egenvall A et al. 2010; Hayes et al. 1981) εκ των οποίων οι διηθητικοί όγκοι να επιδεικνύουν ιδιαίτερα επιθετική συμπεριφορά με υψηλά ποσοστά μετάστασης και σύντομο χρόνο επιβίωσης μετά την χειρουργική τους αφαίρεση (11 μήνες για τους σκύλους και 8 με 12 μήνες για τις γάτες) (Chang SC, et al. 2005; Ito T et al. 1996).

4.4.2.2 Σχετική ηλικία, φύλο και φυλή εμφάνισης του καρκίνου του μαστού.

Σύμφωνα με τα στοιχεία από το Εθνικό Ινστιτούτο Καρκίνου (National Cancer Institute, NCI) των ΗΠΑ μετά την ηλικία των 50 ετών, αυξάνεται ο κίνδυνος εμφάνισης του καρκίνου του μαστού στις γυναίκες. Ο καρκίνος του μαστού συνήθως εμφανίζεται σε μέσης ηλικίας σκύλες 9-11 ετών (Metzger et.al, 2005) και χαρακτηρίζεται από αυξημένη επιθετικότητα ενώ σε μικρότερης ηλικίας σκύλους οι όγκοι είναι συνήθως καλοήθεις. Επίσης η ηλικία εμφάνισης εξαρτάται και από τη μέση διάρκεια ζωής της κάθε φυλής. Επομένως στις μεγαλόσωμες φυλές στις οποίες το χρονικό διάστημα επιβίωσης είναι μικρότερο, ο καρκίνος εμφανίζεται νωρίτερα από ότι στις μικρόσωμες φυλές. Στις θηλυκές γάτες ο μέσος όρος εμφάνισης της νόσου είναι 10-12 έτη (Morris et.al 2013) και η συχνότητα εμφάνισης αυξάνεται με την ηλικία.

Πίνακας 4.5. Αντιστοίχιση χρονολογικής ηλικίας σκύλου – ανθρώπου (Metzger et.al, 2005)

| Dog (years) | Human (years) |
|-------------|---------------|
| 6 | 40-42 |
| 7 | 44-47 |
| 8 | 48-51 |
| 9 | 52-56 |
| 10 | 56-60 |
| 11 | 60-65 |
| 12 | 64-69 |
| 13 | 68-74 |
| 14 | 72-78 |

Ποσοστό μικρότερο του 1% των διαγνωσμένων καρκίνων του μαστού στον δυτικό κόσμο αφορούν τον ανδρικό πληθυσμό (Fentiman 2016), με το ποσοστό θνησιμότητας των νοσούντων να μην υπερβαίνει το 0.2%, (Gucalp, et.al, 2019). Στα αρσενικά σκυλιά παρατηρείται σπάνια (Schneider R et.al, 2017). Στις αρσενικές γάτες, ενώ η συχνότητα εμφάνισης είναι μικρότερη, η κλινική εκδήλωση της νόσου εμφανίζει πολλές ομοιότητες μεταξύ των δύο φύλων(Skorupski et.al, 2005)

Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία της Αμερικάνικης Εταιρείας Καρκίνου η πιθανότητα νόσησης και θνητότητας από καρκίνο του μαστού είναι της τάξης του 11.6 % (1 στις 9) και 3.0% (1 στις 33) όσον αφορά μαύρου χρώματος γυναίκες και 13.6 % (1 στις 7) και 2.5% (1 στις 39) λευκού χρώματος γυναίκες (Lifetime Probability of Developing or Dying from Invasive Cancer by Race and Sex, US, 2016-2018). Αντίθετα οι Ισπανίδες γυναίκες έχουν 30% μικρότερη πιθανότητα να αναπτύξουν και να πεθάνουν από καρκίνο του μαστού συγκριτικά με τις λευκές ομοεθής τους.

Οι πέντε φυλές με τον μεγαλύτερο επιπολασμό στον καρκίνο του μαστού σε έρευνα που διεξήχθη από το 2007 έως το 2010, είναι οι Maltese, Yorkshire terrier, Shih Tzu, Poodle, και οι ημίαιμες. Οι σκύλοι της φυλής Shih Tzu παρουσιάζουν το υψηλότερο ποσοστό κακοήθειας σε σχετικά μικρή ηλικία και ακολουθούν εκείνοι που ανήκουν στη μικτή φυλή, με εμφάνιση της νόσου σε μεγαλύτερη ηλικία (Im KS et al. 2012).

Οι γενετικά διαφοροποιημένες φυλές γατών είναι λιγότερες από τους σκύλους και από τα λίγα δεδομένα που έχουμε μέχρι σήμερα, φαίνεται ότι οι κοινές κοντότριχες γάτες, οι νεαρές γάτες που ανήκουν στη φυλή των Siam και οι ανατολίτικης προέλευσης φυλές έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες ανάπτυξης καρκίνου του μαστού (Egenvall, A. et al. 2009 ; Joanna Morris et al.2013 ; Hayes et al.1981).

4.4.2.3 Διατροφή και περιβάλλον ως επιβαρυντικοί παράγοντες στην εμφάνιση του καρκίνου του μαστού

Επιβαρυντικός παράγοντας ανάπτυξης καρκίνου του μαστού αποτελεί το ποσοστό εναπόθεσης λίπους σε γυναίκες και σε σκύλους. Οι υπέρβαρες ή παχύσαρκες γυναίκες έχουν αυξημένες πιθανότητες εμφάνισης καρκίνου του μαστού και μάλιστα υψηλής κακοήθειας και δυσμενής πρόγνωσης (Carmichael et al. 2004). Η μέση ηλικία εμφάνισης καρκίνου του μαστού είναι μικρότερη σε παχύσαρκους σκύλους (8.7 + 1.9 χρόνια) από εκείνους με ιδανικό σωματικό βάρος (10.4 + 2.7 years). Επίσης το ποσοστό εμφάνισης νεοπλασιών (grade III) ήταν σημαντικά αυξημένο σε παχύσαρκους θηλυκούς σκύλους (H.-Υ. Lim1 et al. 2015). Οι γάτες φαίνεται να αποτελούν εξαίρεση, καθώς η παχυσαρκία δεν αποτελεί σημαντικό επιβαρυντικό παράγοντα (Morris J et al. 2013). Η μη ισορροπημένη υψιθερμιδική διατροφή όμως, αποτελεί σημαντικό επιβαρυντικό παράγοντα καρκίνου του μαστού (Nunes, G. et al., 2011).

Η αύξηση της συχνότητας εμφάνισης καρκίνου του μαστού σε βιομηχανικές περιοχές, τόσο στον άνθρωπο όσο και στα κατοικίδια ζώα, πιστοποιεί το γεγονός ότι η μόλυνση του περιβάλλοντος παίζει σημαντικό ρόλο στην παθογένεια του νοσήματος. Οι παραμένοντες οργανικοί ρύποι είναι ικανοί να αλληλοεπιδρούν με τους ορμονικούς υποδοχείς, των οιστρογόνων, της προγεστερόνης και των ανδρογόνων και έμμεσα να σχετίζονται αιτιολογικά με τον καρκίνο του μαστού (Sénère et al. 2015). Τα κατοικίδια ζουν με τους ανθρώπους και έτσι εκτίθενται στους ίδιους καρκινογόνους παράγοντες που σχετίζονται με την περιβαλλοντική μόλυνση. Αποδείχθηκε ότι στον λιπώδη ιστό θηλυκών σκύλων με καρκίνο του μαστού ανιχνεύθηκαν ποσότητες πυρεθροειδών φυτοφαρμάκων σε αναλογία 33%.

4.4.2.4 Ο ρόλος των ορμονών στην δημιουργία του καρκίνου του μαστού

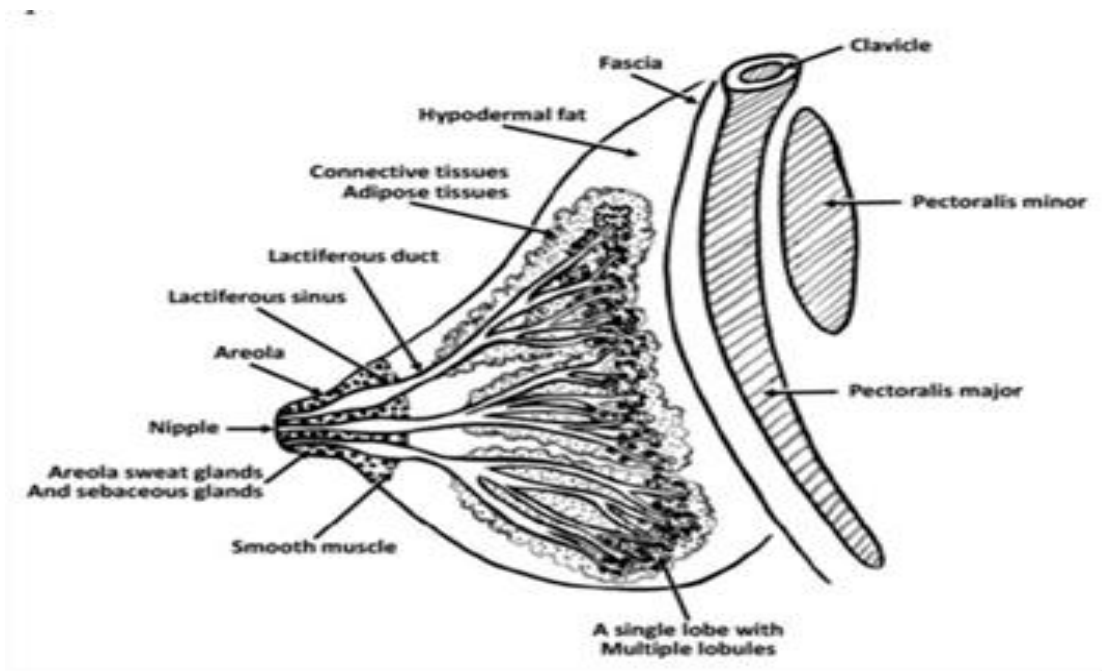
4.4.2.4.1. Ανατομία και φυσιολογία των μαστικών αδένων των θηλαστικών.

Ο ρόλος των μαστικών αδένων στα θηλαστικά είναι σημαντικός αφού μέσω αυτών γίνεται η παροχή γάλακτος στα νεογνά με στόχο την ανάπτυξη τους και την ενίσχυση του ανοσοποιητικού τους συστήματος.

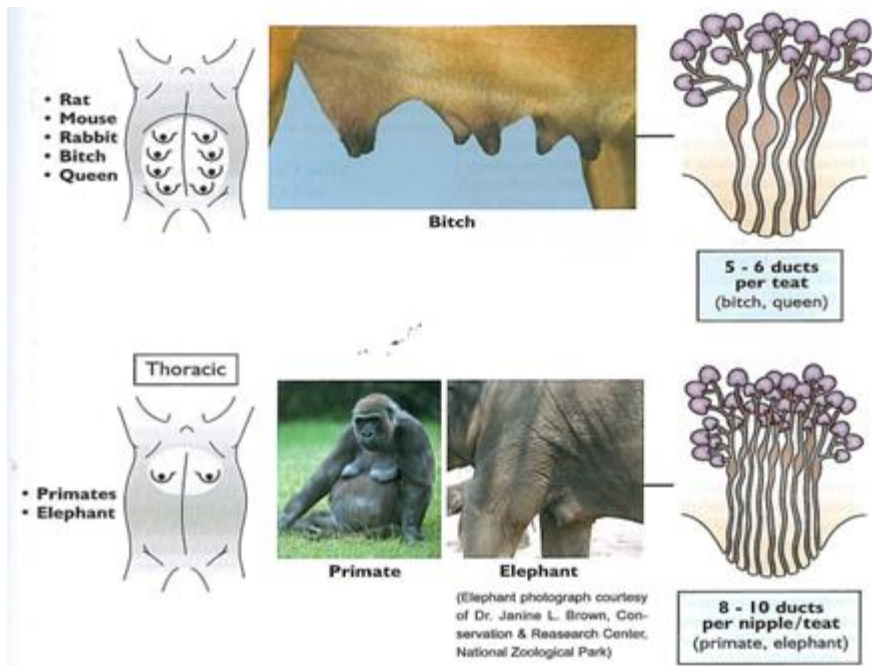
Στον άνθρωπο οι μαστικοί αδένες είναι δύο και εκτείνονται μεταξύ της 2^{ης} ή 3^{ης} και 6^{ης} ή 7^{ης} πλευράς, υποδορίως της πρόσθιας επιφάνειας του θωρακικού τοιχώματος (Rubin R et al. 2011). Στον σκύλο και στη γάτα αποτελούν ανεξάρτητους αδένες οι οποίοι διατάσσονται ανά ζεύγη (7 έως 10) και εκφύονται σε όλο το μήκος της μαστικής ακρολοφίας. (Pathways to Pregnancy and Parturition, 3rd Edition P.L. Senger). Διακρίνονται στους πρόσθιους, οπίσθιους θωρακικούς, πρόσθιους, οπίσθιους κοιλιακούς και βουβωνικούς. [Κλινική ανατομική σκύλου και γάτας]. Οι πρόσθιοι και οι οπίσθιοι κοιλιακοί μαστοί αποχετεύουν τη λέμφο στο στερνικό ή στο μασχαλιαίο λεμφικό κέντρο ενώ οι οπίσθιοι κοιλιακοί και οι βουβωνικοί αποχετεύουν τη λέμφο στα βουβωνικά λεμφικά κέντρα [Κλινική ανατομική σκύλου και γάτας, J.S.Boyd 2nd Edition, (207-208)].

Ο μαστικός αδένας είναι ένας σύνθετος σωληνοκυψελοειδής αδένας. Κατά βάση αποτελείται από εκκριτικά σωληνάκια (αδενοσωλήνες), κυψέλες (αδενοκυψέλες) και από εκφορητικούς πόρους οι οποίοι συνενώνονται σε μεγαλύτερους, τους γαλακτοφόρους και εκβάλλουν ο καθένας χωριστά στη θηλή (Φυσιολογία. Αθ.Σμοκοβίτη 8^η έκδοση, 578). Το εκκριτικό μέρος του μαστού αποτελείται από το λόβιο (άθροιση αδενοκυψελών), τους λοβούς (άθροιση λοβίων) και ισάριθμους γαλακτοφόρους πόρους, οι οποίοι εκβάλλουν ο καθένας ανεξάρτητα στη θηλή. Ο αριθμός των λοβίων και των αδενοκυψελών διαφέρει μεταξύ των θηλαστικών. Ο τελικός πόρος και το λοβίο αποτελούν την λοβιακή μονάδα του τερματικού πόρου (Terminal Duct Lobular Units- TDLU). (Pathways to Pregnancy and Parturition, 3rd Edition, P.L. Senger p 324).

Το σωληνοειδές σύστημα του αδένος διαμορφώνεται από δύο είδη επιθηλιακών κυττάρων τα βασικά (έξω στίχος) και τα αυλικού τύπου (έσω στίχος). Το βασικό επιθήλιο αποτελείται από μυοεπιθηλιακά κύτταρα, ενώ του αυλικού τύπου από κυλινδρικά κύτταρα με τα αρχέγονα κύτταρα (stem progenitor cells) να βρίσκονται διάσπαρτα με ανάλογη κατεύθυνση διαφοροποίησης στα θηλαστικά. (Swarajit Kumar Biswas et al.2022) Τόσο τα λόβια όσο και οι λοβοί αφορίζονται από πέταλα συνδετικού ιστού.

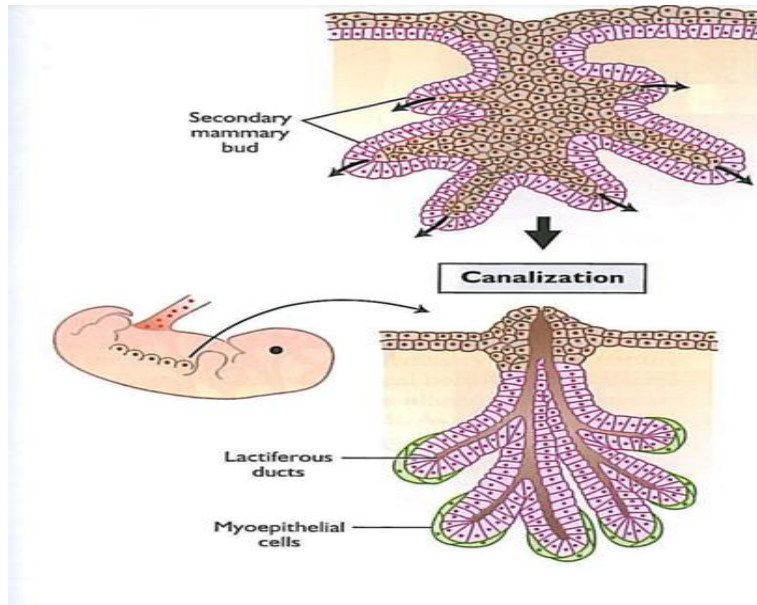


Εικόνα 4.3 Σχηματική απεικόνιση του μαστικού αδένα (Swarajit Kumar Biswas et al.2022)



Εικόνα 4.4 Ανατομική απεικόνιση των μαστικών αδένων των θηλαστικών και της ανάπτυξης των γαλακτοφόρων πόρων. (Pathways to Pregnancy and Parturition, P.L. Senger p 327)

Ο μαστικός αδένας σχηματίζεται κατά την εμβρυική ζωή από τη μαστική ακρολοφία και βρίσκεται υπό τον έλεγχο του μεσεγχύματος του εμβρύου (συνδετικός ιστός), ενώ μέχρι την ενήβωση παρατηρείται ανάπτυξη του συνδετικού ιστού και εναπόθεση λίπους. Ουσιαστικά η ανάπτυξη του αδενώδους παρεγχύματος ξεκινά από την ενήβωση και προάγεται σε κάθε αναπαραγωγικό κύκλο. Πλήρης ανάπτυξη όμως επιτυγχάνεται κατά την κυοφορία και στην γαλακτοπαραγωγική περίοδο. Η ανάπτυξη του μαστικού αδένου σε όλα τα θηλαστικά βρίσκεται υπό γεννητικό και ενδοκρινολογικό έλεγχο. Έτσι οι ωθητικές ορμόνες (οιστρογόνα, προγεστερόνη), ορμόνες της υπόφυσης και της φλοιώδους μοίρας των επινεφριδίων παίζουν τον κύριο ρόλο καθ' όλη τη διάρκεια ανάπτυξης και της λειτουργίας του, με σαφείς διακυμάνσεις μεταξύ των ειδών.



Εικόνα 4.5 Απεικόνιση των κυτταρικών σειρών στα στάδια ανάπτυξης του μαστικού αδένου. .(Pathways to Pregnancy and Parturition P.L. Senger p 325)

4.4.2.4.2 Φυσιολογία του αναπαραγωγικού συστήματος των θηλαστικών.

Η μελέτη του αναπαραγωγικού συστήματος των θηλαστικών είναι απαραίτητη για την κατανόηση των μηχανισμών δημιουργίας και ανάπτυξης του καρκίνου του μαστού. Υπάρχουν δύο είδη αναπαραγωγικών κύκλων στα θηλαστικά, ο οιστρικός κύκλος και ο κύκλος της έμμηνης ρύσης, οι οποίοι είναι αναγνωρίσιμοι με εξωτερική παρατήρηση. Έτσι η δεκτικότητα στην επίβαση από τα κατοικίδια σηματοδοτείται από τα οιστρογόνα τα οποία παράγονται από το αναπτυσσόμενο ωοθυλάκιο, ενώ στα πρωτεύοντα αφορά την αποβολή υγρών, τεμαχίων και ιστών από τον κόλπο.

Ο ωοθηκικός κύκλος αναφέρεται στις μεταβολές που παρατηρούνται στις ωοθήκες ενός θηλαστικού μεταξύ δύο διαδοχικών ωοθυλακιορρηξιών και ελέγχεται από τον υποθάλαμο (απελευθερωτική ορμόνη των γοναδοτρόπων ορμονών), τον πρόσθιο λοβό της υπόφυσης (γοναδοτρόπες ορμόνες), την ωοθήκη (ωοθηκικές ορμόνες) αλλά και από τη μήτρα (παραγωγή της PGF2a).

Σε κάθε ωθητικό κύκλο, που εκτός από τη διάρκεια του, δε διαφέρει μεταξύ των θηλαστικών, διακρίνουμε τα εξής στάδια πρόοιστρος, οίστρος, μέτοιστρος, άνοιστρος. Ο σκύλος παρουσιάζει ωθητικούς κύκλους με εκδήλωση οίστρου δύο φορές τον χρόνο (την άνοιξη και το φθινόπωρο) και σε κάθε αναπαραγωγική περίοδο παρουσιάζει έναν μόνο ωθητικό κύκλο (εποχικά μονοοιστρικό ζώο). Η μέση διάρκεια οίστρου 9 ημέρες και η ωθηλακιορρηξία συμβαίνει 1-2 ημέρες πριν το τέλος του οίστρου. Η γάτα είναι εποχικά πολυοιστρικό ζώο, δηλαδή εμφανίζει πολλούς ωθητικούς κύκλους συνήθως άνοιξη και φθινόπωρο με τη διάρκεια του ωθητικού κύκλου να κυμαίνεται μεταξύ 18-80 ημέρες ανάλογα με την πραγματοποίηση ή όχι συνουσίας κατά τη διάρκεια του οίστρου (96 ώρες). Η ωθηλακιορρηξία στη γάτα συμβαίνει 24-32 ώρες μετά τη συνουσία (Φυσιολογία Αθ.Σμοκοβίτη, 2014 p.541-546.) .

Στα πρωτεύοντα η έμμηνη ρύση συνήθως εμφανίζεται εντός 24 ώρου από τη λήξη της ωχρινικής φάσης. Παρότι η έναρξη τόσο του οιστρικού κύκλου όσο και της έμμηνης ρύσης τοποθετείται χρονικά σχεδόν αμέσως μετά το τέλος της ωχρινικής φάσης, ο χρόνος της ωθηλακιορρηξίας διαφέρει μεταξύ των δύο κύκλων. Αυτό συμβαίνει επειδή στα πρωτεύοντα δεν αλληλεπικαλύπτονται χρονικά η ωχρινική με την ωθηλακική φάση και συνεπώς η ωθηλακιορρηξία πραγματοποιείται τουλάχιστον 12 με 13 ημέρες μετά την έναρξη της έμμηνορροσίας. Στα περισσότερα κατοικίδια ζώα η ωχρινική και η ωθηλακική φάση αλληλεπικαλύπτονται και η ωθηλακιορρηξία συμβαίνει νωρίτερα στα πλαίσια του οιστρικού κύκλου. Στον σκύλο μεσολαβεί ο άνοιστρος (διάρκειας 2-3 μηνών). Με την ήβη ξεκινά η αναπαραγωγική ζωή του ζώου. Στα κατοικίδια ζώα ταυτίζεται με την έναρξη της αναπαραγωγικής δραστηριότητας και στον άνθρωπο με τη πρώτη έμμηνορροσία. Ως έναρξη της ήβης θεωρείται η χρονική στιγμή της πρώτης ωθηλακιορρηξίας. Σε όλα τα είδη, η έναρξη της ήβης προϋποθέτει συγκεκριμένου βαθμού σωματική ανάπτυξη. Η πρώτη ορμονική μεταβολή που παρατηρείται κατά την ενήβωση είναι μια κορύφωση της έκκρισης των γοναδοτροπινών ορμονών που μοιάζει με την κορύφωση πριν την ωθηλακιορρηξία. Αυτή η κορύφωση οφείλεται κατά πάσα πιθανότητα στα οιστρογόνα που παράγονται από τα αναπτυσσόμενα ωθηλάκια. Το αποτέλεσμα είναι η ωχρινοποίηση ενός ή περισσότερων ωθηλακίων και η δημιουργία ωχρινικών δομών με μικρή διάρκεια ζωής περίπου 3-4 ημερών. Ακολουθεί νέα κορύφωση της έκκρισης των γοναδοτρόπων ορμονών, η οποία προκαλεί ωθηλακιορρηξία και το σχηματισμό ενός ωχρού σωματίου το οποίο έχει συνήθως φυσιολογική διάρκεια ζωής. Από το σημείο αυτό και έπειτα ξεκινά η κυκλική δραστηριότητα των ωθηκών.

Στη γάτα η κυκλική δραστηριότητα των ωοθηκών ρυθμίζεται από την έκθεση στο φυσικό φως. Στον άνθρωπο η κυκλική δραστηριότητα ομαλοποιείται με βραδύτερο ρυθμό. Συνήθως η πρώτη αξιοσημείωτη ανάπτυξη ωοθυλακίου δεν ακολουθείται από ωοθυλακιόρρηξη, ενώ στον επόμενο κύκλο ακολουθεί η φυσιολογική κυκλική δραστηριότητα των ωοθηκών.

