



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**«Μελέτη εκφράσεως, τοπογραφικής κατανομής και
συσχέτισης επιθηλιακής μεσεγχυματικής μετατροπής
και πολυδύναμου αρχέγονου δυναμικού σε
καρκινώματα αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας»**

ΣΤΟΓΙΑΝΝΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Ιατρός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΟΓΚΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**«Μελέτη εκφράσεως, τοπογραφικής κατανομής και
συσχέτισης επιθηλιακής μεσεγγυματικής μετατροπής
και πολυδύναμου αρχέγονου δυναμικού σε
καρκινώματα αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας»**

ΣΤΟΓΙΑΝΝΗ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Ιατρός

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2015

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343&32, άρθρο 202, παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)»

Ημερομηνία αίτησης της κ. Στογιάννη Αικατερίνης: 26-3-2009

Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής: 662^α/26-5-2009

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων

Παυλίδης Νικόλαος, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας

Μέλη

Φώτσης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας

Μαλάμου-Μήτση Βασιλική Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 24-9-2009

«Μελέτη εκφράσεως τοπογραφικής κατανομής και συσχέτισης επιθηλιακής μεσεγχυματικής μετατροπής και πολυδύναμον αρχέγονου δυναμικού σε καρκινώματα αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας».

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ : 771^α/28-11-2014

1. Μαλάμου-Μήτση Βασιλική Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
2. Μαρσέλος Μάριος-Αθανάσιος Καθηγητής Φαρμακολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
3. Μπατιστάτου Άννα Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
4. Παυλίδης Νικόλαος, Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
5. Φώτσης Θεόδωρος, Καθηγητής Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
6. Γούσια Άννα Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων
7. Μαγκλάρα Αγγελική Λέκτορας Κλινικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Παν/μίου Ιωαννίνων

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «ΑΡΙΣΤΑ» στις 26-1-2015

ΠΡΟΕΔΡΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

Πασχόπουλος Μηνάς

Καθηγητής Μαιευτικής-Γυναικολογίας



ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη σε όλους τους συνεργάτες και συναδέλφους που με υπομονή, σθένος και ζήλο συντέλεσαν στην εκπόνηση της διατριβής αυτής. Ιδιαίτερω:

Τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:

Νικόλαο Παυλίδη, Καθηγητή Παθολογικής Ογκολογίας, τον μέντορά μου στην Ογκολογία, για την συμβουλευτική και επιστημονική του καθοδήγηση που άμεσα συντέλεσε στην εξέλιξη τόσο της έρευνας όσο και τη δική μου ως ιατρού.

Βασιλική Μαλάμου-Μήτση, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, για την κριτική συμβολή της από την έναρξη έως την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής.

Θεόδωρο Φώτση, Καθηγητή Βιολογικής Χημείας, για την εποικοδομητική καθοδήγηση και βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής διαδικασίας.

Τα μέλη της επταμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:

Μαρσέλο Μάριο-Αθανάσιο, Καθηγητή Φαρμακολογίας

Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας

Μαγκλάρα Αγγελική, Λέκτορα Κλινικής Χημείας

και

Γούσια Άννα, Επίκουρη Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας, για την σημαντικότερη συμβολή της στην ανάγνωση, εκτίμηση και ανάλυση των ανοσοϊστοχημικών χρώσεων.

Τους εκλεκτούς κυρίους και κυρίες:

Πενθερουδάκη Γεώργιο, Επίκουρο Καθηγητή Παθολογικής Ογκολογίας, για τη συμβολή του στη δομή της διατριβής.

Μπέλλου Σοφία, Ε.Ε.ΔΙ.Π Τμήματος Μηχανικών Πληροφορικής και Τηλεπικοινωνιών Πανεπιστημίου Δυτικής Μακεδονίας, Μετα-διδακτορικό συνεργάτη του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών Ιωαννίνων για την πολύτιμη βοήθεια και φιλική μετάδοση της εργαστηριακής της εμπειρίας και γνώσης.

Σιωζοπούλου Βασιλική, Ιατρό Παθολογοανατόμο, για την εισαγωγή στις μεθόδους και λειτουργίες του Εργαστηρίου Παθολογοανατομίας.

Τους συναδέλφους μου ιατρούς, το νοσηλευτικό προσωπικό της Ογκολογικής Κλινικής, το τεχνικό προσωπικό του Εργαστηρίου Παθολογικής Ανατομίας, τους φίλους ερευνητές του Ινστιτούτου Βιοϊατρικών Ερευνών και κυρίως τους ασθενείς μας.

ΑΦΙΕΡΩΝΕΤΑΙ

*Στον άντρα μου,
για την αμέριστη αγάπη, υπομονή και συμπράτασή του....*

*Στους γονείς μου,
για τη συνεχή και αδιάκοπη στήριξη τους....*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ολοκληρώνοντας τις σπουδές μου στην Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, είχα ήδη συνειδητοποιήσει ποιο θα ήταν το μελλοντικό πεδίο εξειδίκευσής μου, η Ογκολογία. Με την πεποίθηση ότι ο σύγχρονος ιατρός οφείλει να διαθέτει όχι μόνο κλινικό αλλά και εργαστηριακό υπόβαθρο ώστε να παρέχει στον ασθενή την καταλληλότερη/εξατομικευμένη θεραπεία, επέλεξα να ξεκινήσω την ιατρική μου πορεία από την Πανεπιστημιακή Ογκολογική Κλινική του ΠΠΓΝ Ιωαννίνων υπό την καθοδήγηση του Καθηγητή κ. Νικόλαου Παυλίδη. Σε μια Κλινική με πλούσιο ερευνητικό και συγγραφικό έργο και ιδιαίτερη εξειδίκευση στα Καρκινώματα Αγνώστου Πρωτοπαθούς Εστίας ήταν φυσικό επακόλουθο η έρευνά μας να στραφεί προς τους μοριακούς μηχανισμούς που διέπουν την εμφάνιση και την εξάπλωση αυτών των όχι και τόσο σπάνιων όγκων. Η Επιθηλιακή προς Μεσεγγυματική Μετατροπή είναι ένα βιολογικό φαινόμενο ζωτικής σημασίας κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Η επανενεργοποίησή της κατά την ενήλικη ζωή έχει ήδη μελετηθεί αρκετά στους συμπαγείς όγκους προάγοντας τόσο την καρκινογένεση όσο και τη μεταστατική διασπορά. Δεν είχε όμως ποτέ μελετηθεί στα ΚΑΠΕ, σε μια νόσο που χαρακτηρίζεται από ένα κατεξοχήν επιθετικό αλλά και παράδοξο μεταστατικό πρότυπο. Ο στόχος μας να αναδείξουμε τους μηχανισμούς που καθοδηγούν αυτή τη βιολογική συμπεριφορά πήρε σταδιακά τη μορφή πρωτοκόλλου και αποτέλεσε το θέμα της παρούσης διδακτορικής διατριβής. Θελήσαμε να μελετήσουμε τη συχνότητα του φαινομένου σε ασθενείς με ΚΑΠΕ και να εντοπίσουμε πιθανές συσχετίσεις με άλλους κλινικοπαθολογοανατομικούς παράγοντες. Προσπαθήσαμε επίσης να δούμε αν τα ευρήματά μας φέρουν κάποια προγνωστική ή προβλεπτική αξία για τους ασθενείς μας. Άλλωστε είναι η μελέτη των παθογενετικών μηχανισμών που θα οδηγήσει μελλοντικά στην ανάδειξη νέων θεραπευτικών στόχων. Τα κεφάλαια της διδακτορικής αυτής διατριβής περιλαμβάνουν το γενικό μέρος του πρωτοκόλλου με την ανασκόπηση της προσφάτως δημοσιευθείσας βιβλιογραφίας και το ειδικό μέρος της μελέτης με τις πληθυσμιακές ομάδες ασθενών που συμμετείχαν, τη χρησιμοποιηθείσα μεθοδολογία, τα αποτελέσματα της έρευνας, την κριτική συζήτηση αυτών και τις μελλοντικές-ερευνητικές και θεραπευτικές-κατευθύνσεις.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	15.
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	23.
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	25.
1. ΟΡΙΣΜΟΣ	25.
3. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	26.
4. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΜΦΑΝΙΣΗ	27.
4.1 Φυσική ιστορία	27.
4.2 Κλινικοπαθολογοανατομικές υποομάδες	28.
4.2.1 Μεταστατικό ΚΑΠΕ στο ήπαρ ή σε πολλαπλές εστίες	28.
4.2.2 Μεταστατικό ΚΑΠΕ στους λεμφαδένες	28.
4.2.2.1 Μεσοθωρακικοί και οπισθοπεριτοναϊκοί λεμφαδένες	28.
4.2.2.2 Μασχαλιαίοι λεμφαδένες	28.
4.2.2.3 Τραχηλικοί λεμφαδένες	29.
4.2.2.4 Βουβωνικοί λεμφαδένες	29.
4.2.3 Μεταστατικό ΚΑΠΕ της περιτοναϊκής κοιλότητας	30.
4.2.3.1 Περιτοναϊκή καρκινώματωση στις γυναίκες	30.
4.2.3.2 Κακοήθης ασκίτης αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας (όχι ορώδες θηλώδες αδενοκαρκίνωμα)	30.
4.2.4 Μεταστατικό ΚΑΠΕ στους πνεύμονες	30.
4.2.4.1 Παρεγχυματικές μεταστάσεις (πνευμονικοί όζοι)	30.
4.2.4.2 Κακοήθης πλευριτική συλλογή	31.
4.2.5 Μεταστατικό ΚΑΠΕ στα οστά	31.
4.2.6 Μεταστατικό ΚΑΠΕ στον εγκέφαλο	31.
4.2.7 Μεταστατικά νευροενδοκρινικά ΚΑΠΕ	32.
4.2.8 Μεταστατικό μελάνωμα αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας	32.
5. ΔΙΑΓΝΩΣΗ	34.
5.1 Διαγνωστικά παθολογοανατομικά στοιχεία	34.
5.2 Διαγνωστική απεικόνιση	36.
5.3 Διαγνωστική ενδοσκόπηση	36.

5.4 Διαγνωστική αξία καρκινικών δεικτών του ορού	36.
6. ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	37.
7. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ	39.
B. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΠΕ	43.
1. ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ	43.
2. ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	44.
3. ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ	45.
4. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ	46.
5. ΠΡΟΦΙΛ ΠΟΛΥΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	47.
Γ. ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ (EMT)	49.
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	49.
2. ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ	51.
3. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΝ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ	52.
3.1 Μονοπάτια μεταγωγής σήματος	53.
3.1.1 TGF-β	54.
3.1.2 Wnt	55.
3.1.3 C-met	56.
3.1.4 Notch	57.
3.1.5 Hedgehog	58.
3.2 Υποξία	59.
4. ΑΠΩΛΕΙΑ ΤΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ	59.
4.1 Μεταγραφικοί παράγοντες	60.
4.1.1 Zinc-finger μεταγραφικοί παράγοντες	60.
4.1.2 Helix-loop-helix μεταγραφικοί παράγοντες	61.
4.2 Μη κωδικοποιούντα RNAs	64.
4.3 Γενετικές/ Επιγενετικές αποκλίσεις	69.
5. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΡΧΕΓΟΝΟΥ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ	70.

6. ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ (ΜΕΤ)	71.
7. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ	72.
Δ. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	75.
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	77.
Α. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΕΣΤΙΑΣ: ΕΠΙΠΤΩΣΗ, ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ	79.
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	81.
2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	82.
2.1 Ασθενείς	82.
2.2 Ιστικές Μικροσυστοιχίες (Tissue Microarrays-TMAs)	83.
2.3 Ανοσοϊστοχημεία (IHC)	85.
2.4 Ανοσοϊστοχημικά cut-offs	86.
2.5 Στατιστική ανάλυση	87.
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	88.
3.1 Ασθενείς και χαρακτηριστικά του όγκου	88.
3.2 Ανοσοϊστοχημική έκφραση των βιομορίων	90.
3.3 Συσχέτιση EMT φαινότυπου με άλλα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά	95.
3.4 Προγνωστική και προβλεπτική αξία	96.
3.5 Πολυπαραγοντική ανάλυση	101.
Β. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΣΤΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΕΣΤΙΑΣ ΑΠΟ microRNA	103.
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	105.
2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	106.
2.1 Ασθενείς	106.
2.2 Ιστικές μικροσυστοιχίες (Tissue Microarrays-TMAs)	107.
2.3 EMT φαινότυπος και ανοσοϊστοχημικά cut-offs	107.
2.4 Μικροεκτομή και απομόνωση RNA	108.
2.5 MicroRNA μικροσυστοιχίες, πλατφόρμα και επεξεργασία σήματος	112.
2.6 Στατιστική ανάλυση	115.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	116.
3.1 Ασθενείς και χαρακτηριστικά του όγκου	116.
3.2 Ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός EMT φαινότυπου	116.
3.3 Σύγκριση miRNA προφίλ μεταξύ EMT-θετικών και EMT-αρνητικών ασθενών (ορισμός με βάση το ποσοστό % των χρωματισμένων κυττάρων)	119.
3.4 MiRNA προφίλ σε ασθενείς μη πλακώδους ιστολογίας	122.
3.5 Σύγκριση miRNA προφίλ μεταξύ EMT-θετικών και EMT-αρνητικών ασθενών (ορισμός με βάση το H-score)	123.
3.6 MiRNA προφίλ ανά βιομόριο	126.
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	129.
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	145.
SUMMARY IN ENGLISH	149.
ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	153.
ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	155.
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	159.
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ	18.
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
Πίνακας 1. Κλινικοπαθολογοανατομικές υποομάδες του ΚΑΠΕ	33.
Πίνακας 2. Έκφραση κυτοκερατινών σε διάφορα όργανα	35.
Πίνακας 3. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις	35.
Πίνακας 4. Υποομάδες του ΚΑΠΕ	38.
Πίνακας 5. Θεραπεία ασθενών με καλής πρόγνωσης ΚΑΠΕ	40.
Πίνακας 6. Συχνά χορηγούμενα σχήματα παρηγορικής χημειοθεραπείας σε ασθενείς με πτωχής πρόγνωσης ΚΑΠΕ	41.
B. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΠΕ	
Γ. ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ (EMT)	
Πίνακας 7. Μοριακοί παράγοντες που συμβάλλουν στην EMT: μεταγραφική ρύθμιση	63.
Πίνακας 8. Μοριακοί παράγοντες που συμβάλλουν στην EMT: μη κωδικοποιούντα RNAs	68.

Δ. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΕΣΤΙΑΣ: ΕΠΙΠΤΩΣΗ, ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ

Πίνακας 9. Ασθενείς και χαρακτηριστικά του όγκου_____ 89.

Πίνακας 10. Δεδομένα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (IHC) και EMT φαινότυπος_____ 94.

Πίνακας 11. Συσχετίσεις ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (% χρωματισμένων κυττάρων) μεταξύ διάφορων βιομορίων. Η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης θεωρήθηκε συνεχής μεταβλητή και το μη-παραμετρικό Spearman's Rho τεστ χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις_ 96.

Πίνακας 12. Συσχετίση EMT φαινοτύπου με κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά_____100.

Πίνακας 13. Κλινικοπαθολογοανατομικοί προγνωστικοί παράγοντες_____ 101.

Β. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΣΤΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΕΣΤΙΑΣ ΑΠΟ microRNA

Πίνακας 14: Ασθενείς και χαρακτηριστικά του όγκου_____ 117.

Πίνακας 15. Δεδομένα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (IHC) και EMT φαινότυπος_____ 118.

Πίνακας 16: MiRNA έκφραση σε EMT-θετικούς και EMT-αρνητικούς ΚΑΠΕ ασθενείς_ 125.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

SUMMARY IN ENGLISH

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ 19.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Α. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Β. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΠΕ

Γ. ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ (EMT)

Εικόνα 1. Επιθηλιακή προς μεσεγγυματική Μετατροπή_____ 51.

Εικόνα 2. Μεταγωγή σήματος	53.
Εικόνα 3. MicroRNA ρύθμιση της EMT	65.
Εικόνα 4. Επιγενετική ρύθμιση	69.
Εικόνα 5. EMT και stem cell-like ιδιότητες	70.

Δ.ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΕΣΤΙΑΣ: ΕΠΙΠΤΩΣΗ, ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ

Εικόνα 6. Ιστικές Μικροσυστοιχίες α: παραγωγή, β: μπλοκ παραφίνης, γ: master array slide	83.
--	-----

Εικόνα 7. Ιστογράμματα συχνοτήτων που δείχνουν την κατανομή έκφρασης (% των χρωματισμένων κυττάρων). α: E-κανταχρίνη, β: N-κανταχρίνη, γ: Βιμεντίνη, δ: SNAIL, ε: OCT4, στ: NOTCH1, ζ: NOTCH2, η: NOTCH3	90.
--	-----

Εικόνα 8. Μία περίπτωση ΚΑΠΕ με θετικό EMT φαινότυπο (ανοσοϊστοχημικά) α: χαμηλή έκφραση E-κανταχρίνης β: υψηλή έκφραση SNAIL γ: υψηλή έκφραση βιμεντίνης	92.
---	-----

Εικόνα 9. Διάστημα ελεύθερο υποτροπής (PFS) αναλόγως του EMT φαινότυπου (% χρωματισμένων κυττάρων)	97.
--	-----

Εικόνα 10. Ολική επιβίωση (OS) αναλόγως του EMT φαινότυπου (% χρωματισμένων κυττάρων)	98.
---	-----

Εικόνα 11. Ολική επιβίωση (OS) αναλόγως του EMT φαινότυπου (H-score)	99.
--	-----

B. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΣΤΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΕΣΤΙΑΣ ΑΠΟ microRNA

Εικόνα 12: MiRNA προφίλ έκφρασης σε EMT-θετικούς vs EMT-αρνητικούς ασθενείς (% χρωματισμένων κυττάρων)	120.
--	------

Εικόνα 13: MiRNA προφίλ έκφρασης σε EMT-θετικούς vs EMT-αρνητικούς ασθενείς με πλακώδη ιστολογία (%ποσοστό χρωματισμένων κυττάρων)	121.
--	------

Εικόνα 14: MiRNA προφίλ έκφρασης σε EMT-θετικούς vs EMT-αρνητικούς ασθενείς με μη πλακώδη ιστολογία (%ποσοστό χρωματισμένων κυττάρων)	122.
---	------

Εικόνα 15: MiRNA προφίλ έκφρασης σε EMT-θετικούς vs EMT-αρνητικούς ασθενείς (H-score)	123.
---	------

Εικόνα 16: MiRNA προφίλ έκφρασης σε EMT-θετικούς vs EMT-αρνητικούς ασθενείς με μη πλακώδη ιστολογία (H-score)	124.
---	------

Εικόνα 17: MiRNA έκφραση ανά EMT δείκτη	126.
---	------

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

SUMMARY IN ENGLISH

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ 20.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σχήμα 1. Κλινικός αλγόριθμος αντιμετώπισης ασθενών με ΚΑΠΕ 42.

B. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΠΕ

Γ. ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΑ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ (EMT)

Δ. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΕΣΤΙΑΣ: ΕΠΙΠΤΩΣΗ, ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ

Σχήμα 2. REMARK flow chart 84.

B. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΣΤΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΕΣΤΙΑΣ ΑΠΟ microRNA

Σχήμα 3: CONSORT flow chart 111.

Σχήμα 4: Αλγόριθμος προετοιμασίας δειγμάτων και επεξεργασίας της συστοιχίας 112.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

SUMMARY IN ENGLISH

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. ΟΡΙΣΜΟΣ

Τα Καρκινώματα Αγνώστου Πρωτοπαθούς Εστίας (ΚΑΠΕ) αντιπροσωπεύουν ένα ετερογενές σύνολο μεταστατικών όγκων για τους οποίους συγκεκριμένες διαγνωστικές διαδικασίες έχουν αποτύχει να προσδιορίσουν την εστία προέλευσης κατά τη στιγμή της διάγνωσης. Η πρωτοπαθής εστία μπορεί είτε να έχει χαμηλό ρυθμό αύξησης είτε να έχει υποστρέψει με αποτέλεσμα σπανίως να εντοπίζεται κατά τη διάρκεια της κλινικής πορείας της νόσου^{1,2,3}.

Ιστορικά, ο ορισμός του ΚΑΠΕ ποικίλλει ανάλογα με τα κριτήρια εισαγωγής που κατά καιρούς χρησιμοποιήθηκαν καθώς και με την πρόοδο των διαγνωστικών μεθόδων. Τη δεκαετία του '70, μερικοί ερευνητές πίστευαν ότι η διάγνωση του ΚΑΠΕ μπορεί να γίνει μόνο εφόσον η πρωτοπαθής εστία δεν ανευρεθεί κατά τη νεκροτομή⁴. Σήμερα, ο ορισμός του ΚΑΠΕ περιλαμβάνει ασθενείς οι οποίοι κατά τη διάγνωση εμφανίζουν ιστολογικά επιβεβαιωμένο μεταστατικό καρκίνο του οποίου η πρωτοπαθής εστία δεν έχει εντοπιστεί μετά από τη λήψη ιατρικού ιστορικού, κλινική εξέταση, αιματολογικό και βιοχημικό έλεγχο, ανάλυση ούρων και κοπράνων, παθολογοανατομική ανάλυση του βιοπτικού υλικού με τη χρήση ανοσοϊστοχημείας, ακτινογραφία θώρακος, αξονική τομογραφία κοιλίας και πυέλου καθώς και σε συγκεκριμένες περιπτώσεις μαστογραφία και ενδοσκόπηση γαστρεντερικού συστήματος^{5,6}.

Ωστόσο, παρά την πρόοδο της μοριακής ανοσοϊστοχημείας και των απεικονιστικών μεθόδων, η διάγνωση και θεραπεία των ασθενών αυτών παραμένει ένα δίλημμα για τον κλινικό ογκολόγο. Αν και η πλειοψηφία των ασθενών με ΚΑΠΕ δεν απαντούν στη συστηματική θεραπεία, συγκεκριμένες κλινικοπαθολογικές ομάδες οι οποίες προσδιορίστηκαν είτε με κλινικά είτε με παθολογοανατομικά κριτήρια φαίνεται να ανταποκρίνονται στη θεραπεία και να έχουν καλύτερη πρόγνωση.

2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Δεδομένα από επιδημιολογικές μελέτες και μεγάλες καταγραφές δείχνουν ότι το ΚΑΠΕ αποτελεί το 2.3-4.2% των ανθρώπινων καρκίνων⁷. Στις ΗΠΑ, η ετήσια

επίπτωση με βάση την ηλικία είναι 7-12 περιπτώσεις ανά 100000 πληθυσμού ενώ στην Αυστραλία 18-19 περιπτώσεις ανά 100000 πληθυσμού ανά έτος^{8,9}. Στην Ευρώπη (Ολλανδία) τα αντίστοιχα δεδομένα είναι 5.3-6.7 περιπτώσεις¹⁰. Συνεπώς, το ΚΑΠΕ αντιπροσωπεύει τον έβδομο με όγδοο συχνότερο τύπο καρκίνου καθώς και την τέταρτη συχνότερη αιτία θανάτου από καρκίνο σε άντρες και γυναίκες¹¹.

Η διάμεση ηλικία εμφάνισης είναι τα 60 έτη με οριακά μεγαλύτερη επίπτωση στους άνδρες. Στα παιδιά το ΚΑΠΕ αντιπροσωπεύει λιγότερο από το 1% των διαγνωσθέντων συμπαγών όγκων.

3. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Τα ΚΑΠΕ κατηγοριοποιούνται σε 5 μεγάλες κατηγορίες:

- Καλά- και μετρίως- διαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα
- Πτωχά-διαφοροποιημένα καρκινώματα (συμπεριλαμβάνονται τα πτωχά διαφοροποιημένα αδενοκαρκινώματα)
- Πλακώδη καρκινώματα
- Μη-διαφοροποιημένα νεοπλάσματα
- Καρκινώματα με νευροενδοκρινική διαφοροποίηση

Περίπου οι μισοί ασθενείς θα διαγνωσθούν με μεταστατικό αδενοκαρκίνωμα. 30% θα έχουν μη-διαφοροποιημένο ή πτωχά-διαφοροποιημένο καρκίνωμα, 15% πλακώδες καρκίνωμα και το εναπομείναν 5% θα διαγνωσθεί με αδιαφοροποίητο νεόπλασμα. Μέσω των νέων ανοσοϊστοπαθολογικών μεθόδων, η τελευταία υποομάδα μπορεί να καταταγεί σε άλλες υποομάδες όπως στα πτωχά-διαφοροποιημένα καρκινώματα, τους νευροενδοκρινικούς όγκους, τα λεμφώματα, τους όγκους απο γεννητικά κύτταρα, τα μελανώματα, τα σαρκώματα και τις εμβρυικές κακοήθειες¹².

4. ΚΛΙΝΙΚΗ ΕΜΦΑΝΙΣΗ

4.1 Φυσική ιστορία

Το ΚΑΠΕ αντιπροσωπεύει μια ιδιαίτερη οντότητα για την οποία συμπεραίνεται ότι ο πρωτοπαθής όγκος μεθίσταται πριν ακόμη αυξηθεί σε τέτοιο μέγεθος που να είναι ανιχνεύσιμος. Η φυσική πορεία αυτών των ασθενών διαφέρει αρκετά από αυτή των ασθενών με γνωστή πρωτοπαθή εστία. Η πρώιμη διασπορά, η κλινική απουσία της πρωτοπαθούς εστίας, το απρόβλεπτο μεταστατικό πρότυπο και η επιθετικότητα αποτελούν τα βασικά χαρακτηριστικά αυτών των όγκων. Η πρώιμη διασπορά αλλωστε αντικατοπτρίζεται στο γεγονός ότι οι ασθενείς δεν εμφανίζουν συμπτώματα που να σχετίζονται με την πρωτοπαθή εστία.

Το απρόβλεπτο μεταστατικό πρότυπο αναφέρεται στις διαφορετικές μεταστατικές εστίες που υπάρχουν κατά τη διάγνωση μεταξύ των όγκων αγνώστου και γνωστής πρωτοπαθούς εστίας. Παραδείγματος χάριν, ο καρκίνος του πνεύμονα που εμφανίζεται ως ΚΑΠΕ περιλαμβάνει τα οστά σε ποσοστό μόνο 4% ενώ ο πρωτοπαθής καρκίνος του πνεύμονα εμφανίζει οστική συμμετοχή περίπου 30-50%. Ομοίως, ο παγκρεατικός καρκίνος που εμφανίζεται ως ΚΑΠΕ έχει 4 φορές μεγαλύτερη πιθανότητα να πλήξει τα οστά ενώ ο καρκίνος του προστάτη ως ΚΑΠΕ έχει 3 φορές μικρότερη πιθανότητα σε σχέση με τους όγκους από γνωστή πρωτοπαθή εστία. Ανάλογο πρότυπο παρατηρείται και στις σπλαγχνικές μεταστάσεις¹³.

Φαίνεται ότι αυτοί οι όγκοι δεν υφίστανται τύπου 1 εξέλιξη δηλαδή από μια προκαρκινωματώδη κατάσταση στην κακοήθεια αλλά είναι κακοήθεις εξ' αρχής (τύπου 2 εξέλιξη). Η κύρια διαφορά, ωστόσο, σε σχέση με τους άλλους όγκους που εμφανίζουν τύπου 2 εξέλιξη είναι ότι δεν σχηματίζουν πρωτοπαθή εστία και μεθίστανται με μη προβλεψίμο τρόπο⁵.

Πάνω από το 50% των ασθενών με ΚΑΠΕ θα έχουν πολλαπλές μεταστατικές εστίες κατά τη διάγνωση ενώ οι υπόλοιποι θα έχουν μόνο μια μεταστατική εστία συνήθως στο ήπαρ, τα οστά, τους πνεύμονες ή τους λεμφαδένες¹⁴.

4.2 Κλινικοπαθολογοανατομικές υποομάδες

4.2.1 Μεταστατικό ΚΑΠΕ στο ήπαρ ή σε πολλαπλές εστίες

Οι ασθενείς με ηπατικές μεταστάσεις αποτελούν την πιο συχνή υποομάδα του ΚΑΠΕ (25%). Μεταστατικές εστίες και σε άλλα όργανα μπορεί να ανευρεθούν κατά τη διάγνωση. Μετρίως- ή πτωχά- διαφοροποιημένα καρκινώματα είναι η πιο συχνή ιστολογική διάγνωση. Η πρόγνωση αυτών των ασθενών είναι πτωχή με διάμεση επιβίωση 6-9 μήνες^{15,16,17}.

4.2.2 Μεταστατικό ΚΑΠΕ στους λεμφαδένες

4.2.2.1 Μεσοθωρακικοί και οπισθοπεριτοναϊκοί λεμφαδένες

Οι ασθενείς που εμφανίζονται με ΚΑΠΕ που προσβάλλει κυρίως τους λεμφαδένες του μεσοθωρακίου και του οπισθοπεριτοναίου, χαρακτηρίζονται ότι έχουν το λεγόμενο «εξωγοναδικό σύνδρομο από γεννητικά κύτταρα»¹⁸. Εμφανίζεται κυρίως σε άνδρες κάτω των 50 ετών και κλινικά χαρακτηρίζεται από την εμφάνιση μεταστατικής νόσου κατά μήκος της μέσης γραμμής, περιλαμβάνοντας μεσοθωρακικούς, οπισθοπεριτοναϊκούς λεμφαδένες και/ή πνευμονικές εστίες. Ιστολογικά, είναι κυρίως αδιαφοροποίητα η πτωχά-διαφοροποιημένα καρκινώματα¹⁹. Αυτοί οι όγκοι εξελίσσονται γρήγορα, αν και ορισμένοι απαντούν στην χημειοθεραπεία επιτυγχάνοντας σχετικά μακροχρόνια ύφεση της νόσου. Η β-χοριακή γοναδοτροπίνη και η άλφα-φετοπρωτεΐνη είναι αυξημένες σε κάποιους ασθενείς. Μόνο λίγοι ασθενείς φέρουν όλα τα στοιχεία του συνδρόμου αλλά ακόμα και η ύπαρξη ενός μπορεί να θέσει τη διάγνωση²⁰.

4.2.2.2 Μασχαλιαίοι λεμφαδένες

Οι περισσότεροι ασθενείς με λεμφαδενικές μεταστάσεις στη μία μόνο μασχάλη είναι κυρίως γυναίκες και θα πρέπει να υποτεθεί ότι πάσχουν από σταδίου II καρκίνου του μαστού. Σε ένα πολύ μικρό ποσοστό γυναικών (0.3%) οι οποίες κατόπιν διαγιγνώσκονται με καρκίνο του μαστού, η νόσος εκδηλώνεται με αυτόν τον τρόπο. Η διάμεση ηλικία εμφάνισης είναι τα 52 έτη (21-80 έτη). Ιστολογικά πρόκειται κυρίως για πτωχά-διαφοροποιημένα διηθητικά πορώδη αδenoκαρκινώματα με θετικούς οιστρογονικούς ή

προγεστερονικούς υποδοχείς στο 20-30% των περιπτώσεων. 70% των ασθενών έχει N1 νόσο ενώ μόνο το 5% των εμφανίζεται με προχωρημένη νόσο. Η μαστογραφία και η μαγνητική τομογραφία του μαστού απαιτείται για τον εντοπισμό της πρωτοπαθούς εστίας ενώ ύποπτες περιοχές θα πρέπει να βιοψούνται. Οι ασθενείς αυτές αντιμετωπίζονται με βάση τις κατευθυντήριες οδηγίες για το στάδιο II του καρκίνου του μαστού και απολαμβάνουν μακρύ διάστημα ελεύθερο νόσου. Οι άνδρες ασθενείς έχουν πολύ χειρότερη πρόγνωση^{21,22,23,24,25}.

4.2.2.3 Τραχηλικοί λεμφαδένες

Οι μεταστάσεις σε τραχηλικούς λεμφαδένες από κλινικά μη εντοπισμένο πρωτοπαθές πλακώδες καρκίνωμα αποτελούν το 1-2% των κακοηθειών κεφαλής-τραχήλου. Με τοπικοπεριοχική θεραπεία, οι ασθενείς αυτοί απολαμβάνουν μακροχρόνια επιβίωση. Ασθενείς, ωστόσο, με υπερκλείδια λεμφαδενοπάθεια ιστολογίας είτε πλακώδους είτε αδιαφοροποίητου καρκινώματος, έχουν χειρότερη πρόγνωση. Αυτοί οι ασθενείς θα πρέπει να υποβληθούν σε αξονική τομογραφία με εκπομπή ποζιτρονίων (FDG-PET), ώστε να εντοπισθεί η πρωτοπαθής εστία στην περιοχή της κεφαλής-τραχήλου^{26,27}.

4.2.2.4 Βουβωνικοί λεμφαδένες

Αυτή είναι μια σπάνια υποομάδα του ΚΑΠΕ με πιο συνήθη ιστολογία αυτή του αδιαφοροποίητου (αναπλαστικού) καρκινώματος. Πλακώδη καρκινώματα ή μεικτά πλακώδη/αδενοκαρκινώματα μπορούν ακόμη να διαγνωσθούν. Η γυναικολογική εξέταση, η εξέταση του πρωκτού και πιθανώς η κυστεοσκόπηση είναι απαραίτητες για αυτούς τους ασθενείς. Τα λεμφώματα και τα μεταστατικά ή αμελανωτικά μελανώματα θα πρέπει να αποκλεισθούν^{28,29}.

4.2.3 Μεταστατικό ΚΑΠΕ της περιτοναϊκής κοιλότητας

4.2.3.1 Περιτοναϊκή καρκινώματωση στις γυναίκες

Αυτές είναι γυναίκες με διάμεση ηλικία τα 60 έτη οι οποίες εμφανίζονται με ασκτική συλλογή και περιτοναϊκές μάζες χωρίς την παρουσία πρωτοπαθούς όγκου στις ωοθήκες. Αυτό το σύνδρομο χαρακτηρίζεται επίσης ως «πολυεστιακό εξω-ωοθηκικό ορώδες καρκίνωμα» ή «περιτοναϊκό ορώδες θηλώδες καρκίνωμα». Η διάγνωση τίθεται με διερευνητική λαπαροτομία. Οι βιοψίες των περιτοναϊκών εμφυτεύσεων αναδεικνύουν θηλώδες ορώδες καρκίνωμα με την παρουσία ή μη ψαμμωδών σωματίων. Τα επίπεδα του CA 125 στον ορό είναι συνήθως αυξημένα. Η απάντηση στη χημειοθεραπεία και η επιβίωση είναι ανάλογη του σταδίου III του καρκίνου των ωοθηκών. Στη διαφορική διάγνωση συμμετέχουν το μεσοθηλίωμα του περιτοναίου, το ψευδομύξωμα του περιτοναίου και ο κακοήθης ασκίτης που προέρχεται από όγκους του γαστρεντερικού συστήματος^{30,31}.

4.2.3.2 Κακοήθης ασκίτης αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας (όχι ορώδες θηλώδες αδενοκαρκίνωμα)

Μερικοί ασθενείς φέρουν μη-θηλώδεις όγκους και μπορεί να είναι τόσο γυναίκες όσο και άνδρες. Σε αυτούς με βλεννώδη αδενοκαρκινώματα και με κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου, ένας όγκος από το γαστρεντερικό σύστημα θα πρέπει να υποτεθεί. Οι όγκοι αυτών των ασθενών δεν απαντούν τόσο καλά στην χημειοθεραπεία όσο αυτοί των ασθενών με ορώδη-θηλώδη ιστολογία³².

4.2.4 Μεταστατικό ΚΑΠΕ στους πνεύμονες

4.2.4.1 Παρεγχυματικές μεταστάσεις (πνευμονικοί όζοι)

Αυτοί οι ασθενείς εμφανίζονται συνήθως με αμφοτερόπλευρες πνευμονικές διηθήσεις και με ιστολογική διάγνωση αδενοκαρκινώματος ποικίλλης διαφοροποίησης. Η πρόγνωσή τους είναι πτωχή. Οι νέοι ασθενείς

με πιθανό εξωγοναδικο γεννητικό σύνδρομο θα πρέπει να διακρίνονται από αυτήν την υποομάδα¹⁴.

4.2.4.2 Κακοήθης πλευριτική συλλογή

Η κακοήθης πλευριτική συλλογή δεν είναι ασυνήθης σε ασθενείς με ΚΑΠΕ, ωστόσο σε ένα πολύ μικρό ποσοστό αποτελεί τη μοναδική εστία. Η πρωτοπαθής εστία παραμένει άγνωστη περίπου στο 7% της μεταστατικής πλευρίτιδας. Αδενοκαρκίνωμα είναι ο πιο συχνός ιστολογικός τύπος. Στη διαφορική διάγνωση συμμετέχει η πρωτοπαθής εστία στον πνεύμονα, το μαστό, την ωοθήκη καθώς και το μεσοθηλίωμα. Γενικά η πρόγνωση των ασθενών είναι πτωχή¹.

4.2.5 Μεταστατικό ΚΑΠΕ στα οστά

Περίπου το ένα τέταρτο των ασθενών με μεταστατικό ΚΑΠΕ στα οστά εμφανίζονται με συμπτώματα από αυτές τις μεταστάσεις παρ'όλο που πάνω από το 50% αυτών έχουν θετικό σπινθηρογράφημα. Οι οστικές μεταστάσεις μπορεί να είναι μονήρεις ή διάχυτες. Το αδενοκαρκίνωμα είναι η πιο συχνή ιστολογική διάγνωση. Ο καρκίνος του προστάτη και του μαστού θα πρέπει να αποκλεισθεί σε άνδρες και γυναίκες αντίστοιχα πριν τεθεί η διάγνωση του ΚΑΠΕ³³.

4.2.6 Μεταστατικό ΚΑΠΕ στον εγκέφαλο

Το μεταστατικό καρκίνωμα του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ) αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας εμφανίζεται είτε με μία μονήρη εστία είτε με πολλαπλές. Περίπου στο 15% των ασθενών με μεταστάσεις στο ΚΝΣ, η πρωτοπαθής εστία δεν ανευρίσκεται παρά τον ενδελεχή έλεγχο. Αυτοί οι ασθενείς παρουσιάζουν νευρολογική σημειολογία. Ιστολογικά, οι ενδοκράνιες εστίες είναι αδενοκαρκινώματα ή μεταστατικά πλακώδη καρκινώματα. Οι ασθενείς με μονήρεις εστίες είναι υποψήφιοι για χειρουργική εξαίρεση και έχουν καλύτερη πρόγνωση^{34,35}.

4.2.7 Μεταστατικά νευροενδοκρινικά ΚΑΠΕ

Τα νευροενδοκρινικά καρκινώματα αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας αποτελούν ένα ευρύ φάσμα των νευροενδοκρινικών κακοηθειών. Τρεις διαφορετικές υποκατηγορίες νευροενδοκρινικών όγκων έχουν περιγραφεί. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τα χαμηλού βαθμού κακοήθειας νευροενδοκρινικά καρκινώματα (πχ τα μεταστατικά καλά-διαφοροποιημένα καρκινοειδή) με συμμετοχή του ήπατος και τα οποία συχνά δίνουν συμπτώματα που σχετίζονται με την έκκριση ορμονών. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει το μικροκυτταρικό αναπλαστικό καρκίνωμα με ιστολογική εμφάνιση και κλινική συμπεριφορά όπως αυτή του μικροκυτταρικού καρκίνου του πνεύμονα ή του εξωπνευμονικού μικροκυτταρικού καρκινώματος. Η τρίτη κατηγορία περιλαμβάνει τα «πτωχά-διαφοροποιημένα καρκινώματα» ή τα «πτωχά-διαφοροποιημένα αδenoκαρκινώματα» αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας με νευροενδοκρινικούς χαρακτήρες και ανοσοϊστοχημική χρώση θετική για χρωμογρανίνη ή/και συναπτοφυσίνη. Αυτοί οι όγκοι ορίζονται ως αμιγώς «πτωχά-διαφοροποιημένοι νευροενδοκρινικοί όγκοι» αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας^{36,37}.

4.2.8 Μεταστατικό μελάνωμα αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας.

Η διάγνωση του μεταστατικού μελανώματος αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας υπολογίζεται να αποτελεί το 2-6% όλων των μελανωμάτων. 10-15% αυτών των περιπτώσεων θεωρούνται αμελανωτικά μελανώματα. Παρά κάποιες αντιθέσεις στην βιβλιογραφία, η κλινική πορεία του μελανώματος αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας είναι παρόμοια με αυτή του πρωτοπαθούς δερματικού μελανώματος όταν συγκρίνονται τα αντίστοιχα στάδια της νόσου³⁸.

Πίνακας 1. Κλινικοπαθολογοανατομικές υποομάδες του ΚΑΠΕ

Όργανο	Ιστολογία
<i>Ήπαρ ή/και άλλες εστίες</i>	Αδενοκαρκίνωμα μέτρια ή πτωχά διαφοροποιημένο
<i>Λεμφαδένες</i>	
Μεσοθωρακίου-οπισθοπεριτοναϊκοί	Αδιαφοροποίητο ή πτωχά διαφοροποιημένο καρκίνωμα
Μασχάλιατοι	Αδενοκαρκίνωμα καλά έως μέτρια διαφοροποιημένο
Τραχηλικοί	Πλακώδες καρκίνωμα
Βουβωνικοί	Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα, πλακώδες, μικτό πλακώδες/αδενοκαρκίνωμα
<i>Περιτοναϊκή κοιλότητα</i>	
Περιτοναϊκή αδενοκαρκινωμάτωση στις γυναίκες	Θηλώδες ή ορώδες αδενοκαρκίνωμα (± ψαμμώδη σωματίδια)
Κακοήθης ασκίτης αγνώστου εστίας	Βλεννώδες αδενοκαρκίνωμα μέτρια ή πτωχα διαφοροποιημένο (± κύτταρα δίκην σφραγιστήρος δακτυλίου)
<i>Πνεύμονες</i>	
Παρεγχυματικές μεταστάσεις	Αδενοκαρκίνωμα ποικίλης διαφοροποίησης
Πλευριτική συλλογή	Αδενόκαρκίνωμα μέτρια ή πτωχά διαφοροποιημένο
<i>Οστά (μονήρης ή πολλαπλές)</i>	Αδενοκαρκίνωμα ποικίλης διαφοροποίησης
<i>Εγκέφαλος (μονήρης ή πολλαπλές)</i>	Αδενοκαρκίνωμα ποικίλης διαφοροποίησης ή πλακώδες
<i>Νευροενδοκρινείς όγκοι</i>	Πτωχά διαφοροποιημένο αδενοκαρκίνωμα με νευροενδοκρινικούς χαρακτήρες, πτωχά διαφοροποιημένα νευροενδοκρινικά καρκινώματα, μικροκυτταρικά αναπλαστικά καρκινώματα
<i>Κακόηθες μελάνωμα</i>	Αδιαφοροποίητο νεόπλασμα με χαρακτήρες μελανώματος

5. ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Παρά την εκτεταμένη διερεύνηση, σε λιγότερους από το 20% των ασθενών με ΚΑΠΕ ανευρίσκεται η πρωτοπαθής εστία. Μελέτες απο νεκροτομικό υλικό αναφέρουν ότι 70% των περιπτώσεων παραμένουν αδιάγνωστες.

Η διαγνωστική προσέγγιση των ασθενών με ΚΑΠΕ περιλαμβάνει κλινικές και εργαστηριακές εξετάσεις, κυρίως παθολογοανατομική διάγνωση, απεικονιστικό έλεγχο και ενδοσκοπικές μελέτες. Οι καρκινικοί δείκτες στον ορό μπορεί να είναι ενδεικτικοί αλλά σε ορισμένες μόνο περιπτώσεις. Οι κλινικοί ογκολόγοι οφείλουν να ακολουθούν συγκεκριμένο αλγόριθμο για τον εντοπισμό του πρωτοπαθούς όγκου λαμβάνοντας υπόψιν το κόστος, όσον αφορά το χρόνο και τους οικονομικούς πόρους, όσο και το τελικό όφελος του ασθενή³⁹.

5.1 Διαγνωστικά παθολογοανατομικά στοιχεία

Σχολαστική ανοσοϊστοχημική μελέτη πρέπει να υφίσταται το βιοπτικό υλικό με στόχο να εντοπισθεί η πρωτοπαθής εστία και να αποκλεισθούν οι χημειοευαίσθητοι και δυνητικά θεραπεύσιμοι όγκοι όπως τα λεμφώματα ή οι όγκοι εκ γεννητικών κυττάρων. Αν η διάγνωση είναι καρκίνωμα ή αδenoκαρκίνωμα θετικό για χρώση του ειδικού προστατικού αντιγόνου (PSA) σε άνδρες ασθενείς και θετικό για υποδοχείς οιστρογόνων-προγεστερόνης σε γυναίκες ασθενείς με μεταστάσεις σε μασχαλιαίους λεμφαδένες, είναι απαραίτητο να αποκλεισθούν οι ορμονοευαίσθητοι όγκοι που ανταποκρίνονται σε συγκεκριμένη θεραπεία. Χρώση για κυτοκερατίνες CK7 και CK20 μπορούν να προσδώσουν ενδείξεις για μια πιθανή πρωτοπαθή εστία, χρώση για χρωμογρανίνη Α και συναπτοφυσίνη είναι απαραίτητη για να αναγνωρισθεί νευροενδοκρινική διαφοροποίηση. Προσφάτως, πλατφόρμες εκφρασης και γονιδιακής ανάλυσης είναι εμπορικά διαθέσιμες με σκοπό να ανιχνεύσουν την πρωτοπαθή εστία και πράγματι μπορούν να την εντοπίσουν σε ορισμένους ασθενείς. Ωστόσο, η επίπτωσή τους στην επιβίωση των ασθενών, μέσω της χρήσης θεραπείας ανάλογης της πρωτοπαθούς εστίας, παραμένει αμφισβητήσιμη και μη αποδεδειγμένη απο προοπτικές μελέτες⁴⁰.