Κατά την ενήβωση σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του εκφορητικού συστήματος του μαστικού αδένος παίζουν τα οιστρογόνα, η αυξητική ορμόνη και τα γλυκοκορτικοειδή ενώ στην ανάπτυξη του εκκριτικού συστήματος η προγεστερόνη και προλακτίνη. Στην όλη διεργασία συμμετέχουν οι ορμόνες του θυρεοειδή και η ινσουλίνη ενώ εμπλέκονται με διαφορετικούς μηχανισμούς (αυτοκρινείς, ενδοκρινείς, παρακρινείς) και διάφοροι αυξητικοί παράγοντες όπως ο παρόμοιος της ινσουλίνης αυξητικός παράγοντας -I, ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας, ο μεσεγχυματικός αυξητικός παράγοντας, ο αιμοπεταλικός αυξητικός παράγοντας, ο ινοβλαστικός, ο υποφυσικός αυξητικός παράγοντας και ο μεταμορφωτικός αυξητικός παράγοντας α και β . (Φυσιολογία Αθ.Σμοκοβίτη, 2014, 581, Κτηνιατρική Φυσιολογία Bradleyg.Klein, 2018 p.666)

Στα περισσότερα κατοικίδια ζώα κατά το μέσο της κυοφορίας, η ανάπτυξη του μαστού είναι ήδη εμφανής. Η έκκριση του γάλακτος ξεκινά συνήθως κατά το τελευταίο στάδιο της κυοφορίας κυρίως χάρη στην αυξημένη έκκριση της προλακτίνης, με αποτέλεσμα τη παραγωγή του πρωτογάλακτος. Με το τέλος της κυοφορίας ο μαστικός αδένας αντί μιας δομής που αποτελείται κατά κύριο λόγο από συνδετικό ιστό (ερειστικό στρώμα) έχει πλέον μετατραπεί σε όργανο πλήρως λειτουργικών αδενοκυψελών που συνθέτουν και εκκρίνουν γάλα. (Κτηνιατρική Φυσιολογία Bradleyg.Kl.,2018, p697).

Στον άνθρωπο η παύση της δραστηριότητας των ωοθηκών ονομάζεται εμμηνόπαυση και συμβαίνει σε γυναίκες μέσης ηλικίας. Στα κατοικίδια ζώα δεν παρατηρείται ανάλογο φαινόμενο. Στα σκυλιά προς το τέλος της ζωής τους, το μεσοίστριο διάστημα αυξάνεται σταδιακά στους 12 με 15 μήνες, ενώ σε περίπτωση εγκυμοσύνης ο αριθμός των κουταβιών είναι μειωμένος και αυξάνεται η πιθανότητα δυστοκίας.

4.4.2.4.3 η ορμονική εξάρτηση του καρκίνου του μαστού στα θηλαστικά

Ο καρκίνος του μαστού συνδέεται σε μεγάλο βαθμό με την επίδραση των γεννητικών ορμονών και με το αναπαραγωγικό προφίλ του οργανισμού. Η πρώιμη εμμηνарχή, η καθυστερημένη εμμηνόπαυση, η μεγάλη ηλικία πρώτης κύησης και ο μικρός αριθμός τέκνων αυξάνουν τον κίνδυνο εμφάνισης. (Rubin R et al. 2011; Turner N et al. 2004; Yi-Sheng Sun1 et al.2017.) Επιβαρυντικός παράγοντας είναι η παραγωγή των οιστρογόνων από την ωοθήκη συνήθως κατά την περίοδο πριν την εμμηνόπαυση, με την ωοθηκεκτομή να μειώνει τον κίνδυνο νόσησης. (G, Key TJ, et al. 2013). Επίσης η χορήγηση εξωγενών ορμονικών σκευασμάτων, οιστρογόνων, προγεσταγόνων έχουν ενοχοποιηθεί τόσο για την πρόκληση καρκίνου του μαστού σε υγιείς γυναίκες όσο και με την αύξηση της πιθανότητας υποτροπής σε ασθενείς μετά το τέλος της θεραπείας τους(Mia Fahle´n et al. 2013).

Στους σκύλους και στις γάτες η ορμονική εξάρτηση του καρκίνου του μαστού είναι δεδομένη. Οι μη στερημένοι θηλυκοί σκύλοι και γάτες, έχουν τετραπλάσια και επταπλάσια πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού, αντίστοιχα, συγκριτικά με εκείνους που στερήθηκαν σε μικρή ηλικία. Στους σκύλους η μεγαλύτερη ηλικία “ωφέλιμης στείρωσης” είναι εκείνης των 2 ετών ενώ για τις γάτες παραμένει απροσδιόριστη (Queiroga et al. 2011; Zappulli et al. 2005).

Στις γάτες η συχνή και επαναλαμβανόμενη χορήγηση ορμονικών σκευασμάτων για την αποτροπή της σύλληψης, την καταστολή του οίστρου και τη μείωση της επιθετικότητας, αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού. (Hayes et al. 1985).

4.4.2.5 Διάγνωση και σταδιοποίηση της νόσου

4.4.2.5.1 Κλινική και ιστολογική ταξινόμηση του νοσήματος

Στα αρχικά στάδια τα συμπτώματα μπορεί να μην είναι εμφανή ή παθολογικά. Κατά την επισκόπηση και τη ψηλάφηση του μαστού στη γυναίκα υπάρχουν κάποια κλινικά σημεία τα οποία αποτελούν ενδείξεις της νόσου. Επομένως ενδέχεται να εμφανιστεί μια μικρή μάζα στην περιοχή του μαστού ή της μασχάλης, πάχυνση ή οίδημα τμήματος του μαστού, ερεθισμός ή αυλάκωση του δέρματος κοντά στη θηλή ή στον μαστό. Εισολκή της θηλής ή πόνος στην περιοχή της θηλής, έξοδος οποιουδήποτε εκκρίματος πλην του γάλακτος από τη θηλή, οποιαδήποτε αλλαγή στο μέγεθος και το σχήμα του μαστού και τέλος πόνος σε οποιαδήποτε σημείο γύρω από τον μαστό. (Breastcancer.org, cancerresearchuk.org.). Για τη σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού χρησιμοποιείται ευρέως το σύστημα σταδιοποίησης TNM της American Joint Committee on Cancer (AJCC). Το 1977, το American Joint Committee on Cancer δημοσίευσε για πρώτη φορά ένα σύστημα σταδιοποίησης των όγκων με βάση τα ανατομικά τους ευρήματα και από τότε τροποποιείται και ανανεώνεται με καινούργια στοιχεία, με πιο πρόσφατη έκδοση αυτή του 2017. (Breast Cancer—Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual Armando E. Giuliano MD 2017). Η ταξινόμηση γίνεται κατά TNM (T= μέγεθος πρωτοπαθούς όγκου, N= προσβολή μασχαλιαίων λεμφαδένων, M= παρουσία ή όχι μεταστάσεων) και περιλαμβάνει πέντε κύριες κατηγορίες με κριτήριο το μέγεθος του όγκου, την προσβολή των λεμφαδένων και την παρουσία μεταστατικών εστιών, απομακρυσμένων ή μη. Σε περίπτωση που οι όγκοι είναι περισσότεροι του ενός, αν είναι σύστοιχοι, η μεγαλύτερη πρωτοπαθής εστία χρησιμοποιείται για ταξινόμηση, ενώ αν είναι αμφοτερόπλευροι ο κάθε όγκος ταξινομείται ως ένα ξεχωριστό καρκίνωμα.

Στους σκύλους κατά την προσκόμιση τους στα κτηνιατρεία έχει παρατηρηθεί ότι δεν εμφανίζουν συμπτώματα ασθένειας (εκτός από το φλεγμονώδες καρκίνωμα), οι οπίσθιοι μαστικοί αδένες προσβάλλονται πιο συχνά, τα νεοπλάσματα διαμέτρου μικρότερης των 3-5 εκ. είναι πιθανότατα πιο καλοήγη και κατά τη στιγμή της διάγνωσης δεν είναι συχνή η μετάσταση (Andreas Beineke et al.2022).

Περιγράφεται το σύστημα κλινικής κατηγοριοποίησης του καρκίνου του μαστού στα κατοικίδια ζώα σκύλος, γάτα (Owen et al.1980).

Η κλινική σταδιοποίηση γίνεται σε 3 κατηγορίες:

N0 = χωρίς μετάσταση στους λεμφαδένες N1 = παρουσία μεταστατικού λεμφαδένα M0 = απουσία απομακρυσμένης μετάστασης, M1 = παρουσία απομακρυσμένης μετάστασης. (Πίνακας 4.6, 4.7)

Οι γάτες συνήθως προσκομίζονται στα κτηνιατρεία με νεοπλασίες διαμέτρου μικρότερης των 5 εκ. Ο μέσος όρος επιβίωσης γατιών που φέρουν όγκους διαμέτρου < 3 εκ. (21–24μήνες) είναι κατά πολύ μεγαλύτερος από εκείνων με διάμετρο >3 εκ. (4-12 μήνες). Κατά τη διάγνωση θα πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψιν το γεγονός ότι περισσότερο του 25% των γατιών έχουν ήδη μετάσταση στους γειτονικούς λεμφαδένες.

Πίνακας 4.6 Σύστημα κλινικής κατηγοριοποίησης, του καρκίνου του μαστού στον σκύλο (Owen et al. 1980)

| Κλινική κατηγορία | Μέγεθος όγκου | Προσβολή Λεμφαδένων | Μεταστάσεις |
|-------------------|---------------|---------------------|-------------|
| Κατηγορία I | T1<3 cm | N0 | M0 |
| Κατηγορία II | T2 = 3-5 cm | N0 | M0 |
| Κατηγορία III | T3>5 cm | N0 | M0 |
| Κατηγορία IV | T | N1 Θετικό | M0 |
| Κατηγορία V | T | N | M1 |

Πίνακας 4.7 Σύστημα κατηγοριοποίησης του καρκίνου του μαστού στη γάτα (Owen et al. 1980)

| Κλινική κατηγορία | Μέγεθος όγκου | Προσβολή Λεμφαδένων | Μεταστάσεις |
|-------------------|---------------|---------------------|-------------|
| Κατηγορία I | T1<2 cm | No | M0 |
| Κατηγορία II | T2 = 3-5 cm | N0 | M0 |
| Κατηγορία III | T3 >3 cm | N0 ή N1 | M0 |
| | T1-T2 | N1 | M0 |
| Κατηγορία IV | T | N1 Θετικό | M1 |

Η λήψη δείγματος με τη χρήση βελόνης (Fine Needle Aspiration) και η κυτταρολογική ταυτοποίηση του όγκου, πρακτική συνήθη στην ιατρική του ανθρώπου, στην κτηνιατρική, πρέπει να αποκλείονται λόγω της μη σωστής εκτίμησης της δυνητικής κακοήθειας του όγκου.(Allen et al. 1986; Cassali et al. 2007).

Η ιστολογική εξέταση είναι σημαντική για την κατηγοριοποίηση του καρκίνου του μαστού. Είναι κοινής αποδοχής η χρησιμοποίηση του τροποποιημένου “Elston and Ellis grading method”, Nottingham Grading System (NGS), το οποίο προτείνεται από πολλούς διεθνείς οργανισμούς [World Health Organization (WHO), American Joint Committee on Cancer (AJCC), European Union (EU), Royal College of Pathologists (UK R.C.P)]. Στον άνθρωπο η συντριπτική πλειοψηφία των νεοπλασμάτων είναι επιθηλιακής προέλευσης κατά (80-85)%, πορογενή (αφορά το επιθήλιο των πόρων) και κατά (15-20)% λοβιακοί (αφορά το επιθήλιο των λοβίων). Ένα μικρό ποσοστό, (λιγότερο από το 10%), αφορά άλλου τύπου ιστολογικούς τύπους. Ακολουθως χαρακτηρίζονται διηθητικοί και in situ, ανάλογα με το αν υπάρχει ή όχι προσβολή της βασικής μεμβράνης. Έτσι η κατηγοριοποίηση συμπεριλαμβάνει τα πορογενή insitu DCIS (25-30)% τα οποία συνήθως είναι υποκλινικά, τα λοβιδιακά in situ LCIS (1)%, διηθητικό πορογενές χωρίς ειδικούς χαρακτήρες NOS (53)% των περιπτώσεων, το μικτό καρκίνωμα (30%), το διηθητικό λοβιδιακό (10%), η εξέλιξη του οποίου οδηγεί σε σπάνιου τύπου παραλλαγές (ωσθήκης, περιτοναίου, μηνίγγων και οφθαλμών), το σωληνώδες(2%), το βλενώδες (2%), το μυελοειδές (2%) και άλλου τύπου (1%). Νόσος του Paget: Συνήθως συνυπάρχει με πορογενές καρκίνωμα και αντιπροσωπεύει διήθηση της επιδερμίδας της θηλής από καρκινωματώδη κύτταρα. Οι μη επιθηλιακοί όγκοι του μαστού είναι σπάνιοι, με τα σαρκώματα και τα λεμφώματα να είναι συνήθως αποτέλεσμα μεταστάσεων στο μαστό.

Πίνακας 4.8. Ιστολογική ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού των κατοικίδιων ζώων (WHO)

| | |
|---|---|
| Hyperplasia/dysplasia <ul style="list-style-type: none"> • Duct ectasia • Lobular hyperplasia (adenosis; regular, with secretory activity, with fibrosis, with atypia) • Epitheliosis • Papillomatosis • Fibroadenomatosis • Gynecomastia | Benign neoplasms <ul style="list-style-type: none"> • Adenoma • Intraductales papillary adenoma • Ductal adenoma • Fibroadenoma • Myoepithelioma • Complex adenoma • Benign mixed tumor |
| Malignant epithelial neoplasms <ul style="list-style-type: none"> • Carcinoma – <i>in situ</i> • Carcinoma – simple (tubular, tubulopapillary, cystic-papillary, cribriform) • Carcinoma – micropapillary invasive • Carcinoma – solid • Comedocarcinoma • Carcinoma – anaplastic • Carcinoma arising in a complex adenoma/mixed tumor • Carcinoma – complex type • Carcinoma and malignant myoepithelioma • Carcinoma – mixed type • Ductal carcinoma • Intraductal papillary carcinoma | Malignant epithelial neoplasms – special types <ul style="list-style-type: none"> • Squamous cell carcinoma • Adenosquamous carcinoma • Mucinous carcinoma • Lipid-rich (secretory) carcinoma • Spindel cell carcinoma (malignant myoepithelioma, squamous cell carcinoma – spindle cell variant) • Inflammatory carcinoma |
| Malignant mesenchymal neoplasms <ul style="list-style-type: none"> • Osteosarcoma • Chondrosarcoma • Fibrosarcoma • Hamangiosarcoma • Other sarcoma | Carcinosarcoma – malignant mixed mammary tumor |
| Neoplasms of the nipple <ul style="list-style-type: none"> • Adenoma • Carcinoma • Carcinoma with epidermal infiltration (Paget-like disease) | Hyperplasia/dysplasia of the nipple <ul style="list-style-type: none"> • Melanosis of the skin of the nipple |

Οι καλοήθεις νεοπλασίες του μαστού στο σκύλο είναι τα αδενώματα, τα θηλώματα των πόρων, τα ινοαδενώματα, τα καλοήθη μικτά νεοπλάσματα. Τα κακοήθη νεοπλάσματα είναι μόλις το 45% και διαφύονται στα καρκινώματα, στα σαρκώματα και στα κακοήθη μικτά νεοπλάσματα (Γενική Παθολογική Ανατομική Νεοπλασία, Κανακούδης ρ.).

Από τα κακοήθη νεοπλάσματα συνήθως το 50% δίνουν μεταστάσεις στους επιχώριους λεμφαδένες και στους πνεύμονες, ενώ σπάνιες είναι στα οστά (Queiroga et al. 2011).

Στις γάτες ο καρκίνος του μαστού αποτελεί το 11% των μη δερματικών νεοπλασμάτων. Συνήθως είναι κακοήθη με δυσμενή πρόγνωση η οποία συνδέεται με τοπική υποτροπή και μετάσταση. Στο επιθετικό φλεγμονώδες καρκίνωμα με εκτεταμένη λεμφική συμμετοχή, οι μαστοί μπορεί να είναι ζεστοί, διογκωμένοι και επώδυνοι. Την ίδια κλινική εικόνα μπορεί να παρουσιάζει η ινοαδενωματώδη υπερπλασία (ινοεπιθηλιακή υπερτροφία), κατάσταση η οποία εμφανίζεται συνήθως σε μικρής ηλικίας γάτες.

Η κλινική εικόνα του φλεγμονώδη καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο και στο σκύλο είναι σχεδόν όμοια με κύρια στοιχεία την παρουσία έντονης φλεγμονής, ερυθρότητας, οιδήματος στο δέρμα και στον μαστικό αδένα. Τα καρκινικά κύτταρα προκαλούν έμφραξη των λεμφαγγείων του δέρματος. Ο μαστός μεγαλώνει γρήγορα, η επιδερμίδα μοιάζει με τη φλούδα πορτοκαλιού ή είναι μελανιασμένη. Συνοδά συμπτώματα πολλές φορές είναι ο πόνος και η υπερευαίσθησία κατά τη ψηλάφηση. Συνήθως απουσιάζουν όγκοι ή μάζες, με τη κλινική εικόνα να οδηγήσει λαθεμένα σε διάγνωση μαστίτιδας ή οξείας δερματίτιδας. Παρόλη την πρόοδο στην ανάπτυξη θεραπευτικών μοντέλων συμπεριλαμβανομένων και στοχευμένων, η πρόγνωση και στα δύο είδη παραμένει χαμηλή.(Teresa P. Raroso et al.2017).

4.4.2.5.2 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού

Ο καρκίνος είναι μια γενετική ασθένεια η οποία οφείλεται σε αλλαγές στην αλληλουχία του DNA, με πολλαπλές σημειακές ή μη παραλλαγές. Οι παραλλαγές αφορούν τα γαμετικά ή τα σωματικά κύτταρα. Οι παραλλαγές της γαμετικής σειράς κληρονομούνται από τους προγόνους και κληροδοτούνται, δηλαδή μεταφέρονται στους απογόνους (κληρονομικός καρκίνος). Οι σωματικές παραλλαγές δεν κληρονομούνται ούτε κληροδοτούνται (σποραδικός καρκίνος) και αποτελούν τη πλειοψηφία των περιστατικών. Οι γενετικές αλλαγές οι οποίες οδηγούν στην καρκινογένεση είναι διαφορετικές, ανάλογα με το στάδιο που συμβαίνουν και αφορούν συνήθως πολλαπλά γονίδια. Οι Douglas και συνεργάτες κατέγραψαν τα χαρακτηριστικά που πρέπει να έχει ένας όγκος για να μπορέσει να αναπτυχθεί, υπερνικώντας ένα ξεχωριστό ρυθμιστικό μηχανισμό άμυνας του οργανισμού. Γνωρίζοντας ότι ο ρυθμός εμφάνισης παραλλαγών είναι της τάξης του 10^{-6} ανά γονίδιο ανά κύτταρο και λαμβάνοντας υπόψιν και τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς υποθέτουμε ότι η ογκογένεση είναι μια πολύπλοκη και σταδιακή διαδικασία. Έτσι οι παραλλαγές που συμβαίνουν στα πρώιμα στάδια, μπορούν να οδηγήσουν σε αποσταθεροποίηση του γονιδιώματος και αύξηση του αριθμού των κυττάρων που φέρουν παραλλαγή στα μετέπειτα (Σύγχρονη κλινική Γενετική, A.Read, 2010, 304-305)

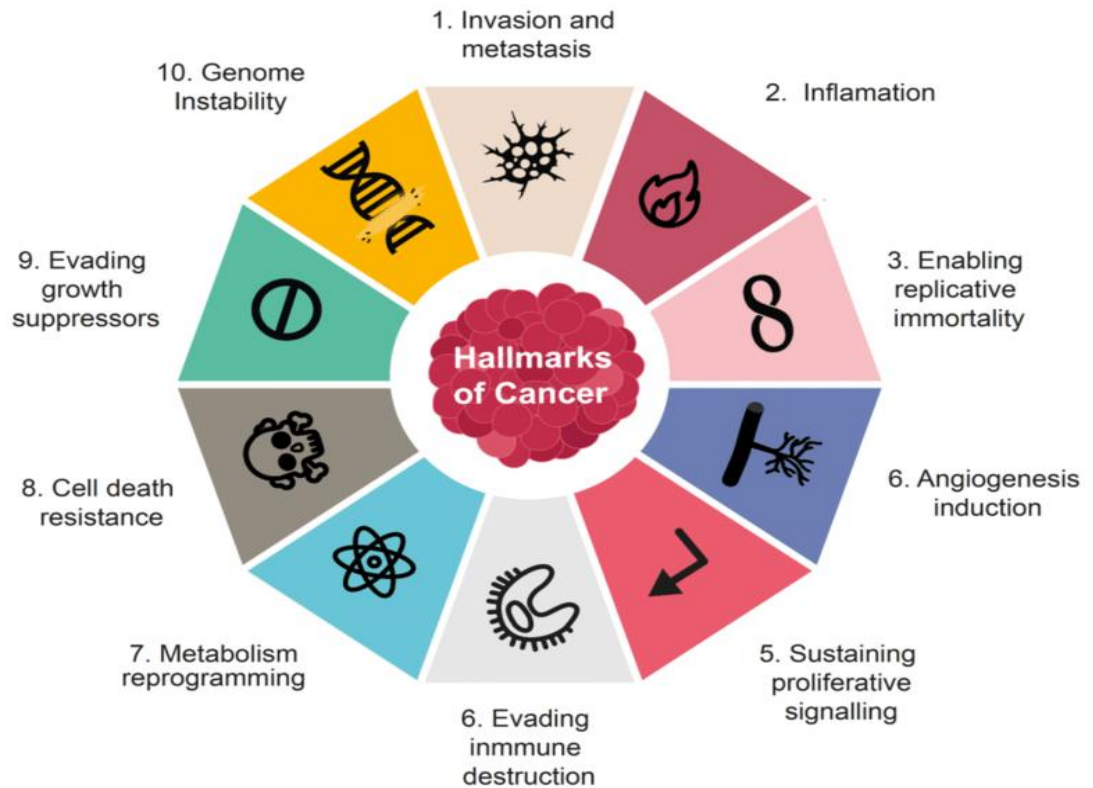
Τα χαρακτηριστικά του καρκίνου (Hallmarks of Cancer) είναι γενετικές μεταβολές των κυττάρων οι οποίες συμβαίνουν κατά τη νεοπλασματική εξεργασία και έχουν διατυπωθεί από τους Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg, βρίσκοντας καθολική αποδοχή από τη διεθνή ογκολογική κοινότητα (Hallmarks of Cancer: The Next Generation, Douglas Hanahan and Robert A. Weinberg, cell 2011).

Συγκεκριμένα αυτά είναι:

1. Πρόκληση ανεξέλεγκτου κυτταρικού πολλαπλασιασμού.
2. Αποφυγή καταστολέων ανάπτυξης.
3. Αποφυγή της ανοσολογικής απόκρισης.
4. Απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου- αθανατοποίηση.
5. Ενεργοποίηση φλεγμονωδών εξεργασιών.
6. Ενεργοποίηση της διήθησης και της μετάστασης.
7. Αγγειογένεση, διεύρυνση της αγγείωσης.
8. Γενωμική αστάθεια και παραλλαγές.
9. Αποφυγή της κυτταρική απόπτωσης.
10. Απορρύθμιση του κυτταρικού μεταβολισμού.

Επίσης αξίζει να επισημανθεί ότι αντικείμενο έρευνας αποτελεί πλέον ο ρόλος των επιγενετικών μηχανισμών και του μικροβίωματος στη δημιουργία και την εξάπλωση του καρκίνου, καθώς και η μελέτη της φαινοτυπικής πλαστικότητας των προγονικών κυττάρων.(Douglas Hanahan ©2021 American Association for Cancer Research)

A



Εικόνα 4.6 Τα χαρακτηριστικά του καρκίνου
Douglas Hanahan and Robert Weinberg, et al. 2011 Hallmarks of cancer.

Οι τρεις κατηγορίες γονιδίων που εμπλέκονται στην καρκινογένεση είναι τα ογκογονίδια (ρυθμίζουν την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό), τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, (ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση ή/και καθοδηγούν την απόπτωση) και τα γονίδια επιδιόρθωσης του DNA (ρυθμίζουν τα σχετικά ένζυμα για την επιδιόρθωση του DNA). Οι γενετικές παραλλαγές οι οποίες προκαλούν αδρανοποίηση των ογκοκατασταλτικών και επιδιορθωτικών γονιδίων καθώς και ενεργοποίηση των ογκογονιδίων (το πρωτο-ογκογονίδιο μετατρέπεται σε ογκογονίδιο), προκαλούν έντονη γενετική αστάθεια. Το 10% περίπου των περιπτώσεων καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο αποδίδεται σε κληρονομούμενες παραλλαγές γονιδίων που εμπλέκονται στην επιδιόρθωση του DNA, στον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης ή στη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης (Casciato et al.2012)

Αναφορικά με τα ογκογονίδια αρκεί μια σημειακή παραλλαγή σε ένα αλληλόμορφο για να οδηγήσει σε ενεργοποίηση του ογκογονιδίου ενώ οι χρωμοσωμικές ανακατατάξεις ή γεγονότα που προκαλούν πολλαπλασιασμό τμήματος ή ολόκληρου του γονιδίου οδηγούν σε αύξηση ή τροποποίηση της παραγόμενης πρωτεΐνης. Η απώλεια λειτουργίας των ογκοκατασταλτικών και ως συνέπεια η καρκινογένεση, είναι αποτέλεσμα παραλλαγών και στα δύο αλληλόμορφα. Με βάση τη θεωρία των δύο πληγμάτων του Knudson , στους σποραδικούς καρκίνους οι παραλλαγές και στα δύο αλληλόμορφα είναι τυχαία γεγονότα.Στις οικογενείς μορφές , η παραλλαγή στο ένα αλληλόμορφο έχει κληρονομηθεί από τον ένα πρόγονο και για την απενεργοποίηση του γονιδίου απαιτείται μια επιπλέον παραλλαγή στο άλλο αλληλόμορφο στα κύτταρα των νεοπλασματικών ιστών. Η απώλεια ή μείωση της λειτουργικότητας του γονιδίου μπορεί να οφείλεται σε παραλλαγές μετατόπισης Πλαισίου Ανάγνωσης, Παρερμηνεύσιμες , ή μη νοηματικές παραλλαγές καθώς και σε εναλλακτικό μάτισμα ή σε επιγενετικές τροποποιήσεις , όπως η μεθυλίωση του υποκινητή και οι μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις.

Οι παραλλαγές στα παραπάνω γονίδια δεν συμβαίνουν ταυτόχρονα στα καρκινικά κύτταρα με αποτέλεσμα τη γενετική ετερογένεια των όγκων. Το σημαντικό είναι ότι οι γενετικές και επιγενετικές αλλαγές είναι αθροιστικές και επάγουν άλλες με αποτέλεσμα την αύξηση των διαστάσεων του όγκου, τη διήθηση του στους γύρω ιστούς και την πιθανότητα μετάστασης.(Genetics in Medicine, Thompson & Thompson, page 313,314)

Η αξιοσημείωτη γενετική ομοιότητα μεταξύ των νεοπλασιών του μαστού του ανθρώπου και των κατοικίδιων ζώων (γάτα, σκύλος) (Lutful Kabir et al. 2015; Adegas et al. 2016), επιτρέπει τη μεταξύ τους μεταφορά της μετάφρασης των γενετικών δεδομένων και τη χρησιμοποίηση κοινών προγνωστικών δεικτών για τη διάγνωση, τη πρόγνωση, την επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος και την εκτίμηση της ανταπόκρισης στη θεραπεία. Στον άνθρωπο διαπιστώθηκε μετά από σύγκριση νεοπλασματικών και υγιών ιστών μαστού, διαφοροποίηση στην έκφραση μεγάλου αριθμού γονιδίων καθώς και στα σχετικά μονοπάτια σηματοδότησης του καρκίνου. Η αντίστοιχη διαφοροποίηση διαπιστώθηκε και σε αντίστοιχες μελέτες σε σκύλους. Μετά από χαρτογράφηση ορθόλογων γονιδίων και την ανάλυση των μεταγραφικών αλλαγών του γονιδιώματος, ανθρώπου και σκύλου, διαπιστώθηκαν σημαντικές ομοιότητες σε πολλά συγγενή με τον καρκίνο μονοπάτια όπως τα 'PI3K/AKT', 'KRAS', 'PTEN', 'WNT-beta catenin' και 'MAPK cascade' καθώς και με τους αντίστοιχους ρυθμιστικούς τους μηχανισμούς.

Έτσι παρατηρείται ότι οι μεταγραφικές σχέσεις μεταξύ διαφορετικών γονιδιακών υπογραφών που παρατηρήθηκαν στον καρκίνο του μαστού του ανθρώπου είναι υψηλά διατηρημένες και σε μοντέλα σκύλου, υποδηλώνοντας μια στενή ομοιότητα στο δίκτυο κυκλωμάτων σηματοδότησης της έναρξης, όσο και της εξέλιξης του όγκου (Paolo Uva et al. 2009). Ο Liu et al. 2014 διερεύνησε τις γενετικές διαφορές ανάμεσα σε απλά και σε μικτά καρκινώματα. Τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι τα απλά καρκινώματα του σκύλου πιθανά προέρχονται από γενωμικές παρεκκλίσεις, ενώ τα μικτά καρκινώματα προέρχονται από επιγενετικές αλλαγές.

Κοινός στόχος στην ιατρική και κτηνιατρική ογκολογία είναι η ταυτοποίηση προγνωστικών παραγόντων οι οποίοι θα μπορούσαν να αναγνωρίσουν θεραπευτικούς στόχους και να υποστηρίξουν την επιβίωση. Στον καρκίνο του μαστού του ανθρώπου, ενώ έχει ταυτοποιηθεί ένας σημαντικός αριθμός βιοδεικτών μόλις ελάχιστοι χρησιμοποιούνται για την επιλογή κατάλληλων θεραπευτικών σχημάτων. Στον καρκίνο του μαστού στον σκύλο η χρήση των βιοδεικτών χρησιμοποιείται μόνο ερευνητικά και ακολουθεί την ιατρική έρευνα. Λίγες είναι οι εξαιρέσεις που οι ανακαλύψεις στον καρκίνο του μαστού στον σκύλο προηγούνται και ακολούθως συμβάλλουν στην ιατρική έρευνα όπως είναι οι Cox-2 και GH/IGF-I (Queiroga et al. 2005 ;Queiroga FI, et al.2008).

Βιολογικός δείκτης είναι ένα χαρακτηριστικό που έχει αντικειμενικά μετρηθεί και αξιολογηθεί σαν ενδεικτικό φυσιολογικών ή παθολογικών καταστάσεων ή αφορά φαρμακολογικές φαρμακοδυναμικές αποκρίσεις σε μια θεραπευτική παρέμβαση [Simon R, J Natl Cancer Inst 2005;97:866-867]. Είναι ένας συνδυασμός μετρήσεων που συνιστούν ένα βιολογικό αποτύπωμα. Η μέτρηση των βιοδεικτών είναι εφικτή μεταξύ άλλων με τη χρήση της ανοσοιστοχημείας και του in situ υβριδισμού.

Στον καρκίνο του μαστού στον άνθρωπο προκειμένου να μειωθεί το κόστος εξέτασης και να γίνει εφικτή η χρήση των βιοδεικτών στην κλινική πράξη, έγινε εμπορικά διαθέσιμη η κατά ομάδες εξέτασης βιοδεικτών όπως είναι το Oncotype DX (πάνελ 21 γονιδίων), Breast Onc Px (14-γονιδίων απομακρυσμένης μετάστασης), το MammaPrint (70-γονίδια με σημασία για την πρόγνωση της νόσου) και τέλος PAM50 (50 γονιδιακές υπογραφές), τα οποία είναι απαραίτητα για τη σταδιοποίηση του όγκου (St. Gallen 2011: Summary of the Consensus Discussion Michael Gnanta, et al. 2011).

Δεδομένου του υψηλού επιπολασμού του καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο και της μη ικανοποιητικής πολλές φορές ανταπόκρισης στη θεραπεία (18 εκ. καινούργιες υποθέσεις καρκίνου το 2018, με 10 εκ θανάτους), δημιουργήθηκε η ανάγκη προσανατολισμού των ερευνών σε εξατομικευμένα σχήματα διάγνωσης και στοχευμένες θεραπείες. Προς αυτή τη κατεύθυνση εκτός της

κλινικής και ιστολογικής ταξινόμησης του καρκίνου, είναι απαραίτητη μοριακή ταξινόμηση και εν γένει η αποτύπωση του γενετικού προφίλ του προς εξέταση νεοπλασματος (Mark Gray et al.2020)

Το 2000 δημοσιεύτηκε στο περιοδικό Nature η μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού βασιζόμενη στην έκφραση γονιδίων, τα οποία ενοχοποιούνται για συμμετοχή στον καρκίνο του μαστού, ενώ το 2017 συμπεριλήφθηκε στην 8^η έκδοση του AJCC συμπεριλήφθηκε (Perou CM et al. 2000; American Joint Committee on Cancer. AJCC Cancer Staging Manual. 8th ed. New York, NY: Springer, 2017:589–628).

Πίνακας 4.9 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού στον Άνθρωπο

| Άνθρωπος/μοριακή ταξινόμηση | Βαθμός κακοήθειας | ER | PR | HER2 | Ki67 | CK5/6 CK14, EGFR |
|---|---------------------------|----|-------------|------|-----------------|------------------------|
| Αυλικού τύπου Α | Χαμηλού βαθμού κακοήθειας | + | + >20% | +/- | Χαμηλό < 14% | |
| Αυλικού τύπου Β | Υψηλού βαθμού κακοήθειας | + | +/- <20% | +/- | Υψηλό >14% | |
| Βασικού τύπου (ή / και τριπλά αρνητικοί | Υψηλού βαθμού κακοήθειας | - | - | - | υψηλό | + |
| HER2 | Υψηλού βαθμού κακοήθειας, | - | - | + | υψηλό | |
| Αταξινόμητος | | | | | χαμηλό | |

Οι παραπάνω μέθοδοι, σε συνδυασμό με τη χρήση επιπλέον βιοδεικτών (κερατίνες 5/6, 14,17,8,18,19, EGFR, Ki67, κ.α). Είναι πολύ σημαντικό να τονιστεί, πως ο κάθε τύπος ανταποκρίνεται σε διαφορετική θεραπεία και πως οι βιοδείκτες που εκφράζονται στον καθένα αποτελούν σημαντικούς προγνωστικούς και προβλεπτικούς παράγοντες.

Οι αυλικού τύπου καρκίνοι είναι οι πιο συχνοί αντιπροσωπεύοντας το 60-70% όλων των τύπων. Χαρακτηρίζονται από υψηλή γενετική έκφραση των οιστρογονικών υποδοχέων (Estrogen Receptors - ER) και πολλών άλλων γονιδίων τα οποία εκφράζονται από τα επιθηλιακά κύτταρα που καλύπτουν τον αυλό της λοβιακής μονάδας του τερματικού πόρου, (TDLU) όπου εμφανίζονται οι περισσότεροι καρκίνοι του μαστού. Συχνά χαρακτηρίζονται από απουσία έκφρασης του ογκογονιδίου Erb-B2 (HER2).

Οι όγκοι οι οποίοι παρουσιάζουν υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER2 υπολογίζονται περίπου στο 12-20% των συνολικών καρκίνων του μαστού και χαρακτηρίζονται από υψηλού επιπέδου έκφρασης του ογκογονιδίου Erb-B2 και χαμηλά επίπεδα έκφρασης του ER. Οι βασικού τύπου καρκίνοι αποτελούν το 15% του καρκίνου του μαστού και εκφράζουν αρκετά από τα γονίδια εκείνα τα οποία εκφράζονται στα βασικά μυοεπιθηλιακά κύτταρα της λοβιακής μονάδας του τερματικού πόρου. Συχνά αποτυγχάνουν να εκφράσουν το ER(Karen S Johnson et al.2021).

Πίνακας 4.10 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού στον σκύλο (Gama 2008)

| Μοριακή ταξινόμηση/ Σκύλος | ER | PR | HER-2 | Βαθμός κακοήθειας |
|---|----|----|-------|---------------------|
| Αυλικό Α | + | + | - | Καλή πρόγνωση 44.8% |
| Αυλικό Β | + | + | + | Καλή πρόγνωση 13.5% |
| Βασικού τύπου (τριπλά αρνητικό) | - | - | - | Επιθετικός 29.9% |
| HER-2 | - | - | + | Επιθετικός 8.3% |

Ο αυλικός τύπου Β καρκίνος έχει χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με τον τύπο Α. Επιθετικός χαρακτηρίζεται ο καρκίνος ο οποίος συνοδεύεται από μεταστάσεις, στην κλίμακα TNM έχει τη χειρότερη πρόγνωση και ο χρόνος επιβίωσης είναι πολύ σύντομος, με τον τριπλά αρνητικό και την υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER-2 να αποτελεί κακό προγνωστικό δείκτη. (Kim et al.2013 ; Varallo et al. 2019 ; Dutra AP et al. 2004).

Μετά από έρευνες που έγιναν από τον Campos αμφισβητείται η προγνωστική αξία της πρωτεΐνης HER-2 στον σκύλο, γεγονός το οποίο οδηγεί σε νέες έρευνες (Campos LC et al. 2015). Παλαιότερες μοριακές ταξινομήσεις χρησιμοποίησαν πέντε δείκτες (ER, PR, HER-2, CK5, p63 and P-cadherin) και με βάση αυτούς κατηγοριοποίησαν τις νεοπλασίες σε 5 φαινότυπους, Luminal A, luminal B, HER-2 positive, basal-like and null phenotype (Virchows Arch et al. 2008), χωρίς να υπάρχει διαφορά στους προγνωστικούς δείκτες εκτός από τον null φαινότυπο. Ο Im et al 2014 χρησιμοποίησε 6 αντισώματα και ομαδοποίησε σε έξι υποτύπους, διαπιστώνοντας ότι η χαμηλή έκφραση των ER και η υπερέκφραση των HER-2 συνοδεύονταν με χαμηλή πρόγνωση στον καρκίνο των μαστικών αδένων στους σκύλους.

Η πιο σημαντική προσπάθεια μοριακής κατηγοριοποίησης του καρκίνου των μαστικών αδένων στη γάτα, έγινε από τον Maria Soares et.al 2016 με τη συμμετοχή 102 γατιών. **Πιν.4.11**

Οι παράμετροι οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την αξιολόγηση της προγνωστικής αξίας του κάθε βιοδείκτη ήταν η ολική επιβίωση (Overall survival = OS) και ο χρόνος επιβίωσης, ελεύθερο ασθένειας (Disease Free Survival= DFS). OS ορίζεται ως το χρονικό διάστημα σε ημέρες, από την ημέρα της αρχικής διάγνωσης έως την ημέρα του θανάτου ή της ευθανασίας λόγω της νεοπλασίας ή την ημέρα της τελευταίας εξέτασης. Ο χρόνος της επιβίωσης, ελεύθερο ασθένειας (Disease Free Survival= DFS) είναι ο χρόνος από την ημερομηνία της πρώτης επέμβασης έως την ημέρα της τοπικής ή της συστηματικής υποτροπής.

Πίνακας 4.11 Μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού στη γάτα established by St. Gallen International Expert Consensus panel (Maria Soares et.al 2016).

| Μοριακή ταξινόμηση / Γάτα | ER | PR | f HER-2 | Ki-67 index | CK5/6 |
|--|-----------|-----------|----------------|--------------------|--------------------|
| Αυλικός Α | +/- + | + + | - - | χαμηλό | Κυμαινόμενο |
| Αυλικός Β | +/- + | + + | - - | υψηλό | Κυμαινόμενο |
| Αυλικός Β | +/- + | + + | + + | κυμαινόμενο | Κυμαινόμενο |
| HER-2 υπερέκφραση | - - | - - | + + | κυμαινόμενο | Κυμαινόμενο |
| Τριπλά αρνητικός (βασικός τύπος) | - - | - - | - - | κυμαινόμενο | + |
| Τριπλά αρνητικός (φυσιικός τύπος) | - - | - - | - - | κυμαινόμενο | - |

Σε αντίθεση με τον άνθρωπο η πλειοψηφία του καρκίνου των μαστικών αδένων στις γάτες δεν εκφράζουν οιστρογονικούς υποδοχείς και δεν παρατηρήθηκε υπερέκφραση της HER-2. Οι νεοπλασίες των μαστικών αδένων στις γάτες χαρακτηρίζονται ως πολύ επιθετικοί, με το 58% να χαρακτηρίζονται ως τριπλά αρνητικού, και το 79% βασικού τύπου (Zappulli et al. 2015). Το 80% του καρκίνου των

μαστικών αδένων στις γάτες είναι ER-negative και χαρακτηρίζονται ως πολύ επιθετικοί ενώ το 30% με καρκίνο του μαστού των ανθρώπων με ER-negative έχουν κακή πρόγνωση, γεγονός το οποίο στοιχειοθετεί την επιλογή της γάτας ως πρότυπο μοντέλο μελέτης του μη ανταποκρινόμενου στην ορμονοθεραπεία καρκίνου του μαστού (Giovanni P Burrai, et.al 2010).

Όταν αναλύθηκαν οι συγκεκριμένοι υπότυποι για απώλεια ετεροζυγωτίας των γονιδίων *BRCA1* and *BRCA2*, δεν ταυτοποιήθηκαν ανάλογες με τον άνθρωπο παραλλαγές. Επομένως η διευκρίνιση του ρόλου των BRCA στην καρκινογένεση και η προγνωστική σημασία πρέπει να διερευνηθεί (Zappulli et al. 2015)

Ο ρόλος των στεροειδών ορμονών και των υποδοχέων τους μελετήθηκε πρώτα στον άνθρωπο από τη δεκαετία του 1970. Στα θηλαστικά οι στεροειδείς ορμόνες παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία του μαστικού αδένου κατά τη διάρκεια της ενήβωσης. Κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης η πλήρης ανάπτυξη των λοβίων και των κυψελίδων λαμβάνει χώρα κατά τη συνεχή επίδραση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης.

4.4.2.5.3 Η μελέτη των υποδοχέων, των γονιδίων, των αυξητικών παραγόντων και γενικότερα των μοριακών δεικτών στον καρκίνο των μαστικών αδένων του σκύλου και της γάτας

Υποδοχείς οιστρογόνου (ER)

Η παρουσία των υποδοχέων συνδέεται με παθολογικά χαρακτηριστικά της ασθένειας καθώς και με το βαθμό διαφοροποίησης τόσο στον σκύλο τόσο και στον άνθρωπο ενώ η απουσία τους συσχετίστηκε με περιστατικά υποτροπής. Υπάρχουν 2 μελετημένες ισομορφές οι ERα, και οι ERβ. Ο ERα είναι ο κύριος και περισσότερο μελετημένος στον άνθρωπο, ενώ στους σκύλους η μειωμένη έκφραση του, συνδέεται με δυσμενή πρόγνωση όσον αφορά όγκους μεγάλου μεγέθους με εξελκώσεις. Η έκφραση του ERβ στον άνθρωπο αποδείχτηκε ότι έχει σχέση με αυξημένο χρόνο επιβίωσης σε εκείνους τους ασθενείς που έλαβαν την φαρμακευτική ουσία ταμοξιφένη καθώς και σε αρνητικούς ERα. Στον σκύλο οι νεοπλασίες ERβ (+), είναι συνήθως καλοήθειες, ενώ η υψηλή έκφραση του σε όγκους με χαμηλό βαθμό κακοήθειας, αποτελεί δείκτη καλής πρόγνωσης. Στις γάτες η απουσία των υποδοχέων οιστρογόνου ER(-) χαρακτηρίζει σε ποσοστό της τάξης του 80% πολύ επιθετικούς καρκίνους, με συνέπεια να προτείνεται από τους ερευνητές ως ζωικό μοντέλο για τη μελέτη του μη ανταποκρινόμενου στην ορμονοθεραπεία καρκίνου του μαστού (Burrai, et al. 2010).

Υποδοχείς προγεστερόνης (PR)

Οι υποδοχείς προγεστερόνης παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του μαστού, προάγοντας την επέκταση των τελικών λοβιακών μονάδων των πόρων κατά την ενήβωση και την εγκυμοσύνη. Φαίνεται να έχουν υψηλή αξία ως δείκτες υποτροπής και η απουσία έκφρασης τους συνδέονται με δυσμενή πρόγνωση. Στον άνθρωπο ο συνδυασμός των δύο παραπάνω υποδοχέων, προγεστερόνης και οιστρογόνων, έχει αποκαλύψει διαφοροποιήσεις στο ποσοστό επιβίωσης με την χειρότερη πρόγνωση να εμφανίζουν ασθενείς με αρνητικοποιημένους και τους δύο ορμονικούς υποδοχείς. Ακολουθούν οι συνδυασμοί ER-/PR+, ER+/PR- and ER+/PR+. Στους σκύλους φυσικά σταθεροί και καλοήθεις ιστοί συνήθως εκφράζουν και τους δύο υποδοχείς ER and PR.

Στους καλοήθεις όγκους πιο συχνά παρατηρείται ο συνδυασμός ERα+/PR+, ενώ μεταξύ των κακοθών όγκων οι ERα-/PR+ πλειοψηφούν. Καθώς ο όγκος εξελίσσεται, φαίνεται να μην εκφράζει κανέναν από τους δύο υποδοχείς. Έτσι στο μεταστατικό στάδιο το προφίλ ER-/PR- υποδηλώνει δυσμενή πρόγνωση (Queiroga et al.2011).

GH-induced IGF (αυξητική ορμόνη) το μονοπάτι του υποδοχέα του παρόμοιου με την ινσουλίνη αυξητικού παράγοντα (insulin-like growth factor-I receptor, IGF-IR)

Στους ανθρώπους έχει διερευνηθεί αρκετά ο ρόλος του άξονα GH/IGF-I στην καρκινογένεση του μαστού. GH-induced IGF- ο ινσουλινόμορφος αυξητικός παράγοντας επαγόμενος από την αυξητική ορμόνη είναι απαραίτητος ώστε τα οιστρογόνα και η προγεστερόνη να δράσουν στον μαστικό αδένα. Μια πρόσφατη ιδέα είναι η χρησιμοποίηση αναστολέων GH/IGF-I στην πρόληψη του καρκίνου του μαστού.

Στους σκύλους παρατηρήθηκε ότι η εντοπισμένη παραγωγή αυξητικής ορμόνης (GH) από τον μαστικό αδένα προκλήθηκε από την διέγερση της προγεστίνης. Έτσι ενισχύεται η υπόθεση ότι η έκκριση της GH ενδέχεται να είναι ο μεσολαβητής της υπερπλασίας του επιθηλίου η οποία παρατηρείται μετά τη χορήγηση προγεστίνης. Ο ρόλος της προγεστίνης στην έναρξη της παραγωγής GH σε υγιής και νεοπλασματικούς ιστούς πρέπει να διερευνηθεί.

Η μοριακή ανάλυση του υποδοχέα της αυξητικής ορμόνης (Growth Hormone Receptor-GHR) ανέδειξε την ομολογία του υποδοχέα με εκείνη των άλλων θηλαστικών συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου, το οποίο και στη συγκεκριμένη ορμόνη σημαντική για την συγκριτική παθολογία. Ο άξονας GH/IGF-I axis ενδέχεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόγνωση του καρκίνου του μαστού καθώς οι

συγκεντρώσεις στον ορό και στον ιστό των κακοηθών όγκων φαίνεται να συνδέονται και να αποτελούν αρνητικό προγνωστικό δείκτη χρόνου επιβίωσης μετά από τη χειρουργική αφαίρεση. Στην ίδια μελέτη αναφέρθηκε ότι η τιμή της IGF1 στον ορό θηλυκών σκύλων με κακοήθεις όγκους ήταν αρκετά υψηλότερη σε σχέση με εκείνη των υγιών σκύλων.

Η **προλακτίνη** ορμόνη γνωστή για τη γαλακτοπαραγωγική της δραστηριότητα μπορεί να παίζει σημαντικό ρόλο ως αυξητικός παράγοντας στη νεοπλασία του μαστού. Διάφορες έρευνες έχουν αποδείξει την συνεργία της προλακτίνης και των στεροειδών ορμονών κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του μαστικού αδένου καθώς και του καρκίνου του μαστού. Στον σκύλο, το 2005, τέθηκε η πρώτη υπόθεση ότι η προλακτίνη και οι στεροειδείς ορμόνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού, προκαλώντας τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων. Θα πρέπει να γίνουν περισσότερες μελέτες προς αυτή την κατεύθυνση στην κτηνιατρική επιστήμη.

Δείκτες κυτταρικού πολλαπλασιασμού, ογκογονίδια, ογκοκατασταλτικά γονίδια.

Η **πρωτεΐνη Ki-67** είναι δείκτης κυτταρικού πολλαπλασιασμού. Δεν εκφράζεται στη φάση G0 ενώ είναι παρόν στις φάσεις ανάπτυξης και διαίρεσης του κυτταρικού κύκλου (G1,S, G2 και στη μίτωση). Η έκφραση της πρωτεΐνης Ki-67 συνδέεται με τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και την κλινική πορεία της νόσου σε ανθρώπους και σκύλους. Στις γάτες ανιχνεύτηκε σε μικρή ποσότητα σε δυσπλαστικούς ιστούς, σημειώνοντας προοδευτική αύξηση από τις καλοήθεις στις κακοήθεις νεοπλασίες. (Soares et al.2022).

Μια άλλη πρωτεΐνη που αποτελεί δείκτη με αντίστοιχο ρόλο είναι το **πυρηνικό αντιγόνο πολλαπλασιαζόμενων κυττάρων PCNA (proliferating cell nuclear antigen)**, το οποίο είναι απαραίτητο για τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό ενώ παράλληλα συμμετέχει στους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς βλαβών του DNA. Στο σκύλο μελετήθηκε πάντα σε συνδυασμό με το αντιγόνο Ki-67, με αποτέλεσμα να διαπιστωθούν υψηλότερα επίπεδα της PCNA πρωτεΐνης σε κακοήθη σε σύγκριση με τους υπερπλαστικούς και καλοήθεις όγκους.

Μεταλλοπρωτεϊνάση θεμέλιας ουσίας, εξωκυττάρια ουσία (Matrix metalloproteinases MMP) είναι μια οικογένεια ενζύμων συνδεδεμένα με τον ψευδάργυρο τα οποία προκαλούν πρωτεόλυση των συστατικών της εξωκυττάριας ουσίας συμβάλλοντας στην εξάπλωση των καρκινικών κυττάρων. Στον καρκίνο του μαστού στον άνθρωπο η εκτίμηση των MMP-2 και MMP-9 (με χρήση ηλεκτροφορητικής τεχνικής και ανίχνευσης υδρολυτικών ενζύμων) ανέδειξε μια σημαντική συσχέτιση της ενεργοποίησης

του MMP-2, με τη μετάσταση σε λεμφαδένες. Γι' αυτό το λόγο, προτείνεται η χρήση του MMP-2 ως στόχος στην θεραπεία του καρκίνου του μαστού.