Πίνακας 2. Έκφραση κυτοκερατινών σε διάφορα όργανα

Όργανο	Κυτοκερατίνες
Κόλον	CK7- / CK20+
Στόμαχος	CK7- / CK20+, CK7+ / CK20+
Χοληδόχος κύστη	CK7+ / CK20- , CK7+ / CK20+
Πάγκρεας	CK7+ / CK20- , CK7+ / CK20+
Πνεύμονας	CK7+ / CK20-
Ωοθήκες, μη-βλεννώδεις	CK7+ / CK20-
Ωοθήκες, βλεννώδεις	CK7- / CK20+ , CK7+ / CK20+
Μαστός	CK7+ / CK20-
Ουροθήλιο	CK7+ / CK20+
Ενδομήτριο	CK7+ / CK20-
Προστάτης	CK7- / CK20-
Νεφρός	CK7- / CK20-
Ήπαρ	CK7- / CK20-

Πίνακας 3. Ανοσοϊστοχημικές χρώσεις

Τύπος όγκου	Χρώση
Καρκίνωμα	Κυτοκερατίνες, EMA
Λέμφωμα	CLA, EMA
Σάρκωμα	Βιμεντίνη, Δεσμίνη, Αντιγόνο κατα του παραάγοντα VII
Μελάνωμα	S-100, HMB-45, Βιμεντίνη, NSE
Νευροενδοκρινής	Χρωμογρανίνη, Συναπτοφουσίνη, Κυτοκερατίνες, EMA, NSE
Γεννητικών κυττάρων	Κυτοκερατίνες, EMA, HCG, AFP
Προστάτης	PSA, Κυτοκερατίνες, EMA
Μαστός	Κυτοκερατίνες, EMA, ER, PR
Θυροειδής	Θυρεοσφαιρίνη, Κυτοκερατίνες, EMA, Καλσιτονίνη

EMA: επιθηλιακό μεμβρανικό αντιγόνο, CLA: κοινό αντιγόνο κατά των λευκοκυττάρων, NSE: ειδική των νευρώνων ενολάση, HCG: χοριακή γοναδοτροπίνη, AFP: α-φετοπροτεΐνη, PSA: ειδικό προστατικό αντιγόνο, ER: υποδοχείς οιστρογόνων, PR: υποδοχείς προγεστερόνης

5.2 Διαγνωστική απεικόνιση

Μια ακτινογραφία θώρακος ρουτίνας είναι τμήμα της αρχικής προσέγγισης του ασθενή με ΚΑΠΕ. Η αξονική τομογραφία (CT) κοιλίας και πυέλου οδηγεί στην ανεύρεση της πρωτοπαθούς εστίας στο 30-35% των ασθενών. Η αξία της αξονικής τομογραφίας θώρακος δεν έχει ακόμη πιστοποιηθεί. Επιπλέον, η αξονική τομογραφία συντελεί στη σταδιοποίηση της νόσου. Η μαστογραφία συνιστάται σε γυναίκες με μεταστατικό ανεδοκαρκίνωμα με συμμετοχή μασχαλιαίων λεμφαδένων ενώ η μαγνητική τομογραφία των μαστών είναι ιδιαίτερος ευαίσθητη στον εντοπισμό του μαστογραφικά δύσκολα ανιχνεύσιμου καρκίνου του μαστού. Το FDG-PET είναι μια χρήσιμη μοντέρνα τεχνική για την ανίχνευση κυρίως πρωτοπαθών εστιών με πλακώδη ιστολογία στην περιοχή της κεφαλής-τραχήλου. Επιπλέον παρέχει ουσιαστικές πληροφορίες που επηρεάζουν την θεραπευτική αντιμετώπιση ασθενών με μια μονήρη μετάσταση και για τους οποίους σημαντική επιλογή είναι η τοπική θεραπεία⁴¹.

5.3 Διαγνωστική ενδοσκόπηση

Οι ενδοσκοπικές μελέτες θα πρέπει να κατευθύνονται από την αντίστοιχη συμπτωματολογία. Επομένως, ασθενείς με συμπτώματα και σημεία από το αναπνευστικό σύστημα θα πρέπει να υποβληθούν σε βρογχοσκόπηση, αντιστοίχως ασθενείς με συμπτώματα από το γαστρεντερικό σύστημα θα πρέπει να υποβληθούν σε γαστροσκόπηση ή κολonosκόπηση, ενώ ασθενείς με μεταστατική νόσο στους βουβωνικούς λεμφαδένες θα πρέπει να υποβληθούν σε πρωκτοσκόπηση ή/και κολποσκόπηση³⁹.

5.4 Διαγνωστική αξία καρκινικών δεικτών του ορού

Η μελέτη των συνήθως χρησιμοποιούμενων καρκινικών δεικτών του ορού (CA 15-3, CA 125, CA 19-9, CEA) δεν έχει αποδειχθεί να παρέχει προγνωστική ή διαγνωστική βοήθεια. Ωστόσο, συγκεκριμένοι δείκτες θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε συγκεκριμένες ομάδες ασθενών με ΚΑΠΕ

όπως το CA 15-3 σε γυναίκες με διήθηση μασχαλιαίων λεμφαδένων, το CA 125 σε ασθενείς με ορώδη-θηλώδη περιτοναϊκή καρκινωμάτωση, β-HCG και AFP σε ασθενείς με προσβολή των λεμφαδένων στις μέσης γραμμής και PSA σε άνδρες με οστεοβλαστικές βλάβες¹.

6. ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΕΠΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Γενικά, οι ασθενείς που διαγιγνώσκονται με ΚΑΠΕ έχουν περιορισμένο προσδόκιμο επιβίωσης, περίπου 6-9 μήνες. Ωστόσο, κάποιες υποομάδες έχουν καλύτερη πρόγνωση και απολαμβάνουν μακρόχρονη επιβίωση. Οι αναλύσεις προγνωστικών και προβλεπτικών παραγόντων σε ασθενείς με ΚΑΠΕ έχουν συμπεριλάβει αρκετές κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους όπως την ηλικία, το φύλο, τη φυσική κατάσταση, την απώλεια βάρους, την ιστολογική διάγνωση, το φορτίο νόσου, τη θέση της μετάστασης, το πλήθος των μεταστατικών εστιών και τους καρκινικούς δείκτες. Συγκεκριμένοι θετικοί και αρνητικοί προγνωστικοί και προβλεπτικοί παράγοντες εντοπίστηκαν οι οποίοι συντέλεσαν στην κατάταξη των ασθενών στην ομάδα καλής ή κακής πρόγνωσης. Οι παράγοντες αυτοί είναι η ιστολογική διάγνωση (πτωχά-διαφοροποιημένο καρκίνωμα, πλακώδες καρκίνωμα, νευροενδοκρινικό καρκίνωμα), η λεμφαδενική συμμετοχή (εκτός των υπερκλειδίων), ο αριθμός των μεταστατικών εστιών (<2), το γυναικείο φύλο, η φυσική κατάσταση, η απώλεια βάρους και μερικοί δείκτες στον ορό (αλκαλική φωσφατάση, γαλακτική δεϋδρογονάση-LDH, CEA)^{6,15}.

Η μεσοψηφία των ασθενών με ΚΑΠΕ (15-20%) ανήκουν στην ομάδα της καλής πρόγνωσης. Αυτοί υποκρύπτουν χημειοευαίσθητους και δυνητικά θεραπεύσιμους όγκους και επιτυγχάνουν μακρύ έλεγχο της νόσου μετά από κατάλληλη διεπιστημονική αντιμετώπιση¹.

Δυστυχώς όμως, η πλειοψηφία των ασθενών (80-85%) δεν ανήκει στην προαναφερθείσα υποομάδα. Η ευαισθησία στην θεραπεία είναι μέτρια και η διάμεση επιβίωση είναι ένας χρόνος (6-10 μήνες). Δύο προγνωστικές υποομάδες μπορούν να προσδιοριστούν μεταξύ των ασθενών με κακής πρόγνωσης ΚΑΠΕ: η πρώτη χαρακτηρίζεται από καλή φυσική κατάσταση (performance status 0-1) και φυσιολογικά επίπεδα LDH με διάμεση επιβίωση το ένα ετος ενώ η δεύτερη χαρακτηρίζεται από την

παρουσία ενός ή κανενός απο τους προηγούμενους παράγοντες και η διάμεση επιβίωση των ασθενών είναι 4 μήνες^{2,40,42}.

Πίνακας 4. Υποομάδες του ΚΑΠΕ

Καλής πρόγνωσης	Πτωχής πρόγνωσης
1. Πτωχά διαφοροποιημένο καρκίνωμα με κατανομή μέσης γραμμής (εξωγοναδικό σύνδρομο)	1. Αδενοκαρκίνωμα μεταστατικό στο ήπαρ ή σε άλλα όργανα
2. Γυναίκες με θηλώδες αδενοκαρκίνωμα της περιτοναϊκής κοιλότητας	2. Μη-θηλώδης κακοήθης ασκίτης (αδενοκαρκίνωμα)
3. Γυναίκες με αδενοκαρκίνωμα που διηθεί μόνο τους μασχालιαίους λεμφαδένες	3. Πολλαπλές μεταστάσεις στον εγκέφαλο-παρεγκεφαλίδα (αδενοκαρκίνωμα ή πλακώδες καρκίνωμα)
4. Πλακώδες καρκίνωμα της κεφαλής-τραχήλου	4. Πολλαπλές πνευμονικές μεταστάσεις (αδενοκαρκίνωμα)
5. Μεμονωμένη βουβωνική λεμφαδενοπάθεια	5. Πολλαπλές μεταστάσεις στα οστά (αδενοκαρκίνωμα)
6. Πτωχά διαφοροποιημένα νευροενδοκρινικά καρκινώματα	
7. Άνδρες με βλαστικές οστικές μεταστάσεις και αυξημένο PSA	
8. Ασθενείς με μονήρη, μικρό και δυνητικά εξαιρέσιμο όγκο	

7. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Η θεραπευτική αντιμετώπιση θα πρέπει να εξατομικεύεται ανάλογα με την κλινικοπαθολογοανατομική ομάδα στην οποία ανήκει ο κάθε ασθενής. Το 10-15% των ασθενών με ΚΑΠΕ που ανήκουν στην υποομάδα της καλής πρόγνωσης αντιμετωπίζεται αντιστοίχως των ασθενών με μεταστατική νόσο γαστρής πρωτοπαθούς εστίας. Αυτοί οι ασθενείς απολαμβάνουν μακροχρόνιο έλεγχο της νόσου στο 30-60% των περιπτώσεων. Αναδρομικές μελέτες έχουν δείξει ότι η κλινική συμπεριφορά, η βιολογία, η απάντηση στη θεραπεία και η έκβαση των ασθενών με καλής πρόγνωσης ΚΑΠΕ είναι παρόμοια με αυτή των ασθενών με μεταστάσεις από γνωστό πρωτοπαθή όγκο^{25,31,43}.

Οι ασθενείς με κακής πρόγνωσης ΚΑΠΕ έχουν ζοφερή πρόγνωση ακόμη και όταν αντιμετωπισθούν με διάφορους χημειοθεραπευτικούς συνδυασμούς όπως έχει παρατηρηθεί μέσω κλινικών μελετών^{44,45}. Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση δεν απέδειξε ανωτερότητα στην αποτελεσματικότητα οποιουδήποτε χρησιμοποιούμενου σχήματος που περιλαμβάνει πλατίνα, ταξάνες ή νεώτερους κυτταροτοξικούς παράγοντες (γεμισιταβίνη, αλκαλοειδή της vinca, ιρινοτεκάνη)⁴⁶. Ο μοναδικός ρεαλιστικός στόχος σε αυτούς τους ασθενείς επί του παρόντος είναι η παράταση της επιβίωσης με όσο το δυνατόν έλεγχο των συμπτωμάτων και διατήρηση της ποιότητας ζωής. Συνεπώς, σχήματα με τη λιγότερη τοξικότητα προτιμούνται σε ασθενείς που η φυσική τους κατάσταση το επιτρέπει να λάβουν χημειοθεραπεία.

Το αν οι ασθενείς με ΚΑΠΕ μπορούν να λάβουν στοχευτικούς παράγοντες ακόμη δεν έχει διευκρινισθεί⁴⁷. Πρώιμα δεδομένα από αναδρομικές μελέτες έχουν δείξει ότι ασθενείς με ΚΑΠΕ οι οποίοι ανοσοϊστοχημικά ή μέσω κάποιας μοριακής πλατφόρμας έχουν διαγνωσθεί με «κολοορθικό» καρκίνωμα, έχουν απαντήσει σε σχήματα που δίνονται σε ασθενείς με γνωστό κολοορθικό καρκίνο (FOLFOX, FOLFIRI)⁴⁸. Ωστόσο, αυτά τα δεδομένα προέρχονται από μικρό δείγμα ασθενών και προοπτικές μελέτες απαιτούνται για περαιτέρω επιβεβαίωση των ευρημάτων αυτών.

Επιπλέον, οι ασθενείς με ΚΑΠΕ θα πρέπει να ενθαρρύνονται ως προς τη συμμετοχή τους σε κλινικές μελέτες με συνδυασμό κυτταροτοξικών – στοχευτικών παραγόντων ή με χορήγηση θεραπείας ανάλογης της πιθανής πρωτοπαθούς εστίας αν αυτή έχει ανευρεθεί μετά απο ανοσοϊστοχημική ή μοριακή ανάλυση^{49,50}.

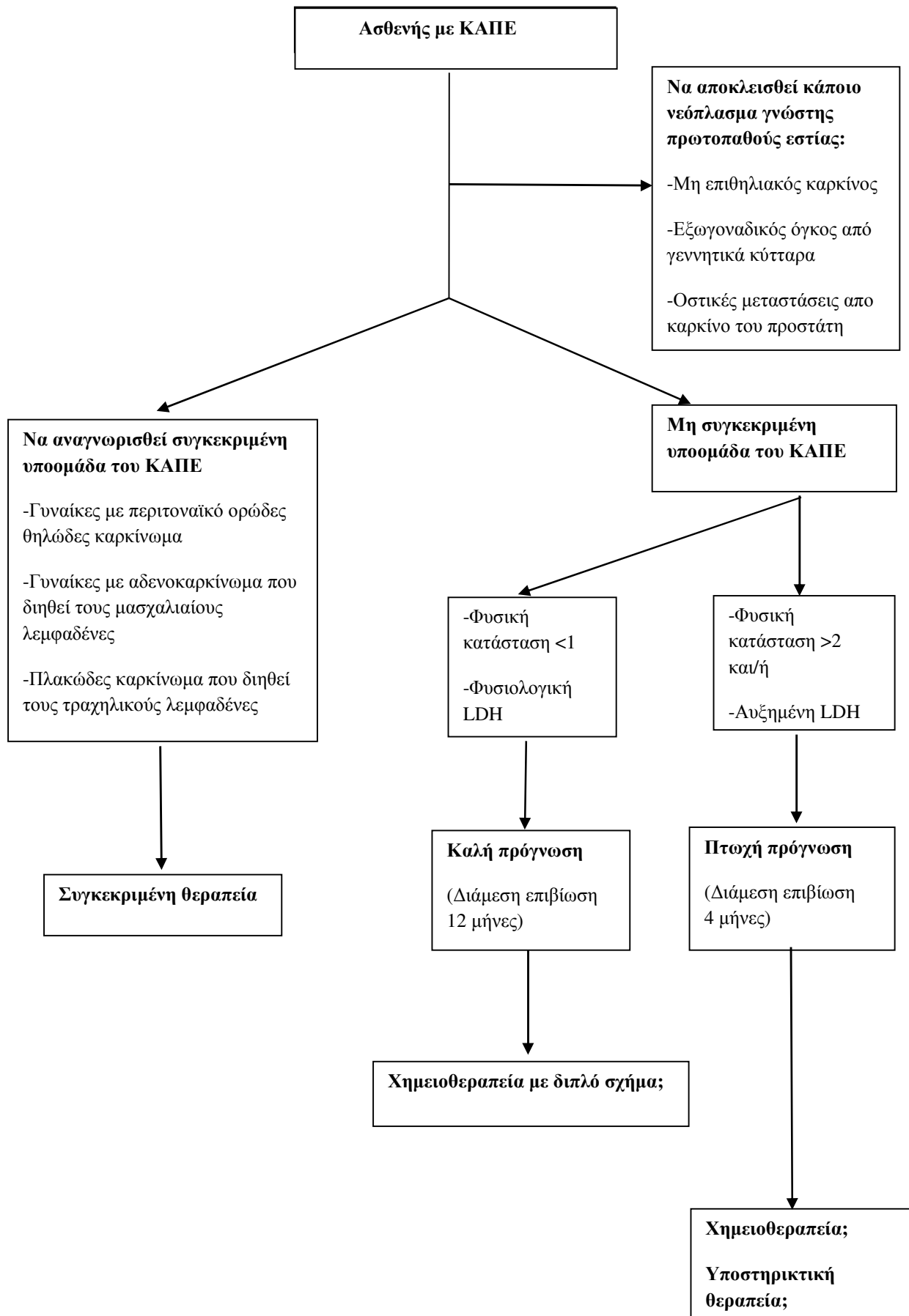
Πίνακας 5. Θεραπεία ασθενών με καλής πρόγνωσης ΚΑΠΕ

Υποομάδα ΚΑΠΕ	Προτεινόμενη θεραπεία	Δυνητικά ισοδύναμος όγκος
Πτωχά διαφοροποιημένα νευροενδοκρινικά καρκινώματα αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας	Πλατίνα - ετοποσίδη	Πτωχά διαφοροποιημένος νευροενδοκρινικός όγκος γνωστής πρωτοπαθούς εστίας
Καλά διαφοροποιημένοι νευροενδοκρινικοί όγκοι αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας	Ανάλογα σωματοστατίνης, στρεπτοζοκίνη, 5-φθοροουρακίλη, σουνιτινίμη, εβερόλιμους	
Περιτοναϊκή αδενοκαρκινωμάτωση θηλώδους-ορώδους ιστολογίας σε γυναίκες	Χειρουργική αντιμετώπιση ακολουθούμενη αποχημειοθεραπεία με πλατίνα-ταξάνες	Καρκίνος ωοθηκών
Μεμονωμένες μεταστάσεις σε μασχालιαίους λεμφαδένες σε γυναίκες	Χειρουργική εκτομή λεμφαδένων, μαστεκτομή ή ακτινοβολία μαστού και επικουρική χημειοορμονοθεραπεία	Καρκίνος μαστού (ανευρίσκεται στο 50-70% μετά απο Μαγνητική τομογραφία)
Πλακώδες καρκίνωμα στους τραχηλικούς (όχι υπερκλειδίους) λεμφαδένες	Χειρουργική εκτομή ή/και ακτινοβολία. Σε προχωρημένα στάδια χημειοθεραπεία εισαγωγής με πλατίνα ή χήμειο-άκτινοθεραπεία	Πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής-τραχήλου
Μονήρης μεταστατική εστία αγνώστου πρωτοπαθούς	Χειρουργική εκτομή ή/και ακτινοθεραπεία ± συστηματική θεραπεία	Μονήρης μετάσταση
Άνδρες με βλαστικές οστικές μεταστάσεις και αυξημένο PSA	Θεραπεία καταστολής ανδρογόνων ± ακτινοθεραπεία	Καρκίνος προστάτη
ΚΑΠΕ μέσης γραμμής	Χημειοθεραπεία βασισμένη στην πλατίνα	Εξωγοναδικό σύνδρομο

Πίνακας 6. Συχνά χορηγούμενα σχήματα παρηγορικής χημειοθεραπείας σε ασθενείς με πτωχής πρόγνωσης ΚΑΠΕ

Χημειοθεραπεία	Χρόνος	Διάστημα	Σχόλια
Σισπλατίνη 60-75 Γεμισταβίνη 1000	Ημέρα 1 Ημέρες 1 και 8	Ανά 3 εβδομάδες	Ασθενείς με καλή φυσική κατάσταση, απαιτείται καλή ενυδάτωση
Σισπλατίνη 75 Ετοποσίδη 100	Ημέρα 1 Ημέρες 1-3	Ανά 3 εβδομάδες	Ασθενείς με καλή φυσική κατάσταση, νευροενδοκρινικά χαρακτηριστικά, απαιτείται καλή ενυδάτωση
Πακλιταξέλη 175 Καρμποπλατίνη AUC 5	Ημέρα 1	Ανά 3 εβδομάδες	Νευροτοξικότητα
Δοσιταξέλη 75 Καρμποπλατίνη AUC 5	Ημέρα 1	Ανά 3 εβδομάδες	Νευροτοξικότητα
Ιρινοτεκάνη 160 Οξαλιπλατίνη 80	Ημέρα 1	Ανά 3 εβδομάδες	Νευροτοξικότητα, διάρροιες
Καμπεσιταμπίνη 2000 p.os Οξαλιπλατίνη 85-130 Γεμισταμπίνη 1000 / Ιρινοτεκάνη 100	Ημέρες 1-14 Ημέρα 1 Ημέρες 1 και 8	Ανά 3 εβδομάδες Ανά 3 εβδομάδες	Διάρροιες, νευροτοξικότητα

Σχήμα 1. Κλινικός αλγόριθμος αντιμετώπισης ασθενών με ΚΑΠΕ



B. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΠΕ

Οι προσπάθειες ώστε να αναδειχθεί η μοριακή βιολογία του ΚΑΠΕ αρχικά επικεντρώθηκαν στις χρωμοσωμικές ανωμαλίες, την ανοσοϊστοχημική μελέτη έκφρασης πρωτεϊνών και την ανεύρεση μεταλλάξεων ενός ή περισσότερων γονιδίων. Πίσω από αυτές τις προσπάθειες ωστόσο παραμένει η πεποίθηση ότι η απορρύθμιση ενός ή περισσότερων γονιδίων και κατά συνέπεια και των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν είναι αυτή που οδηγεί στην συστηματική διασπορά και την υποστροφή της πρωτοπαθούς εστίας. Η πλειοψηφία αυτών των απλουστευμένων υποθέσεων δεν έχει επιβεβαιωθεί δεδομένου ότι οι ερευνητικές προσπάθειες δεν ανέδειξαν ούτε σταθερές ούτε συγκεκριμένες μεταλλάξεις γονιδίων ή πρωτεϊνών που να είναι απαραίτητες για την ανάπτυξη και επιβίωση ενός κακοήθους κλώνου με αυξημένη μεταστατική τάση.

1. ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΕΣ ΑΝΩΜΑΛΙΕΣ

Χρωμοσωμική αστάθεια (ανευπλοϊδία) έχει ανευρεθεί στο 70-90% των συμπαγών όγκων και πιθανώς αντικατοπτρίζει κάποια διαταραχή της χρωμοσωμικής αντιγραφής κατά τη διάρκεια του κυτταρικού πολλαπλασιασμού⁵¹.

Χρωμοσωμικές ανωμαλίες έχουν εντοπισθεί στο κοντό σκέλος του χρωμοσώματος 1 που περιλαμβάνουν διαγραφή του 1p, μεταθέσεις με σημείο αναφοράς το 1p, ισοχρωμόσωμα 1q και ενδείξεις γονιδικής ενίσχυσης. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν διαπιστωθεί και σε άλλους προχωρημένους όγκους. Επίσης ανάλογες ανωμαλίες έχουν εντοπισθεί και στο κοντό σκέλος του χρωμοσώματος 12. Το ισοχρωμόσωμα i(12)p ή μια διαγραφή εντός του 12p- ενός χρωμοσωμικού δείκτη γεννητικών κυττάρων- έχει παρατηρηθεί στο 25% των ασθενών με πτωχά διαφοροποιημένα καρκινώματα με, κυρίως, λεμφαδενική διασπορά. Επιπλέον, η παρουσία του i(12)p είναι προβλεπτικός παράγοντας απάντησης στη θεραπεία με πλατίνα, γεγονός που το καθιστά σημαντικό δείκτη παρακολούθησης ασθενών με λεμφαδενικές μεταστάσεις μέσης γραμμής αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας^{52,53}.

Ο συγκριτικός γενωμικός υβριδισμός, λοιπόν, θα μπορούσε να αποβεί πολύ πιο ευαίσθητο εργαλείο από την ανάλυση του καρυότυπου για την κατηγοριοποίηση των ΚΑΠΕ στα αντίστοιχα καρκινώματα γνωστής πρωτοπαθούς εστίας⁵⁴.

2. ΟΓΚΟΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Τα ογκογονίδια υπερεκφράζονται ή ενισχύονται σε πολλούς συμπαγείς όγκους. Οι κωδικοποιημένες πρωτεΐνες προωθούν την κακοήγη μετατροπή και επιβίωση ενεργοποιώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επάγοντας την κυτταρική μετανάστευση, εμποδίζοντας την απόπτωση, και προάγοντας την νεοαγγειογένεση.

Πρόσφατες μελέτες έχουν αποδείξει την υπερέκφραση των c-Myc, Ras και HER-2 ογκοπρωτεϊνών στο ένα τέταρτο με ένα τρίτο των ασθενών με ΚΑΠΕ και δημιουργούν μια αισιοδοξία ως προς τον εντοπισμό των ασθενών με το συγκεκριμένο προφίλ ώστε να αντιμετωπισθούν με στοχευτικούς παράγοντες αυτών των μορίων^{55,56,57,58}.

Ο EGFR προσφάτως τέθηκε υπό προσεκτική μελέτη λόγω του ρόλου του στην κακοήγη μετατροπή. Η προγνωστική αξία της χρήσης EGFR ανταγωνιστών των τυροσινικών κινασών (TKIs) σε ασθενείς με καρκίνο του πνεύμονα με μετάλλαξη των εξωνίων 18-21 πυροδότησε τη μελέτη της έκφρασής του και στα ΚΑΠΕ. Ωστόσο σε πρόσφατες μελέτες υπερέκφραση του EGFR παρατηρήθηκε σε χαμηλό ποσοστό ασθενών με ΚΑΠΕ ενώ τελικά καμία δεν κατόρθωσε να αναδείξει στατιστικά σημαντικό συσχετισμό της έκφρασης του EGFR με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους, απάντηση στη θεραπεία και ολική επιβίωση^{59,60}.