Στον καρκίνο των μαστικών αδένων του σκύλου, η ανοσοϊστοχημική έκφραση MMP-9 a MMP-2 ανέδειξε υψηλή έκφρασης του MMP-9 σε κακοήθεις όγκους το οποίο επιδεικνύει ότι ο MMP-9 παίζει σημαντικό ρόλο στην επιθετική μορφή του συγκεκριμένου καρκίνου και είναι ενδεικτικό της πιθανής προγνωστικής του αξίας. Σε κάποια άλλη μελέτη σε νεοπλάσματα στο σκύλο αποδείχτηκε, με τη χρήση της ζυμογραφίας και της ανοσοϊστοχημείας, ότι η παραγωγή MMP ήταν αυξημένη στα περιφερικά όρια του όγκου σε σύγκριση με το κέντρο, ερχόμενο σε συμφωνία με τον προτεινόμενο ρόλο των MMPs στην εξάπλωση. (Santos AA, et al.2012). Σε διηθητικούς καρκίνους σε γάτες διαπιστώθηκε η παρουσία των MMP-2 και MMP-9 σε μεταστατικά καρκινικά κύτταρα στη λεμφική κυκλοφορία (Akkoc A, et al. 2012).

Heat-shock proteins. Οι πρωτεΐνες θερμικού σοκ είναι μια οικογένεια πρωτεϊνών που παράγονται από τα κύτταρα ως απόκριση σε καταστάσεις αποκατάστασης της ισορροπίας μετά από έκθεση σε καταστάσεις οξέος και χρόνιου στρες, όπως είναι οι υψηλές θερμοκρασίες, το pH και τα χαμηλά επίπεδα οξυγόνου. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες έχουν διττό ρόλο καθώς συγκεντρώνονται στα καρκινικά κύτταρα, συμβάλλοντας στην επιβίωση του όγκου ενώ από την άλλη πλευρά έχουν μια εξωκυτταρική ανοσολογική λειτουργία η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εισάγει μια ειδική αντινεοπλασματική ανταπόκριση. Σε έρευνες σε νεοπλάσματα των μαστικών αδένων σκύλων διαπιστώθηκε ανάλογη συμπεριφορά (αύξηση της έκφρασης του υπεύθυνου mRNA). Από τα παραπάνω ευρήματα ενισχύεται η αξία του σκύλου ως μοντέλο στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών της καρκινογένεσης (Okada S, et al.2015).

Βλεννίνες. Οι βλεννίνες είναι μια οικογένεια γλυκοπρωτεϊνών, οι οποίες έχουν ταυτοποιηθεί σαν δείκτες δυσμενούς πρόγνωσης και σαν ελκυστικός θεραπευτικός στόχος, καθώς προάγουν την νεοπλασματική εξεργασία.

Στον καρκίνο του μαστικού αδένα του ανθρώπου, η παρουσία της βλεννίνης 1 (MUC1) έχει άμεση σχέση με καλά διαφοροποιημένους όγκους και συνδέεται με καλή πρόγνωση (Kufe et al. 2009). Η έκφραση της MUC1 μπορεί να εκφράζεται στη μεμβράνη των νεοπλασματικών κυττάρων σε βλεννώδη, ή πιο δυναμικά στο κυτταρόπλασμα των διηθητικών πορωδών καρκινωμάτων. Αντίστοιχα διαφορετικά μοτίβα της έκφρασης MUC1 μπορεί να είναι παρούσα σε κακοήθη νεοπλάσματα των μαστικών αδένων σε σκύλους, καθώς και σε φυσικά συνδεδεμένους ιστούς. Σε αυτή τη πρόσφατη μελέτη η υπερέκφραση

της MUC1 έχει συνδεθεί με απομακρυσμένη μετάσταση και επομένως μπορεί να έχει ρόλο ως επιπρόσθετος προγνωστικός δείκτης, ή ανοσοθεραπευτικός στόχος σε αυτά τα νεοπλάσματα (Vafaei et al. 2022).

Η **μασπίνη** είναι ένας αναστολέας πρωτεΐνάσης της σερίνης ο οποίος έχει κατασταλτική δράση και εκφράζεται στο φυσιολογικό επιθήλιο του μαστού στον άνθρωπο. Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις η μασπίνη είναι ικανός αναστολέας της διήθησης των νεοπλασματικών κυττάρων του μαστικού αδένου και του προστάτη, μπλοκάροντας την κινητικότητα τους στην κυτταρική επιφάνεια. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση της μασπίνης αποδείχθηκε ότι συνδέεται με υψηλής κακοήθειας νεοπλάσματα, καθώς και με αρνητικοποιημένους τους υποδοχείς της προγεστερόνης.

Στον μαστικό αδένου του σκύλου η μασπίνη φαίνεται να αποτελεί έναν ευαίσθητο μυοεπιθηλιακό δείκτη. Οι μυοϊνοβλάστες του στρώματος δεν αντιδρούν με τα αντισώματα της μασπίνης, το οποίο θα μπορούσε να αποτελεί πλεονέκτημα στην ανίχνευση των *in situ* και μικροδιηθητικών μορφών των κακοηθών νεοπλασμάτων με μυοεπιθηλιακή κυτταρική προέλευση. Δυστυχώς υπάρχει μεγάλο κενό σε μελέτες που αφορούν την προγνωστική αξία και της βιολογικής επιθετικότητας του όγκου σε σχέση με την έκφραση της μασπίνης (Shah FD, et al.2009).

Το αντιγόνο Sialyl Lewis x (sLx), γνωστό και ως σύμπλεγμα διαφοροποίησης 15s ή εμβρυϊκό αντιγόνο 1 ειδικού σταδίου, είναι ένας τετρασακχαρίτης υδατάνθρακας που συνήθως συνδέεται με Ο-γλυκάνες στην επιφάνεια των κυττάρων. Έχει ζωτικό ρόλο στις διαδικασίες αναγνώρισης από κύτταρο σε κύτταρο, ενώ είναι υπεύθυνος για την προσκόλληση πολλών τύπων καρκινικών κυττάρων στο ενδοθήλιο του ανθρώπου, επηρεάζοντας το σχηματισμό μεταστάσεων στον καρκίνο του παγκρέατος και στο έντερο. Διαπιστώθηκε ότι στο καρκίνωμα του μαστού η έκφραση του αντιγόνου ήταν ενισχυμένη στις μεταστατικές συγκρινόμενες με τις αρχικές εστίες. Από την άλλη πλευρά δε φαίνεται να συνδέεται με απομακρυσμένες μεταστάσεις και φτωχή πρόγνωση, παρόλο που υψηλότερη έκφραση παρατηρήθηκε στην επιφάνεια των κυττάρων σε υψηλού βαθμού *in situ* πορώδες καρκίνωμα και χαμηλότερη στην περιοχή που περιβάλλει το διηθητικό καρκίνο. Στην πλειοψηφία του καρκίνου των μαστικών αδένων στο σκύλο και στη γάτα, το αντιγόνο sLx εκφράζεται μέσω της ανοσοϊστοχημικής ανάλυσης, ενώ απουσιάζει στους φυσιολογικούς μαστικούς αδένες (Nakagawa T et al.2002). Αποκαλύφθηκε σημαντική σχέση μεταξύ της έκφρασης του sLx και της μετάστασης στους λεμφαδένες, σε κακοήγη νεοπλάσματα των μαστικών αδένων του σκύλου. Τελικά, οι ερευνητές συμπεράναν ότι

μάλλον το sLx δεν συνεισφέρει στο αιματογενές μονοπάτι της μετάστασης, εφόσον δε συσχετίζεται με απομακρυσμένες μεταστάσεις. (Pinho SS, et al.2007)

Cox-2. Η συνθάση 2 του ενδοϋπεροξειδίου της προσταγλανδίνης, επίσης γνωστή ως κυκλοοξυγενάση-2 ή COX-2, είναι ένα ένζυμο που στον άνθρωπο κωδικοποιείται από το γονίδιο PTGS2). Στον καρκίνο του μαστού στον άνθρωπο, η υπερέκφραση του Cox-2 μάλλον εμπλέκεται στην παραγωγή των προσταγλανδινών κυρίως στα πρώτα στάδια της καρκινογένεσης στον μαστικό αδένα, καθώς και σε ευμεγέθεις, μεταστατικούς όγκους (Williams et al.1999) Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ανάλογα ευρήματα παρατηρήθηκαν στον καρκίνο του μαστού στον σκύλο. Αρκετές μελέτες απέδειξαν την υψηλότερη έκφραση του COX-2 σε κακοήθειες σε σχέση με τις καλοήθειες νεοπλασίες. Επίσης παρατηρήθηκε σχέση μεταξύ των υψηλών επιπέδων Cox-2 και τον χαμηλό DFS και OS. Στον καρκίνο του μαστού του ανθρώπου διατυπώθηκε θετική σχέση μεταξύ της υπερέκφρασης COX-2 και της αγγειογένεσης, ενισχύοντας την άποψη για τον ενδεχόμενο θεραπευτικό ρόλο των αναστολέων του COX-2, μέσω των αντιαγγειογενετικών τους ιδιοτήτων. Στους σκύλους, στοιχειοθετήθηκε η σχέση μεταξύ της πυκνότητας των μικροαγγείων και την υπερέκφραση του Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Τα υψηλότερα επίπεδα Cox-2, βρέθηκαν στο φλεγμονώδη καρκίνωμα του μαστού του σκύλου αλλά όχι του ανθρώπου. Στην πλειοψηφία των καρκινωμάτων του μαστικού αδένα γάτας εκφράστηκε σε διάφορα επίπεδα (Sayasith et al.2009)

VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας, είναι μια πρωτεΐνη σήματος που παράγεται από πολλά κύτταρα και διεγείρει το σχηματισμό αιμοφόρων αγγείων. Το 2021 σε 50 γάτες με καρκίνωμα των μαστικών αδένων αξιολογήθηκαν τα επίπεδα των βιοδεικτών VEGF-A, VEGFR-1, και VEGFR-2 στον ορό του αίματος, σε λεμφοκύτταρα τα οποία διηθούν τη νεοπλασία tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) και σε καρκινικά κύτταρα. (Masuda et al.2012)) Γάτες με καρκίνωμα μαστικών αδένων με χαρακτηριστικά HER-2 (+) και TN φυσιολογικό εμφάνισαν αυξημένα επίπεδα VEGF-A, VEGFR-1, και VEGFR-2 στον ορό τους, σε σχέση με τα υγιή ζώα, υποδεικνύοντας ότι οι βιοδείκτες αυτοί μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως υποσχόμενοι προγνωστικοί δείκτες για τους μη διηθητικούς καρκίνους των συγκεκριμένων υποτύπων. Επιπλέον, ο VEGF-A στον ορό του αίματος μαζί με τους υποδοχείς είναι σε συνέργεια με την έκφραση του στα TILs, υποδεικνύοντας ότι πίσω από την υποξία, η φλεγμονή είναι ένας άλλος μηχανισμός ο οποίος οδηγεί την εξέλιξη του καρκίνου μέσω του σήματος VEGFA/VEGFRs. Οι ομοιότητες των παραπάνω με τον καρκίνο του μαστού στον άνθρωπο ισχυροποιεί τη γάτα ως μοντέλο μελέτης του (Nascimento C et al. 2021). Η συμβολή του VEGF στην διαδικασία της αγγειογένεσης, της ανάπτυξης

του όγκου, της κυτταρικής επιβίωσης και της ικανότητας μετάστασης έχει μελετηθεί στον φλεγμονώδη καρκίνο των μαστικών αδένων του σκύλου (τριπλά αρνητικός τύπος). Η χρησιμοποίηση του σκύλου ως μοντέλο και η μελέτη θεραπευτικών σχημάτων που στοχοποιούν τον VEGF ή τους υποδοχείς του είναι γεγονός (Alonso-Diez Á et al.2021).

Γονίδια που σχετίζονται με τον καρκίνο του μαστού

Το 2007 σε μελέτη GWAS στην οποία συμμετείχαν 21,860 νοσούντες σκύλοι από καρκίνο των μαστικών αδένων και 22.578 υγιείς (δείγματα ελέγχου) ταυτοποιήθηκαν τέσσερα γονίδια *FGFR2*, *TNRC9*, *MAP3K1* και *LSP1* τα οποία εμπλέκονται στον καρκίνο των μαστικών αδένων (Easton, D et al.2007). Το 2011, Borge et al. συμπεριέλαβε 64_SNPs από 11 υποψήφια γονίδια *BRCA1*, *BRCA2*, *BRIP1*, *CDH1*, *CHEK2*, *EGFR*, *ESR1*, *HER2*, *PTEN*, *STK11*, και *TP53*, από 8 διαφορετικές φυλές σκύλων διαχωρίζοντας τα, σε 2 ομάδες υψηλής και χαμηλής επικινδυνότητας. Ακολούθησαν έρευνες θέτοντας τα γονίδια *CDK5RAP2*, (Melin M et al.2016), *RAD51* and *STK11* (Canadas A et al.2018) υποψήφια στην παθογένεση της νόσου.

Το p53 είναι ένα ογκοκατασταλτικό γονίδιο το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης. Στον άνθρωπο η ανοσοέκφραση της αυξημένης συγκέντρωσης της πυρηνικής πρωτεΐνης p53, ως προϊόν έκφρασης του αντίστοιχου γονιδίου, φαίνεται να έχει προγνωστική αξία, όντας δείκτης για ασθενείς με μικρό δείκτη επιβίωσης. Παραλλαγές στο συγκεκριμένο γονίδιο συνδέονται με τον τριπλά αρνητικό καρκίνο του μαστού (Walerych et al. 2012).

Στους σκύλους η συχνότητα παρουσίας των πρωτεϊνικών προϊόντων φτάνει στο 20% όμοια με αυτή που παρατηρήθηκε στους ανθρώπους. Επίσης, παραλλαγές στα διατηρημένα τμήματα του p53 φαίνεται να έχουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση του μαστού σε άνθρωπο και σε σκύλο.

Παραλλαγές του γονιδίου p53 στον σκύλο ταυτοποιήθηκαν στα εξόνια 2, 4 και 5 και μια σημειακή παραλλαγή στο Ala125Val, αντιστοιχώντας σε ίδια παραλλαγή Ala125Val στο ανθρώπινο γονίδιο p53 (Veldhoen et al.1999). Η παρουσία της παραλλαγής αυτής φαίνεται να συνδέεται με επιθετικούς τύπους καρκίνου σε σκύλο και σε άνθρωπο. Τα προϊόντα έκφρασης του p53 στο σκύλο φαίνεται να είναι τα ίδια, με αποτέλεσμα να μοιράζονται τους ίδιους θεραπευτικούς στόχους με τον άνθρωπο. Στις γάτες, παραλλαγές στο γονίδιο p53 έχουν ήδη αναφερθεί σε 193 γάτες με καρκίνο του μαστού. Ταυτοποιήθηκε τροποποιημένη πρωτεΐνη p53, σε ιστούς από καρκινώματα γάτας, παρόμοια με αυτή που αναφέρθηκε στο καρκίνο του μαστού του ανθρώπου. (Vilhena et al. 2000).

Το γονίδιο p63 κωδικοποιεί την πρωτεΐνη p63 η οποία παίζει σημαντικό ρόλο σε αρκετές ενδοκυτταρικές διεργασίες, όπως η ενεργοποίηση της μεταγραφής και η απόπτωση, ενώ εμπλέκεται και στην αναγέννηση των επιθηλιακών βλαστοκυττάρων. Η ανάλυση του p63 σε διάφορους τύπους καρκίνου στον άνθρωπο έδειξε υπερέκφραση του στα βασικά επιθηλιακά κύτταρα, ώστε να υποστηρίζεται ο ρόλος που παίζει στη διαφοροποίηση και στον έλεγχο της αύξησης των κυττάρων στα επιθηλιακά στρώματα. Στους σκύλους ο p63 αποτελεί επίσης συμπληρωματικό δείκτη της διαφοροποίησης των βασικών επιθηλιακών κυττάρων από τα βλαστικά κύτταρα του στρώματος. Η υπερέκφραση του γονιδίου προτείνει την συσχέτιση των μυοεπιθηλιακών βλαστικών κυττάρων, και την αποκωδικοποίηση της ιστογένεσης του καρκίνου των μαστικών αδένων. (Gama A et al.2003) Στις γάτες διαπιστώθηκε η υπερέκφραση του σε καρκινώματα και κακοήγη μυοεπιθηλιώματα.,σε περιστατικά μίκτων νεοπλασιών (Sammargo A, et al.2020).

Τα Ογκογονίδια μελετήθηκαν με την οδό έκφρασης των μονοπατιών τους να είναι κοινά στον καρκίνο του μαστού σε σκύλο και άνθρωπο, ενώ ανακαλύφθηκαν σημαντικές ομοιότητες μεταξύ των δικτύων σημάτων τα οποία διέπουν τη βιολογία του καρκίνου. Οι προγνωστικές υπογραφές σε αυτά τα είδη παρουσιάζουν ισχυρή σύνδεση. Επίσης έχει προταθεί, η πιθανότητα ανάπτυξης μεταφραστικών βιοδεικτών στα σκυλιά με στόχο να εφαρμοστούν ακολούθως και στους ανθρώπους (Uva, P et al.2009).

Οικογένεια ογκογονιδίων HER Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει 4 μέλη: το HER-1 (επιδερμικός αναπτυξιακός παράγοντας - Epidermal Growth Factor Receptor- EGFR), το HER-2, το HER-3 και το HER-4. **Το HER-2/neu** είναι το ανθρώπινο ομόλογο του πρωτο-ογκογονιδίου neu (ένα πολύ καλά μελετημένο πρωτοογκογονίδιο στον άνθρωπο) βρίσκεται στο χρωμόσωμα 17q21 και κωδικοποιεί μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη, αποτελούμενη από 1255 αμινοξέα την p185 με δράση τυροσινικής κινάσης. Χρησιμοποιείται ευρέως ως προγνωστικός δείκτης, με εντυπωσιακά θεραπευτικά αποτελέσματα σε ασθενείς που έλαβαν ειδική θεραπεία για τους όγκους αυτούς. Στην κτηνιατρική επιστήμη η αντίστοιχη έρευνα δεν είναι τόσο διαδεδομένη. Διαπιστώθηκε μετά από ανάλυση 79 καρκίνων του μαστού στο σκύλο ότι το HER2/neu+ εκφράζεται σε 50% των καλοηθών όγκων, όπως είναι τα αδενώματα απλού και μικτού τύπου και 19.1% των αδενοκαρκινωμάτων (Rungsiyarat et al.1999). Στην παραπάνω μελέτη το γονίδιο HER-2/neu εκφραζόταν σε ποσοστό (20-30)% των κακοηθειών, ποσοστό ίδιο με εκείνο που εκφραζόταν στους ανθρώπους. Σε μια μελέτη των Kerns and collaborators παρατηρήθηκε παράλληλα έκφραση των p53 and HER2/neu, γεγονός το

οποίο θα μπορούσε να ερμηνευτεί ως απώλεια του μηχανισμού ο οποίος ελέγχει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενεργοποιώντας δυνητικά την κακοήθεια.

Ο υποδοχέας του επιδερμικού αναπτυξιακού παράγοντα (EGFR) γνωστό και ως HER-1, αποτελεί προϊόν του *c-erbB* πρωτο-ογκογονιδίου. Θετική έκφραση στο EGFR στον άνθρωπο έχει αναφερθεί στα φυσικά μυοεπιθηλιακά κύτταρα σε υπερπλαστικές και σε καλοήθεις αλλοιώσεις. Στον καρκίνο των μαστικών αδένων στον σκύλο, η θετική έκφραση του συγκεκριμένου υποδοχέα σχετίζεται με μικρότερο DFS και OS. Η ταυτόχρονη αύξηση της προγεστερόνης και του EGF στον ιστό θέτει την υπόθεση ότι στον σκύλο τίθεται σε λειτουργία ένας μηχανισμός ο οποίος εμπλέκει την προγεστερόνη ως παράγοντα ευαισθητοποίησης των νεοπλασματικών κυττάρων στην επίδραση των πολλαπλασιαστικών και αγγειογενετικών επιδράσεων του EGF. Προτείνεται ως μοριακός προγνωστικός δείκτης στον τριπλά αρνητικά καρκίνου του μαστού (ER-, PR- and HER2/neu-) (Masuda H, et al. 2012).

PTEN (Phosphatase and Tensin homolog) είναι ένα από τα ογκοκατασταλτικά γονίδια αποτελεί αρνητικό ρυθμιστή του συστήματος μεταγωγής σημάτων προς τον πυρήνα HER2/PI3K/Akt. Παρατηρούνται παραλλαγές του στον καρκίνο του μαστού, του εγκεφάλου και του προστάτη. Στον καρκίνο του μαστού στον άνθρωπο η απώλεια της έκφρασης της πρωτεΐνης συνδέεται με τον ER-/PR- φαινότυπο, μετάσταση σε λεμφαδένες και μικρό χρόνο επιβίωσης. Στον καρκίνο των μαστικών αδένων του σκύλου και στη γάτα, η κλινικοπαθολογία που ακολουθεί την απουσία της έκφρασης της πρωτεΐνης PTEN είναι παρόμοια με αυτή που έχει αναφερθεί στον άνθρωπο, με υψηλότερα ποσοστά έλλειψης της στο διηθητικό καρκίνωμα. Στα τελικά στάδια της νόσου παρατηρείται απουσία έκφρασης της (Ressel L, et al.2009).

Τα γονίδια **BRCA1 και BRCA2** είναι ογκοκατασταλτικά γονίδια υψηλής διεισδυτικότητας, οι παραλλαγές των οποίων συνδέονται με την υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο (Da Silva and Lakhani, 2010; Vargas et al., 2011). Το **BRCA2** συγκεκριμένα ενοχοποιείται για τον καρκίνο του μαστού στον άντρα (Mehrgou A, et al.2016). Η περιοχή BRCT στο **BRCA1** γονίδιο συμμετέχει στον μηχανισμό επιδιόρθωσης του DNA (Starita et al; 2015) ενώ το γονίδιο **BRCA2** περιλαμβάνει οκτώ επαναλήψεις BRCT (Guidugli et al.2014), μέσω των οποίων, ελέγχει τη λειτουργία του ενζύμου RAD51, το οποίο με τη σειρά του συμβάλει μέσω ομόλογου ανασυνδυασμού στους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του DNA (Soares M, et al 2016 ; Davies AA et al.2001). Η χαμηλή ανοσοέκφραση του συμπλέγματος BRCA1/BRCA2/RAD51, συνδέεται με ιστολογικά τελικού σταδίου

καρκίνου, υποδεικνύοντας μια σχέση μεταξύ της έλλειψης των πρωτεϊνών και του φαινοτυπικά επιθετικού καρκίνου (Söderlund.K. et al.2007).

Υπάρχει φαινοτυπική επικράτηση των παραλλαγών του γονιδίου BRCA1 σε άτομα που ανήκουν στην ίδια οικογένεια (Van der Groep et al., 2011) ενώ η θέση και η έκταση των παθολογικών παραλλαγών του γονιδίου, διαφοροποιείται μεταξύ των φυλών και εθνοκοιτήτων, όπως αποδείχθηκε σε μελέτες που έγιναν σε πληθυσμούς Σουηδών (Johannsson et al., 1996), Ισπανών (Lagos-Jaramillo et al., 2011), εβραίων Ασkenάζι (Tonin et al.,1996), αφροαμερικανών (Gao et al., 1997) και Κορεατών (Ahn et al., 2007).Έχουν αναφερθεί περί τις 500 παραλλαγές, με το 15.2% των ασθενών να φέρουν τριπλά αρνητικό υπότυπο, (Fostira et al. 2010), και συγκεκριμένα πλειοψηφικά νεαρές γυναικών που ανήκουν στη μαύρη φυλή. Αναλύοντας το γονιδίωμα του καρκίνου των μαστικών αδένων σε σκύλους, διαπιστώθηκε ότι τα δύο γονίδια παίζουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο του μαστού. Οι παραλλαγές στο γονίδιο *BRCA1* συνδέονταν με υψηλής κακοήθειας νεοπλασμάτα και στη γενετική σειρά, υποδηλώνοντας κληρονομική προδιάθεση σε νεαρής ηλικίας σκύλους, που ανήκουν στη φυλή English Springer Spaniel (Egenvall A, et al.2005). Το γονίδιο *BRCA2* αποδείχθηκε ότι συνδέεται με καλοήθη και κακοήθη περιστατικά, γεγονός το οποίο έρχεται σε συμφωνία την κοινή κληρονομική προδιάθεση και την άποψη ότι η ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού είναι μια μοριακή συνέχεια από την καλοήθη στη κακοήθη εξαλλαγή (Patricio Rivera, et al.2009).

Στους σκύλους, ο καρκίνος του μαστού είναι πιο συχνός στις φυλές English Springer Spaniel, German shepherd, Poodle, Maltese, and Beagle (Sorenmo et al. 2011) με τοπογραφικές διαφοροποιήσεις. Αν και η ανίχνευση του νοσήματος στις οικογένειες των σκύλων είναι δύσκολη, διαπιστώθηκε σε συγγενείς σκύλους, της φυλής των Beagles (Schafer et al., 1998), με κληρονομική προδιάθεση και στα δύο γονίδια. Αρκετές έρευνες (Lakhani et al. 2002; Musolino et al. 2007) απέδειξαν ότι το 60–90% των καρκίνων του μαστού στον άνθρωπο που είχαν σχέση με παραλλαγές στο γονίδιο *BRCA1* είναι αρνητικοί για το ER και 50-80% είναι αρνητικοί για το PR. Σε συνάφεια με αυτά τα ευρήματα η μελέτη που πραγματοποίησε ο Keum-Soon Im, το 2012, απέδειξε ότι το 100% νεοπλασιών μαστικών αδένων, σκύλων που ανήκανε στη φυλή Shih Tzu με υπερέκφραση του *BRCA1*, ήταν επίσης ER και PR αρνητικοί θέτοντας τους ως υποψήφια μοντέλα μελέτης του σχετιζόμενου με παραλλαγές στο *BRCA1*, καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο.

Στη γάτα όταν αναλύθηκαν οι συγκεκριμένοι υπότυποι δεν ταυτοποιήθηκαν ανάλογες με τον άνθρωπο παραλλαγές. Επομένως η διευκρίνιση του ρόλου των *BRCA1* και *BRCA2* στην

καρκινογένεση και η προγνωστική σημασία πρέπει να διερευνηθεί (V.Zappulli1 et al.2014).Η πιο συχνή γενετική αλλοίωση στον κληρονομικό καρκίνο του μαστού είναι η απώλεια της ετεροζυγωτίας των ογκοκατασταλτικών γονιδίων *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* και *PTEN*. Η υπερέκφραση του γονιδίου *BRCA1* συνήθως συνδέεται με τον τριπλό αρνητικό φαινότυπο (ER, PR, και HER-2 αρνητικό) ή των βασικό υπότυπο (ER και HER-2 αρνητικό και θετικό για οποιοδήποτε βιοδείκτη), τόσο στον καρκίνο του μαστού στον άνθρωπο (Sørlie et al., 2001; Lee et al. 2011) όσο και στον σκύλο (Keum-Soon Im a et al. 2012).

Τα γονίδια που ανήκουν στην **BCL-2** οικογένεια κωδικοποιούν διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες συμμετέχουν στην απόπτωση. Στον άνθρωπο παρατηρείται υπερέκφραση της πρωτεΐνης BCL-2 σε 75% δειγμάτων από νεοπλασματικούς μαστικούς αδένες (Dawson et al.2010), επιβεβαιώνοντας την ικανότητα των νεοπλασμάτων να αποφεύγουν την απόπτωση. Διαπιστώθηκε ανοσοϊστοχημικά, η υποκυτταρική διανομή της πρωτεΐνης BCL-2 σε όλους τους νεοπλασματικούς ιστούς των μαστικών αδένων της γάτας (Madewell et al.1999). Μια μελέτη στον καρκίνο του μαστού στον άνθρωπο και στον σκύλο απέδειξε μια ενισχυμένη έκφραση των Bcl-2, Bcl-XL, HSP-70 και HSP -90 (μόρια τα οποία έχουν σχέση με την αναχαίτηση της απόπτωσης) με κατιούσα ρύθμιση των Bax και των κασπασών, οι οποίες ρυθμίζουν την απόπτωση. Ένα χαρακτηριστικό της καρκινογένεσης, είναι η διαφυγή των νεοπλασματικών κυττάρων από τους αποπτωτικούς μηχανισμούς (Dolka I, et al. 2016).

4.5.Θεραπευτικές προσεγγίσεις του καρκίνου του μαστού.

4.5.1 Ο σκύλος και η γάτα ως φυσικό μοντέλο μελέτης θεραπευτικών πρωτοκόλλων

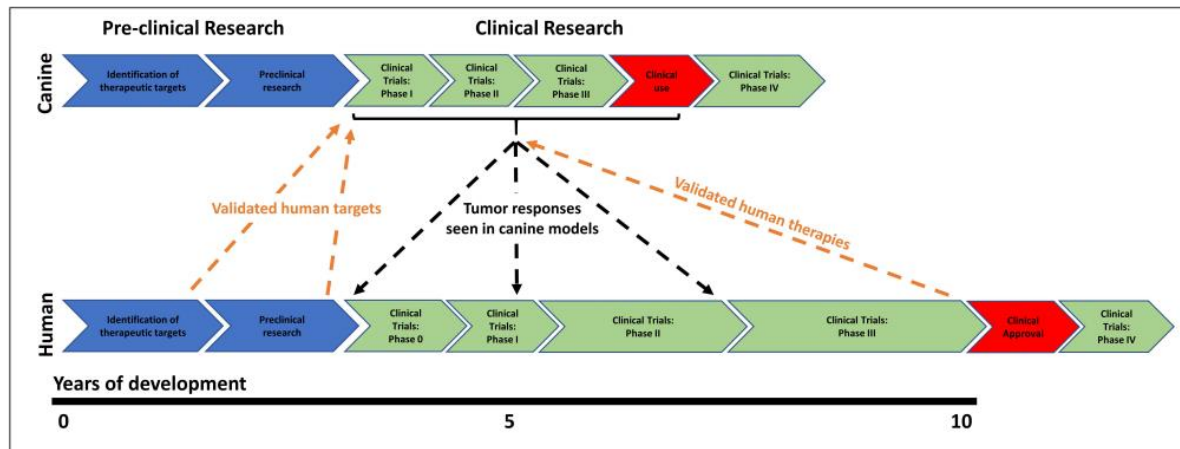
Η σύγχρονη ανάπτυξη ενός αντικαρκινικού φαρμάκου αξιολογείται αρχικά σε συμβατικά προκλινικά μοντέλα με εκτίμηση της αποτελεσματικότητας και τοξικότητας τους. Εν συνεχεία είναι ζητούμενο τα τελευταία χρόνια να αξιολογούνται οι μεταφραστικές μελέτες σε ζώα που φυσικά νοσούν από καρκίνο πριν τη χρησιμοποίησή τους σε κλινικές δοκιμές σε ανθρώπους. Τα συμβατικά προκλινικά μοντέλα μελέτης παρουσιάζουν σοβαρά μειονεκτήματα, μεταξύ των οποίων είναι το μικρό μέγεθος τους σε σχέση με τον άνθρωπο. Η πρόσφατη αλληλούχιση του γονιδιώματος των θηλαστικών, η μελέτη της βιολογίας του καρκίνου στα ζώα συντροφιάς και η ανάγκη για ανακάλυψη αποτελεσματικών θεραπευτικών σχημάτων στα ζώα συντροφιάς έδωσε τη δυνατότητα τέτοιου είδους προσεγγίσεων. Τα αποτελέσματα από τη χορήγηση χημικής ουσίας σε ποντικούς 20 γραμμαρίων, η οποία προορίζεται προς χρήση σε άνθρωπο 70 κιλών

ενδέχεται να οδηγήσει σε επισφαλή αποτελέσματα. Αυτό μπορεί να συμβεί διότι η φαρμακοκινητική της ουσίας συμπεριλαμβανομένου της απορρόφησης, διανομής, μεταβολισμού ενέχει πολλές διαφοροποιήσεις (Mondal P, et al.2022).

Επομένως το ιδανικό μονοπάτι ανάπτυξης του φαρμάκου, τα τελευταία χρόνια είναι η ανάπτυξη ενδιάμεσων προκλινικών σταδίων μελέτης σε σκύλους οι οποίοι νοσούν. Μέσω αυτής της προσέγγισης, δίνονται απαντήσεις σε ερωτήματα που αφορούν τη τοξικότητα, τη δοσολογία, τη φαρμακοκινητική, τη φαρμακοδυναμική και την αποτελεσματικότητα του φαρμάκου πριν προχωρήσει στο επόμενο στάδιο μελέτης. Αυτή η συγκριτική προσέγγιση είναι πολύ πιθανό να μειώσει το χρονικό διάστημα έγκρισης νέων θεραπευτικών σχημάτων λαμβάνοντας το μικρότερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τον άνθρωπο εξέλιξης της νόσου. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι η χρησιμοποίηση του σκύλου ως ενδιάμεσο κλινικό στάδιο είναι περιορισμένη και δεν είναι δυνατό να αφορά όλα τα φάρμακα και τις ειδικές συνθήκες νόσησης. Η χρησιμοποίηση του σκύλου σε προκλινικές μελέτες ενισχύεται από τη κτηνιατρική κοινότητα δημοσιοποιώντας σε διαδικτυακές πλατφόρμες τις τρέχοντες κλινικές δοκιμές με δυνατότητα συμμετοχής.

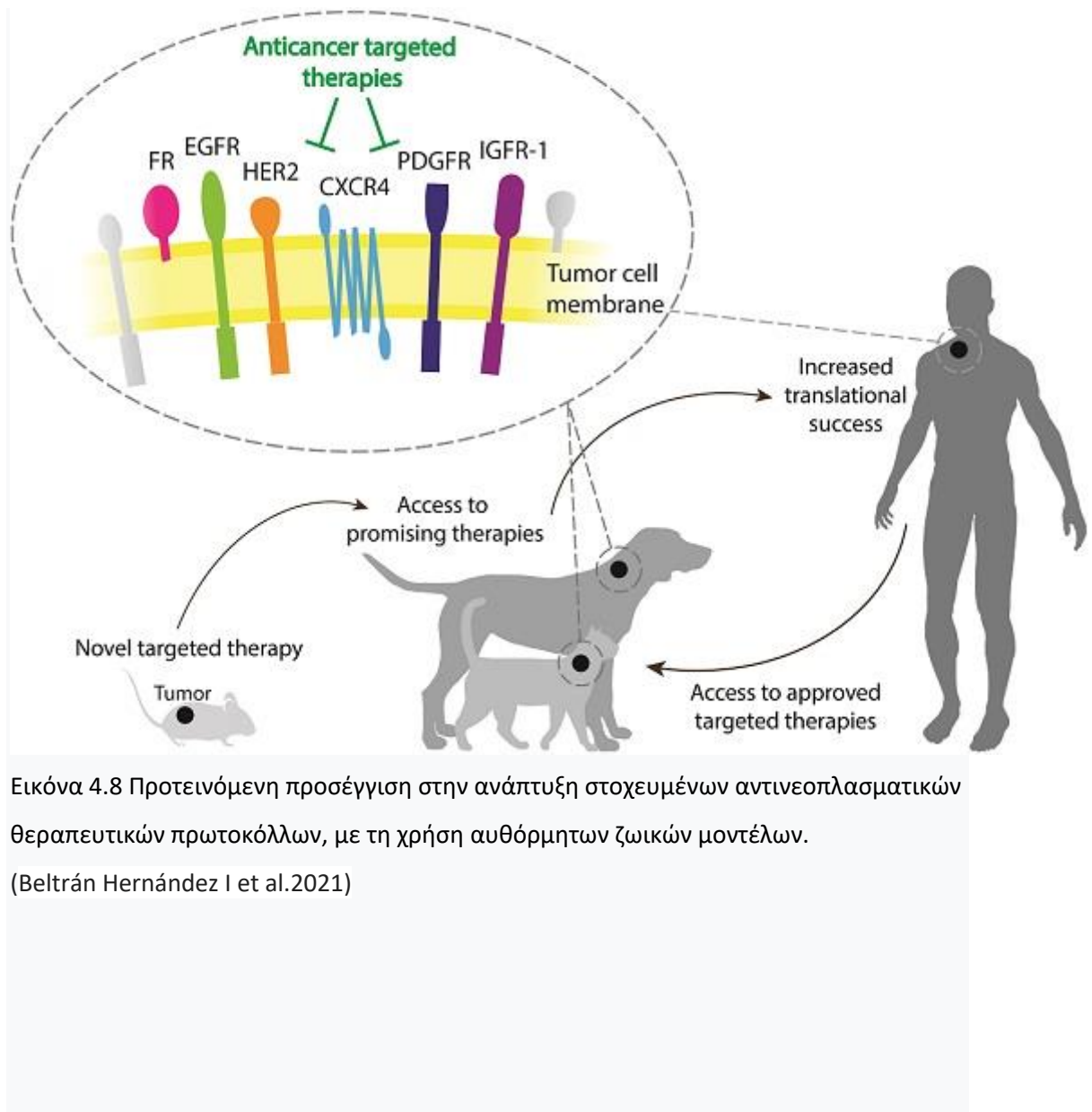
<https://www.avma.org/about/avma-strategic-planning>

<http://vetcancersociety.org/pet-owners/clinical-trials>



Εικόνα 4.7 Gray M, et al. 2020. Το χρονικό διάστημα έγκρισης των φαρμακευτικών σκευασμάτων στον σκύλο είναι μικρότερο από του ανθρώπου.

Εκτός από τη χρησιμοποίηση του σκύλου φαίνεται και η γάτα να συμμετέχει σταδιακά σε ανάλογες μελέτες. Γενικά, ακολουθούνται διάφορα στάδια προκλινικών μελετών. Σε ένα αρχικό στάδιο, στοχευμένα θεραπευτικά πρωτόκολλα εφαρμόζονται σε εργαστηριακά μοντέλα ζώων (π.χ τρωκτικά) και σε επόμενο στάδιο εγκρίνεται η εφαρμογή τους σε κατοικίδια ζώα τα οποία νοσούν από σχετικές νεοπλασίες, εκφράζοντας τον εν λόγω στόχο. Με αυτό τον τρόπο οι κτηνιατρικοί ασθενείς έχουν τη δυνατότητα πρόσβασης σε νέες και πολλά υποσχόμενες θεραπευτικές προσεγγίσεις ενώ παράλληλα αποκτώνται ισχυρά δεδομένα σε ένα σχετικό με τον άνθρωπο περιβάλλον, αυξάνοντας την επιτυχία της κλινικής εφαρμογής στον άνθρωπο.



Εικόνα 4.8 Προτεινόμενη προσέγγιση στην ανάπτυξη στοχευμένων αντινεοπλασματικών θεραπευτικών πρωτοκόλλων, με τη χρήση αυθόρμητων ζωικών μοντέλων. (Beltrán Hernández I et al.2021)

4.5.2 Οι σύγχρονες θεραπευτικές προσεγγίσεις για τον καρκίνο των μαστικών αδένων του σκύλου και της γάτας .

Η συνήθης θεραπευτική πρακτική στην αντιμετώπιση του καρκίνου του μαστού στα κατοικίδια ζώα είναι η ολική χειρουργική αφαίρεση των νεοπλασμάτων. Τα ποσοστά εμφάνισης υποτροπής και μεταστάσεων οδηγούν στην ανάγκη χρήσης συνοδών θεραπευτικών προσεγγίσεων (Stratmann N, et al 2008). Η χρήση της χημειοθεραπείας σε σκύλους με καρκίνο των μαστικών αδένων δεν είναι η αναμενόμενη. Έτσι η χρήση των φαρμάκων doxorubicin (Hahn

K, et al.1992), carboplatin (Sorenmo K.et al., 2003), mitoxantrone, paclitaxel (Poirier VJ et al., 2004) δεν είχε την ανάλογη αποτελεσματικότητα, με υψηλά ποσοστά υποτροπής και φτωχή πρόγνωση (Stratmann N, et al., 2008).

Η ακτινοθεραπεία στα σκυλιά χρησιμοποιήθηκε μόνο σε συνδυασμό με τα θεραπευτικά σχήματα piroxicam, toceranib και thalidomide, αυξάνοντας τον χρόνο επιβίωσης των νοσούντων σκύλων.(Rossi F et al., 2018).

Οι στοχευμένες θεραπείες συμπεριλαμβάνουν φαρμακευτικά σκευάσματα τα οποία εμποδίζουν την ανάπτυξη του καρκίνου, επιδρώντας σε ειδικά μόρια υπεύθυνα για τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων, την μετάσταση σε άλλους ιστούς και την ενίσχυση του μικροπεριβάλλοντος του καρκίνου (Masoud V, et al.2017).

Μονοκλωνικά αντισώματα αναγνωρίζουν και επιδρούν σε μια ειδική πρωτεΐνη των καρκινικών κυττάρων (trastuzumab, pertuzumab, deruxtecan, ado - trastuzumab emtansine, sacituzumab govitecan-hziy, και η pembrolizumab).

Μοριακοί αναστολείς στοχεύουν συγκεκριμένα τμήματα του καρκινικού κυττάρου και αναστέλλουν την ανάπτυξη και επιβίωση του. Δρουν ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά. Χρησιμοποιούνται συνήθως σε μεταστατικούς καρκίνους του μαστού (lapatinib, neratinib, tucatinib, palbociclib, ribociclib, abemaciclib, olaparib, talazoparib, alpelisib, και everolimus) <https://www.cancer.net/cancer-types/breast-cancer-metastatic/types-treatment>.

Η ανοσοθεραπεία η οποία ονομάζεται και βιολογική θεραπεία, έχει σχεδιαστεί με στόχο την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Σε μεταστατικούς καρκίνους του μαστού χρησιμοποιούνται τα Pembrolizumab και Dostarlimab (Jemperli). Οι σκύλοι χρησιμοποιούνται ως ενδιάμεσο μοντέλο σε πολλές καινούργιες κλινικές δοκιμές με τη χρήση ανοσοθεραπευτικών σκευασμάτων (Dow S. et al 2020).

Οι νεοπλασίες σε ER+σε γυναίκες ανταποκρίνονται σε θεραπείες αντιοιστρογονικές όπως η tamoxifen ή fulvestrant, ή σε αναστολείς της ενδογενούς σύνθεσης της 17βιοιστραδιόλης με τη χρήση αναστολέων αρωματάσης (Lanari C,et al.2012). Η tamoxifen στον σκύλο, δεν χρησιμοποιείται λόγω του κινδύνου εμφάνισης οιδηματικού αιδοίου, της εξόδου πυώδους εκκρίματος και πυομήτρας. Η αντιπρογεστερονική θεραπεία στον άνθρωπο συμπεριλαμβάνει τα φάρμακα megestrol acetate, medroxyprogesterone acetate, mifepristone, και onaprestone (Horwitz KB et al 2020). Στον σκύλο τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται ευρέως η aglepristone

για την πρόκληση αποβολής και θεραπείας της πυομήτρας. Η χρησιμοποίησή της για τον καρκίνο των μαστικών αδένων είναι σε εξέλιξη (Ros L, et al.2014).

Πολλές κατηγορίες ανταγωνιστών των HER-2 υποδοχέων χρησιμοποιούνται στον άνθρωπο όπως τα μονοκλωνικά αντισώματα trastuzumab και pertuzumab, αναστολείς της τυροσινικής κινάσης όπως είναι η lapatinib, neratinib, and afatinib και τα antibody–drug conjugates όπως η trastuzumab emtansine. Όλα τα παραπάνω σκευάσματα είναι εγκεκριμένα από European Medicines Agency (EMA) για κλινική χρήση σε ασθενείς με HER-2+ (Goutsouliak K et al.2020). Στο μέλλον γίνονται προσπάθειες εισόδου σε κλινικές δοκιμές στον σκύλο, ενώ μόνο η gefitinib έχει δοκιμαστεί (Fazekas J, et al.2016).

Στην κτηνιατρική ογκολογία δύο σκευάσματα έχουν εγκριθεί και χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του μαστοκυτώματος. Είναι οι αναστολείς της c-KIT τυροσινικής κινάσης toceranib (Palladia) και masitinib. Το toceranib αντίστοιχο με τη sunitinib, το οποίο είναι εγκεκριμένο στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού, σε πρώτες μελέτες φαίνεται να έχει ικανοποιητικά αποτελέσματα στον καρκίνο των μαστικών αδένων του σκύλου, με πνευμονική μετάσταση (London C, et al.2012).

Τα φάρμακα που ανήκουν στην κατηγορία των αντι-κυκλοοξυγενασών (anti-COX-2) έχουν ευρεία χρήση στην κτηνιατρική πράξη για την αντιφλεγμονώδη δράση τους (firocoxib, deracoxib, cimicoxib, robenacoxib, και mavacoxib). Σε αντικαρκινικές θεραπείες που αφορούν τον μαστό χρησιμοποιούνται επικουρικά ανεξάρτητα από την ενζυμική έκφραση του όγκου. Σε πολλές περιπτώσεις δεν υπάρχουν αντίστοιχες κλινικές δοκιμές. (Melissa Paoloni et al.2008) Επίσης μια πολλά υποσχόμενη θεραπεία είναι η εισαγωγή ενός “φυσιολογικού” γονιδίου στο γονιδίωμα του ασθενούς το οποίο θα αντικαταστήσει το γονίδιο που φέρει την παραλλαγή και είναι υπεύθυνο για τη νεοπλασματική εξεργασία.

https://www.itsa.kit.edu/downloads/etag_resa07a.pdf. “Santow Carballal et al/2018)

Θεραπίες για τον καρκίνο του μαστού βρίσκονται σε κλινικό στάδιο. Σχετικό παράδειγμα είναι εμβολιακό σκεύασμα με p62 από νεοπλασματικά κύτταρα του μαστικού αδένος σκύλου (ξενόγραφο ποντικού) και καρκινώματα του μαστικού αδένος σκύλου. Το εμβόλιο χορηγείται ενδομυϊκά και βρίσκεται σε μεταβατικό κλινικό στάδιο μελέτης. Η αντινεοπλασματική του δράση συνδέεται με διήθηση των λεμφοκυττάρων και την ενθυσίαση του όγκου (Gabai V. Et al. 2014)

Μια άλλη πολλά υποσχόμενη θεραπεία που βρίσκεται σε κλινικό στάδιο είναι εμβόλιο που φέρει πλασμίδιο DNA το οποίο κωδικοποιεί την ιντερφερόνη β. Το εμβόλιο χορηγείται διεγχειρητικά στον νεοπλασματικό όγκο και περιοδικά γίνονται υποδόριες εγχύσεις που συνδέονται με την παραγωγή ιντερλευκίνης -2 και εκχυλισμάτα αλλογενών νεοπλασματικών κυττάρων (Finocchiaro LME, et al.2018).

Η στοχευμένη θεραπεία έναντι των HER-2 υποδοχέων είναι καλά εδραιωμένη στον άνθρωπο, ενώ στον σκύλο μόνο η gefitinib (εκλεκτικός μικρός μοριακός αναστολέας του EGFR που έχει δράση κινάσης της τυροσίνης) έχει δοκιμαστεί (Fazekas J, et al.2016)

Δοκιμές χρήσης νανοσωματιδίων για την καταπολέμηση του καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο, τον σκύλο και τη γάτα, τα οποία αποτελούνται υποψήφια μοντέλα μελέτης (T Paz Boix-Montesinos, et al.2021)

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Τα γενετικά νοσήματα του ανθρώπου αποτελούν αντικείμενο έρευνας της Ιατρικής επιστήμης. Με τις εξελίξεις στο χώρο της βιολογίας και της βιοπληροφορικής, είναι δυνατή η διάγνωση, η διαχείριση και σε πολλές περιπτώσεις ακόμη και η θεραπεία τους. Ο καρκίνος του μαστού όπως και όλα τα είδη καρκίνου συγκαταλέγεται στα νοσήματα με γενετικό υπόβαθρο και αντιμετωπίζεται ως τέτοιο. Απαραίτητη προϋπόθεση για την αποτελεσματική χρησιμοποίηση όλων των γενωμικών εργαλείων που έχει στη διάθεση της η επιστήμη της βιολογίας και της ιατρικής είναι η χρησιμοποίηση ζωικών μοντέλων.

Τα πιο διαδεδομένα είναι τα ζώα εργαστηρίου και κυρίως τα ποντίκια τα οποία λόγω του χαμηλού κόστους, του εύκολου χειρισμού τους από τους ερευνητές, καθώς και της γενετικής ομοιότητας που παρουσιάζουν με τον άνθρωπο (Tratar U.L et al., 2018), χρησιμοποιούνται σχεδόν σε όλες τις σχετικές ερευνητικές εργασίες. Ενώ περισσότερες από το 95% των in vivo ερευνητικών εργασιών που αφορούν τον καρκίνο (Workman P et al., 2010) χρησιμοποιούν τα εργαστηριακά μοντέλα, σημαντικό μειονέκτημα είναι η αδυναμία έρευνας σε μεταφραστικό επίπεδο, με αποτέλεσμα την μη σωστή αξιολόγηση και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. (Cheo DJ et al., 2011). Οι τεχνικές της βιοτεχνολογίας όπως είναι η Crispr Cas-9 καθιστούν δυνατή την εισαγωγή γενετικού υλικού σε εργαστηριακά ποντίκια

και την επαγωγή καρκίνου σε αυτά ή στους απογόνους τους, χωρίς όμως να είναι σε θέση να μιμηθούν ολόκληρη την έκφραση και τα πρότυπα παραλλαγής ενός «καρκινογόνου γονιδιώματος». Επίσης, η χρησιμοποίηση των γενετικά επαγόμενων μοντέλων καρκίνου είναι γενικά χρονοβόρα και δαπανηρή διαδικασία και τις περισσότερες φορές απαιτεί υψηλά εκπαιδευμένο προσωπικό και προηγμένη υποδομή. Η ανάγκη αυτή οδήγησε τους ερευνητές προς τη μελέτη οργανισμών που νοσούν αυθόρμητα από τη νόσο και εμφανίζουν γενετική ομολογία με τον άνθρωπο.

Τα φυσικά μοντέλα ζώων αποτελούν ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα ενός φυσικά νοσούντος πληθυσμού, ο οποίος παρουσιάζει γενετική ποικιλομορφία μεταξύ των ατόμων του. Ως εκ τούτου, συνιστούν ένα ισχυρό εργαλείο μελέτης της αιτιολογικής βάσης των γενετικών νοσημάτων και της αξιολόγησης θεραπευτικών δοκιμών, οι οποίες είναι αποτέλεσμα προηγούμενης έρευνας με διαγονιδιακά πρότυπα. (Braidy et al.2015).