Το c-Kit και ο υποδοχέας του αυξητικού παράγοντα των αιμοπεταλίων (PDGFR) είναι δύο διαμεμβρανικοί υποδοχείς σήματος προς κυτταρικό πολλαπλασιασμό, αγγειογένεση και αναστολή απόπτωσης. Μεταλλάξεις αυτών των υποδοχέων πυροδοτούν νεοπλαστική διαφοροποίηση των στρωματικών όγκων του γαστρεντερικού (GISTs), οι οποίοι όμως καθίστανται ιδιαίτερα ευαίσθητοι στους αναστολείς τυροσινικών κινασών (TKIs) έναντι των c-Kit/PDGFR. Δυστυχώς, ανάλογη δράση των συγκεκριμένων μεταγωγέων σήματος δεν παρατηρήθηκε στην παθογένεση των ΚΑΠΕ, Συνεπώς, η αναστολή της δράσης των c-Kit τυροσινικών κινασών δυνητικά δεν βελτιώνει την πτωχή πρόγνωση των ασθενών με ΚΑΠΕ⁶¹.

Αντιστοίχως, η μελέτη της έκφρασης την αντιαποπτωτικής πρωτεΐνης Bcl-2 σε ασθενείς με ΚΑΠΕ δεν έδειξε προγνωστική αξία παρά την υπερέκφρασή της στο 40% των ασθενών. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η αντιαποπτωτική δράση της Bcl-2 παραμένει σημαντική σε μια υποομάδα του ΚΑΠΕ σε αντίθεση με άλλες προχωρημένου σταδίου κακοήθειες οι οποίες χάνουν την Bcl-2 έκφραση νωρίς κατά την εξέλιξη του καρκινικού κλώνου⁶².

3. ΟΓΚΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ΓΟΝΙΔΙΑ ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες που καταστέλλουν την κακοήγη μετατροπή, την επιβίωση και τη μεταστατική διασπορά διατηρώντας αναλλοίωτο το κυτταρικό DNA και ρυθμίζοντας τον κυτταρικό κύκλο. Το p53, το λεγόμενο και «προστάτης του γονιδιώματος», είναι αυτό που έχει μελετηθεί περισσότερο, εμφανίζοντας ανοσοϊστοχημική έκφραση της p53 πρωτεΐνης στο 55% των όγκων⁶³.

Σε πρόσφατη ανοσοϊστοχημική μελέτη σε 47 ασθενείς με ΚΑΠΕ, περίπου οι μισοί όγκοι (53%) εξέφραζαν την p53 πρωτεΐνη. Η έκφραση αυτή από μόνη της δεν είχε προγνωστική αξία αλλά σε συνδυασμό με υπερέκφραση της Bcl-2 (20% των όγκων) ήταν προβλεπτικός παράγοντας απάντησης στη θεραπεία με πλατίνα⁶². Μια άλλη μελέτη, ωστόσο, που μελέτησε τις μεταλλάξεις των εξωνίων 5-9 του p53 μέσω PCR σε 15 ασθενείς με ΚΑΠΕ, έδειξε χαμηλό ποσοστό μεταλλάξεων (26%) του p53 σε αυτούς τους έντονα μετστατικούς ανευπλοϊδικούς όγκους⁶⁴. Η ασυμφωνία αυτή δυνητικά οφείλεται στην διαφορετική ειδικότητα των αντισωμάτων έναντι των wild-type ή των μεταλλαγμένων προϊόντων του p53, την εμφάνιση μεταλλάξεων εκτός των εξωνίων 5-9 καθώς και στη διαφορετική δράση των ρυθμιστικών παραγόντων του p53 (MDM-2, p14, p21)⁶⁵.

Γονίδια που καταστέλλουν την μετάσταση έχουν επίσης προσφάτως αναγνωρισθεί. Στόχος τους είναι να ρυθμίζουν την ικανότητα του καοήγη κλώνου να μεθίσταται και να εμποδίζουν την ανάπτυξή του σε απομακρυσμένους ιστούς. Μέχρι σήμερα περίπου 14 τέτοια γονίδια έχουν εντοπισθεί με το KiSS-1 να είναι αυτό που έχει διερευνηθεί περισσότερο⁶⁶. Απώλεια της δράσης του KiSS-1 έχει συσχετισθεί σε συμπαγείς όγκους με αυξημένο στάδιο, υψηλό φορτίο όγκου και πτωχή πρόγνωση⁶⁷. Σε 50 ασθενείς

με ΚΑΠΕ, ωστόσο, PCR μελέτες απέδειξαν μετάλλαξη του γονιδίου του KiSS-1 μόνο σε έναν ασθενή. Συνεπώς, η έντονα μεταστατική τάση των ΚΑΠΕ πιθανώς να ορίζεται από δυσλειτουργία άλλων ογκοκατασταλτικών γονιδίων ή άλλων γονιδίων που καταστέλλουν την μετάσταση πέραν του KiSS-1⁶⁸.

4. ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗ

Η αγγειογένεση ορίζεται ως η διαδικασία σχηματισμού νέων αγγείων από τα οποία ο όγκος τρέφεται, αναπτύσσεται και μεθίσταται. Η εμφάνιση ενός αγγειογενετικού κλώνου ο οποίος διασπείρεται συστηματικά ενώ η πρωτοπαθής εστία υποστρέφει, είναι μία ελκυστική υπόθεση για την ανάπτυξη των ΚΑΠΕ⁶⁹.

Πρόσφατη μελέτη της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης του CD34 (δείκτης πυκνότητας της μικροαγγείωσης) δεν τον ανέδειξε ως προγνωστικό παράγοντα ασθενών με ΚΑΠΕ⁷⁰. Άλλη μελέτη ανέδειξε ισχυρή έκφραση του VEGF και της θρομβοσποντίνης-1 (TSP-1) στο 80% και 20% ασθενών με ΚΑΠΕ αντίστοιχα. Καμία από τις δύο πρωτεΐνες δεν συσχετίστηκε με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους ενώ η πυκνότητα της μικροαγγείωσης ήταν μεγαλύτερη στην υποομάδα πτωχής πρόγνωσης του ΚΑΠΕ⁷¹. Η ίδια ομάδα έδειξε υπερέκφραση των μεταλλοπρωτεασών 2 και 9 (MMP-2, MMP-9), οι οποίες είναι βασικοί ρυθμιστές της αποδόμησης του εξωκυττάριου στρώματος, στο 49% και 36% αντιστοίχως 75 ασθενών με ΚΑΠΕ. Η έκφρασή τους και εδώ ήταν μεγαλύτερη σε ασθενείς με πτωχής πρόγνωσης ΚΑΠΕ και συσχετίστηκε με χαμηλότερη επιβίωση⁷².

Τα γενικότερα δεδομένα δημιουργούν την εικόνα μιας έντονης αγγειογενετικής τάσης στα ΚΑΠΕ. Αν και δεν διαφέρουν αρκετά από αυτά μελετών σε προχωρημένου σταδίου όγκους γνωστής πρωτοπαθούς εστίας, παρέχουν ένα σταθερό υπόβαθρο για την χρήση αντί-αγγειογενετικών παραγόντων στην κλινική θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με ΚΑΠΕ.

5. ΠΡΟΦΙΛ ΠΟΛΥΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

Η τεχνολογική πρόοδος κατά της δεκαετία του 1990 επέβαλε τη μετάβαση από τη μελέτη μεμονωμένων γονιδίων στην ταυτόχρονη μελέτη χιλιάδων γονιδίων ή προϊόντων τους σε έναν ιστό. Μικροσυστοιχίες συμπληρωματικού DNA ή ολιγονουκλεοτιδίων, πλατφόρμες σειριακής ανάλυσης έκφρασης γονιδίων (SAGE) και πρωτεϊνικές μικροσυστοιχίες είναι δυνατά όπλα στην αναγνώριση νέων υποομάδων του ΚΑΠΕ, στην προσπάθεια συσχέτισής του με την πιθανή αντίστοιχη γνωστή πρωτοπαθή εστία και στην ανεύρεση μιας κοινής μοριακής υπογραφής.

Δύο διαφορετικές υποθέσεις που στηρίζονται μεθοδολογικά στη χρήση νουκλεϊνικών οξέων ή πρωτεϊνικών μικροσυστοιχιών, υπόκεινται στο εκάστοτε ερευνητικό σκεπτικό. Σύμφωνα με την πρώτη, ο κάθε τύπος επιθηλίου έχει διαφορετική βιολογική λειτουργία και συνεπώς εκφράζει διαφορετικά γονίδια τα οποία συσχετίζονται με τη λειτουργία αυτή. Η διατήρηση αυτής της ειδικής για κάθε ιστό γονιδιακής έκφρασης κατά την καρκινογένεση μπορεί να κατηγοριοποιήσει κάθε ΚΑΠΕ στην αντίστοιχη πρωτοπαθή εστία. Επιπλέον, τα πρότυπα γονιδιακής έκφρασης των μεταστατικών εστιών προσομοιάζουν περισσότερο με αυτά της πρωτοπαθούς εστίας σε σχέση με άλλα αδενοκαρκινώματα από διαφορετικούς πρωτοπαθείς όγκους. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι πολλοί καρκίνοι διατηρούν τη γενετική ταυτότητα του ιστού προέλευσης και κατά τη διάρκεια της μεταστατικής εξέλιξης^{73,74}.

Η εναλλακτική υπόθεση υποστηρίζει ότι τα ΚΑΠΕ δεν εμφανίζουν γονιδιακή έκφραση αναλόγως του ιστού προέλευσης αλλά έχουν ένα κοινό πρότυπο πολυγονιδιακής έκφρασης, μοναδικό για την ανάπτυξη εξ' αρχής μεταστατικής νόσου⁷⁵. Παρά το γεγονός ότι οι λευχαιμίες, τα λεμφώματα, τα μεσοθηλιώματα και οι όγκοι του κεντρικού νευρικού συστήματος έχουν ήδη κατηγοριοποιηθεί ανάλογα με την ιστολογία και τον ιστό προέλευσης, τα αδενοκαρκινώματα δεν ταυτοποιούνται αναλόγως της πρωτοπαθούς εστίας. Επιπροσθέτως, οι χαμηλής διαφοροποίησης όγκοι δεν μπορούν να κατηγοριοποιηθούν μέσω της πολυγονιδιακής τους έκφρασης σε κάποιον ιστό προέλευσης, αναδεικνύοντας έτσι το γεγονός ότι οι πτωχά διαφοροποιημένες

κακοήθειες διαθέτουν ριζικά ξεχωριστά πρότυπα γονιδιακής έκφρασης αντί απλά να στερούνται κάποιων δεικτών διαφοροποίησης⁷⁶.

Δεδομένου του κόστους, των τεχνικών και διαχειριστικών προβλημάτων που χαρακτηρίζουν τη διαγνωστική χρήση μικροσυστοιχιών, τέτοιου είδους απλές και εύχρηστες μέθοδοι μπορούν να αποδειχθούν ως ένας χρήσιμος συνδυασμός του επιστημονικά διαθέσιμου με το ρεαλιστικά εφικτό.

Γ. ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ (EMT)

Η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή είναι σημείο-κλειδί κατά την εμβρυϊκή μορφογένεση ενώ φαίνεται ότι εμπλέκεται και στην δημιουργία απομακρυσμένων μεταστάσεων καθώς και στην απόκτηση χαρακτήρων αρχέγονων πολυδύναμων κυττάρων (stem-cell properties). Πρόσφατες μελέτες συντέλεσαν περισσότερο στην κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που ρυθμίζουν την EMT και οδηγούν σε πιο αδιαφοροποίητους όγκους. Δεδομένης της κλινικής σημασίας των διαδικασιών που επάγουν την EMT, η αναστολή τους μοιάζει να είναι μία ελκυστική θεραπευτική επιλογή με δυνητικά σημαντική επίπτωση στην επιβίωση.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

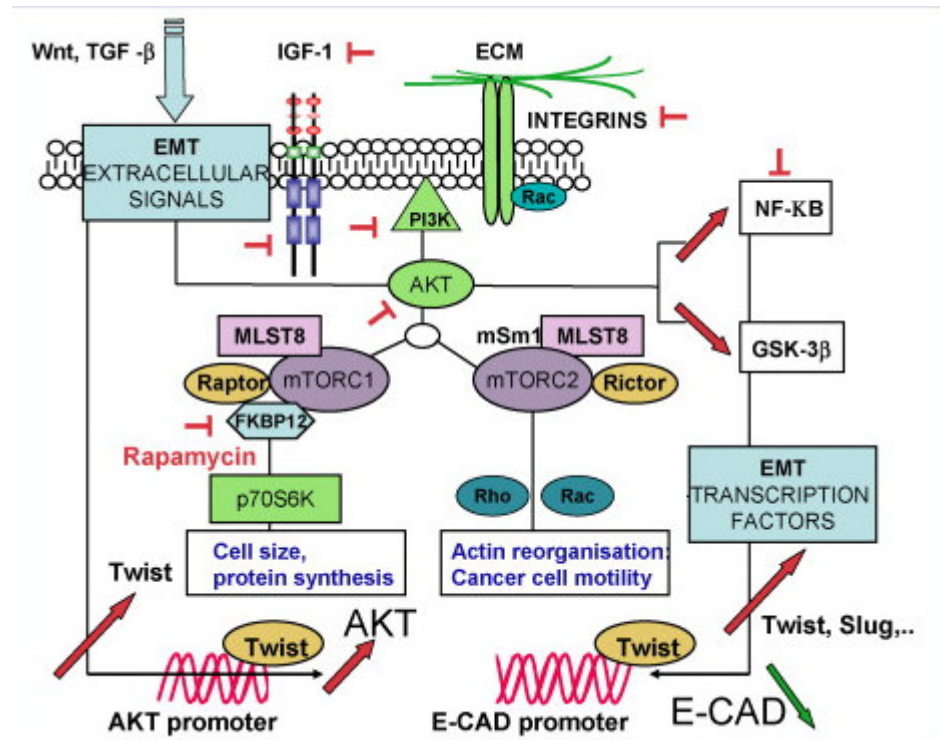
Η εξέλιξη των πολυκύτταρων οργανισμών επέτρεψε την ανάπτυξη ειδικών κυτταρικών τύπων καθώς και την διαποικίληση των κυτταρικών φαινότυπων. Ένας από τους πιο αρχέγονους διαχωρισμούς στον κυτταρικό φαινότυπο των πρόωρων οργανισμών είναι η διάκριση μεταξύ επιθηλιακών και μεσεγχυματικών κυττάρων. Τα επιθηλιακά κύτταρα παρέχουν την κύτταρο-προς-κύτταρο συνοχή η οποία είναι απαραίτητη στην διατήρηση της ακεραιότητας του πολυκύτταρου οργανισμού και λειτουργούν ως φυσικός φραγμός που επιτρέπει στο εσωτερικό περιβάλλον του κυττάρου να ρυθμίζεται και να δρα ανεξάρτητα από το εξωτερικό. Ωστόσο, η ανάπτυξη πιο πολύπλοκων δομών και λειτουργιών απαιτεί την ευελιξία την οποία παρέχει ένας άλλος τύπος κυττάρων, τα μεσεγχυματικά. Τα κύτταρα που διαθέτουν μεσεγχυματικό φαινότυπο προσφέρουν δομική στήριξη στα επιθηλιακά, κυρίως μέσω της παραγωγής του εξωκυττάρου στρώματος, και σε αντίθεση με τα σταθερά και ακίνητα επιθηλιακά, είναι πολύ κινητικά και διεισδυτικά⁷⁷.

Ο καρκίνος είναι μία πολύπλοκη ασθένεια κατά της οποίας τα θηλαστικά έχουν αναπτύξει ποικίλους αμυντικούς μηχανισμούς. Ο τελικού σταδίου καρκίνος είναι απόλυτα συνυφασμένος με τη μεταστατική νόσο. Ο σχηματισμός μεταστάσεων απαιτεί έναν «καταρράκτη» βημάτων που τελικά οδηγούν στη δημιουργία δευτεροπαθών εστιών σε απομακρυσμένα σημεία σε σχέση με την πρωτοπαθή. Μία διαδικασία που μεσολαβεί στην πρώτη φάση σχηματισμού της μετάστασης είναι η επιθηλιακή προς μεσεγχυματική μετατροπή (EMT). Ο όρος αυτός αναφέρεται σε ένα πολύπλοκο σύνολο μοριακού και κυτταρικού

επαναπρογραμματισμού κατά τον οποίο τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν τα διαφοροποιημένα χαρακτηριστικά τους, όπως η συνοχή, η πολικότητα και η σταθερότητα, και αποκτούν μεσεγγυματικούς χαρακτήρες όπως η κινητικότητα, η διεισδυτικότητα και η αντίσταση στην απόπτωση⁷⁸.

Η EMT, όπως και η αντίστροφη διαδικασία-μεσεγγυματική προς επιθηλιακή μετατροπή (MET), έχουν διεξοδικά μελετηθεί στην ανάπτυξη των θηλαστικών, όπου πολυάριθμες εμβρυϊκές διαδικασίες όπως και η οργανογένεση εξαρτώνται από την μεταβολή του επιθηλιακού σε μεσεγγυματικό φαινότυπο, παραδείγματος χάριν η γαστριδίωση, ο σχηματισμός της υπερώας, η νεφρογένεση, η μυογένεση, ο σχηματισμός των καρδιακών βαλβίδων και της νευρικής ακρολοφίας. Μια βασική διαφορά όμως μεταξύ των εβρυϊκών διεργασιών και της ογκογένεσης είναι ότι στη δεύτερη περίπτωση εμπλέκονται γενετικά μη φυσιολογικά κύτταρα τα οποία προοδευτικά χάνουν την απαντητικότητά τους στα ρυθμιστικά σήματα και αποκτούν την ικανότητα άμετρης εξέλιξης. Η εξέλιξη αυτή είναι αποτέλεσμα τόσο της επίκτητης γενετικής και επιγενετικής αστάθειας των καρκινικών κυττάρων όσο και των βιολογικών αλλαγών που προκαλούνται σε αυτά μέσω των σημάτων που λαμβάνουν από το μικροπεριβάλλον του στρώματος. Κατά την EMT, διάφορες επιθηλιακές πρωτεΐνες όπως η E-καντχερίνη, α-, β- και γ-κατενίνη υποεκφράζονται ενώ άλλες μεσεγγυματικές πρωτεΐνες όπως η βιμεντίνη, η φιμπρονεκτίνη και η ακτίνη των λείων μυϊκών ινών υπερεκφράζονται⁷⁹. Ωστόσο, το πιο σημαντικό χαρακτηριστικό της EMT είναι η υποέκφραση της E-καντχερίνης. Αυτή η γλυκοπρωτεΐνη μπορεί να κατασταλεί από δύο τύπους μεταγραφικών παραγόντων, τους έλικα-βρόχος-έλικα (helix-loop-helix) μεταγραφικούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων των E12/E47, Twist1 και Twist2 καθώς και τους μεταγραφικούς παράγοντες με δακτύλιο ψευδαργύρου (zinc finger), συμπεριλαμβανομένου του Snail και της Zeb οικογένεια. Η EMT επάγεται από διάφορα ογκογονίδια όπως το RAS, Erb2 και TrkB τα οποία ενεργοποιούν πολλαπλούς παράγοντες, κινάσες, καθώς και τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος Wnt, Notch και NFκB⁸⁰. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι μη κωδικοποιούντα RNAs τα οποία μετά-μεταγραφικά ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων, όπως η miR-200 και miR-205 οικογένεια, είναι σημαντικοί διαμεσολαβητές της EMT και ενισχυτές του επιθηλιακού φαινότυπου⁸¹. Επίσης κατά τη διαδικασία σχηματισμού μεταστάσεων, μέσω της EMT, τα καρκινικά

κύτταρα αποκτούν την ικανότητα αυτοανανέωσης, ανάλογη με αυτή που αποκτούν τα αρχέγονα πολυδύναμα κύτταρα όταν αναπαράγονται για να δημιουργήσουν μακροσκοπικές μεταστάσεις. Διαφορετικά δεδομένα από διαφορετικές μελέτες εισηγούνται έναν πιθανό συσχετισμό μεταξύ των λιγότερο διαφοροποιημένων αρχέγονων κυττάρων και των κυττάρων που έχουν αποκτήσει, μετά από EMT, μεσεγχυματικό φαινότυπο⁸².



Εικόνα 1. Επιθηλιακή προς μεσεγχυματική Μετατροπή

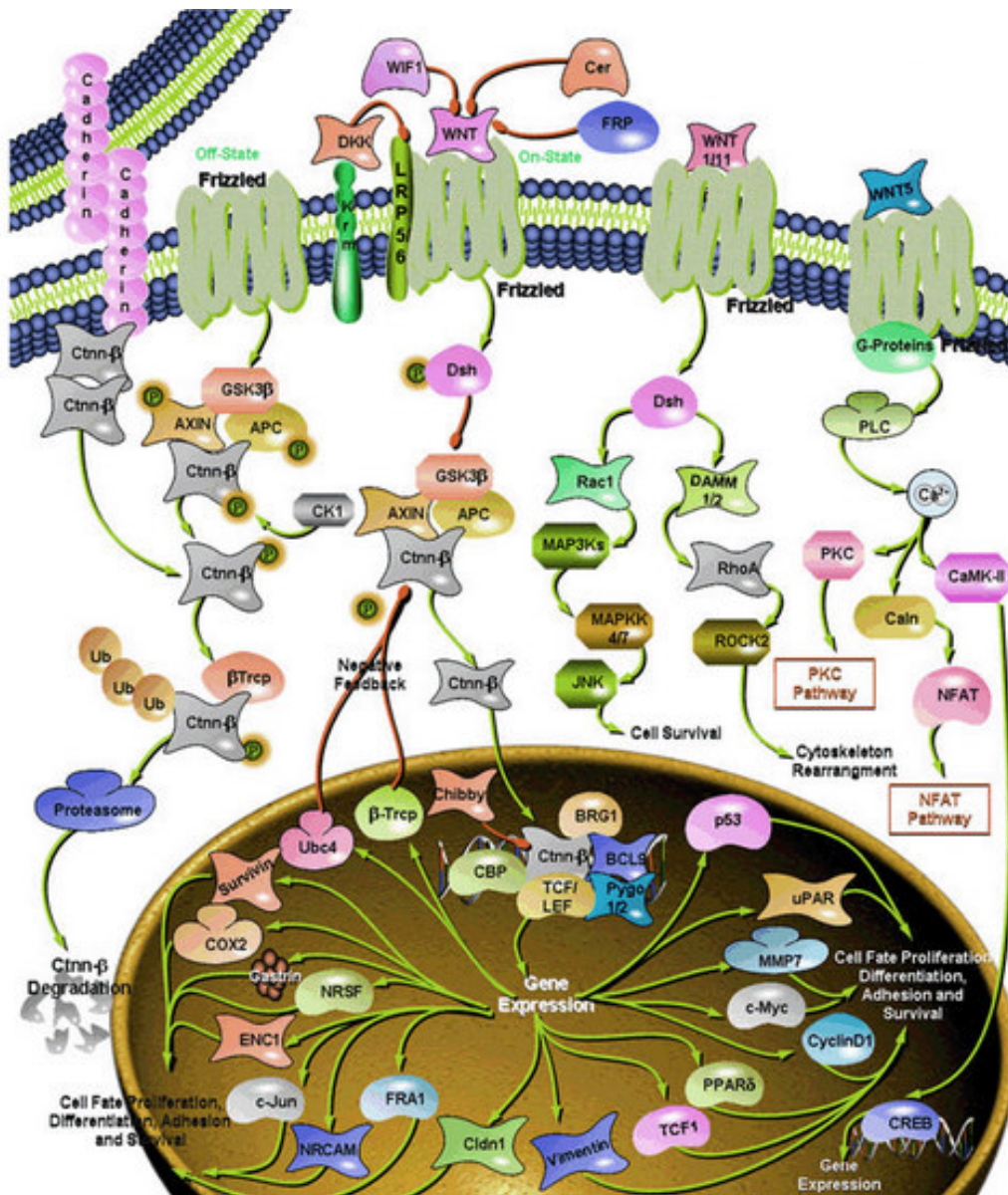
2. ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗ

Μοριακές αναλύσεις, οι οποίες στηρήχθηκαν στη μελέτη της EMT και MET κατά την ιστογένεση και οργανογένεση ποντικών, οδήγησαν στον εντοπισμό γονιδίων απαραίτητων για αυτές τις διαδικασίες. Αλληλεπιδράσεις μεταξύ των TGF (Transforming Growth Factor), Notch-, Wnt- και TK (Tyrosine Kinase) μονοπατιών μεταγωγής σήματος, ορχηστρώνουν την EMT τόσο όσον αφορά την μορφογένεση όσο και την ανάπτυξη του όγκου. Η πιο πρόωμη διαδικασία EMT στην εμβρυϊκή ανάπτυξη είναι ο σχηματισμός

μεσεγχυματικών κυττάρων και μεσοδέρματος κατά τη γαστριδίωση, μέσω της διάσπασης της βασικής μεμβράνης. Στη συνέχεια, η δράση του παράγοντα ανάπτυξης των ινοβλαστών-FGF(Fibroblast Growth Factor)-στα κύτταρα επιφέρει την υπερέκφραση του zinc finger παράγοντα Snail, την υποέκφραση της E-καντχερίνης και την αποσταθεροποίηση των κύτταρο-προς-κύτταρο συνδέσεων. Στο επόμενο στάδιο, κατά την νευριδίωση, η μοριακή βάση της EMT συσχετίζεται και πάλι με την έκφραση του παράγοντα παρεμπόδισης της E-καντχερίνης, Snail, ο οποίος υπόκειται στον έλεγχο άλλων παραγόντων μεταγωγής σήματος όπως η πρωτεΐνη μορφοποίησης των οστών (BMP- Bone Morphogenic Protein), ο Wnt και ο FGF. Κατά την ανάπτυξη της καρδιάς, των σκελετικών μυών και της σκληράς υπερώας, η EMT προάγεται από τον TGF-β, BMP, β-catenin, Msx1/2, Slug, Twist και Pax3 μεταξύ άλλων παραγόντων. Οι ίδιοι ρυθμιστικοί μηχανισμοί που μετατρέπουν τα επιθηλιακά σε μεταναστευτικά μεσεγχυματικά κύτταρα κατά την οργανογένεση, είναι αυτοί που ενεργοποιούνται στον καρκίνο και συνεισφέρουν στην διήθηση και την μετάσταση⁸³.

3. ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΡΟΠΗΣ

Πολλαπλά εξωκυττάρια σήματα ενεργοποιούν την EMT ενώ υπάρχουν ταυτόχρονα ποικίλες σημαντικές διασταυρώσεις μεταξύ των κατιόντων ενδοκυττάρων σημάτων και μεταγραφικών παραγόντων οι οποίοι ρυθμίζουν αυτή την πολύπλοκη διαδικασία, συμπεριλαμβανομένων διαφόρων βρόχων θετικής ανάδρασης. Αυτό το δίκτυο αλληλεπιδράσεων επάγει τον μεσεγχυματικό φαινότυπο, μέσω διαφόρων επιγενετικών μεταβολών, δημιουργώντας μη αναστρέψιμες αλλαγές ακόμη και όταν τα αρχικά σήματα ενεργοποίησης της EMT δεν είναι παρόντα.



Εικόνα 2. Μεταγωγή σήματος

3.1. Μονοπάτια μεταγωγής σήματος

Οι αρχικοί παράγοντες ενεργοποίησης της EMT στα καρκινώματα είναι συχνά στοιχεία ετεροτυπικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος και προέρχονται είτε από κύτταρα που αποτελούν το μικροπεριβάλλον του όγκου είτε από κύτταρα που αποτελούν το φυσιολογικό ή το νεοπλαστικό στρώμα.

3.1.1. TGF-β

Το TGF-β μονοπάτι εμπλέκεται στην αναστολή της ανάπτυξης των φυσιολογικών κυττάρων. Ωστόσο, αυτή η δράση είναι εξαρτώμενη από το περιβάλλον του κυττάρου ενώ ο TGF-β συμβάλλει στην ανάπτυξη του όγκου όταν τα κύτταρα αποκτούν ιδιότητες αντίστασης στην ανασταλτική του δράση⁸⁴. Σε τεχνητό περιβάλλον, η ErH4 επιθηλιακή κυτταρική σειρά από ποντίκια σχημάτισε οργανόμορφες δομές όταν εκτέθηκε σε μικρές δόσεις Tgf-β, οι οποίες δεν προκαλούν απόπτωση. Ωστόσο όταν ErH4 κύτταρα με μεταλλαγμένο Ras, υποστούν EMT, τότε επανακτούν τον επιθηλιακό τους φαινότυπο, εφόσον ο παράγοντας διέγερσης σταματήσει. Σε ζωντανούς οργανισμούς, αυτά τα Ras-μεταλλαγμένα κύτταρα προοδευτικά αποκτούν έναν ινωδοβλαστικό διηθητικό φαινότυπο ο οποίος συσχετίζεται με μια μεταβολή από την παρακρινή στην αυτοκρινή Tgf-β μεταγωγή σήματος. Η ενεργοποίηση των MAP (Mitogen-activated protein kinases) κινασών από το ογκογονίδιο Ras είναι απαραίτητη για την EMT και το σχηματισμό μεταστάσεων⁸⁵. Μέσω του ίδιου μηχανισμού αυτοκρινούς παραγωγής Tgf-β, η EMT επάγεται από την ενεργοποίηση του ογκογονιδίου Raf σε MDCK (Madin-Darby Canine Kidney cells) κύτταρα, επαυξάνοντας την θετική του δράση στην διεισδυτικότητα. Επιπλέον, κατά την καρκινογένεση στο δέρμα, ο Tgf-β έχει διπλό ρόλο: εμποδίζει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό μέχρι να ξεπεραστεί ένα συγκεκριμένο όριο οπότε και ξεκινά τόσο ο πολλαπλασιασμός όσο και η αποδιαφοροποίηση προς δημιουργία του καρκίνου εξ ατρακτοειδών κυττάρων, την πιο κακοήγη μορφή του καρκίνου του δέρματος⁸⁶. Στα επιθηλιακά κύτταρα των θηλαστικών, ο υποδοχέας Tgf-β τύπου II μπορεί να φωσφορυλιώσει τις πρωτείνες SMAD 2, 3, οι οποίες ενεργοποιούν μηχανισμούς μεταγραφής γονιδίων, όπως και την πρωτεΐνη ρύθμισης της κυτταρικής πολικότητας PAR6A. Αυτή η φωσφορυλίωση οδηγεί στην απώλεια της κορυφαίας-βασικής πολικότητας και στην διάλυση των συνδέσεων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων προωθώντας έτσι την κινητικότητά τους⁸⁷. Εκτός από τη διεισδυτικότητα, υπάρχουν ενδείξεις συμμετοχής του Tgf-β στην εξέλιξη του καρκίνου σε καρκινικά κύτταρα του παχέως εντέρου, δεδομένου ότι τα κύτταρα που δεν έχουν τον υποδοχέα τύπου II του Tgf-β έχουν καλύτερη πρόγνωση από αυτά στα οποία ο υποδοχέας είναι παρών⁸⁸. Τέλος, το TGF-β μονοπάτι

επηρεάζει τη δράση πολλών άλλων μονοπατιών μεταγωγής σήματος που προάγουν την EMT, όπως το Notch, το Wnt και της ιντεγκρίνης.

3.1.2. Wnt

Το μονοπάτι Wnt/ β-κατενίνης εμπλέκεται στη ρύθμιση της EMT τόσο κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη όσο και στην καρκινογένεση μέσω της αναστολής της συνθετάσης του γλυκογόνου κινάσης-3β (GSK3β) και της επακόλουθης αποδόμησης της β-κατενίνης στο κυτταρόπλασμα. Τα αυξημένα επίπεδα β-κατενίνης, δίνουν τη δυνατότητα σε αυτο το μόριο να μετακινηθεί προς τον πυρήνα, όπου δρα ως υπομονάδα ενός μεταγραφικού παράγοντα ο οποίος επαγει την έκφραση πληθώρας γονιδίων που σχετίζονται με την EMT⁸⁹. Σε τεχνητό περιβάλλον έχει επιβεβαιωθεί ο ρόλος του μονοπατιού της Wnt/β-κατενίνης στην διαδικασία ενεργοποίησης της EMT. Σε καρκινικά κύτταρα του μαστού, το Wnt μονοπάτι επάγει τον ρυθμιστή της EMT Snail και υπερεκφράζει τον μεσεγχυματικό δείκτη βιμεντίνη. Ωστόσο σε μελέτες σε ζωντανούς οργανισμούς, έχει δειχθεί ότι η β-κατενίνη από μόνη της δεν επαρκεί για την ενεργοποίηση της EMT. Σχεδόν σε όλα τα καρκινώματα του παχέως εντέρου, η γενετική απενεργοποίηση του γονιδίου της αδενωματώδους πολυποδίασης (APC-Adenomatous Polyposis Coli) και/ή η ενεργοποίηση της β-κατενίνης, δημιουργούν υψηλές ενδοκυττάρειες συγκεντρώσεις αυτής της πρωτεΐνης. Ωστόσο, η πλειοψηφία αυτών των όγκων δεν φέρει μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά, γεγονός που υποδηλώνει ότι αν και η ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού είναι αναγκαία, δεν είναι ικανή να πυροδοτήσει την έκφραση EMT παραγόντων⁹⁰. Η έκφραση δεικτών που υποδεικνύουν ενεργοποίηση του μονοπατιού Wnt/β-κατενίνης έχει συσχετισθεί κλινικά με πτωχή πρόγνωση στον καρκίνο του μαστού⁹¹. Επιπλέον, στον κολοορθικό καρκίνο έχει διαπιστωθεί ότι η μέσω Wnt μεταγωγή σήματος αυξάνεται όταν αναστέλλεται η δράση γονιδίων που έχουν χαρακτηριστεί ως Wnt-ανταγωνιστές όπως τα Sox17 (Sry-related HMG-box), SFRPs (Secreted frizzled-related protein) και DKK1 (Dickkopf-related protein 1)⁹².

3.1.3. C-met

Ένας σημαντικός αριθμός πειραμάτων κατευθύνθηκε στη δράση του Met μονοπατιού μεταγωγής σήματος για την ενεργοποίηση της EMT μέσω της κυτταρικής διαφοροποίησης, της τοπικοπεριοχικής διήθησης και του σχηματισμού απομακρυσμένων μεταστάσεων. Η Y14 και Y15, δύο κοντινές κινάσες στην κυτταροπλασματική μονάδα του Met, «στρατολογούν» διάφορες συνδετικές πρωτεΐνες (Grb2, Shc, Gabl, Cbl), διάφορες πρωτεΐνες –τελεστές (PI3K, Src, PLCγ), την τυροσινική φωσφατάση Shp2 και τον μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή της μετάφρασης 3 (Stat3-signal transducer and activator of transcription 3). Δεδομένου του εύρους αυτών των μορίων που είναι απαραίτητα για την ενεργοποίηση του Met, είναι ιδιαίτερα δύσκολο να ταυτοποιηθούν οι μεταγωγείς σήματος που πρέπει να λάβουν δράση ώστε να επαχθεί η EMT. Σε τεχνητό περιβάλλον, η Gabl, η οποία ενισχύει τη δράση του Met, διεγείρει την κλαδική μορφογένεση μέσω της ενεργοποίησης της Shp2 και της PLCγ⁹³. Επιπλέον, η EMT προάγεται σε μία μετάλλαξη του Cbl η οποία στερείται το σημείο σύνδεσης του Met. Η ενεργοποίηση τόσο της PI3K όσο και της Src είναι απαραίτητη για το σχηματισμό των μυοτομίων κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη ποντικών ενώ η ενεργοποίηση του Stat3 είναι απαραίτητη για την κλαδική μορφογένεση σε τρισδιάστατη γέλη – και οι δύο διαδικασίες απαιτούν EMT^{94,95}. Ο Ηπατοκυτταρικός αυξητικός παράγοντας (HGF-Hepatocyte Growth Factor), ένας πολυλειτουργικός αυξητικός παράγοντας που εμπλέκεται στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, τη διαφοροποίηση και την επιβίωση των κυττάρων, πυροδοτεί τα MDCK κύτταρα να υποστούν EMT και να σχηματίσουν διακλαδιζόμενες δομές μέσω της ενεργοποίησης του c-Met μονοπατιού⁹⁶. Στους ζωντανούς οργανισμούς, ωστόσο, συγκεκριμένες λειτουργίες, που έχουν μελετηθεί σε κυτταροκαλλιέργειες, μοιάζουν να μην υφίστανται ή τουλάχιστον όχι με τις ίδιες ιδιότητες. Το Met φαίνεται να συμμετέχει στην αύξηση του όγκου με μηχανισμούς υπερπαραγωγής και ενεργοποίησης του συγκεκριμένου μονοπατιού μεταγωγής σήματος σε όγκους του θυροειδούς και του παγκρέατος, σε αντίθεση με μηχανισμούς ενίσχυσης οι οποίοι ενεργοποιούνται σε μεταστατικά στο ήπαρ καρκινώματα^{97,98,99}. Επιπλέον, ενεργοποιές μεταλλάξεις έχουν ανευρεθεί σε μεταστατικά καρκινώματα κεφαλής-τραχήλου, όχι όμως

και στους αντίστοιχους πρωτοπαθείς όγκους¹⁰⁰. Αν και η συμμετοχή όλων αυτών των μορίων μας εμποδίζει από το να ανακτήσουμε μια ξεκάθαρη εικόνα όλων των οδών που οδηγούν στην EMT, είναι προφανές ότι γενετικά σήματα, διαμεσολαβούμενα από την Gab1, καθώς και άλλα, πιο ειδικά, μέσω των κλασσικών παραγόντων PI3k, Src, PLCγ και Ras, επίσης απαιτούνται για την ενεργοποίησή της.

3.1.4. Notch

Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος Notch διατηρεί μια ισορροπία μεταξύ του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης. Επομένως, θεωρείται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό και την εξέλιξη του καρκίνου. Η πολυπλοκότητα του μονοπατιού Notch έγκειται στην συμμετοχή σε αυτό πολλών υποδοχέων, συνδετών και διαμεσολαβητών. Επιπλέον, το αποτέλεσμα της ενεργοποίησής του είναι ειδικό για κάθε κύτταρο και μπορεί να έχει είτε ογκογόνα είτε ογκοκατασταλτική δράση. Στα θηλαστικά, η οικογένεια των Notch διαμεμβρανικών υποδοχέων αποτελείται από 4 μέλη: Notch 1-4, πέντε συνδέτες τύπου Delta (Dll 1-4), και Jagged 1 και 2. Με την ενεργοποίησή του, το Notch διασπάται, απελευθερώνοντας την ενδοκυττάρια μονάδα του (intracellular domain of the notch-ICN) μέσω μιας καταιγίδας πρωτεόλυσης από την μεταλλοπρωτεάση TACE (tumour necrosis factor- α -converting enzyme) και το σύμπλοκο της γ -σεκρετάσης. Επί απουσίας της ICN, η μεταγραφή των γονιδίων-στόχων του Notch αναστέλλεται από ένα σύμπλοκο που διαμεσολαβείται από την CSL (C protein binding factor 1/Suppressor of Hairless/Lag-1). Ποικίλα ογκογόνα μονοπάτια όπως τα NF- κ B, Akt, Hedgehog, mTOR, Ras, Wnt, EGFR, PDGF, υποδοχείς οιστρογόνων και υποδοχείς ανδρογόνων πιστεύεται ότι διασταυρώνονται κατά την εξέλιξη του καρκίνου¹⁰¹. Ο ρόλος αυτών των μονοπατιών έχει μελετηθεί κυρίως σε περιβάλλον εργαστηρίου. Η υπερέκφραση του Notch σε ενδοθηλιακά κύτταρα επάγει την έκφραση του Snail, αποφέροντας την εξασθένιση της έκφρασης της E-καντχερίνης, την απώλεια της σταθερότητας και την απόκτηση EMT χαρακτηρισμών¹⁰². Επίσης, η έκφραση του Hey-1 και του Jagged-1 επάγεται από τον TGF- β κατά την έναρξη της EMT σε επιθηλιακά κύτταρα του μαστού, σε

κύτταρα νεφρικών σωληναρίων και της επιδερμίδας^{103,104}. Τέλος, έχει ανευρεθεί ότι η υπερέκφραση του PDGF-D σε προστατικά καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε σημαντική επάγωγή της EMT όπως αναδεικνύεται από αλλαγές στην κυτταρική μορφολογία σχετικές με απώλεια της E-καντχερίνης και προσθήκη της βιμεντίνης¹⁰⁵. Σε ζωντανούς οργανισμούς, οι έρευνες στρέφονται κυρίως στον παράγοντα Slug, έναν καταστολέα της έκφρασης της E-καντχερίνης. Αρκετές μελέτες ανέδειξαν την σχέση της υπερέκφρασης του Slug με μικρότερη επιβίωση σε καρκινώματα του μαστού, του οισοφάγου και του παχέως εντέρου. Η έκφραση του Slug έχει στατιστικώς σημαντικά συσχετισθεί με το αυξημένο στάδιο κατά Dukes, την δημιουργία απομακρυσμένων μεταστάσεων και τη χαμηλότερη ολική επιβίωση ασθενών με κολο-ορθικό καρκίνο. Άλλωστε ασθενείς με θετική έκφραση του Slug και με μειωμένη έκφραση E-καντχερίνης είχαν τη χειρότερη πρόγνωση. Επιπλέον, έχει αναφερθεί ότι η υπερέκφραση του Slug συνδέεται άμεσα με την χαμηλή έκφραση της E-καντχερίνης, η οποία σχετίζεται με την ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων και αυξημένου pTNM σταδίου στον καρκίνο του στομάχου¹⁰⁶. Αυτά τα δεδομένα υποδηλώνουν ξεκάθαρα ότι η ενεργοποίηση του Notch μονοπατιού με όλα τα επακόλουθα γεγονότα, διαμεσολαβείται από τον Slug, ο οποίος προάγει την αύξηση του όγκου και τη δημιουργία μεταστάσεων δηλαδή προσδίδει χαρακτηρισ EMT.

3.1.5 Hedgehog

Το Hedgehog μονοπάτι μεταγωγής σήματος, το οποίο συνεισφέρει στην διατήρηση του πολυδύναμου δυναμικού των κυττάρων, έχει συσχετισθεί με την ανάπτυξη μεταστάσεων σε κυτταρικές σειρές με καρκίνο του προστάτη. Σε τεχνητό περιβάλλον, η εξωγενής έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα Gli-1 σε κύτταρα ποντικών με μη μεταστατικό προστατικό καρκίνο προκάλεσε έντονη μεταναστευτικότητα ενώ στους ζωντανούς οργανισμούς προήγαγε τη δημιουργία πνευμονικών δευτεροπαθών εστιών μέσω του μηχανισμού έκφρασης του Snail και καταστολής της E-καντχερίνης. Αυτές οι δράσεις αναστέλλονται εντελώς από τον βασικό αναστολέα του μονοπατιού αυτού, την κυκλοπαμίνη, αναδεικνύοντας έτσι ότι η μέσω Hedgehog μεταγωγή σήματος

συμμετέχει στην EMT¹⁰⁷. Σε άλλους συμπαγείς όγκους και πάλι η Gli οδηγεί σε υπερέκφραση του Snail και σε αυτοκρινή ενεργοποίηση του PDGF υποδοχέα και του μονοπατιού Wnt στον καρκίνο του δέρματος¹⁰⁸.

Συμπερασματικά, λοιπόν, ο ρόλος των μονοπατιών μεταγωγής σήματος Wnt, Notch και Hedgehog στον αναπρογραμματισμό των κυττάρων προς EMT, προσθέτει ακόμα περισσότερα δεδομένα στην άποψη ότι τα καρκινικά κύτταρα συχνά ενεργοποιούν λανθάνοντες μηχανισμούς ανάπτυξης ώστε να ελέγχουν πολλαπλά βήματα κατά τη διαδικασία της ογκογένεσης.

3.2. Υποξία

Διάφοροι μηχανισμοί σε συνδυασμό με την υποξία προάγουν την EMT. Αυτοί οι μηχανισμοί συνίστανται κυρίως στον παράγοντα που προάγει την υποξία 1a (Hypoxia-inducible factor-1a-HIF1a), τον HGF, τον Snail και Twist, όπως και την ενεργοποίηση του μονοπατιού Notch ή NF-κB και την DNA υπομεθυλίωση¹⁰⁹. Σε τεχνητό περιβάλλον, σε διάφορες κυτταρικές σειρές, χαμηλά επίπεδα οξυγόνου (3%) φαίνεται ότι επάγουν την EMT μέσω αναστολής της δράσης της GSK3β. Τα υποξικά κύτταρα επιδεικνύουν αυξημένη επιθετικότητα και συμμετοχή στο μονοπάτι μεταγωγής σήματος Wnt καταλήγοντας σε υπερέκφραση του Snail¹¹⁰. Μέσω του ίδιου μηχανισμού, η υπερέκφραση του Snail προκαλεί την καταστολή της E-καντχερίνης και την απελευθέρωση της β-κατενίνης η οποία μπορεί να ενεργοποιήσει και να σταθεροποιήσει την έκφραση μεταγραφικών παραγόντων που προάγουν την EMT στον πυρήνα, με αποτέλεσμα την περαιτέρω ενίσχυση και σταθερόποίηση της μεσεγχυματικής κατάστασης. Συνεπώς, η υποξία, ως ένας φυσιολογικός μηχανισμός, όχι μόνο προάγει την EMT αλλά και σταθεροποιεί το μεσεγχυματικό φαινότυπο.

4. ΑΠΩΛΕΙΑ ΤΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ

Η απώλεια της έκφρασης της E-καντχερίνης εμπλέκεται σημαντικά στην EMT και η ίδια η E-καντχερίνη εμφανίζεται ως μία πρωτεΐνη-φύλακας

του επιθηλιακού φαινότυπου. Σε τεχνητό περιβάλλον, υπάρχει ευθεία συσχέτιση μεταξύ της μη παραγωγής της E-καντχερίνης και της απώλειας του επιθηλιακού φαινότυπου. Ωστόσο, η παραγωγή της διατηρείται στους περισσότερους διαφοροποιημένους όγκους, συμπεριλαμβανομένων των καρκινωμάτων του δέρματος, της κεφαλής-τραχήλου, του μαστού, του πνεύμονα, του ήπατος και του προστάτη αν και φαίνεται να υπάρχει αντιστρόφως ανάλογη σχέση μεταξύ των επιπέδων της και του σταδίου ή της επιβίωσης¹¹¹. Η ρύθμιση της E-καντχερίνης κατά την εξέλιξη του καρκίνου σε χαμηλότερα επίπεδα συντονίζεται από τη δράση μεταγραφικών παραγόντων, μη κωδικοποιούντων RNA καθώς και μέσω γενετικών/επιγενετικών αποκλίσεων.