Κάθε έρευνα σε οποιοδήποτε επίπεδο που αφορά τη χρησιμοποίηση ζώων υπόκειται σε ηθικούς και κοινωνικούς περιορισμούς, ανάλογα με την εποχή και την κοινωνία στην οποία πραγματοποιείται. Στον Δυτικό κόσμο υπάρχει μεγάλη κινητοποίηση για την προάσπιση των δικαιωμάτων των ζώων και το φιλοζωικό αίσθημα είναι πολύ υψηλό. Συγκεκριμένα, στην Ευρωπαϊκή Ένωση οι ερευνητές οι οποίοι χρησιμοποιούν οποιοδήποτε ζώο για ερευνητικούς σκοπούς οφείλουν να ακολουθούν συγκεκριμένους κανόνες μεταχείρισης των ζώων με βάση την οδηγία 2010/63 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και Συμβουλίου της 22 Σεπτεμβρίου 2010. Σκοπός της Ευρωπαϊκής οδηγίας είναι να διασφαλίσει την ευζωία των ζώων που χρησιμοποιούνται για ερευνητικούς σκοπούς. Σύμφωνα με την παραπάνω οδηγία, ο αριθμός των ζώων που χρησιμοποιούνται σε μια έρευνα θα πρέπει να είναι ο μικρότερος δυνατός και ο σχεδιασμός της θα πρέπει να είναι τέτοιος, ώστε με οποιοδήποτε τρόπο να μην προκαλείται στα ζώα πόνος ή δυσφορία σε οποιοδήποτε βαθμό. Επίσης θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πειραματόζωα μόνο στις περιπτώσεις εκείνες που δεν υπάρχει άλλη εναλλακτική επιστημονική επιλογή.

Έτσι οι ερευνητές οφείλουν να υποβάλλουν λεπτομερή αναφορά για τους λόγους που συμπεριλαμβάνονται πειραματόζωα στην έρευνα τους και το όφελος από αυτήν. Έχει υπολογιστεί ότι σε ετήσια βάση ο αριθμός των πειραματόζωων που χρησιμοποιούνται σε ερευνητικά προγράμματα, πανεπιστημιακά ιδρύματα, φαρμακευτικούς και ερευνητικούς οργανισμούς και εμπορικές εταιρείες αφορά περίπου 50 με 100 εκατομμύρια ζώα τα οποία τελικά καταλήγουν σε ευθανασία (Εθνικό Κέντρο Τεκμηρίωσης και Ηλεκτρονικού Περιεχομένου, Ηθική και Δεοντολογία στην Επιστημονική έρευνα, τεύχος 81, 12/2010). Με βάση τα παραπάνω, αντιλαμβανόμαστε ότι είναι

πιο δύσκολο να εγκριθούν προγράμματα τα οποία συμπεριλαμβάνουν μεγάλα ζώα σε σχέση με εκείνα που χρησιμοποιούν μικρά, καθώς έρχονται αντιμέτωπες με έντονες αντιδράσεις από το κοινωνικό σύνολο. Μεταξύ των μεγάλων ζώων τα παραγωγικά ζώα λόγω της σύνδεσής τους με την κατανάλωσή τους από τον άνθρωπο, δεν αντιμετωπίζονται με την ίδια ευαισθησία για τη χρήση τους σε σχέση με τον σκύλο και τη γάτα (Mondal P. et al.2022).

Επομένως όταν αναφερόμαστε σε μελέτες που συμπεριλαμβάνουν κατοικίδια ζώα, τις περισσότερες φορές πραγματοποιούνται σε μη εργαστηριακές συνθήκες αλλά στο φυσικό τους περιβάλλον διαβίωσης. Η χρησιμότητά τους ενισχύεται από τα κοινά γενετικά νοσήματα μεταξύ ανθρώπου, του σκύλου και της γάτας τα οποία οφείλονται συνήθως σε παραλλαγές σε ορθόλογα γονίδια και συνοδεύονται από μοριακή, βιοχημική, παθολογική και κλινική ομοιότητα. Ενισχύοντας την παραπάνω παραδοχή, το 1974 ιδρύθηκε στο Πανεπιστήμιο της Πενσυλβάνιας το Κέντρο Παραπομπής-Παρακολούθησης Ζωικών Μοντέλων για Ανθρώπινα Γενετικά Νοσήματα (Referral Center for Animal Models of Human Genetic Disease -RCAM). Σκοπός του κέντρου είναι η επισήμανση, χαρακτηρισμός και η διατήρηση αναπαραγωγικών πληθυσμών σκύλου και γάτας σε φυσικό περιβάλλον, ώστε τα συγκεκριμένα είδη να καθιερωθούν ως μοντέλα μελέτης για τα γενετικά νοσήματα του ανθρώπου (Brittney L. et al.2017). Σημαντικά στοιχεία είναι καταγεγραμμένα με ελεύθερη πρόσβαση σε βάσεις δεδομένων όπως είναι το Online Mendelian Heritance in Animals στην οποία αναγράφονται γονίδια, κληρονομικές διαταραχές και χαρακτηριστικά σε περισσότερα από 135 είδη ζώων.

Οι ερευνητές βρίσκονται σε διαρκή αναζήτηση το ιδανικού μοντέλου ζώου το οποίο θα εκπληρώνει όλες τις απαραίτητες προϋποθέσεις και θα επιτρέπει την εξαγωγή αξιόπιστων πληροφοριών. Συνοψίζοντας, όσον αφορά τη μελέτη των γενετικών νοσημάτων, το πρότυπο μοντέλο ζώου είναι αυτό που: α) εξετάζει στενά συγγενή είδη ή διάφορα μέλη του ίδιου είδους με φυσικό προσδόκιμο ζωής, β) έχει ήδη αναπτύξει επαρκείς ιατρικές διαδικασίες, γ) έχει ένα καλά αναλυμένο γονιδίωμα, δ) δεν απαιτεί τεχνητή στέγαση και μπορεί να ζήσει στο φυσικό της περιβάλλον ενώ διερευνάται και ε) επιτρέπει τη συλλογή σημαντικών πληροφοριών μέσα σε ένα σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα (Gilmore et al.2015). Από τα παραπάνω φαίνεται ότι τα μεγάλα ζώα τα οποία έχουν εξημερωθεί και ζουν κοντά με τον άνθρωπο ή ακόμη καλύτερα μοιράζονται τις ίδιες συνθήκες διαβίωσης με αυτόν πληρούν τα κριτήρια εκείνα που απαιτούνται για τη μελέτη γενετικών νοσημάτων.

Ο σκύλος κυρίως και δευτερευόντως η γάτα φαίνεται να συγκεντρώνουν τα παραπάνω χαρακτηριστικά και επάξια να θεωρούνται ως ιδανικά μοντέλα μελέτης των γενετικών νοσημάτων

του ανθρώπου. Συγκεκριμένα, υπάρχουν διαθέσιμα γενεαλογικά αρχεία και πλήρη κτηνιατρικά δεδομένα, τα οποία αποτελούν πολύτιμα εργαλεία μελέτης και οργάνωσης των θεραπευτικών δοκιμών με συμμετοχή των κατοικίδιων ως φυσικών μοντέλων (Marjo K. Hytonen et al.2016).

Επισημαίνεται πως η καταγραφή των οικογενειών των καθαρόαιμων φυλών και η διατήρηση τράπεζας γενετικού υλικού σε γενετικά εργαστήρια ανά τον κόσμο, διευκολύνει τον εντοπισμό και τη μελέτη παραλλαγών του γονιδιώματος τους. Συγκεκριμένα αρκετοί σύλλογοι καθαρόαιμων φυλών σκύλων και γάτας ανά χώρα, απαιτούν από τα μέλη τους τη διενέργεια συγκεκριμένων ανά φυλή γενετικών εξετάσεων πριν τη συμμετοχή του ζώου σε αναπαραγωγικό πρόγραμμα, ενώ οι κρατικοί μηχανισμοί σε πολλές χώρες διατηρούν βάσεις αποθήκευσης γενετικού υλικού. Έτσι όλο και περισσότεροι εκτροφείς και ιδιοκτήτες σκύλου και γάτας διενεργούν για προληπτικούς ή διαγνωστικούς λόγους γενετικές εξετάσεις στα κατοικίδια τους. Η δυνατότητα αυτή δόθηκε τα τελευταία χρόνια καθώς το κόστος των εξετάσεων είναι σχετικά χαμηλό, ενώ η αποστολή του γενετικού υλικού γίνεται πολύ εύκολα και γρήγορα μέσω του απλού ταχυδρομείου, με τη λήψη παρειακών επιχρισμάτων με χρήση βαμβακοφόρου στυλεού. Στις ιστοσελίδες των γενετικών εργαστηρίων παρέχονται πληροφορίες για το σύνολο των στοχευμένων εξετάσεων ανά φυλή και είδος ζώου καθώς και πληροφορίες για κάθε νόσημα . Επομένως, εκτός από τη καταγραφή των αποτελεσμάτων των συγκεκριμένων εξετάσεων σε βάσεις δεδομένων, είναι δυνατή και η μελέτη του νοσήματος μέσα σε μια φυλή.

Εκτός από τον σκύλο και τη γάτα γενετικές εξετάσεις ζητούν οι ιδιοκτήτες των πτηνών και των αλόγων αλλά σε πολύ περιορισμένο βαθμό. Όσον αφορά τις γενετικές εξετάσεις σε παραγωγικά ζώα, χοίρους, αιγοπρόβατα και αγελάδες, διεξάγονται από πανεπιστημιακά ιδρύματα και εταιρείες με ερευνητικούς σκοπούς.

Λαμβάνοντας υπόψιν, ότι ο αριθμός των κατοικίδιων αυξάνεται όλο και περισσότερο, με αποτέλεσμα να παρατηρείται και αναλογική αύξηση των γενετικών τεστ, είναι εφικτή η ανίχνευση και μελέτη ενός κοινού με τον άνθρωπο νοσήματος μέσα στον πληθυσμό. Μόνο στο Ηνωμένο Βασίλειο οι οικόσιτοι σκύλοι αριθμούνται γύρω στα 12 εκ. άτομα το 2015.(Murray J et al.2015), ενώ ο συνολικός αριθμός ασφαλισμένων κατοικίδιων για το έτος 2021 φτάνει τα 3.7 εκατομμύρια άτομα (<https://www.statista.com/statistics/830150/number-of-pet-insurance-policies-united-kingdom-uk/>). Επίσης αξίζει να σημειωθεί ότι για τη μελέτη και τη χαρτογράφηση των μονογονιδιακών νοσημάτων στους σκύλους, απαιτούνται λιγότερα SNP δεικτών και συνεπώς συμμετοχή λιγότερων

ζώων σε σχέση με αυτές των ανθρώπων. Αυτό συμβαίνει λόγω της μεγάλης έκτασης LD μέσα στις φυλές των σκύλων και το περιορισμένο LD στον άνθρωπο (Kerstin Lindblad-Toh et al.2020).

Έτσι πραγματοποιούνται αναλύσεις οικογενειών σε ευρεία κλίμακα με πολύ καλά αποτελέσματα, τουλάχιστον όσον αφορά σε πρώτη φάση, στην ανίχνευση της υπεύθυνης για τη νόσο παραλλαγής.

Εκατομμύρια γάτες και σκύλοι διαγιγνώσκονται ετησίως με καρκίνο, με αποτέλεσμα να υπάρχει επαρκής αριθμός ζώων στα οποία θα μπορούν να γίνουν αντίστοιχες μελέτες (Salas-Araujo Y.J. et al.2002). Έτσι προκύπτει, ότι οι ιδιοκτήτες κατοικίδιων ζώων δύναται να συνεισφέρουν οικονομικά στην παροχή υψηλού επιπέδου ιατροφαρμακευτικής περίθαλψης, και να δηλώσουν τη συμμετοχή του σκύλου και της γάτας σε ερευνητικά προγράμματα, τα οποία μπορούν να συγχρηματοδοτηθούν από εταιρείες που δραστηριοποιούνται στο χώρο της γενετικής και της ογκολογίας (Onaciu A, et al., 2020).

Σε ότι αφορά αφορά τον καρκίνο του μαστού τα μεγάλα ζώα ως μοντέλα μελέτης, προτιμώνται από τα εργαστηριακά μικρού μεγέθους με βασικό πλεονέκτημα το φυσικό μέγεθός τους, το οποίο είναι πιο κοντά στον άνθρωπο και ειδικά στους παιδιατρικούς ασθενείς. Έτσι ένας σκύλος ο οποίος ζυγίζει 40 κιλά παρουσιάζει ανατομικές και φαινοτυπικές ομοιότητες μεγαλύτερες με τον άνθρωπο, από ότι ένας ποντικός ο οποίος ζυγίζει κάτω από 100 γρ. Επιπρόσθετα, είναι δυνατή η διενέργεια παρόμοιων με τον άνθρωπο επεμβατικών μεθόδων οι οποίες μπορούν να εφαρμοστούν σε επείγουσες καταστάσεις, όπως είναι η ολική μαστεκτομή με την αφαίρεση των συνοδών λεμφαδένων. Ιατρικές συσκευές οι οποίες είναι σχεδιασμένες για την εφαρμογή τους στον άνθρωπο και αφορούν τη διάγνωση παρακολούθηση και θεραπεία των μαστικών όγκων, μπορούν να χρησιμοποιηθούν με την ίδια επιτυχία στα μεγάλα ζώα και να καταλήξουν σε πολύτιμα συγκρίσιμα συμπεράσματα. Έτσι είναι δυνατή η διεξαγωγή απεικονιστικών εξετάσεων όπως είναι ο υπέρηχος, η αξονική και μαγνητική τομογραφία ακόμα και η Τομογραφία εκπομπής ποζιτρονίων (ποζιτρονική τομογραφία, PET-CT scan), τεχνικές οι οποίες δεν είναι δυνατόν να εφαρμοστούν με την ίδια επιτυχία στα μικρού μεγέθους ζώα. (Sánchez D, et al.2019.) Η χρήση ακτινοβολιών και της κρυοχειρουργικής στην αντιμετώπιση συμπαγών όγκων εφαρμόζονται σε κτηνιατρικές κλινικές, ενισχύοντας τα δεδομένα στη συγκριτική ογκολογία. Όσων αφορά τα παραγωγικά ζώα δεν υπάρχουν νοσοκομειακές εγκαταστάσεις με ανάλογο εξοπλισμό όπως του ανθρώπου και των μικρών ζώων, ενώ οι κτηνοτρόφοι δεν ενδιαφέρονται για την εξατομικευμένη αντιμετώπιση ή προσπάθεια θεραπείας των γενετικών νοσημάτων των ζώων τους και του καρκίνου, δεδομένου ότι κάτι τέτοιο έχει υψηλό οικονομικό κόστος για την εκτροφή. Επιπλέον ενισχυτικός παράγοντας της μελέτης των γενετικών νοσημάτων

αποτελεί η στενή σχέση και η συμβίωση ανθρώπων και κατοικίδιων κάνοντας πιο εύκολη την παρατήρηση της επίδρασης των περιβαλλοντικών συνθηκών στην παθοφυσιολογία, κυρίως των πολυπαραγοντικών νοσημάτων. (Hayward, J. J. et al.2016). Σε ότι αφορά τον καρκίνο του μαστού, τα μοντέλα που αυθόρμητα νοσούν, υφίστανται την επίδραση των ίδιων επιβαρυντικών παραγόντων όπως η διατροφή, οι συνθήκες διαβίωσης, οι περιβαλλοντικοί ρύποι και το στρες, οι οποίοι συμβάλλουν στη δημιουργία και την εξέλιξη του καρκίνου (Onaciu A, et al.2020). Τα εργαστηριακά ζώα ζουν σε συνθήκες εργαστηρίου οι οποίες είναι σταθερές και απόλυτα ελεγχόμενες και διαφέρουν κατά πολύ από τις πραγματικές συνθήκες που βιώνει ο ασθενής. Για να βελτιώσουν τη μεταφραστική αξία μιας μελέτης, όπως είναι για παράδειγμα μια νέα θεραπεία στην ογκολογία, οι ερευνητές προχωρούν σε τυπική διαμόρφωση του περιβάλλοντος (όπως είναι η διατροφή και η στέγαση) και την επιλογή μοντέλων με παρόμοια συναισθηματικά με τον άνθρωπο χαρακτηριστικά και τα οποία συνδέονται με το φύλο και την ηλικία (Van Meer P et al.2005). Ωστόσο, το “ελεγχόμενο περιβάλλον” δεν μπορεί να εκτιμηθεί αντικειμενικά και να αξιολογηθεί η επίδραση του στα αποτελέσματα της μελέτης (Chesler E.J et al.2002). Στην κλινική πράξη, το περιβάλλον που βιώνουν τα φυσικά νοσούντα άτομα είναι πιο πολύπλοκο και επηρεάζεται από μη γνωστές μετρήσιμα παραμέτρους.

Τα φυσικά μοντέλα ζώων σκύλος και γάτα κρίνονται ως απαραίτητα στην μελέτη των γενετικών νοσημάτων του ανθρώπου. Η κλινικοπαθολογική ομοιότητα που παρουσιάζουν με ορισμένα γνωστά αλλά εξαιρετικά σπάνια γενετικά νοσήματα του ανθρώπου δίνει τη δυνατότητα μελέτης τους καθ’ όλη τη διάρκεια ζωής του ζώου. Επιπρόσθετα, είναι δυνατή η παρακολούθηση και αξιολόγηση της επίδρασης του περιβάλλοντος στην κλινική εκδήλωση πολυπαραγοντικών νοσημάτων. Έχει αποδειχθεί η γενετική ετερογένεια που παρουσιάζει ο καρκίνος του μαστού στα κατοικίδια και έχουν αναλυθεί οι ομοιότητες και οι διαφορές στην φυσιοπαθολογία του νοσήματος. Εμφανίζουν όγκους με τα ίδια βιολογικά χαρακτηριστικά και μοιράζονται κοινούς περιβαλλοντικούς παράγοντες επικινδυνότητας με τον άνθρωπο. Επίσης το σωματικό μέγεθος τους, ο επαρκής επιπολασμός του καρκίνου και η έλλειψη εδραιωμένων θεραπειών, διευκολύνει την ταχεία έναρξη, εξέλιξη και ολοκλήρωση νέων θεραπευτικών πρωτοκόλλων.

Μεταξύ των μεγάλων ζώων, ο χοίρος λόγω της γενετικής του ομολογίας και της κοινής με τον άνθρωπο φαρμακοκινητικής του συμπεριφοράς, αξιολογείται από πολλούς ερευνητές ως πρότυπο γενετικό μοντέλο. Η μικρή διάρκεια ζωής του, το αυξημένο κόστος αγοράς και συντήρησής του και

οι κοινωνικοί και ηθικοί περιορισμοί τελικά υπερισχύουν, με αποτέλεσμα να αμφισβητηθεί η παραπάνω επιλογή (Mondal P et al. 2022).

Το πρόβατο είναι ένα από τα μεγάλα ζώα τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν και ακόμα χρησιμοποιούνται σε πολλά ερευνητικά προγράμματα. Η έξοχη κοινωνική συμπεριφορά που το χαρακτηρίζει διευκολύνει το χειρισμό του, αλλά η μικρή διάρκεια ζωής του, η έλλειψη υψηλού επιπέδου παροχής κτηνιατρικών υπηρεσιών, η κατευθυνόμενη εκτροφή του από τους κτηνοτρόφους με γνώμονα τη βελτίωση των εκτροφικών του χαρακτηριστικών, αποτελούν ανασταλτικούς παράγοντες στην επιλογή του ως φυσικό μοντέλο μελέτης των γενετικών νοσημάτων του ανθρώπου (Banstola et al.2022).

Από τα μεγάλα ζώα ο σκύλος και η γάτα παρουσιάζουν μεγαλύτερες ομοιότητες με τον άνθρωπο από οποιοδήποτε άλλο ζώο και αποτελούν σχεδόν το ιδανικό μοντέλο μελέτης όσον αφορά τον καρκίνο του μαστού. Στον άνθρωπο στη γάτα και στον σκύλο η εμφάνιση του καρκίνου του μαστού είναι ορμονοεξαρτώμενη. Και στα τρία είδη φαίνεται ότι οι γεννητικές ορμόνες παίζουν τον ίδιο ρόλο στην ανάπτυξη, τη λειτουργία των μαστικών αδένων και η παρατεταμένη δράση τους κατά τη διάρκεια των αναπαραγωγικών κύκλων ενοχοποιείται για την καρκινογένεση. Επίσης η χορήγηση εξωγενών ορμονικών σκευασμάτων συνδέεται με την αύξηση της συχνότητας νόσησης.(Hayes et al. 1985 ;Queiroga et al. 2011; Zappulli et al. 2005).

Η φυλή, η ηλικία στον άνθρωπο και στα κατοικίδια ζώα φαίνεται ότι επηρεάζει τη σύνθεση του μικροπεριβάλλοντος του όγκου σε κυτταρικό, μοριακό και γενετικό επίπεδο. Η επίγνωση των διαφορών αυτών και η περαιτέρω έρευνα θα οδηγήσει στην ανάπτυξη ειδικών φυλετικών βιοδεικτών και θεραπευτικών στόχων οι οποίοι τελικά θα συμβάλουν στη βελτίωση της εφαρμογής της εξατομικευμένης θεραπείας του καρκίνου του μαστού (Kim G.et al. 2020).

Η παχυσαρκία και η μη ισορροπημένη διατροφή αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Τα κατοικίδια ζώα συμβιώνουν με τον άνθρωπο και υιοθετούν τις ίδιες διατροφικές συνήθειες, ενώ απολαμβάνουν και αυτά τις συνέπειες της καθιστικής ζωής. Έτσι σε μικρό χρονικό διάστημα, δεδομένου ότι και το όριο ζωής των κατοικίδιων είναι πολύ μικρότερο από αυτό του ανθρώπου, δίνεται η δυνατότητα μελέτης της επίδρασης των λιπών και των υδατανθράκων στην παθογένεση της νόσου. Σε αυτό το σημείο χρειάζεται προσοχή γιατί πρέπει να ληφθεί υπόψιν ο διαφορετικός ρυθμός μεταβολισμού των τροφών και στα τρία είδη.

Η επίδραση του περιβάλλοντος συμπεριλαμβανομένου του στρες και της επαφής με μολυσματικούς παράγοντες παίζει ρόλο στην δημιουργία και ανάπτυξη του καρκίνου του μαστού. Τα κατοικίδια τα οποία ζουν στο ίδιο ακριβώς περιβάλλον, πίνουν το ίδιο νερό και αναπνέουν τον ίδιο αέρα με τον άνθρωπο, επηρεάζονται ανάλογα. Η μικρή διάρκεια ζωής τους επιτρέπει τη μελέτη της ανάπτυξης νεοπλασιών σε πληθυσμούς που κατοικούν σε περιβαλλοντικά υποβαθμισμένες περιοχές. (Marconato, et al. 2009 ; Andrade, F.H et al. 2010).

Για να είναι δυνατή η μελέτη του καρκίνου του μαστού, είναι απαραίτητη η κλινικοπαθολογική και μοριακή του ταξινόμηση με κοινά με τον άνθρωπο κριτήρια. Με αυτόν τον τρόπο είναι εφικτή η συγκριτική μελέτη καθώς και η εφαρμογή κοινών προγνωστικών και θεραπευτικών μεθόδων. Για τη σταδιοποίηση του καρκίνου του μαστού στον άνθρωπο, χρησιμοποιείται ευρέως το σύστημα TNM της American Joint Committee on Cancer (AJCC). Αναλογικά όσον αφορά τον καρκίνο των μαστικών αδένων του σκύλου και της γάτας, έχουν προταθεί και χρησιμοποιηθεί ανάλογα συστήματα ταξινόμησης. Έτσι είναι δυνατή η κλινική εκτίμηση της εξέλιξης του νοσήματος.

Η ιστολογική εξέταση του καρκίνου του μαστού αναδεικνύει τις ομοιότητες και τις διαφορές εκείνες που είναι σημαντικές για τη μελέτη της εξέλιξης του μαστού. Συμπερασματικά προκύπτει ότι το 25% των γενετικών μεταβολών στους μεταστατικούς καρκίνους των μαστικών αδένων του σκύλου συνδέονται με αντίστοιχες αλλαγές στους ανθρώπους (Klopffleisch R et al.2010), ενώ επιπροσθέτως το πορογενές μη διηθητικό και το διηθητικό καρκίνωμα του μαστού στον σκύλο και στον άνθρωπο, εμφανίζουν κοινή εικόνα σε μοριακό και ιστοπαθολογικό επίπεδο (Mohammed SI et al.2020). Οι καλοήθεις όγκοι και οι μεσεγχυματικοί όγκοι είναι πιο συχνοί στον σκύλο σε σχέση με τον άνθρωπο, με αποτέλεσμα να δίνεται η ευκαιρία μελέτης τους (Salas Y, et al.2015).

Ο φλεγμονώδης καρκίνος του μαστού στους ανθρώπους είναι η πιο επιθετική μορφή καρκίνου του μαστικού αδένου και χαρακτηρίζεται από φαινοτυπική ιδιαιτερότητα, παρουσιάζει δυσμενή πρόγνωση με παρουσία μεταστάσεων. Ο σκύλος είναι φυσικό μοντέλο μελέτης για τον συγκεκριμένο τύπο καρκίνου, καθώς παρουσιάζει αξιολογώμενη κλινική, παθολογική και μοριακή ομοιότητα με εκείνη του ανθρώπου.

Στη γάτα οι όγκοι στο μαστό συνήθως είναι κακοήθεις με δυσμενή πρόγνωση, οι οποίοι συνδέονται με τοπική υποτροπή και μετάσταση. Συνηθέστερα είναι τα καρκινώματα εκείνα τα οποία εμφανίζουν μεγαλύτερη ομοιότητα με τα αντίστοιχα στον άνθρωπο. Ως προγνωστικός συγκριτικός δείκτης αποτελεί το 1 έτος επιβίωσης / ύφεση μετά το χειρουργείο με τα αντίστοιχα 10 χρόνια για τον

άνθρωπο (MacEwen et al. 1984). Συχνές είναι και οι μεταστάσεις που έχουν έως τώρα αναφερθεί (50-90%), και κυρίως αφορούν τους επιχώριους λεμφαδένες (83%), τους πνεύμονες (83%), το ήπαρ (25%) και τις πλευρές (22%). Η διάρκεια επιβίωσης μετά τη διάγνωση υπολογίζεται στους 12 μήνες χωρίς θεραπευτική αγωγή (Zappulli et al. 2015). Από τους καλοήθεις όγκους κοινοί σε νεαρές γάτες και γυναίκες είναι οι καλοήθεις ινοαδενωματώδης όγκοι, με τη γάτα να αποτελεί μοντέλο μελέτης αυτών. (Torrighiani F et al.2022). Μια από τις μεγαλύτερες δυσκολίες στη μελέτη του καρκίνου του μαστού στη γάτα είναι το υψηλό ποσοστό ζώων τα οποία εμφανίζουν συγχρόνως μάζες σε διάφορους μαστικούς αδένες συνήθως στον ίδιο στοίχο την στιγμή της διάγνωσης, με αποτέλεσμα να δυσχεραίνεται η μελέτη και η παρακολούθηση της πορείας της νόσου. Στον άνθρωπο ο αμφοτερόπλευρος καρκίνος του μαστού δεν είναι συνηθισμένος , καθώς και η συνύπαρξη διαφορετικών τύπων καρκίνου (Saad RS, et al.2008).

Με δεδομένο ότι στο σκύλο, στη γάτα και στον άνθρωπο, η ογκογένεση είναι μια πολύπλοκη διαδικασία με κοινά χαρακτηριστικά όπως αυτά έχουν διατυπωθεί από τους Douglas Hanahan και Robert A. Weinberg, 2011, γίνεται αναφορά στους κοινούς εκείνους βιοδείκτες μεταξύ των τριών ειδών, οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την μοριακή ταξινόμηση του καρκίνου του μαστού. Η μεταγραφική ανάλυση των νεοπλασματικών ιστών του σκύλου απέδειξε κοινά μονοπάτια με εκείνα στον καρκίνο του μαστικού αδένου του ανθρώπου και αφορούν τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, την αποπτωτική σηματοδότηση, τις ανοσολογικές λειτουργίες, την αγγειογένεση και τη μετανάστευση κυττάρων (Graim K et al.2020).

Με τη ταξινόμηση σε αυλικού τύπου, βασικού τύπου, τριπλά αρνητικού και εκείνων με υπερέκφραση της πρωτεΐνης HER-2, δίνεται η δυνατότητα να προκύψουν κοινά συμπεράσματα για τη γενετική συμπεριφορά της νόσου. Έτσι με την αξιολόγηση ενός βιοδείκτη για έναν τύπο καρκίνου στα ζώα, υπάρχει συσχέτιση με τον αντίστοιχο τύπο στον άνθρωπο. Η κλινικοπαθολογική μελέτη των διαφορετικών υποτύπων απέδειξε σημαντικές ομοιότητες με τον καρκίνο του μαστού στη γυναίκα, ειδικά σε ότι αφορά τους όγκους που ανήκουν στην κατηγορία, αυλικό B/ HER2- αρνητικό, Αυλικό B HER2-θετικό και τριπλά αρνητικό βασικού τύπου(ER-, PR- and HER2/neu-). Επομένως η γάτα είναι το ιδανικό φυσικό μοντέλο μελέτης του καρκίνου του μαστού που ανήκουν στους παραπάνω υπότυπους. Παρόλα αυτά η μελέτη της ετερογένειας του καρκίνου των μαστικών αδένων στη γάτα απαιτεί περισσότερες έρευνες με σκοπό τη καλύτερη διαχείριση της νόσου και τη κατανόηση της συμπεριφοράς του όγκου (Maria Soares, et al.2016). Οι διαφοροποιήσεις στους υποδοχείς των ER ,PR έχουν σημαντική επίδραση στην ενδοκρινική θεραπεία καθώς επιλεκτικοί ρυθμιστές των

υποδοχέων ER μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη θεραπεία του καρκίνου του μαστού του σκύλου, ειδικά σε στρατηγικές χημειοπρόληψης. Στον σκύλο και στη γάτα η απουσία των παραπάνω υποδοχέων υποδηλώνει κακή πρόγνωση, μικρό ποσοστό επιβίωσης και αυξημένη πιθανότητα μεταστάσεων. Για πρώτη φορά στην ιατρική και την κτηνιατρική επιστήμη η προγνωστική αξία της τιμής των GH και IGF-I στον καρκίνο του μαστού αποδείχτηκε, με αποτέλεσμα να ανοιχθούν νέοι δρόμοι στο σχετικό ερευνητικό πεδίο.

Συνήθως οι ερευνητές προχωρούν σε έρευνες στα ζώα με οδηγό αυτές που έχουν ήδη γίνει σε ανθρώπινους νεοπλασματικούς ιστούς. Εξάιρεση αποτελούν οι έρευνες που αφορούν το Cox-2 στον φλεγμονώδη καρκίνο του μαστού στον σκύλο (Queiroga FL et al.2005) καθώς και η προγνωστική αξία των GH/IGF-I. (Queiroga FL et al.2008).

Οι γενετικές έρευνες είναι απαραίτητες και έχουν βαθμιαία αυξηθεί τα τελευταία χρόνια. Η μελέτη συγκεκριμένων παραλλαγών σε γονίδια τα οποία είναι ήδη γνωστό ότι εμπλέκονται στη καρκινογένεση του μαστικού αδένου, συμβάλλει αδιαμφισβήτητα στην ευρεία κατανόηση αυτής της πολύπλοκης ασθένειας. Η εποχή μας όντας η εποχή των -omics όπου το κάθε νόσημα διερευνάται με βάση το γενετικό μεταβολικό, πρωτεϊνικό, και μεταφραστικό του προφίλ, θέτει τις βάσεις προς την εξατομικευμένη διαχείριση και θεραπεία των γενετικών νοσημάτων, συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου (Jing Zhang et al). Τελικός σκοπός των γενετικών αυτών ερευνών είναι ο καθορισμός ενδεχόμενων στόχων για εξατομικευμένες θεραπευτικές προσεγγίσεις στον καρκίνο του μαστού του ανθρώπου και των μαστικών αδένων του σκύλου και της γάτας, ερχόμενοι σε πλήρη συμφωνία με τις σύγχρονες, αναδυόμενες τάσεις, τις ονομαζόμενες “theranostics” (Blomme and Spear et al.2010) θεραπευτική διαγνωστική (μετάφραση από το καταστατικό της European society of pharmacogenomics and theranostics, 2022). Η φαρμακοκινητική των σκευασμάτων που χρησιμοποιούνται για τον καρκίνο του μαστού είναι πιο κοντά στα μεγάλα από ότι στα μικρού μεγέθους ζώα. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να ελεγχθεί πιο αξιόπιστα η τοξικότητα και η θεραπευτική αξία ενός σκευάσματος. Πανεπιστημιακά ιδρύματα , κτηνιατρικές ογκολογικές κλινικές δίνουν πληροφορίες μέσω του διαδικτύου για ανοιχτή πρόσκληση συμμετοχής των κατοικίδιων σε θεραπευτικά σχήματα που βρίσκονται σε προκλινικό στάδιο μελέτης.

Η χρήση των κατοικίδιων ζώων στην μελέτη του καρκίνου του μαστού βρίσκεται σε “εμβρυικό” στάδιο δεδομένου ότι οι δυσκολίες που συναντά στην εφαρμογή της δεν είναι ήσσονος σημασίας. Η διεπιστημονική συνεργασία και ο συντονισμός επιστημονικών κέντρων και κτηνιατρικών κλινικών

που είναι απαραίτητα για τη διεξαγωγή των κλινικών δοκιμών, πολλές φορές δεν είναι εύκολο να επιτευχθούν. Η απόσταση μεταξύ των νοσοκομειακών εγκαταστάσεων, των γενετικών εργαστηρίων και η απουσία εμπειρίας του συντονισμού ανάλογων συνεργασιών λειτουργεί ως τροχοπέδη. Τα πρωτόκολλα διεξαγωγής της έρευνας είναι καινοτόμα και πρέπει να σχεδιαστούν από την αρχή, με κίνδυνο να μην είναι πλήρη και αξιόπιστα. Επίσης το υψηλό κόστος φροντίδας των κτηνιατρικών ασθενών εμποδίζει την επαρκή θεραπεία τέτοιων ζώων, εξαιτίας έλλειψης δημόσιων πόρων/προγραμμάτων για τέτοιου είδους ιατρική περίθαλψη. Οι κτηνιατρικές κλινικές οι οποίες έχουν την υποδομή και επανδρώνονται από το εξειδικευμένο προσωπικό για να υποστηρίξουν τέτοιου είδους θεραπείες, είναι πολύ λίγες και δραστηριοποιούνται σε ελάχιστα κράτη που διαθέτουν υψηλό βιοτικό επίπεδο. Είναι προφανής και αναγκαία συνθήκη, η συμμετοχή οποιουδήποτε ζώου σε ερευνητικό πρόγραμμα να συνοδεύεται από έγκριση πιστοποίησης για την τήρηση των κανόνων περί ηθικής και δεοντολογίας διαχείρισης των ζώων. Το γεγονός αυτό, αν και απαραίτητο, απαιτεί χρόνο ο οποίος πολλές φορές είναι ζωτικής σημασίας για τη ζωή του κτηνιατρικού ασθενούς και την επιτυχή έκβαση της μελέτης.

Ένας επίσης σημαντικός ανασταλτικός παράγοντας είναι η ελλιπής ενημέρωση και κατανόηση τόσο των κτηνιάτρων όσο και των ιδιοκτητών, για τις δυνατότητες πιθανής αύξησης του χρόνου επιβίωσης του κατοικίδιου τους. Υπάρχει η πεποίθηση στο κοινωνικό σύνολο, ότι οι ερευνητές λειτουργούν με βάση το ανθρώπινο όφελος χωρίς να σχεδιάζουν ανακουφιστικά πρωτόκολλα για τους κτηνιατρικούς ασθενείς. Το αποτέλεσμα πολλές φορές είναι να επιλέγεται από τους ιδιοκτήτες η ευθανασία ως η καλύτερη επιλογή (Gray M, et al., 2020).

Εν κατακλείδι, έχει υποστηριχθεί ότι η συμμετοχή της γάτας και του σκύλου με αυθόρμητα εμφανιζόμενους καρκίνους σε πειραματικές προκλινικές μελέτες θα ωφελήσει τόσο τα ζώα όσο και τους ανθρώπους (παθολογική ανακούφιση για το ζώο και εξαιρετικά μεταφραστικά δεδομένα για την πρόοδο της κλινικής μελέτης για τον άνθρωπο) (Onaciu A et al.2020). Σταδιακά, η επιλογή των φυσικών μοντέλων γίνεται αποδεκτή από την επιστημονική κοινότητα, το οποίο αποδεικνύεται μεταξύ άλλων και από το γεγονός ότι ένα ολόκληρο τεύχος του περιοδικού " Human Genetics" (vol. 128, issue May 2019) ήταν αφιερωμένο στη γενετική του σκύλου. Επίσης πολλά ερευνητικά προγράμματα με αντικείμενο τη μελέτη του καρκίνου του μαστού στα ζώα χρηματοδοτούνται από διεθνείς οργανισμούς όπως το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας στις Ηνωμένες Πολιτείες και το COST B20 το οποίο χρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Ένωση. European Cooperation in Science and Technology.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Acland GM, Aguirre GD, Bennett J, Aleman TS, Cideciyan AV, Bennicelli J, Dejneka NS, Pearce-Kelling SE, Maguire AM, Palczewski K, Hauswirth WW, Jacobson SG. Long-term restoration of rod and cone vision by single dose rAAV-mediated gene transfer to the retina in a canine model of childhood blindness. *Mol Ther*. 2005 Dec;12(6):1072-82
 - Acland GM, Aguirre GD, Ray J, Zhang Q, Aleman TS, Cideciyan AV, Pearce-Kelling SE, Anand V, Zeng Y, Maguire AM, Jacobson SG, Hauswirth WW, Bennett J. Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet*. 2001 May;28(1):92-5
 - Akkoc A, Inan S, Sonmez G. Matrix metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and steroid receptor expressions in feline mammary tumors. *Biotech Histochem*. 2012 May;87(4):312-9. doi: 10.3109/10520295.2011.652173
 - Alonso-Diez Á, Cáceres S, Peña L, Crespo B, Illera JC. Anti-Angiogenic Treatments Interact with Steroid Secretion in Inflammatory Breast Cancer Triple Negative Cell Lines. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 21;13(15):3668. doi: 10.3390/cancers13153668
 - Amoasii L, Hildyard JCW, Li H, Sanchez-Ortiz E, Mireault A, Caballero D, Harron R, Stathopoulou TR, Massey C, Shelton JM, Bassel-Duby R, Piercy RJ, Olson EN. Gene editing restores dystrophin expression in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. *Science*, 2018 Oct 5;362(6410):86-91
 - Andrade, F.H., Figueiroa, F.C., Bersano, P.R. et al. Malignant mammary tumor in female dogs: environmental contaminants. *Diagn Pathol* 5, 45 (2010)
 - Ashish R. Pinnapureddy, Cherie Stayner¹ Large animal models of rare genetic disorders: sheep as phenotypically relevant models of human genetic disease, *Orphanet Journal of Rare Diseases* (2015) 10:107
 - Barbara Gandolfi and Hasan Alhaddad Genetic and genomic strategies over three decades, *Journal of Feline Medicine and Surgery* (2015) 17, 405–415
 - Barbara Gandolfi and Hasan Alhaddad INVESTIGATION OF INHERITED DISEASES IN CATS Genetic and genomic strategies over three decades *Journal of Feline Medicine and Surgery* (2015) 17, 405–415 Canine and Feline Models of Human Genetic Diseases and Their Contributions to Advancing Clinical Therapies Brittney L. Gurda, Allison M. Bradbury, and Charles H. Vite*
- Department of Clinical Studies, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 2017
Brittney L. Gurda, Allison M. Bradbury, and Charles H. Vite Canine and Feline Models of Human Genetic Diseases and Their Contributions to Advancing Clinical Therapies *
Department of Clinical Studies, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 2017
- Beltrán Hernández I, Kromhout JZ, Teske E, Hennink WE, van Nimwegen SA, Oliveira S. Molecular targets for anticancer therapies in companion animals and humans: what can we learn from each other? *Theranostics*. 2021 Feb 6;11(8):3882-3897. doi: 10.7150/thno.55760. PMID: 33664868; PMCID: PMC7914358.

- Beveridge, W. I. & Sobin, L. H. (1974). [International histological classification of tumors of domestic animals. Introduction]. *Bulletin of the World Health Organization*, 50 (1-2)
- Biswas SK, Banerjee S, Baker GW, Kuo CY, Chowdhury I. The Mammary Gland: Basic Structure and Molecular Signaling during Development. *Int J Mol Sci*. 2022 Mar 31;23(7):3883. doi: 10.3390/ijms23073883. PMID: 35409243; PMCID: PMC8998991.
- Borge, K. S., Børresen-Dale, A. L., & Lingaas, F. (2011). Identification of genetic variation in 11 candidate genes of canine mammary tumour. *Veterinary and Comparative Oncology*, 9(4), 241–250. doi:10.1111/j.1476-5829.2010.00250.
- Burrai, G.P., Mohammed, S.I., Miller, M.A. *et al.* Spontaneous feline mammary intraepithelial lesions as a model for human estrogen receptor- and progesterone receptor-negative breast lesions. *BMC Cancer* 10, 156 (2010). <https://doi.org/10.1186/1471-2407-10-156>
- Campos LC, Silva JO, Santos FS, Araújo MR, Lavalle GE, Ferreira E and Cassali GD: Prognostic significance of tissue and serum HER2 and MUC1 in canine mammary cancer. *J Vet Diagn Invest* 27: 531-535, 2015
- Canadas A, Santos M, Nogueira A, Assis J, Gomes M, Lemos C, Medeiros R, Dias-Pereira P. Canine mammary tumor risk is associated with polymorphisms in RAD51 and STK11 genes. *J Vet Diagn Invest*. 2018 Sep;30(5):733-738. doi: 10.1177/1040638718789231.
- Carmichael AR, Bates T. Obesity and breast cancer: a review of the literature. *Breast*. 2004 Apr;13(2):85-92.
- Cehajic Kapetanovic J, McClements ME, Martinez-Fernandez de la Camara C, MacLaren RE. Molecular Strategies for RPGR Gene Therapy. *Genes (Basel)*. 2019 Sep 4;10(9):674
- Chang SC, Chang CC, Chang TJ, Wong ML. Prognostic factors associated with survival two years after surgery in dogs with malignant mammary tumors: 79 cases (1998-2002). *J Am Vet Med Assoc*. 2005; 227(10):1625-162
- Cheon D.-J., Orsulic S. Mouse Models of Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*. 2011;6:95–119. doi: 10.1146/annurev.pathol.3.121806.154244
- Chesler E.J., Wilson S.G., Lariviere W.R., Rodriguez-Zas S.L., Mogil J.S. Influences of laboratory environment on behavior. *Nat. Neurosci*. 2002;5:1101–1102. doi: 10.1038/nn1102-1101
- Davies AA, Masson JY, McIlwraith MJ, Stasiak AZ, Stasiak A, Venkitaraman AR, West SC. Role of BRCA2 in control of the RAD51 recombination and DNA repair protein. *Mol Cell*. 2001 Feb;7(2):273-82. doi: 10.1016/s1097-2765(01)00175-7. PMID: 11239456.
- Dawson SJ, Makretsov N, Blows FM, BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. *Br J Cancer*. 2010 Aug 24;103(5):668-75. doi: 10.1038/sj.bjc.6605736. Epub 2010 Jul 27. Erratum in: *Br J Cancer*. 2010 Sep 28;103(7):1137. PMID: 20664598; PMCID: PMC2938244.

- Diagnostic cytology and histopathology of canine mammary gland tumors Andreas Beineke Department of Pathology, University of Veterinary Medicine Hanover, EVSSAR course 2022.)
- Dolka I, Król M, Sapieryński R. Evaluation of apoptosis-associated protein (Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3 and p53) expression in canine mammary tumors: An immunohistochemical and prognostic study. *Res Vet Sci.* 2016 Apr;105:124-33. doi: 10.1016/j.rvsc.2016.02.004.
- Dow S. A Role for Dogs in Advancing Cancer Immunotherapy Research. *Front Immunol.* 2020 Jan 17; 10:2935. doi: 10.3389/fimmu.2019.02935. PMID: 32010120; PMCID: PMC6979257.
- Dutra AP, Granja NV, Schmitt FC, c-erbB-2 expression and nuclear pleomorphism in canine mammary tumors. *Braz J Med Biol Res.* 2004 Nov;37(11):1673-81.
- Easton, D., Pooley, K., Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature* 447, 1087–1093 (2007). <https://doi.org/10.1038/nature05887>
- Egenvall A, Bonnett BN, Häggström J, Ström Holst B, Möller L, Nødtvedt A. Morbidity of insured Swedish cats during 1999-2006 by age, breed, sex, and diagnosis. *J Feline Med Surg.* 2010;12(12): 948-959
- Egenvall A, Bonnett BN, Ohagen P, Olson P, Hedhammar A, von Euler H. Incidence of and survival after mammary tumors in a population of over 80,000 insured female dogs in Sweden from 1995 to 2002. *Prev Vet Med.* 2005 Jun 10;69(1-2):109-27. doi: 10.1016/j.prevetmed.2005.01.014. Epub 2005 Feb 23. PMID: 15899300.
- Egenvall, A.; Nødtvedt, A.; Haggstrom, J.; Ström Holst, B.; Möller, L.; Bonnett, B.N. Mortality of life-insured Swedish cats during 1999–2006: Age, breed, sex, and diagnosis. *J. Vet. Intern. Med.* 2009, 23, 1175–1183
- F.W. Nicholas Introduction to Veterinary genetics 3rd edition, 2010
- Fahlén M, Fornander T, Johansson H, Johansson U, Rutqvist LE, Wilking N, von Schoultz E. Hormone replacement therapy after breast cancer: 10 year follow up of the Stockholm randomised trial. *Eur J Cancer.* 2013 Jan;49(1):52-9.
- Fazekas J, Fördös I, Singer J, Jensen-Jarolim E. Why man's best friend, the dog, could also benefit from an anti-HER-2 vaccine. *Oncol Lett.* 2016 Oct;12(4):2271-2276.
- Finocchiaro LME, Spector AIM, Agnetti L, Arbe MF, Glikin GC. Combination of suicide and cytokine gene therapies as surgery adjuvant for canine mammary carcinoma. *Vet Sci.* (2018) 5:70)
- Gabai V, Venanzi FM, Bagashova E, Rud O, Mariotti F, Vullo C, et al. Pilot study of p62, DNA vaccine in dogs with mammary tumors. *Oncotarget.* (2014) 5:12803–10
- Gama A, Alves A, Gartner F, Schmitt F. p63: a novel myoepithelial cell marker in canine mammary tissues. *Vet Pathol.* 2003 Jul;40(4):412-20. doi: 10.1354/vp.40-4-412. PMID: 12824513.