4.1. Μεταγραφικοί παράγοντες

4.1.1. Zinc-finger μεταγραφικοί παράγοντες

Κεντρικός ρόλος στην καταστολή του γονιδίου της E-καντχερίνης έχει αποδοθεί στη λειτουργία του Snail το οποίο ενεργοποιείται κατά την απόκτηση EMT χαρακτηριστικών. Το Snail μπορεί να προσδεθεί στα δύο E-κουτιά του προαγωγέα της ανθρώπινης E-καντχερίνης και να δράσει ως αναστολέας της έκφρασής της. Επομένως οποιαδήποτε βιολογική διεργασία που μπορεί να οδηγήσει σε υπερέκφραση του Snail, μειώνει αντίστοιχα την έκφραση της E-καντχερίνης με αποτέλεσμα τη δημιουργία του EMT φαινότυπου. Το Snail εκφράζεται σε υψηλού βαθμού κακοήθειας καρκίνους του μαστού όπως και σε νόσο με θετικούς λεμφαδένες. Επιπλέον, αντιστρόφως ανάλογη σχέση έχει δειχθεί μεταξύ των επιπέδων της E-καντχερίνης και του Snail σε καρκινώματα του μαστού καθώς και στο πλακώδες καρκίνωμα της κεφαλής-τραχήλου¹¹².

Το Slug, ένα άλλο στενό μέλος της συγκεκριμένης οικογένειας, έχει ανευρεθεί σε σημεία EMT στους σπονδυλωτούς οργανισμούς. Η αναστολή της E-καντχερίνης από το Slug εκινεί την EMT επιτρέποντας την απώλεια της προσκόλλησης του ενός κυττάρου στο άλλο και την απώλεια της πολικότητας της βασικής μεμβράνης οδηγώντας έτσι στη διευκόλυνση της κυτταρικής

μετανάστευσης. Το Slug φαίνεται να διαδραματίζει διπλό ρόλο, τόσο στην ανάπτυξη της νευρικής ακρολοφίας όσο και αμιγώς στην EMT. Στην περίπτωση της EMT, το γονίδιο της μικρής πρωτεΐνης-προσδέτη RhoB, η οποία εμπλέκεται στην κινητικότητα των κυττάρων, είναι ένας στόχος. Πράγματι, τόσο το Snail όσο και το Slug εκφράζονται ως απάντηση σε πολυάριθμα σήματα επαγωγής της EMT τα οποία πηγάζουν από μονοπάτια όπως το Wnt, Lbx1, TGF-β, Notch, απώλεια του Sim2 και την υποξία¹¹³.

Το SIP1 (ZEB2) είναι άλλη μία zinc-finger πρωτεΐνη-αναστολέας της E-καντχερίνης της οποίας τα σημεία πρόσδεσης επικαλύπτουν αυτά του Snail. Το Sip1 προάγει την EMT που πυροδοτείται από το μονοπάτι μεταγωγής σήματος του TGF-β, χωρίς να ασκεί καμία επίδραση στο Snail. Το Sip1 εκφράζεται επίσης σε κυτταρικές σειρές στις οποίες ο προαγωγέας της E-καντχερίνης έχει υπερμεθυλωθεί. Σε αυτές τις περιπτώσεις το Sip1 εμπλέκεται επίσης και στην αναστολή της μεταγραφής του γονιδίου της E-καντχερίνης¹¹⁴.

4.1.2. Helix-loop-helix μεταγραφικοί παράγοντες

Ο μεταγραφικός παράγοντας Twist ρυθμίζει την κυτταρική κινητικότητα και την αναδιάρθρωση των όγκων κατά την πρόιμη εμβρυογένεση. Λειτουργώντας ως ένας βασικός helix-loop-helix μεταγραφικός παράγοντας μπορεί να ομοδιμεριστεί ή να ετεροδιμεριστεί με άλλες helix-loop-helix πρωτεΐνες και να ενεργοποιήσει ή να καταστείλει διάφορους στόχους συμπεριλαμβανομένων και αποπτωτικών γονιδίων. Κατά την EMT, το Twist ενεργοποιεί αντιαποπτωτικά προγράμματα με σκοπό να επιτρέψει στα επιθηλιακά κύτταρα να μετατραπούν σε μεσεγχυματικά αποφεύγοντας τον κυτταρικό θάνατο¹¹⁵. Σε τεχνητό περιβάλλον, έχει δειχθεί ότι η καταστολή της έκφρασης του Twist στα ιδιαίτεως επιθετικά 4T1 καρκινικά κύτταρα του μαστού, οδηγεί στην καταστολή της ικανότητάς τους να μεθίστανται στον πνεύμονα. Αντιθέτως, η ικανότητά τους να σχηματίζουν πρωτοπαθή όγκο δεν επηρεάστηκε. Η έκτοπη έκφραση του Twist είχε ως αποτέλεσμα την απώλεια της διαμεσολαβούμενης από την E-καντχερίνη προσκόλλησης μεταξύ των κυττάρων και την απόκτηση μεσεγχυματικών δεικτών και κινητικότητας¹¹⁶.

Επιπλέον, στον καρκίνο του στομάχου, η έκφραση του Twist φαίνεται να είναι πιο αυξημένη στον διάχυτο τύπο σε σχέση με τον εντερικό τύπο ενώ υψηλή έκφρασή του έχει παρατηρηθεί στο μεταστατικό μελάνωμα γεγονός που το καθιστά ως ανεξάρτητο παράγοντα πτωχής πρόγνωσης σε αυτούς τους ασθενείς^{117,118}. Η υπερέκφραση του Twist έχει συσχετισθεί επίσης με τον πιο επιθετικό τύπο του νευροβλαστώματος ο οποίος σχετίζεται με την ενίσχυση του N-myc¹¹⁹. Αυτά τα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το Twist συμβάλλει στην κακοήθη εισβολή και την μετάσταση μέσω την ενεργοποίησης λανθανόντων EMT προγραμμάτων.

Ένας άλλος σημαντικός αναστολέας της έκφρασης της E-καντχερίνης που ανήκει σε αυτή την οικογένεια, είναι ο μεταγραφικός παράγοντας E12/E47, το παράγωγο του E2A γονιδίου. Επαγωγή του E2a γονιδίου σε MDCK κύτταρα τα καθιστά εντόνως ογκογόνα. Το μεταφραστικό παράγωγο του E2a έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει σε κυτταρικές σειρές που χαρακτηρίζονται από την απώλεια της E-καντχερίνης. Ο τρόπος δράσης αυτού του γονιδίου σε έμβρυα ποντικών δείχνει ότι αυτός ο μεταγραφικός παράγοντας εμπλέκεται κυρίως στην διατήρηση του μεσεγχυματικού φαινότυπου παρά στην επαγωγή των EMT διεργασιών¹²⁰.

Πίνακας 7. Μοριακοί παράγοντες που συμβάλλουν στην EMT: μεταγραφική ρύθμιση

Μοριακοί παραγοντες	Λειτουργία	Σχέση με τον καρκίνο
SNAI1	Zinc-finger, καταστολή μεταγραφής, κυτταρικός επαναπρογραμματισμός	+ καρκίνος του μαστού, κολο-ορθικός καρκίνος, καρκίνος ενδομητρίου, πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής/τραχήλου, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, γαστρικός καρκίνος, αδενοκαρκίνωμα οισοφάγου, καρκίνος ωοθήκης, καρκίνος του παγκρέατος, συνοβιακό καρκίνωμα
SNAI1	Zinc-finger, καταστολή μεταγραφής, κυτταρικός επαναπρογραμματισμός	+ καρκίνος του μαστού, κολο-ορθικός καρκίνος, πλακώδες καρκίνωμα του οισοφάγου, γαστρικός καρκίνος, πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής/τραχήλου, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, καρκίνος του πνεύμονα, κακώθης μεσοθηλίωμα, καρκίνος της ωοθήκης, καρκίνος του παγκρέατος
ZEB1	Zinc-finger E-box , καταστολή μεταγραφής, κυτταρικός επαναπρογραμματισμός	+ καρκίνος της ουροδόχου κύστεως, καρκίνος του μαστού, κολο-ορθικός καρκίνος, αδενοκαρκίνωμα ενδομητρίου, πλακώδες καρκίνωμα του οισοφάγου, γαστρικός καρκίνος, πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής/τραχήλου, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, λειομυοσάρκωμα, καρκίνος του πνεύμονα, καρκίνος του παγκρέατος, καρκίνος του προστάτη
ZEB2	Zinc-finger E-box , καταστολή μεταγραφής, κυτταρικός επαναπρογραμματισμός	+ καρκίνος της ουροδόχου κύστεως, καρκίνος του μαστού, κολο-ορθικός καρκίνος, γαστρικός καρκίνος, πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής/τραχήλου, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, καρκίνος του πνεύμονα, καρκίνος της ωοθήκης, καρκίνος του παγκρέατος
E47	Helix-loop-helix	+ γαστρικός καρκίνος, καρκίνος του προστάτη
KLF8	Zinc-finger, καταστολή/ενεργοποίηση μεταγραφής	+ όγκος του εγκεφάλου, καρκίνος του μαστού, γαστρικός καρκίνος, όγκος του ήπατος, καρκίνος της ωοθήκης, καρκίνος του νεφρού
Brachyury	Ενεργοποίηση μεταγραφής	+ κολο-ορθικός καρκίνος, καρκίνος του πνεύμονα
TWIST1	bHLH παράγοντας	+ καρκίνος της ουροδόχου κύστεως, καρκίνος του μαστού, κολο-ορθικός καρκίνος, πλακώδες καρκίνωμα του οισοφάγου, γαστρικός καρκίνος, πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής/τραχήλου, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, καρκίνος της ωοθήκης, καρκίνος του παγκρέατος, καρκίνος του προστάτη
FOXC2	Ενεργοποίηση μεταγραφής	+ καρκίνος του μαστού, κολο-ορθικός καρκίνος, πλακώδες καρκίνωμα του οισοφάγου, καρκίνος του πνεύμονα
Gooseoid	Homeobox πρωτεΐνη	+ καρκίνος του μαστού
E2-2	bHLH (class 1) παράγοντας	+ πλακώδες καρκίνωμα του πνεύμονα
SIX1	Homeobox πρωτεΐνη	+ καρκίνος του μαστού, καρκίνος του τραχήλου της μήτρας, καρκίνος της ωοθήκης

PRRX1	Homeobox πρωτεΐνη	+ καρκίνος του μαστού, καρκίνος του πνεύμονα
HDAC1,2,3	Διακετυλάσες ιστονών	+ καρκίνος του μαστού, κολο-ορθικός καρκίνος, γαστρικός καρκίνος, ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα, καρκίνος του πνεύμονα, καρκίνος του παγκρέατος, καρκίνος του προστάτη, καρκίνος του νεφρού
SIRT1	NAD-εξαρτώμενη διακετυλάση ιστονών	+ κολο-ορθικός καρκίνος, καρκίνος του δέρματος
EZH2	PRC2 συστατικό	+ B non-Hodgkin's λεμφόμα, καρκίνος της ουροδόχου κύστεως, καρκίνος του μαστού, κολο-ορθικός καρκίνος, γλοιοβλάστωμα, λέμφωμα Hodgkin, καρκίνος της στοματικής κοιλότητας, καρκίνος του ήπατος, καρκίνος του πνεύμονα, λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα, μελάνωμα, καρκίνος του προστάτη, καρκίνος του όρχεως
SUZ12	PRC2 συστατικό	+ καρκίνος του μαστού, κολο-ορθικός καρκίνος, καρκίνος εκ γεννητικών κυττάρων, καρκίνος του ήπατος, καρκίνος του πνεύμονα, λέμφωμα από κύτταρα του μανδύα, μελάνωμα, αδένωμα παραθυρεοειδών, αδένωμα υπόφυσης
LSD1	H3K4, H3K9 διμεθυλάση, επιγενετικός ρυθμιστής	+ καρκίνος του μαστού, καρκίνος της ουροδόχου κύστεως, κολο-ορθικός καρκίνος, καρκίνος του πνεύμονα, καρκίνος του προστάτη, σάρκωμα
SUV39H1	Μεθυλτρανσφεράση των ιστονών	+ κολο-ορθικός καρκίνος
G9a	Μεθυλτρανσφεράση των ιστονών	+ καρκίνος του πνεύμονα
BMI1	PRC1 συστατικό	+ οξεία μυελοειδής λευχαιμία, καρκίνος του μαστού, όγκοι του γαστρεντερικού, λέμφωμα, νευροβλάστωμα, καρκίνος του πνεύμονα, αδένωμα παραθυρεοειδών, αδένωμα υπόφυσης
LOXL2	Allysyl οξειδάση	+ κολο-ορθικός καρκίνος, καρκίνος του μαστού, καρκίνος του λάρυγγα, καρκίνος του πνεύμονα, γαστρικός καρκίνος, πλακώδες καρκίνωμα του οισοφάγου, καρκίνος της ωοθήκης, καρκίνος κεφαλής/τραχήλου, μελάνωμα; + στο στρώμα περιφερικά κολο-ορθικού καρκίνου, καρκίνου του παγκρέατος, καρκίνου του λάρυγγα, καρκίνου του ενδομητρίου, σεμινωμάτωσης καρκίνου του όρχεως, ηπατοκυτταρικού καρκινώματος, διαυγοκυτταρικού καρκίνου του νεφρού

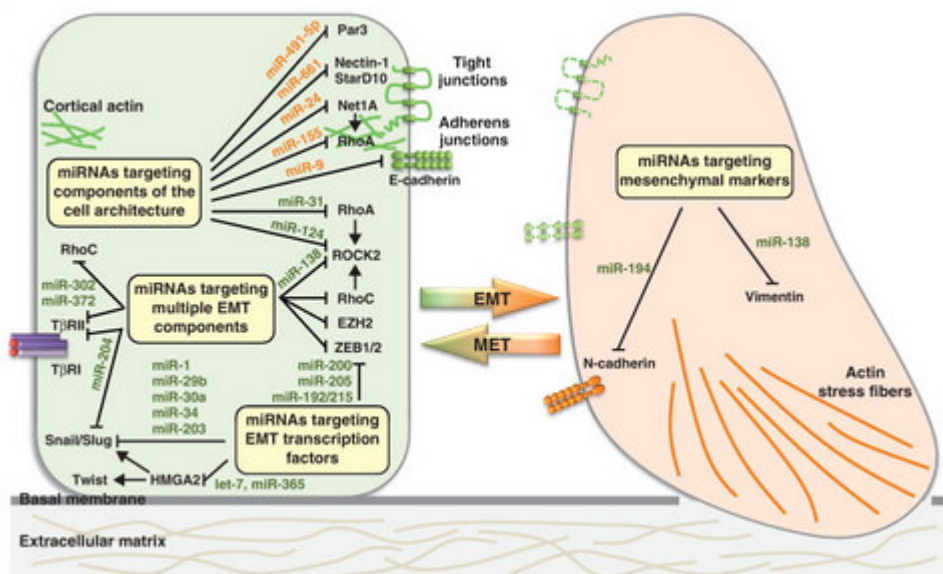
+ :υψηλή έκφραση, EZH2: enhancer of zeste2, FOXC2: Forkhead box C2, HDAC: histone deacetylase, KLF8: Kruppel-like factor 8, LOXL2: lysyl oxidase-like 2, LSD1: lysine-specific demethylase 1, PRC2: Polycomb repressor complex 2, PRRX1: paired-related homeobox gene1, SIRT1: sirtuin 1, SUV39H1: suppressor of variegation 3-9 homologue 1, SUZ12: suppressor of zeste 12

4.2. Μη κωδικοποιούντα RNAs

Τα μη κωδικοποιούντα RNA (microRNAs-miRNAs) αποτελούν μια νέα κατηγορία ρυθμιστών της γονιδιακής έκφρασης, η οποία φαίνεται να δρα στο μετά-μεταγραφικό επίπεδο αν και πιθανώς να παίζει ρόλο και στην εδραίωση επιγενετικών προγραμμάτων. Τα τελευταία χρόνια τα miRNAs

αναγνωρίστηκαν ως ρυθμιστές της λειτουργίας των αρχέγονων, πολυδύναμων κυττάρων, της διαφοροποίησης και της εμβρυϊκής ανάπτυξης. Επιπλέον δρουν και ως ογκοκατασταλτικά ή ογκογονίδια¹²¹. Μέσω της δράσης των ενζύμων της RNAase III αποκτούν ένα μέγεθος 19-25 βάσεων μονόκλωνου RNA και στη συνέχεια προσδένονται σε κατασταλτικά σύμπλοκα (miRNA-induced silencing complexes-miRISCs) τα οποία επίσης περιλαμβάνουν αρκετές πρωτεΐνες. Τα miRNAs μπορούν να προσδεθούν σε διάφορους mRNA στόχους και είτε να προάγουν την αποδομή τους είτε να εμποδίσουν τη μετάφραση είτε να επηρεάσουν τη μεταγραφή με διάφορους τρόπους που δεν έχουν ακόμη πιστοποιηθεί¹²².

Πρόσφατες μελέτες έχουν προσδώσει δράση για την ενεργοποίηση EMT μηχανισμών στην οικογένεια miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, miR-429) και στο miR-205. Σε όλες τις περιπτώσεις η ενεργοποίηση της EMT συσχετίστηκε με την καταστολή της έκφρασης της E-καντχερίνης⁸¹. Η οικογένεια miR-200 φαίνεται ότι διατηρεί τον επιθηλιακό χαρακτήρα των κυττάρων μέσω της επιλεκτικής καταστολής της ZEB οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων, ZEB1 και ZEB2. Οι ZEB1 και ZEB2 είναι βασικοί ρυθμιστές του μεσεγχυματικού φαινοτύπου και καταστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων που έχουν E-box δομή, όπως η E-καντχερίνη¹²³.



Εικόνα 3. MicroRNA ρύθμιση της EMT

Η συμβολή της οικογένειας miR-200 και του miR-205 στην ρύθμιση της EMT αναδείχθηκε από δύο ανεξάρτητες μελέτες οι οποίες χρησιμοποίησαν διαφορετικές πειραματικές στρατηγικές. Στην πρώτη μελέτη το πρότυπο της miRNA έκφρασης συσχετίστηκε με επιθηλιακά και μεσεγχυματικά χαρακτηριστικά όπως καθορίστηκαν από τα επίπεδα mRNA της E-καντχερίνης και της βιμεντίνης. Η έκφραση του miR-205 και της miR-200 οικογένειας ήταν αντιστρόφως ανάλογη της έκφρασης της βιμεντίνης. Οι στόχοι αυτών των miRNAs περιλαμβάνουν τόσο τον ZEB1 όσο και τον ZEB2 μεταγραφικό παράγοντα, οι οποίοι καταστέλλουν την έκφραση της E-καντχερίνης. Περαιτέρω έρευνα έδειξε ότι η έκφραση αυτών των miRNAs συσχετίζεται θετικά με την E-καντχερίνη και αρνητικά με την βιμεντίνη σε ορώδη-θηλώδη καρκινώματα της ωοθήκης. Άλλη μελέτη επίσης περιέγραψε την καταστολή της έκφρασης των miR-205 και της οικογένειας miR-200 σε MDCK (Madin-Darby canine kidney cells) κύτταρα από νεφρό μετά από προαγωγή EMT από τον TGFβ ή την τυροσινική φωσφατάση PEZ. Και πάλι οι ZEB1 και ZEB2 ήταν στόχοι^{81,124,125}. Ένα καινοτόμο μοντέλο της ρύθμισης των επιπέδων του ZEB2 mRNA αναδείχθηκε μέσω της SNAII επαγωγής της EMT σε κυτταρικές σειρές από ανθρώπινο κολο-ορθικό καρκίνο. Συγκεκριμένα, η έκφραση του ZEB2 αυξήθηκε - αυξημένα επίπεδα mRNA - μετά από EMT που προάχθηκε από το SNAII, χωρίς όμως να παρατηρήθηκε κάποια αξιολογη επίδραση στην μεταγραφή του. Αναδείχθηκε έτσι ότι η έκφραση του ZEB2 ρυθμίζεται από ένα φυσικό αντίγραφο το οποίο εμποδίζει την πρόσδεση ενός εσωνίου στο 5' άκρο το οποίο φέρει ένα σημείο εισόδου του ριβοσώματος. Το 5' άκρο επίσης διαθέτει μια αλληλουχία η οποία μειώνει την απόδοση της μετάφρασης μέσω της παρεμπόδισης εισόδου του ριβοσώματος και επομένως οδηγεί στη μείωση των επιπέδων της ZEB2 πρωτεΐνης στα επιθηλιακά κύτταρα. Ακριβώς η ανάστροφη διαδικασία ακολουθείται αφού έχει ενεργοποιηθεί η EMT, οπότε διατηρείται ελεύθερο το σημείο εισόδου του ριβοσώματος, αυξάνεται η απόδοση της μετάφρασης, αυξάνονται τα επίπεδα της ZEB2 πρωτεΐνης και κατ' επέκταση μειώνονται τα επίπεδα της E-καντχερίνης¹²⁶.

Επιπλέον, μέσω της ρύθμισης της EMT, τα miRNAs συμμετέχουν επίσης στη διεύθυνση του καρκίνου και τη μετάσταση. Συγκεκριμένες μελέτες ανέδειξαν χαμηλή έκφραση της οικογένειας miR-200 σε όγκους της ωοθήκης

και της χοληδόχου κύστεως σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό. Επίσης χαμηλή αναδείχθηκε και η έκφραση του miR-205 στον καρκίνο του μαστού και του οισοφάγου ενώ ήταν αυξημένη στον καρκίνο των ωοθηκών και της ουροδόχου κύστεως και πάλι σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό^{127,128,129,130}. Η ανάλυση της έκφρασης κάποιων τυχαίων miRNAs σε μεταστατικές και μη μεταστατικές καρκινικές κυτταρικές σειρές από μαστό έδειξε ότι το miR-10b είναι ένα miRNA που συσχετίζεται με την απόκτηση μεσεγχυματικών χαρακτήρων καθώς και αυξημένη διεισδυτικότητα. Στη συνέχεια βρέθηκε ότι το miR-10b προάγεται από το TWIST1. Η έκφρασή του ενισχύει την κυτταρική διείσδυση και τη μετάσταση μέσω της καταστολής της μετάφρασης του HOXD10 και της αύξησης των επιπέδων της RHOC πρωτεΐνης. Σημαντική παρατήρηση ήταν ότι τα επίπεδα του miR-10b ήταν υψηλότερα σε ασθενείς που έφεραν από τη διάγνωση ήδη μεταστατικό καρκίνωμα του μαστού¹³¹.

Είναι προφανές ότι η απορρύθμιση της έκφρασης των miRNAs έχει σημαντικό αντίκτυπο στο σχηματισμό απομακρυσμένων μεταστάσεων. Το λειτουργικό αποτέλεσμα, ωστόσο, εξαρτάται από το γονίδιο-στόχο του οποίου η έκφραση επηρεάζεται. Επιπλέον, η δράση των miRNAs καθορίζεται τόσο από τον τύπο του όγκου όσο και από το γενικότερο κυτταρικό περιβάλλον οδηγώντας τελικά στη δημιουργία ενός μοναδικού φαινότυπου.