- Gandolfi B, Alhaddad H, Affolter VK, et al. To the root of the curl: a signature of a recent selective sweep identifies a mutation that defines the Cornish Rex cat breed. *PLoS One* 2013; 8: e67105. 1
- Ghoncheh M, Pournamdar Z and Salehiniya H: Incidence and mortality and epidemiology of breast cancer in the world. *Asian Pac J Cancer Prev* 17: 43-46, 2016
- Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, Edelstein M, Abedi MR. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med.* 2018 May;20(5):e3015
- Goutsouliak K, Veeraraghavan J, Sethunath V, De Angelis C, Osborne CK, Rimawi MF, et al. Towards personalized treatment for early stage HER2-positive breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* (2020) 17:233–50.)
- Graim K, Gorenshiteyn D, Robinson DG, Carriero NJ, Cahill JA, Chakrabarti R, et al. Modeling Molecular Development of Breast Cancer in Canine Mammary Tumors. *Genome Res* (2020) 31(2):337–47. doi: 10.1101/gr.256388.119
- Gray M, Meehan J, Martínez-Pérez C, Kay C, Turnbull AK, Morrison LR, Pang LY and Argyle D (2020) Naturally- Occurring Canine Mammary Tumors as a Translational Model for Human Breast Cancer. *Front. Oncol.* 10:617
- Gucalp A, Traina TA, Eisner JR, Parker JS, Selitsky SR, Park BH, Elias AD, Baskin-Bey ES, Cardoso F. Male breast cancer: a disease distinct from female breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2019 Jan;173(1):37-48
- Hahn K, Richardson R, Acvim D, Knapp D. Canine malignant mammary neoplasia: biological behavior, diagnosis, and treatment alternatives. *J Am Anim Hosp Assoc.* (1992) 28:251. (56–58)
- Hakim CH, Kumar SRP, Perez-Lopez DO, Wasala NB, Zhang D, et al. Cas9-specific immune responses compromise local and systemic AAV CRISPR therapy in multiple dystrophic canine models. *Nat Commun.* 2021;12:6769. [DOI: 10.1038/s41467-021-26830-7
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* 2011 Mar 4;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013. PMID: 21376230
- Hayes AA, Mooney S. Feline mammary tumors. *Vet Clin North Am Small Anim. Pract.* 1985 May;15(3):513-20. doi: 10.1016/s0195-5616(85)50054-6. PMID: 3874468
- Hayes HM Jr, Milne KL, Mandell CP. Epidemiological features of feline mammary carcinoma. *Vet Rec.* 1981 May 30;108(22):476-9.
- Hayward, J. J. et al. Complex disease and phenotype mapping in the domestic dog.2016 *Nat. Commun.* 7:10460
- Heem Wong C, Wei Siah K, Lo AW. Estimation of clinical trial success rates and related parameters. *Biostatistics.* 2019; 20: 273-286
- Holen I, Speirs V, Morrissey B and Blyth K): In vivo models in breast cancer research: Progress, challenges and future directions. *Dis Model Mech* 10: 359-371, 2017

- Horwitz KB, Sartorius CA. 90 YEARS OF PROGESTERONE: Progesterone and progesterone receptors in breast cancer: past, present, future. *J Mol Endocrinol.* (2020) 65: T49–63
- Howlader N, Noone A, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, et al. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Cancer Statistics Review, 1975-2017. Bethesda, MD: National Cancer Institute (2020).
- Im KS, Kim IH, Kim NH, Lim HY, Kim JH, Sur JH. Breed-related differences in altered BRCA1 expression, phenotype and subtype in malignant canine mammary tumors. *Vet J.* 2013 Mar;195(3):366-72.
- Im KS, Kim NH, Lim HY, Kim HW, Shin JI, Sur JH. Analysis of a new histological and molecular-based classification of canine mammary neoplasia. *Vet Pathol.* 2014 May;51(3):549-59. doi: 10.1177/0300985813498780. Epub 2013 Sep 3. PMID: 24003019
- Ito T, Kadosawa T, Mochizuki M, Matsunaga S, Nishimura R, Sasaki N. Prognosis of malignant mammary tumor in 53 cats. *J Vet Med Sci.* 1996;58(8):723-726)
- Jing Zhang^{1,2,3}, Xiaoyue Sun^{1,2,3} and Chunwei Cao¹ Recent advances in genetically modified large-animal models of human diseases, *BIOI* 2022, Vol 3, No. 4, 161–171 161 <https://bio-integration.org> doi: 10.15212/bioi-2022-0018
- J.S. Boyd Κλινική ανατομική σκύλου και γάτας 2nd Edition, (207-208)
- Karen S Johnson, MD, Emily F Conant, MD, Mary Scott Soo, MD, Molecular Subtypes of Breast Cancer: A Review for Breast Radiologists, *Journal of Breast Imaging*, Volume 3, Issue 1, January/February 2021, Pages 12–24, <https://doi.org/10.1093/jbi/wbaa110>
- Kerstin Lindblad-Toh What animals can teach us about evolution, the human genome, and human disease. *Upsala Journal of Medical Sciences* 2020, vol.125, No. 1, 1–9
- Kerstin Lindblad-Toh What animals can teach us about evolution, the human genome, and human disease, *Upsala Journal of Medical Sciences* 2020, vol.125, No. 1, 1–9
- Kerstin Lindblad-Toh¹, Claire M Wade Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog Vol 438|8 December 2005
- Key TJ, Appleby PN, Reeves Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, GK, Travis RC, Alberg AJ, Barricarte A, Berrino F, Krogh V, Sieri S, Brinton LA, Dorgan JF, Dossus L, Dowsett M, Eliassen AH, Fortner RT, Hankinson SE, Helzlsouer KJ, Hoff man-Bolton J, Comstock GW, Kaaks R, Kahle LL, Muti P, Overvad K, Peeters PH, Riboli E, Rinaldi S, Rollison DE, Stanczyk FZ, Trichopoulos D, Tworoger SS, Vineis P. Sex hormones and risk of breast cancer in premenopausal women: a collaborative reanalysis of individual participant data from seven prospective studies. *Lancet Oncol.* 2013 Sep;14(10):1009-19
- Kim G, Pastoriza JM, Condeelis JS, Sparano JA, Filippou PS, Karagiannis GS and Oktay MH (2020) The Contribution of Race to Breast Tumor Microenvironment Composition and Disease Progression. *Front. Oncol.* 10:1022.
- Kim NH, Lim HY, Im KS, Kim JH and Sur JH: Identification of Triple-negative and Basal-like canine mammary carcinomas using four basal markers. *J Comp Pathol* 148: 298-306, 2013

- Klopffleisch R, Lenze D, Hummel M, Gruber AD. Metastatic Canine Mammary Carcinomas can be Identified by a Gene Expression Profile That Partly Overlaps With Human Breast Cancer Profiles. *BMC Cancer* (2010) 10:618. doi: 10.1186/1471-2407-10-618
- Komáromy AM, Alexander JJ, Rowlan JS, Garcia MM, Chiodo VA, Kaya A, Tanaka JC, Acland GM, Hauswirth WW, Aguirre GD. Gene therapy rescues cone function in congenital achromatopsia. *Hum Mol Genet.* 2010 Jul 1;19(13):2581-93
- Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer.* 2009 Dec;9(12):874-85. doi: 10.1038/nrc2761. PMID: 19935676; PMCID: PMC2951677
- Lanari C, Wargon V, Rojas P, Molinolo AA. Antiprogestins in breast cancer treatment: are we ready? *Endocr. Relat. Cancer.* (2012) 19:R35–50. doi: 10.1530/ERC-11-0378)
- Lagos-Jaramillo VI, Press MF, Ricker CN, Dubeau L, Mai PL, Weitzel JN. Pathological characteristics of BRCA-associated breast cancers in Hispanics. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Nov;130(1):281-9. doi: 10.1007/s10549-011-1570-7
- Leroy G, Verrier E, Meriaux JC, Rognon X. Genetic diversity of dog breeds: within-breed diversity comparing genealogical and molecular data. *Anim Genet.* 2009 Jun;40(3):323-32
- Lim HY, Im KS, Kim NH, Kim HW, Shin JI, Yhee JY, Sur JH. Effects of Obesity and Obesity-Related Molecules on Canine Mammary Gland Tumors. *Vet Pathol.* 2015 Nov;52(6):1045-51
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature.* 2005;438: 803–19
- London C, Mathie T, Stingle N, Clifford C, Haney S, Klein MK, et al. Preliminary evidence for biologic activity of toceranib phosphate (Palladia(R)) in solid tumours. *Vet Comp Oncol.* (2012) 10:194–20
- Lyons LA. The Feline Genome and Clinical Implications. *The Cat.* 2012:1263–9. doi: 10.1016/B978-1-4377-0660-4.00043-0. Epub 2011 Dec 5. PMCID: PMC7152298
- Lysosomal Storage Diseases 2 Frances M. Platt1 , Alessandra d'Azzo2 , Beverly L. Davidson3,4, Elizabeth F. Neufeld5 3 and Cynthia J. Tiff, 2018
- Madewell BR, Gandour-Edwards R, Edwards BF, Walls JE, Griffey SM. Topographic distribution of bcl-2 protein in feline tissues in health and neoplasia. *Vet Pathol.* 1999 Nov;36(6):565-73. doi: 10.1354/vp.36-6-565. PMID: 10568437.
- Mak IWY, Evaniew N, Ghert M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res.* 2014; 6: 114-118
- Marc P. Hoepfner1, Andrew Lundquist2 An Improved Canine Genome and a Comprehensive Catalogue of Coding Genes and Non-Coding Transcripts *Plos One* 2014 | Vol. 9

- Marconato, L., Leo, C., Girelli, R., Salvi, S., Abramo, F., Bettini, G., Comazzi, S., Nardi, P., Albanese, F. and Zini, E. (2009), Association between Waste Management and Cancer in Companion Animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23: 564-569.
- Marjo K. Hytonen ^{a,b,c} and Hannes Lohi ^{a,b,c} a Canine models of human rare disorders Department of Veterinary Biosciences, University of Helsinki, Helsinki, Finland; c rare diseases 2016, Vol. 4, No. 1, O'Brien SJ, Menotti-Raymond M, Murphy WJ, Yuhki N. The Feline Genome Project. *Annu Rev Genet.* 2002;36: 657-86
- Masuda H, Zhang D, Bartholomeusz C, Doihara H, Hortobagyi GN, Ueno NT. Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Nov;136(2):331-45. doi: 10.1007/s10549-012-2289-9. Epub 2012 Oct 17. PMID: 23073759; PMCID: PMC3832208.
- Masoud V, Pagès G. Targeted therapies in breast cancer: new challenges to fight against resistance. *World J Clin Oncol.* (2017) 8:12
- Mehrgou A, Akouchekian M. The importance of BRCA1 and BRCA2 genes mutations in breast cancer development. *Med J Islam Repub Iran.* 2016 May 15;30:369. PMID: 27493913; PMCID: PMC4972064.
- Melin M, Rivera P, Arendt M, Elvers I, Murén E, Gustafson U, et al. (2016) Genome-Wide Analysis Identifies Germ-Line Risk Factors Associated with Canine Mammary Tumours. *PLoS Genet* 12(5): e1006029. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006029>
- Melissa C. Paoloni, DVM, Chand Khanna, DVM, PhD* Comparative Oncology Today Comparative Oncology Program, National Cancer Institute, National Institutes of Health, 37 Convent Drive, Room 2144, Bethesda, MD 20892, USA *Vet Clin Small Anim* 37 (2007) 1023–1032
- Melissa Paoloni and Chand Khanna Translation of new cancer treatments from pet dogs to humans 2008 Nature Publishing Group
- Mohammed SI, Utturkar S, Lee M, Yang HH, Cui Z, Atallah Lanman N, et al. Ductal Carcinoma In Situ Progression in Dog Model of Breast Cancer. *Cancers* (2020) 12(2):418. doi: 10.3390/cancers12020418
- Mondal P, Bailey KL, Cartwright SB, Band V, Carlson MA. Large Animal Models of Breast Cancer. *Front Oncol.* 2022 Feb 4; 12:788038
- Montgomery Slatkin Linkage disequilibrium — understanding the evolutionary past and mapping the medical future *Nature* volume 9 | June 2008 | 477
- Morris J. Mammary Tumors in the Cat: Size matters, so early intervention saves lives. *Journal of Feline Medicine and Surgery.* 2013;15(5):391-400

- Murray J, Gruffydd-Jones T, Roberts M, Browne W. Assessing changes in the UK pet cat and dog populations: numbers and household ownership. *Vet Record*. (2015) 2015:103223. doi: 10.1136/vr.103223
- Nakagawa T, Uyama R, Ohashi E, Takahashi T, Hong SH, Mochizuki M, Matsunaga S, Nishimura R, Sasaki N. The expression of sialyl Lewis X in canine and feline mammary gland tumors. *J Vet Med Sci*. 2002 Oct;64(10):949-52. doi:10.1292/jvms.64.949.
- Nascimento C, Gameiro A, Ferreira J, Correia J, Ferreira F. Diagnostic Value of VEGF-A, VEGFR-1 and VEGFR-2 in Feline Mammary Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021 Jan 1;13(1):117. doi: 10.3390/cancers13010117. PMID: 33401382; PMCID: PMC7795286.
- Nunes, G.; Filgueira, F.; de Paula, V.; Reis, P.; Filgueira, K., Mammary neoplasias in domestic female cats: possible influence of the diet on the etiology. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal* 2011, 05 (02), 30 – 37.
- Okada S, Furuya M, Takenaka S, Fukui A, Matsubayashi M, Tani H, Sasai K. Localization of heat shock protein 110 in canine mammary gland tumors. *Vet Immunol Immunopathol*. 2015 Oct 15;167(3-4):139-46. doi: 10.1016/j.vetimm.2015.07.012
- Onaciu A, Munteanu R, Munteanu VC, Gulei D, Raduly L, Feder RI, Pirlog R, Atanasov AG, Korban SS, Irimie A, Berindan-Neagoe I. Spontaneous and Induced Animal Models for Cancer Research. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Aug 31;10(9):660. doi: 10.3390/diagnostics10090660
- Owen LN. *TNM Classification of Tumors in Domestic Animals*, 1st ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1980: 1–53
- Pang LY, Argyle DJ. Using naturally occurring tumors in dogs and cats to study telomerase and cancer stem cell biology. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Apr;1792(4):380-91
- *Pathways to Pregnancy and Parturition*, 3rd Edition Phillip L. Senger, Author, 2012
- Perou CM, Sørli T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000;406(6797):747–752. American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. New York, NY: Springer, 2017:589–628
- Peter J. Russell, i *Genetics Μια Μενδελικὴ Προσέγγιση* 1st edition, p.1143-1180, 1152-1153, 982
- Pinho SS, Matos AJ, Lopes C, Marcos NT, Carvalheira J, Reis CA, Gärtner F. Sialyl Lewis x expression in canine malignant mammary tumours: correlation with clinicopathological features and E-Cadherin expression. *BMC Cancer*. 2007 Jul 6;7:124. doi: 10.1186/1471-2407-7-124.
- Poirier VJ, Hershey AE, Burgess KE, Phillips B, Turek MM, Forrest LJ, et al. Efficacy and toxicity of paclitaxel (Taxol) for the treatment of canine malignant tumors. *J Vet Intern Med*. (2004) 18:219–22
- *Prognostic Evaluation of Feline Mammary Carcinomas: A Review of the Literature*V. Zappulli (2015).

- Queiroga FL, Perez-Alenza MD, Silvan G, Pena L, Lopes C and Illera JC: Cox-2 levels in canine mammary tumors, including inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological features and prognostic significance. *Anticancer Res* 25: 4269-4275, 2005
- Queiroga FL, Perez-Alenza MD, Silvan G, Pena L, Lopes CS and Illera JC: Crosstalk between GH/IGF-I axis and steroid hormones (progesterone, 17beta-estradiol) in canine mammary tumors. *J Steroid Biochem Mol Biol* 110: 76-82, 2008).
- Queiroga FL, Raposo T, Carvalho MI, Prada J, Pires I. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. *In Vivo*. 2011 May-Jun;25(3):455-65.
- Raposo TP, Arias-Pulido H, Chaheer N, Fiering SN, Argyle DJ, Prada J, Pires I, Queiroga FL. Comparative aspects of canine and human inflammatory breast cancer. *Semin Oncol*. 2017 Aug;44(4):288-300. doi: 10.1053/j.seminoncol.2017.10.012. Epub 2018 Jan 19. PMID: 29526258.
- Ressel L, Millanta F, Caleri E, Innocenti VM, Poli A. Reduced PTEN Protein Expression and Its Prognostic Implications in Canine and Feline Mammary Tumors. *Veterinary Pathology*. 2009;46(5):860-868. doi:10.1354/vp.08-VP-0273-P-FL
- Rivera P, Melin M, Biagi T, Fall T, Häggström J, Lindblad-Toh K, von Euler H. Mammary tumor development in dogs is associated with BRCA1 and BRCA2. *Cancer Res*. 2009 Nov 15;69(22):8770-4. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1725. Epub 2009 Nov 3. PMID: 19887619.
- Robert W. Leader *Comparative Pathology*. Science. 31 Oct 1969. Vol 166, Issue 3905.p. 553
- Ros L, Holst BS, Hagman R. A retrospective study of bitches with pyometra, medically treated with aglepristone. *Theriogenology*. (2014) 82:1281–6
- Rossi F, Sabattini S, Vascellari M, Marconato L. The impact of toceranib, piroxicam and thalidomide with or without hypofractionated radiation therapy on clinical outcome in dogs with inflammatory mammary carcinoma. *Vet Comp Oncol*. (2018) 16:497–504
- Rubin R et al. Breast cancer in Rubin's pathology clinicopathologic foundations of medicine R.E. Editor 2011 p. 669-680
- Rungsipipat A, Tateyama S, Yamaguchi R, Uchida K, Miyoshi N, Hayashi T. Immunohistochemical analysis of c-yes and c-erbB-2 oncogene products and p53 tumor suppressor protein in canine mammary tumors. *J Vet Med Sci*. 1999 Jan;61(1):27-32. doi: 10.1292/jvms.61.27. PMID: 10027159.
- Saad RS, Denning KL, Finkelstein SD, Liu Y, Pereira TC, Lin X, Silverman JF. Diagnostic and prognostic utility of molecular markers in synchronous bilateral breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2008 Oct;21(10):1200-7. doi: 10.1038/modpathol.2008.35
- Sammarco A, Finesso G, Zanetti R, Ferro S, Rasotto R, Caliarì D, Goldschmidt MH, Orvieto E, Castagnaro M, Cavicchioli L, Zappulli V. Biphaseic Feline Mammary Carcinomas Including Carcinoma and Malignant Myoepithelioma. *Vet Pathol*. 2020 May;57(3):377-387. doi: 10.1177/0300985820908792. Epub 2020 Feb 26. PMID: 32100640.

- Salas Y, Márquez A, Diaz D, Romero L. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed During the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. *PloS One* (2015) 10(5):e0127381. doi: 10.1371/journal.pone.0127381
- Salas-Araujo Y.J., Márquez A., Diaz D., Romero L. Epidemiological Study of Mammary Tumors in Female Dogs Diagnosed during the Period 2002-2012: A Growing Animal Health Problem. *PLoS ONE*. 2015;10:e0127381. doi: 10.1371/journal.pone.0127381.
- Sánchez D, Romero L, López S, Campuzano M, Ortega R, Morales A, Guadarrama M, Cesarman-Maus G, García-Pérez O, Lizano M. ¹⁸F-FDG-PET/CT in Canine Mammary Gland Tumors. *Front Vet Sci*. 2019 Aug 27;6:280. doi: 10.3389/fvets.2019.00280. PMID: 31508434; PMCID: PMC6718568
- Santos-Carballal B, Fernández Fernández E, Goycoolea FM. Chitosan in non-viral gene delivery: role of structure, characterization methods, and insights in cancer and rare diseases therapies. *Polymers*. (2018) 10:444
- Santos AA, Lopes CC, Marques RM, Amorim IF, Gärtner MF, de Matos AJ. Matrix metalloproteinase-9 expression in mammary gland tumors in dogs and its relationship with prognostic factors and patient outcome. *Am J Vet Res*. 2012 May;73(5):689-97. doi: 10.2460/ajvr.73.5.689. PMID: 22533401
- Sayasith K, Sirois J, Doré M. Molecular characterization of feline COX-2 and expression in feline mammary carcinomas. *Vet Pathol*. 2009 May;46(3):423-9. doi: 10.1354/vp.08-VP-0161-D-FL. Epub 2009 Jan 27. PMID: 19176489
- Schneider R: Comparison of age, sex, and incidence rates in human and canine breast cancer. *Cancer* 26: 419-426, 1970. Mammary gland tumors in a male Cocker Spaniel, Soon-Chan Kwon 2017
- Sévère S, Marchand P, Guiffard I, Morio F, Venisseau A, Veyrand B, Le Bizec B, Antignac JP, Abadie J. Pollutants in pet dogs: a model for environmental links to breast cancer. *Springerplus*. 2015 Jan 22; 4:27.
- Shah FD Shukla SN, Shah PM, Shukla HK, Patel PS. Clinical significance of matrix metalloproteinase 2 and 9 in breast cancer. *Indian J Cancer*. 2009 Jul-Sep;46(3):194-202. doi: 10.4103/0019-509X.52953. PMID: 19574670.
- Shearin AL, Ostrander EA. Leading the way: canine models of genomics and disease. *Dis Model Mech*. 2010 Jan-Feb;3(1-2):27-34. doi: 10.1242/dmm.004358. PMID: 20075379; PMCID: PMC4068608.
- Skorupski KA, Overley B, Shofer FS, Goldschmidt MH, Miller CA, Sørenmo KU. Clinical characteristics of mammary carcinoma in male cats. *J Vet Intern Med*. 2005 Jan-Feb;19(1):52-5
- Soares M, Madeira S, Correia J, Peleteiro M, Cardoso F, Ferreira F. Molecular based subtyping of feline mammary carcinomas and clinicopathological characterization. *Breast*. 2016 Jun;27:44-51. doi: 10.1016/j.breast.2016.02.016.

- Soares M, Correia AN, Batista MR, Correia J, Ferreira F. *HER2, PR, ER, Ki-67 and Cytokeratin 5/6 Expression in Benign Feline Mammary Lesions*. *Animals (Basel)*. 2022 Jun 21;12(13):1599. doi: 10.3390/ani12131599.
- Söderlund Karin *The BRCA1/BRCA2/RAD51 complex is a prognostic and predictive factor in early breast cancer*. *Radiother Oncol* 84: 242-251, 2007. Sorenmo K. Canine mammary gland tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. (2003) 33:573–96.
- Stephen J. O'Brien,, Marilyn Menotti-Raymond,, William J. Murphy, and Naoya Yuhki *The Feline Genome Project Annual Review of Genetics* 2002 36:1, 657-686
- Stratmann N, Failing K, Richter A, Wehrend A. Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy. *Vet Surg*. (2008) 37:82–6
- Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, Shi W, Jiang J, Yao PP, Zhu HP. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*. 2017 Nov 1;13(11):1387-1397
- Switonski M. Impact of gene therapy for canine monogenic diseases on the progress of preclinical studies. *J Appl Genet*. 2020 May;61(2):179-186
- Torrigiani F, Moccia V, Brunetti B, Millanta F, Valdivia G, Peña L, Cavicchioli L, Zappulli V. Mammary Fibroadenoma in Cats: A Matter of Classification. *Vet Sci*. 2022 May 26;9(6):253. doi: 10.3390/vetsci9060253. PMID: 35737305; PMCID: PMC9231207
- Tratar U.L., Horvat S., Cemazar M. Transgenic Mouse Models in Cancer Research. *Front. Oncol*. 2018;8 doi: 10.3389/fonc.2018.00268.
- T Paz Boix-Montesinos a,1 , Paula M. Soriano-Terue he past, present, and future of breast cancer models for nanomedicine development *Advanced Drug Delivery Reviews* 173 (2021) 306–330
- Thompson and Thompson *Genetics in Medicine*, Eighth Edition 2016, p.2 Behjati S, Tarpey PS What is next generation sequencing *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice* 2013;98:236-238.
- Tonin, P., Weber, B., Offit, K. *et al*. Frequency of recurrent BRCA1 and BRCA2 mutations in Ashkenazi Jewish breast cancer families. *Nat Med* 2, 1179–1183 (1996). <https://doi.org/10.1038/nm1196-1179>
- Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer*. 2004 Oct;4(10):814-9.
- Uva P, Aurisicchio L, Watters J, Loboda A, Kulkarni A, Castle J, Palombo F, Viti V, Mesiti G, Zappulli V, Marconato L, Abramo F, Ciliberto G, Lahm A, La Monica N, de Rinaldis E. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics*. 2009 Mar 27;10:135. doi: 10.1186/1471-2164-10-135. PMID: 19327144; PMCID: PMC2670324.
- Uva, P., Aurisicchio, L., Watters, J. *et al*. Comparative expression pathway analysis of human and canine mammary tumors. *BMC Genomics* 10, 135 (2009). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-13>

- Vafaei, R., Samadi, M., Hosseinzadeh, A. *et al.* Comparison of mucin-1 in human breast cancer and canine mammary gland tumor: a review study. *Cancer Cell Int* **22**, 14 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02398-6>
- Van Meer P., Raber J. Mouse behavioural analysis in systems biology. *Biochem. J.* 2005;389:593–610. doi: 10.1042/BJ20042023.
- Van Steenbeek FG, Hytönen MK, Leegwater PA, Lohi H. The canine era: the rise of a biomedical model. *Anim Genet.* 2016 Oct;47(5):519-27. doi: 10.1111/age.12460. Epub 2016 Jun 21. PMID: 27324307.
- Varallo GR, Gelaleti GB, Maschio-Signorini LB, Moschetta MG, Lopes JR, De Nardi AB, Tinucci-Costa M, Rocha RM, De Campos Zuccari DAP. Prognostic phenotypic classification for canine mammary tumors. *Oncol Lett.* 2019 Dec;18(6):6545-6553. doi: 10.3892/ol.2019.
- Veldhoen N, Watterson J, Brash M, Milner J. Identification of tumour-associated and germ line p53 mutations in canine mammary cancer. *Br J Cancer.* 1999 Oct;81(3):409-15. doi: 10.1038/sj.bjc.6690709.
- Vidhya Jagannathan 1 , Christophe Hitt Dog10K_Boxer_Tasha_1.0: A Long-Read Assembly of the Dog Reference Genome *Genes* 2021, 12(6), 847
- Vilhena, H. *et al.* (2020). Canine and Feline Spontaneous Mammary Tumours as Models of Human Breast Cancer. In: Pastorinho, M., Sousa, A. (eds) *Pets as Sentinels, Forecasters and Promoters of Human Health.* Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-30734-9_9
- Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI, Yang J. Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet.* 2012 Jan 13;90(1):7-24.
- Walerych D, Napoli M, Collavin L, Del Sal G. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis.* 2012 Nov;33(11):2007-17. doi: 10.1093/carcin/bgs232
- Wasala NB, Hakim CH, Chen SJ, Yang NN, Duan D. Questions Answered and Unanswered by the First CRISPR Editing Study in a Canine Model of Duchenne Muscular Dystrophy. *Hum Gene Ther.* 2019 May;30(5):535-543
- Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene.* 1999 Dec 20;18(55):7908-16. doi: 10.1038/sj.onc.1203286. PMID: 10630643
- Withrow SJ, Vail DM. *Withrow & MacEwen's small animal clinical oncology.* 4th edition. St. Louis (MO): Saunders Elsevier; 2007
- Workman P., An Ad Hoc Committee of the National Cancer Research Institute. Aboagye E.O., Balkwill F., Balmain A., Bruder G., Chaplin D.J., Double J.A., Everitt J., Farningham D.A.H., *et al.* Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Br. J. Cancer.* 2010;102:1555–1577. doi: 10.1038/sj.bjc.6605642

- Yiu EM, Kornberg AJ. Duchenne muscular dystrophy. *J Paediatr Child Health*. 2015 Aug;51(8):759-64.
- Zappulli V, De Zan G, Cardazzo B, Bargelloni L, Castagnaro M. Feline mammary tumours in comparative oncology. *J Dairy Res*. 2005;72 Spec No:98-106. doi: 10.1017/s0022029905001263. PMID: 16180727
- Zappulli V, Rasotto R, Caliarì D, Mainenti M, Peña L, Goldschmidt MH, Kiupel M. Prognostic evaluation of feline mammary carcinomas: a review of the literature. *Vet Pathol*. 2015 Jan;52(1):46-60. doi: 10.1177/0300985814528221. Epub 2014 Apr 16. PMID: 24741029.
- Zhang XH, Giuliano M, Trivedi MV, Schiff R, Osborne CK. Metastasis Dormancy in Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer. *Clin Cancer Res* (2013) 19(23):6389–97. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-0838.