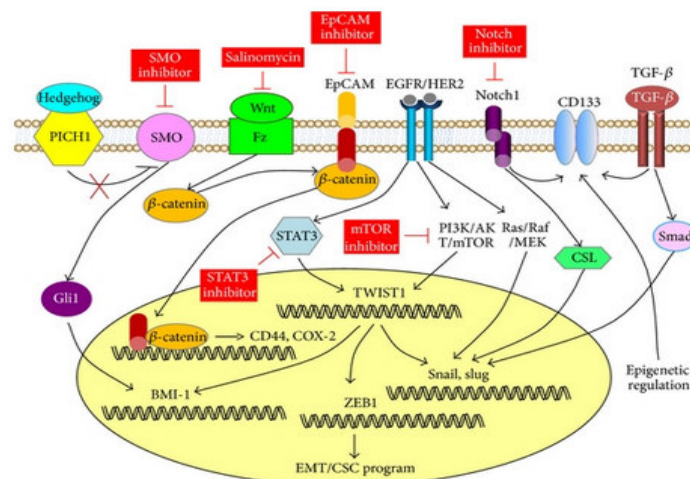
Πίνακας 8. Μοριακοί παράγοντες που συμβάλλουν στην EMT: μη κωδικοποιούντα RNAs

Μοριακός παράγοντας	Λειτουργία	Σχέση με τον καρκίνο
miR-200	Καταστολή του όγκου	- καρκίνος ουροδόχου κύστεως, γαστρικός καρκίνος, ατρακτοειδές καρκίνωμα κεφαλής/τραχήλου, καρκίνος ωοθήκης, καρκινοσάρκωμα ενδομητρίου + ενδομητριοειδές καρκίνωμα, καρκίνος του παγκρέατος, σε απομακρυσμένες μεταστάσεις vs πρωτοπαθή εστία σε καρκίνο του μαστού, επίπεδα στο αίμα ασθενών με γαστρικό καρκίνο
miR-205	Καταστολή του όγκου	- καρκίνος της ουροδόχου κύστεως, μελάνωμα, ατρακτοειδέ καρκίνωμα κεφαλής/τραχήλου, πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής/τραχήλου, καρκίνος του προστάτη + καρκίνος του πνεύμονα, καρκίνος του ενδομητρίου
miR-34	Καταστολή του όγκου	- καρκίνος του μαστού, κολο-ορθικός καρκίνος, καρκίνος του πνεύμονα, καρκίνος της ωοθήκης, καρκίνος του παγκρέατος, σάρκωμα, καρκίνος του νεφρού, ουροθηλιακός καρκίνος
miR-101	Καταστολή του όγκου	- γαστρικός καρκίνος, ηπατοκυτταρικός καρκίνος, καρκίνος του πνεύμονα
miR-9	Προαγωγή του όγκου	+ όγκος του εγκεφάλου, καρκίνος του μαστού, γαστρικός καρκίνος, σε απομακρυσμένες μεταστάσεις vs πρωτοπαθή εστία σε καρκίνο του μαστού - καρκίνος του μαστού, καρκίνος της ωοθήκης, σε μεταστάσεις vs πρωτοπαθή έστια σε όγκους του εγκεφάλου
miR-335	Καταστολή του όγκου	+ καρκίνος του μαστού, μείωση του ελεύθερου μεταστάσεων διαστήματος επίβιωσης
miR-10b	Καταστολή του όγκου	+ καρκίνος του μαστού, μεταστατική διασπορά από τη διάγνωση

+ :υψηλή έκφραση, -:χαμηλή έκφραση

4.3 Γενετικές/ Επιγενετικές αποκλίσεις

Η δράση αρκετών γονιδίων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της EMT μπορεί να τροποποιηθεί εντός του όγκου λόγω γενετικών ή επιγενετικών αποκλίσεων. Όπως έχει προαναφερθεί, η απώλεια της έκφρασης της E-καντχερίνης μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω πολλών εναλλακτικών μηχανισμών. Μεταλλάξεις του γονιδίου CDH1, το οποίο κωδικοποιεί την E-καντχερίνη, έχουν ενοχοποιηθεί για την πρόκληση του κληρονομικού διάχυτου γαστρικού καρκίνου, ενώ μια υποομάδα αυτών των ασθενών δύναται να αναπτύξει επιπλέον λοβιακό καρκίνο του μαστού^{132,133}. Σε συσχέτιση με τα προηγούμενα, σωματική γενετική απενεργοποίηση του CDH1 έχει παρατηρηθεί στα λοβιακά καρκινώματα του μαστού χωρίς να οδηγεί απόλυτα σε EMT, σε αντίθεση με την επιγενετική απενεργοποίησή του η οποία τελικά οδηγεί σε καταστολή της έκφρασης της E-καντχερίνης¹³⁴.



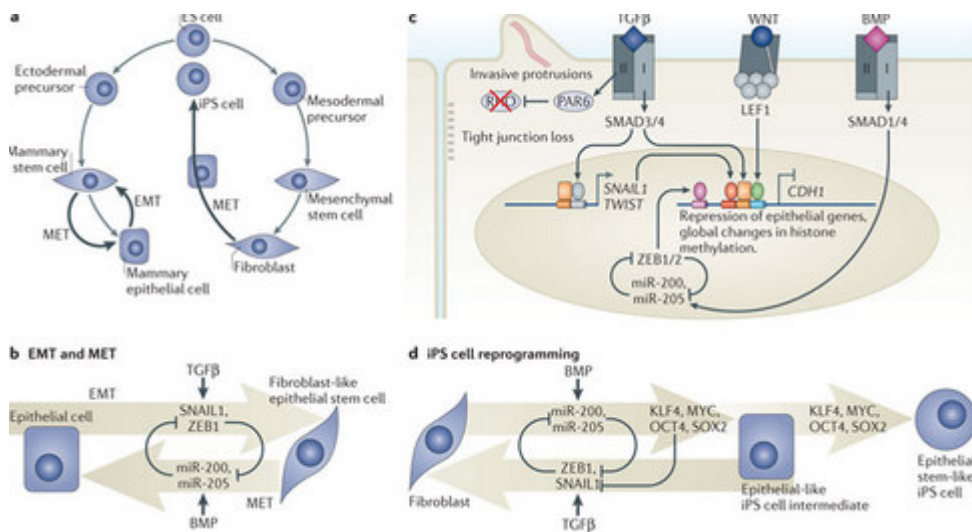
Εικόνα 4. Επιγενετική ρύθμιση

Μέσω διαφορετικών μηχανισμών, η υπομεθυλίωση γονιδίων που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες μπορεί να οδηγήσει σε EMT, ενώ στα καρκινικά κύτταρα συσχετίζεται επιπλέον με πτωχή διαφοροποίηση και υψηλό κίνδυνο σχηματισμού απομακρυσμένων μεταστάσεων¹³⁵. Μια πρόσφατη μελέτη περιέγραψε τα πρότυπα μεθυλίωσης του DNA σε κύτταρα που προσομοίαζαν με αρχέγονα (φαινότυπος CD44+CD24-) και σε πιο διαφοροποιημένα κύτταρα (φαινότυπος CD44-CD24+) τα οποία απομονώθηκαν είτε από φυσιολογικό μαστό είτε από αντίστοιχο καρκινικό

ιστό. Παρατηρήθηκε υπομεθυλίωση και υψηλή έκφραση μεταγραφικών παραγόντων που ενισχύουν την EMT στα κύτταρα που έφεραν τον φαινότυπο του αρχέγονου δυναμικού Cd44+Cd24- σε σύγκριση με τα αντίστοιχα που δεν έφεραν τον συγκεκριμένο φαινότυπο¹³⁶. Η έκτοπη έκφραση ενός εξ' αυτών των μεταγραφικών παραγόντων, του FoXC1 (forkhead box protein C1), τόσο σε MCF-12A όσο και σε MDCK κυτταρικές σειρές, οδήγησε σε πλήρη EMT, όπως αναδείχθηκε από την χαμηλή έκφραση E-καντχερίνης, την υψηλή έκφραση της βιμεντίνης και την υψηλή κινητικότητα και διεισδυτικότητα της κυτταρικής καλλιέργειας^{137,138}.

5. ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΡΧΕΓΟΝΟΥ ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΟΥ ΔΥΝΑΜΙΚΟΥ

Τα καρκινικά κύτταρα με ιδιότητες αρχέγονου πολυδύναμου δυναμικού (Cancer Stem Cells-CSCs) αποτελούν μια υποομάδα καρκινικών κυττάρων η οποία έχει τη δυνατότητα να αυτοανανεώνεται και να παράγει τα διάφορα κύτταρα από τα οποία αποτελείται ο όγκος. Έλαβαν τη συγκεκριμένη ονομασία λόγω των ιδιοτήτων τους και της ικανότητας τους να ενδυναμώνουν την ογκογένεση. Τα CSCs μοιράζονται σημαντικούς χαρακτήρες με τα αντίστοιχα πολυδύναμα κύτταρα που προέρχονται από φυσιολογικό ιστό όπως την δυνατότητα της αυτοανανέωσης (μέσω συμμετρικής ή ασύμμετρης διαίρεσης) και την ικανότητα προς περαιτέρω διαφοροποίηση¹³⁹.



Εικόνα 5. EMT και stem cell-like ιδιότητες

Για τις επιθηλιακές κακοήθειες, η EMT θεωρείται ένα αποφασιστικό γεγονός για τον σχηματισμό μεταστάσεων και χαρακτηρίζεται από τη διάρρηξη της ομοιόστασης του επιθηλιακού κυττάρου και την απόκτηση μεσεγχυματικού φαινότυπου. Η EMT ελέγχεται από μονοπάτια μεταγωγής σήματος όπως το Wnt ή το διαμεσολαβούμενο από τον TGFβ, τα οποία επίσης ενεργοποιούνται κατά το σχηματισμό νεοπλαστικού ιστού. Πρόσφατες μελέτες εισηγούνται την ύπαρξη μιας άμεσης σύνδεσης μεταξύ της EMT και της απόκτησης χαρακτήρων αρχέγονου πολυδύναμου δυναμικού, δεδομένου ότι τα κύτταρα τα οποία υφίστανται EMT αποκτούν τις ανάλογες ιδιότητες¹⁴⁰. Τα κύτταρα που υφίστανται EMT είναι δυνητικά πρόδρομα των μεταστατικών καρκινικών κυττάρων και θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν και ως μεταστατικά CSCs. Συνεπώς, τα ίδια μονοπάτια μεταγωγής σήματος φαίνεται να είναι αυτά που ενορχηστρώνουν την αυτοανανέωση, τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, που προκάλλουν νεοπλασίες και προάγουν την EMT (Wnt, Notch, Hedgehog, BMI1)¹⁴¹.

6. ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΠΡΟΣ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗ (MET)

Οι όγκοι οι οποίοι επιδεικνύουν μια γονιδιακή υπογραφή χαρακτηριστική της EMT συσχετίζονται με το σχηματισμό απομακρυσμένων μεταστάσεων καθώς και με μικρότερες περιόδους επιβίωσης ελεύθερης μεταστάσεων. Μια προφανής αντίθεση σε αυτή τη συσχέτιση μεταξύ EMT και μετάστασης προέρχεται από την παρατήρηση ότι οι απομακρυσμένες μεταστάσεις εμφανίζουν επιθηλιακό φαινότυπο που προσομοιάζει στενά με εκείνον των καρκινικών κυττάρων του πρωτοπαθούς όγκου¹⁴². Επομένως τίθεται το ερώτημα αν πραγματικά τα κύτταρα πρέπει να υποστούν EMT ώστε να διασπαρούν, γιατί οι απομακρυσμένες μεταστάσεις διαθέτουν παρόμοιο ιστοπαθολογικό προφίλ με την πρωτοπαθή εστία από την οποία προήλθαν.

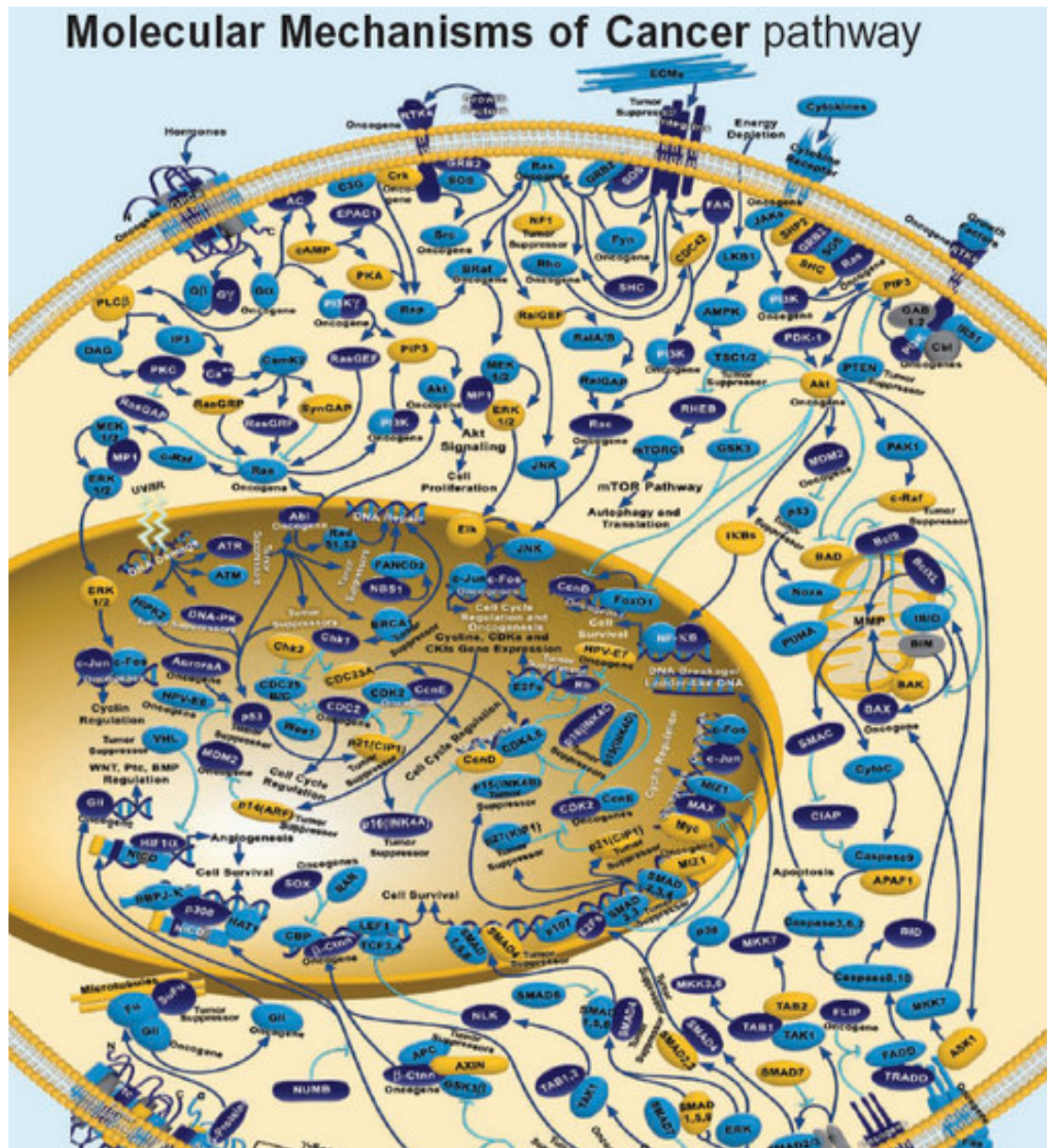
Αυτή η ασυμφωνία εκλογικεύεται από την παρατήρηση ότι μετά τη μεταστατική διασπορά και τη δημιουργία του μεταστατικού κλώνου, μέσω της MET, επανέρχονται τα μεσεγχυματικά καρκινικά κύτταρα σε μια πιο διαφοροποιημένη επιθηλιακή κατάσταση^{143,144}. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι το επίπεδο μεθυλίωσης του DNA του προαγωγέα του γονιδίου CDH1

ποικίλλει στα διαφορετικά στάδια της μεταστατικής διαδικασίας. Σε πρωτοπαθή καρκινώματα του μαστού, τα καρκινικά κύτταρα που υφίστανται υπερμεθυλίωση και καταστολή της έκφρασης του CDH1, είναι πιο επιθετικά και μεταστατικά αλλά στη συνέχεια η έκφραση της E-καντχερίνης ξαναεπάγεται στις μεταστατικές εστίες, μια αλλαγή που συνοδεύεται από την απομεθυλίωση του προαγωγέα του CDH1¹⁴⁵. Πιθανόν, καρκινικά κύτταρα από την πρωτοπαθή εστία με συγκεκριμένο επίπεδο μεθυλίωσης του DNA να είναι αυτά που «επιλέγονται» ώστε να διηθήσουν απομακρυσμένους ιστούς και να επιβάλλουν τον φαινότυπό τους στις μακροσκοπικές μεταστάσεις. Ωστόσο, αυτό το μοντέλο της διαδοχικής εναλλαγής EMT και MET δεν έχει μελετηθεί αρκετά.

7. ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΕΙΣ

Μέσω της κατανόησης των μηχανισμών που διέπουν την EMT, θα μπορούσαμε να την σταματήσουμε. Η θεραπευτική στρατηγική έχει ως στόχο την αποτροπή των μεταστάσεων και γενικά της υποτροπής του καρκίνου. Οι πιο εμφανείς στόχοι είναι οι υποδοχείς τυροσινικών κινασών όπως οι MET, IGFR1 και η οικογένεια ERBB. Επιπλέον, μη-υποδοχείς τυροσινικών κινασών, κυρίως ο SRC, θα μπορούσαν να αποτελέσουν καλούς στόχους για το σχεδιασμό φαρμάκων κατά της EMT. Το μονοπάτι μεταγωγής σήματος RAS παρήγαγε επίσης θεραπευτικούς στόχους. Αναστολείς της φαρνεσυλατρανσφεράσης, οι οποίοι θεωρούνται απαραίτητη για την πρόσδεση του RAS στην κυτταρική μεμβράνη, έχουν δοκιμαστεί σε αρκετούς όγκους, ενώ αναστολείς του MEK και MAPK χρησιμοποιούνται ακόμη μόνο σε πειραματικά μοντέλα¹⁴⁶. Η αποκατάσταση της έκφρασης της E-καντχερίνης θα μπορούσε, επίσης, να αποτελέσει ένα μηχανισμό αναστολής της EMT μέσω της επανενεργοποίησης των τυροσινικών φωσφατασών, όπως της PTP-LAR ή μέσω της αναστολής των μεταγραφικών παραγόντων που καταστέλλουν την έκφρασή της, όπως του Snail, SIP1 και E2A¹⁴⁷. Γενικότερα, η εγκατάσταση ενός προγράμματος MET θα επιβράδυνε την αποδιαφοροποίηση και της διασπορά των καρκινικών κυττάρων. Μελλοντικά θα πρέπει οι μελέτες όχι μόνο να ερευνούν του μοριακούς μηχανισμούς της EMT αλλά να προχωρούν

στην ανεύρεση θεραπευτικών παραγόντων που δυνητικά θα προλαμβάνουν τη μετάσταση¹⁴⁸.



Δ. ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Η διασπορά των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο είναι ένας βασικός παράγοντας εξέλιξης του καρκίνου, ο οποίος καταστέλλει τη δυνατότητα αποτελεσματικής θεραπείας και ουσιαστικά επιβαρύνει την πρόγνωση του ασθενή. Μόλις προσφάτως ξεκινήσαμε να κατανοούμε τους μηχανισμούς διασποράς των καρκινικών κυττάρων και να αναγνωρίζουμε πιθανούς θεραπευτικούς στόχους ώστε να προλάβουμε ή τουλάχιστον να περιορίσουμε το εύρος της μεταστατικής νόσου. Όσο αυτοί οι μηχανισμοί γίνονται καλύτερα κατανοητοί, τόσο εντοπίζονται πρισσότερες ομοιότητες με τους αντίστοιχους μηχανισμούς μετανάστευσης και διήθησης. Οι ομοιότητες αυτές οδηγούν στην υπόθεση ότι κατά την ογκογένεση, τα αναπτυξιακά μονοπάτια μεταγωγής σήματος ενεργοποιούνται ανάρμοστα και έτσι οδηγούμαστε στην εξέλιξη του καρκίνου. Η EMT είναι ένας πρωταρχικός μηχανισμός μετανάστευσης και διήθησης κατά την φυσιολογική ανάπτυξη. Ωστόσο, η επανενεργοποίηση αυτού του μηχανισμού κατά την ογκογένεση συντελεί στην πρόοδο της νόσου.

Στόχος της συγκεκριμένης μελέτης είναι να αναδείξουμε την ενεργοποίηση της EMT σε ένα τύπο όγκων οι οποίοι είναι κατεξοχήν μεταστατικοί, στα καρκινώματα αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας, και να αποδείξουμε ότι η ύπαρξη του EMT φαινότυπου συσχετίζεται με αρνητική προγνωστική αξία για τον ασθενή. Επιπλέον, θέλαμε να μελετήσουμε την έκφραση των μη κωδικοποιούντων RNAs (miRNAs) σε ασθενείς που έφεραν ή δεν έφεραν τον EMT φαινότυπο, ώστε το ρυθμιστικό τους πλαίσιο να αποτελέσει μελλοντικά πεδίο έρευνας για πιθανούς θεραπευτικούς στόχους.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

**Α. ΑΝΟΣΟΪΣΤΟΧΗΜΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΗΣ
ΠΡΟΣ ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΗ ΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΣΕ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ
ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΕΣΤΙΑΣ: ΕΠΙΠΤΩΣΗ,
ΣΥΣΧΕΤΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΗ ΑΞΙΑ**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο μεταστατικός Καρκίνος Αγνώστου Πρωτοπαθούς Εστίας (ΚΑΠΕ) υπολογίζεται ότι αποτελεί το 3% όλων των νεοπλασιών και ανήκει ανάμεσα στις 10 συχνότερες διαγνώσεις καρκίνου. Τα ΚΑΠΕ αποτελούν μια ετερογενή ομάδα καρκινωμάτων κυρίως επιθηλιακής προέλευσης, με ιδιαίτερη βιολογική συμπεριφορά και πιθανώς μοναδική βιολογία¹. Η φυσική ιστορία των ασθενών με ΚΑΠΕ είναι εξίσου ετερογενής με αναφερόμενη διάμεση επιβίωση από 4 έως 11 μήνες. Ωστόσο, συγκεκριμένες υποομάδες του ΚΑΠΕ, που αναγνωρίζονται μέσω συγκεκριμένων κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών, φαίνεται να ανταποκρίνονται στη θεραπεία και να απολαμβάνουν μακροχρόνιο έλεγχο της νόσου. Παρ'όλα αυτά, η συντριπτική πλειοψηφία των ασθενών (80%) έχουν συστηματικές σπλαγχνικές μεταστάσεις με ιστολογία αδενοκαρκινώματος ή πτωχά διαφοροποιημένου καρκινώματος και ανήκουν στην υποομάδα πτωχής πρόγνωσης του ΚΑΠΕ, η οποία χαρακτηρίζεται από πρόωρη συστηματική διασπορά, αντίσταση τη θεραπεία και ζοφερή έκβαση¹⁴.

Ο καρκίνος τελικού σταδίου είναι αλληλένδετος με τη μεταστατική διασπορά η οποία είναι η συχνότερη αιτία θανάτου των ασθενών με καρκίνο. Ο καταρράκτης της μετάστασης περιλαμβάνει αρκετά στάδια των οποίων το έσχατο είναι ο σχηματισμός δευτεροπαθών εστιών σε απομακρυσμένες θέσεις¹⁴⁹. Μία διαδικασία που συμβάλλει στα αρχικά στάδια της μετάστασης είναι η Επιθηλιακή προς Μεσεγχυματική Μετατροπή (EMT). Η EMT αναφέρεται σε ένα πολύπλοκο μοριακό και κυτταρικό προγραμματισμό κατά τον οποίο τα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν τα διαφοροποιημένα τους χαρακτηριστικά - απώλεια της κυτταρικής προσκόλλησης, της πολικότητας της βασικής μεμβράνης και της σταθερότητας - και αποκτούν αντίστοιχα μεσεγχυματικούς χαρακτήρες, όπως κινητικότητα, επιθετικότητα και αντίσταση στην απόπτωση. Η απορρύθμιση αυτού του προγραμματισμού έχει παθολογικές συνέπειες⁷⁸. Η EMT χαρακτηρίζεται από την υποέκφραση επιθηλιακών δεικτών, κυρίως της E-καντχερίνης, αυξημένη έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα που την καταστέλλει, SNAIL και υπερέκφραση μεσεγχυματικών δεικτών όπως η N-καντχερίνη και η βιμεντίνη¹⁵⁰. Σε κυτταρικό επίπεδο, η EMT προάγει ένα μηχανισμό με τον οποίο τα καρκινικά κύτταρα εγκαταλείπουν την πρωτοπαθή εστία και εισέρχονται στους γύρω ιστούς και τα αγγεία θέτωντας τις βάσεις της μεταστατικής διασποράς. Επιπλέον, τα μεταστατικά καρκινικά

κύτταρα φαίνεται να αποκτούν ιδιότητες αυτοανανέωσης, παρόμοιες με αυτές των αρχέγονων πολυδύναμων κυττάρων ώστε να δημιουργήσουν μακροσκοπικές μεταστάσεις¹⁵¹. Αυτό φαίνεται να αυξάνει την πιθανότητα να είναι η EMT ο μηχανισμός που προσδίδει την ικανότητα αυτή στα διηθητικά καρκινικά κύτταρα¹⁵². Επομένως, δεδομένου ότι η EMT έχει υποθεθεί ότι συμβάλλει στην εξέλιξη του καρκίνου και σχετίζεται με πολυδύναμα αρχέγονα χαρακτηριστικά, θελήσαμε να διαπιστώσουμε την επίπτωσή της σε μια αναδρομική σειρά 100 ασθενών με ΚΑΠΕ και να ερευνήσουμε τη σχέση της με συγκεκριμένα παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, με την έκφραση της πρωτεΐνης NOTCH και την απόκτηση φαινοτυπικών ιδιοτήτων αρχέγονου δυναμικού. Επιπλέον, θελήσαμε να εξετάσουμε αν η ύπαρξη ενός EMT φαινοτύπου προσδίδει προβλεπτική αξία ως προς την απάντηση στη θεραπεία και την τελική έκβαση των ασθενών.

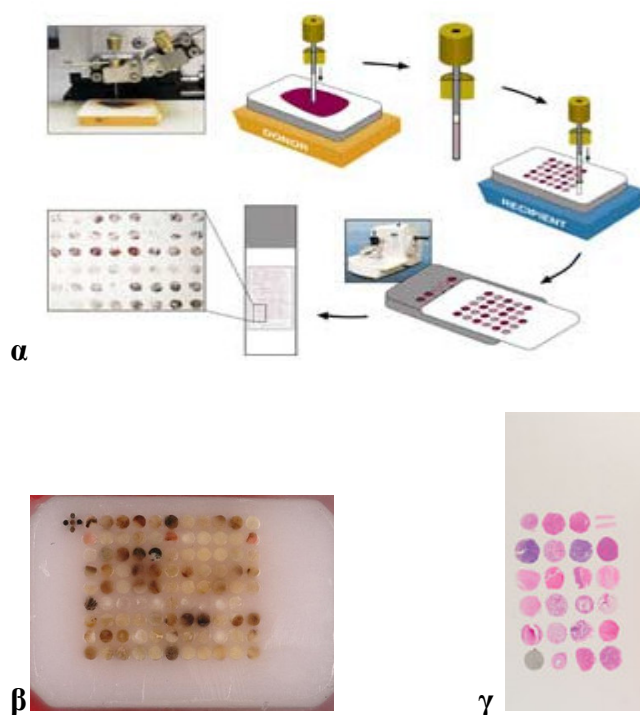
2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ασθενείς

Η τράπεζα των ασθενών αποτελούνταν από 150 ασθενείς που διαγνώστηκαν με ΚΑΠΕ και αντιμετωπίστηκαν σε κέντρα της HeCOG (Hellenic Cooperative Oncology Group) όπως και σε κέντρα της Βαλένθιας, Ισπανία (Institute of Health Research Hospital Clinic of Valencia –INCLIVA- University of Valencia, Spain). Από τους 100 από αυτούς ελήφθησαν δείγματα όγκου (μπλοκ). Όλοι οι ασθενείς είχαν υποβληθεί σε μια συγκεκριμένη διαγνωστική διερεύνηση η οποία αποτελούνταν από τη λήψη ιστορικού, τη φυσική εξέταση, αξονική τομογραφία θώρακος-κοιλίας-πυέλου, μαστογραφία στις γυναίκες, πλήρες αιματολογικό και βιοχημικό προφίλ, προστατικό αντιγόνο και α-φετοπρωτεΐνη και ενδοσκοπικές μελέτες αναπνευστικού και γαστρεντερικού συστήματος αναλόγως των συμπτωμάτων. Όλοι οι ασθενείς παρέιχαν γραπτή συγκατάθεση για τη χρήση των δεδομένων τους και του βιοπτικού τους υλικού.

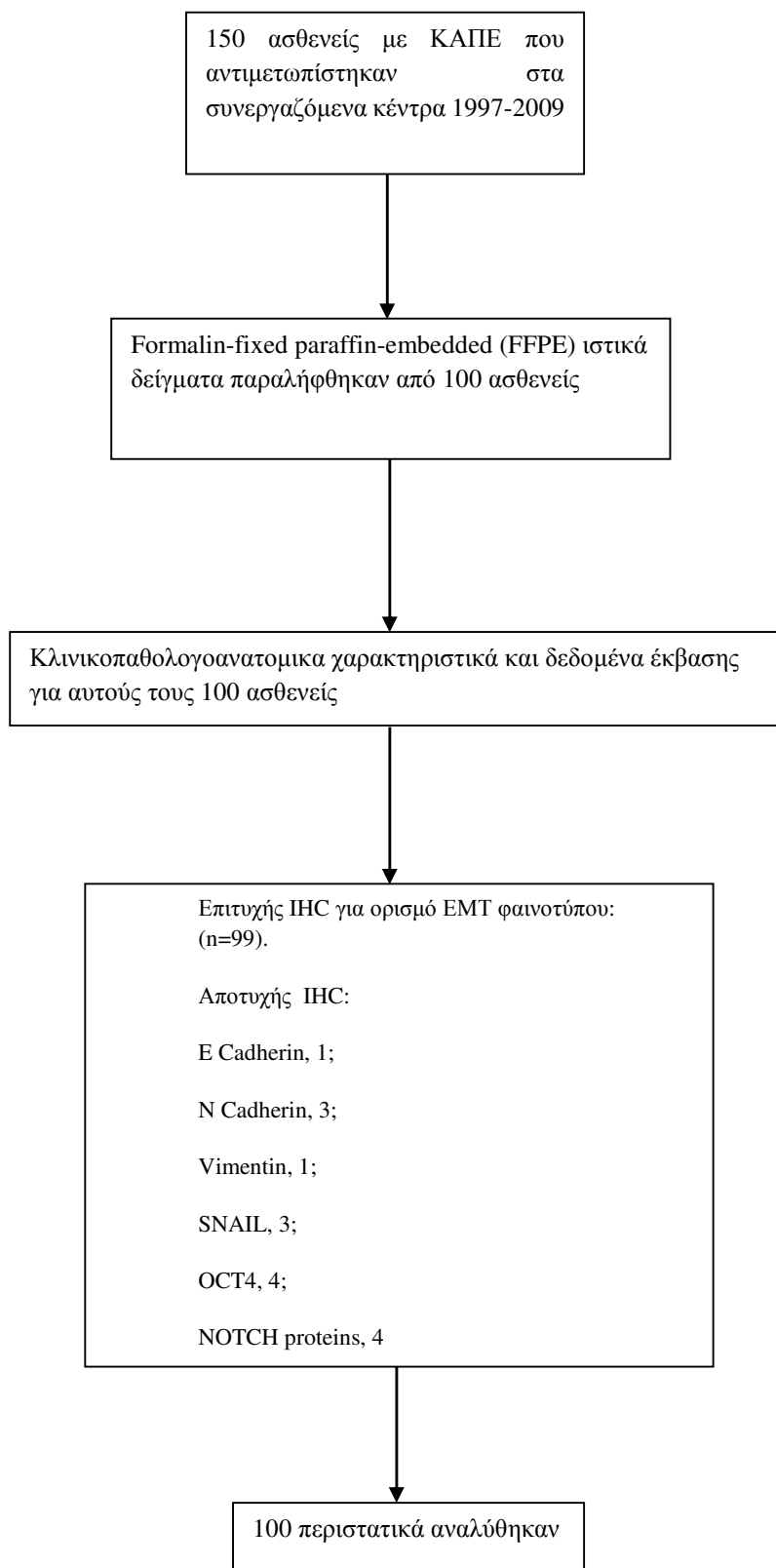
2.2 Ιστικές μικροσυστοιχίες (Tissue Microarrays-TMAs)

100 ιστικά μπλοκ παραφίνης (Formalin-fixed paraffin-embedded - FFPE) ασθενών με ΚΑΠΕ αναγνωρίστηκαν αναδρομικά. Κάθε περιστατικό επανελέγχθηκε ιστολογικά από έμπειρους παθολογοανατόμους με στόχο να πιστοποιηθεί η ύπαρξη όγκου, η παθολογοανατομική διάγνωση επιθηλιακού καρκινώματος και να αποκλεισθεί η διάγνωση λεμφώματος, μελανώματος, μεσεγχυματικής προέλευσης όγκου και όγκου εκ γεννητικών κυττάρων. Μεταστατικές εστίες που ήταν προσβάσιμες προς βιοψία ήταν το ήπαρ (16), ο πνεύμονας (9), οι λεμφαδένες (44), οι περιτοναϊκές εμφυτεύσεις (20). Ιστικοί κύλινδροι πάχους 1.5mm εισήχθησαν σε ένα ενιαίο μπλοκ παραφίνης με ειδικές ισαπέχουσες θέσεις υποδοχής δείγματος για ιστικές μικροσυστοιχίες στο Παθολογοανατομικό Τμήμα του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Δύο κηλίδες (spots) από κάθε όγκο, πάχους 5μm τοποθετήθηκαν σε κάθε ένα από πέντε κύρια πλακίδια (master array slides), ένα για κάθε υπό μελέτη δείκτη. Αυτά δόθηκαν στο Παθολογοανατομικό Τμήμα του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων για ανοσοϊστοχημική χρώση και εκτίμηση. Ακολουθεί REMARK flow chart¹⁵³.



Εικόνα 6. Ιστικές Μικροσυστοιχίες α: παραγωγή, β:μπλοκ παραφίνης, γ:master array slide

Σχήμα 2. REMARK flow chart



2.3 Ανοσοϊστοχημεία (IHC)

Οι ιστικές μικροσυστοιχίες μελετήθηκαν ως προς την ανοσοϊστοχημική έκφραση του επιθηλιακού δείκτη επιφανείας E-καντχερίνη, των μεσεγχυματικών δεικτών επιφανείας N-καντχερίνη και βιμεντίνη, του μεταγραφικού παράγοντα που προάγει την EMT SNAIL και του δείκτη αρχέγονου πολυδύναμου δυναμικού OCT4.

Χρώσεις:

- OCT-4A: C52G3 rabbit monoclonal antibody; Cell Signaling
- SNAIL rabbit polyclonal to SNAIL – aminoterminal end, ab70983; Abcam Cambridge, UK
- N-cadherin: monoclonal mouse anti-N-cadherin, Clone 3B9; Invitrogen
- E-cadherin: mouse anti-E-cadherin, Clone 4A2C7; Invitrogen
- VMN: mouse anti-vimentin, Clone V9; Invitrogen
- NOTCH1: anti-activated NOTCH1 (ab8925) at 1:300 dilution; Abcam
- NOTCH 2: anti-activated NOTCH2 (ab72803) at 1:100 dilution; Abcam
- NOTCH3: anti-NOTCH3 (ab23426) at 1:1600, Abcam

Χρησιμοποιήθηκαν τομές πάχους 5μm από κάθε μπλοκ μικροσυστοιχίας. Το αυτοματοποιημένο σύστημα επεξεργασίας BenchMark XT IHC/ISH Staining Module (Ventana Medical Systems, Inc., Tucson, AE, USA) χρησιμοποιήθηκε για τη βελτιστοποίηση της απόδοσης των αντισωμάτων OCT-4A, SNAIL, NCADH, ECADH και VIM. Ακολουθήθηκε πλήρως αυτοματοποιημένο πρωτόκολλο κατά το οποίο όλες οι διεργασίες- αποπαραφίνωση, τιτλοποίηση, πλύση, ενίσχυση, εντοπισμός σήματος και χρώση- έγιναν σε ένα βήμα (XT iVIEW DAB v3 procedure). Συγκεκριμένα, το σύστημα επεξεργασίας ξεκίνησε αυτόματα τις διεργασίες:

1. Αποπαραφίνωση
2. 3 κύκλοι μονιμοποίησης
 - Ήπιος (8 λεπτά)
 - Τυπικός (30 λεπτά)
 - Εκτεταμένος (60 λεπτά)

3. Επιλογή θερμοκρασιών επώασης
4. Στοιχειομετρική ανάλυση/ αποκάλυψη αντιγονικών επιτόπων
 - OCT-4A dilution 1:50
 - SNAIL dilution 1:10
 - N-cadherin dilution 1:30
 - E-cadherin dilution 1:30
 - vimentin dilution 1:30
5. Επώαση
6. Ενίσχυση του αντισώματος
7. Αντίχρωση (4 λεπτά σε αιματοξυλίνη 10%)
8. Μετά αντίχρωση (Εφαρμογή bluing reagent)
9. Τοποθέτηση καλυπτρίδας

Θετικά δείγματα ελέγχου ήταν καρκινώματα από μαστό, έντερο, νεφρό και θυροειδή αδένα, φυσιολογικός πλακούντας και λέμφωμα αμυγδαλής ενώ για το αρνητικό δείγμα ελέγχου, το μελετώμενο αντιγόνο παραλήφθηκε. Ο EMT φαινότυπος ορίστηκε ως μερική απώλεια της έκφρασης της E-καντχερίνης, έκφραση οποιασδήποτε από την N-καντχερίνη/ βιμεντίνη και ταυτόχρονη έκφραση SNAIL, όπως προσδιορίστηκε από το ποσοστό των χρωματισμένων κυττάρων¹⁵⁴. Τα πλακίδια εκτίμηθηκαν ταυτόχρονα από 2 παθολογοανατόμους και την υπότροφο σε οπτικό μικροσκόπιο τριών κεφαλών χωρίς να γνωρίζουν εκ των προτέρων τα κλινικά και παθολογοανατομικά δεδομένα. Θετικά χρωματισμένα φλεγμονώδη κύτταρα και περιοχές νέκρωσης δεν συμπεριελήφθησαν στην μέτρηση.

Πλήρη επιδημιολογικά, κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά και η θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών καταγράφηκαν ηλεκτρονικά προς περαιτέρω ανάλυση.

2.4 Ανοσοϊστοχημικά cut-offs

Δεδομένου ότι δεν υπάρχει πιστοποιημένο σύστημα βαθμονόμησης (scoring system) της ανοσοϊστοχημικής χρώσης για τα υπό μελέτη βιομόρια και ότι δεν υπάρχει προηγούμενη εμπειρία στα ΚΑΠΕ, τα ανοσοϊστοχημικά

cut-offs υπολογίστηκαν προοπτικά με βάση αναλύσεις κατανομής σε ιστογράμματα συχνότητας. Συγκεκριμένα:

- Μερική απώλεια της έκφρασης της E-καντχερίνης ορίστηκε όταν η χρώση παρατηρείται σε <60% των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για N-καντχερίνη ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε $\geq 40\%$ των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για βιμεντίνη ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε $\geq 40\%$ των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για SNAI1 ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε >80% των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για OCT4 ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε τουλάχιστον 1% των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για NOTCH1 ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε $\geq 5\%$ των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για NOTCH2 ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε >20% των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για NOTCH3 ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε >80% των καρκινικών κυττάρων

Στη συνέχεια, για να μην απωλέσουμε τιμές που θα μπορούσαν να έχουν προγνωστική αξία, κάναμε ROC (Receiver-operating-curve) ανάλυση στην ανοσοϊστοχημική βαθμονόμηση, λαμβάνοντας το θάνατο ως ενδεικτική παράμετρο και δεν βρήκαμε κάποιο cut-off με σημαντική ευαισθησία και ειδικότητα.

2.5 Στατιστική ανάλυση

Οι συσχετισμοί μεταξύ των υπό μελέτη δεικτών εκτιμήθηκαν με τον συντελεστή συσχέτισης Spearman (Spearman correlation coefficient-Rho). Το τεστ Kruskal-Wallis χρησιμοποιήθηκε ως μη παραμετρικό ανάλογο (ANOVA). Το Cox μοντέλο αναλογικού κινδύνου χρησιμοποιήθηκε για να μελετήσουμε την προγνωστική αξία των διάφορων μεταβλητών και το χ^2 τεστ για την προβλεπτική τους αξία, αντίστοιχα. Το διάστημα ελεύθερο υποτροπής

(Progression-free survival-PFS) υπολογίστηκε από τη διάγνωση έως την πρόοδο της νόσου ή το θάνατο. Η ολική επιβίωση (overall survival-OS) υπολογίστηκε από τη διάγνωση έως το θάνατο ή έως την τελευταία ημερομηνία παρακολούθησης (follow-up) με τις καμπύλες Kaplan-Meier και το Logrank τεστ. Όλες οι υπολογιζόμενες p-values ήταν διωνυμικές και τα αποτελέσματα θεωρούνταν στατιστικώς σημαντικά όταν $p < 0.05$. Όλες οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού SPSS 16.0 (Chicago, Illinois, USA).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ασθενείς και χαρακτηριστικά του όγκου

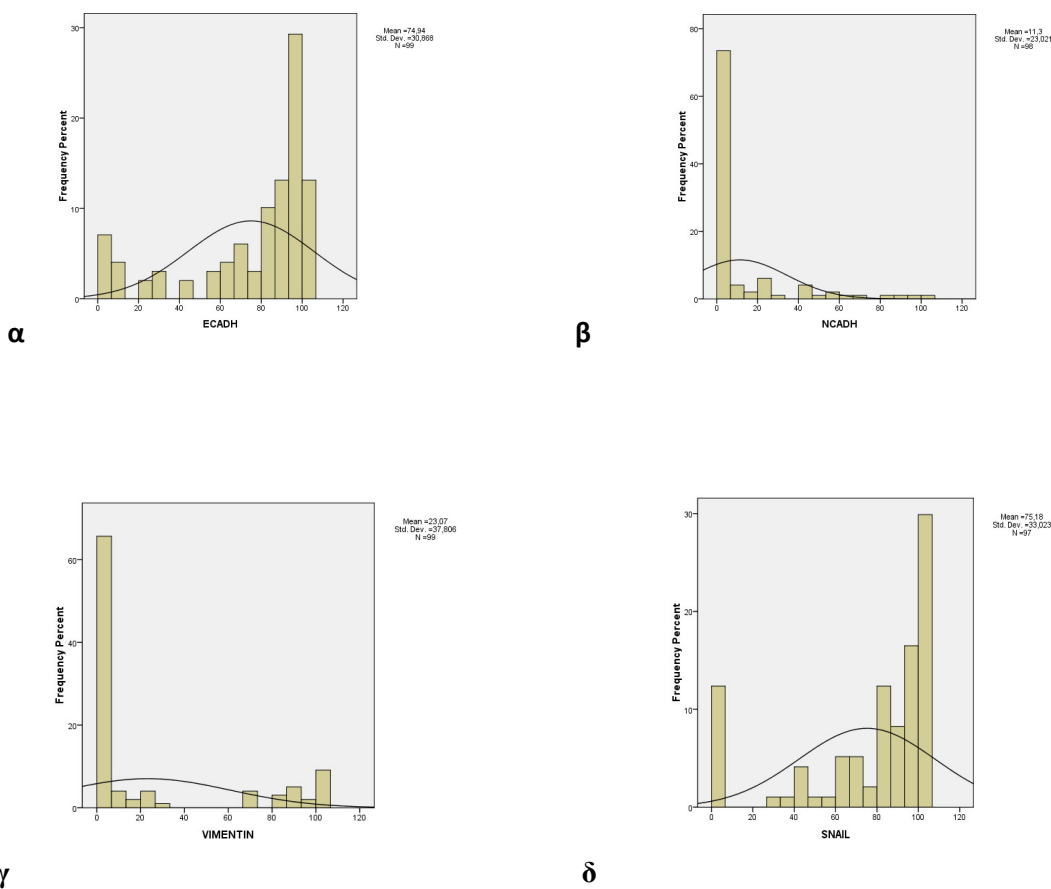
Ο υπό μελέτη πληθυσμός αποτελούνταν από 100 ασθενείς που διαγνώστηκαν με ΚΑΠΕ (47 άνδρες, 53 γυναίκες) με διάμεση ηλικία τα 61 έτη και κυρίως καλή φυσική κατάσταση (Performance Status-PS 0-1 75%). Στην πλειοψηφία των ασθενών η ιστολογική διάγνωση ήταν αδenoκαρκίνωμα, με πτωχή διαφοροποίηση στο 46%. 68 ασθενείς υποβλήθηκαν σε παρηγορητική χημειοθεραπεία, κυρίως με βάση την πλατίνα (49). Λεπτομερή επιδημιολογικά, κλινικοπαθολογοανατομικά και θεραπευτικά δεδομένα φαίνονται στον πίνακα που ακολουθεί.

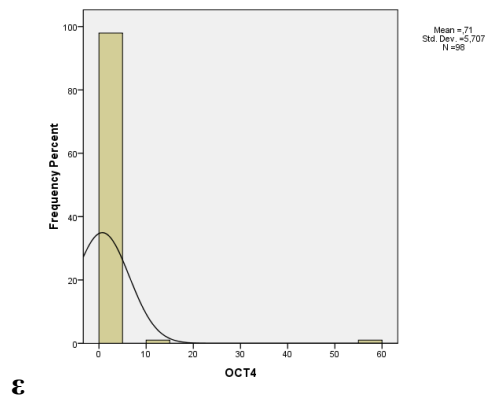
Πίνακας 9. Ασθενείς και χαρακτηριστικά του όγκου

Παράμετρος	Αριθμός περιπτώσεων
Γένος	
Άνδρες/Γυναίκες	47/53
Ηλικία, έτη	
Διάμεση (εύρος)	61 (35-85)
PS κατηγοριοποίηση	
PS 0-1 vs 2	69/23
Απωλεσθέντα δεδομένα	8
Ιστολογία	
Αδενοκαρκίνωμα	55
Πλακώδες καρκίνωμα	20
Πτωχά διαφοροποιημένο/ αδιαφοροποίητο καρκίνωμα	15
Μη ταξινομούμενο νεόπλασμα	9
Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)	
Καλά διαφοροποιημένο	7
Μέτρια διαφοροποιημένο	38
Πτωχά διαφοροποιημένο	46
Απωλεσθέντα δεδομένα	9
Αριθμός μεταστατικών εστιών	
1	51
2 ή περισσότερες	49
Υπομάδα ΚΑΠΕ	
Σπλαγγνική	27
Μασχαλιαίοι λεμφαδένες	8
Περιτοναϊκή καρκινωμάτωση	20
Πλακώδες τραχήλου/ βουβώνων	11
Λεμφαδένες	25
Απωλεσθέντα δεδομένα	9
Χημειοθεραπεία	
Παρηγορητική	68
Βασισμένη στην πλατίνα	49
Απάντηση στη θεραπεία	
Πλήρης/ Μερική ύφεση	40

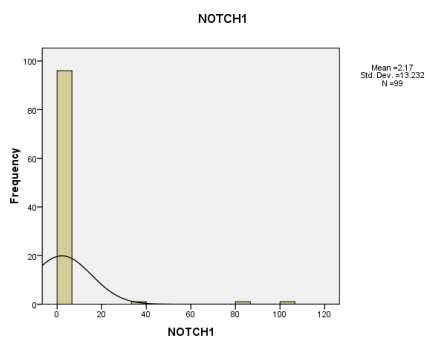
3.2 Ανοσοϊστοχημική έκφραση των βιομορίων

Τα βιομόρια με την πιο συχνή ανοσοϊστοχημική έκφραση σύμφωνα με τις cut-off τιμές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η E-καντχερίνη (78.8% των περιπτώσεων) και το SNAIL (61.9% των περιπτώσεων). Αντιθέτως, η N-καντχερίνη, η βιμεντίνη και το OCT4 εκφράστηκαν λιγότερο. Συγκεκριμένα, η βιμεντίνη εμφάνισε ένα διχοτομημένο πρότυπο έκφρασης με τις περισσότερες περιπτώσεις να είναι είτε αρνητικές είτε πολύ έντονα θετικές. Η χρώση ήταν κυτταροπλασματική και μεμβρανική για την E-καντχερίνη, την N-καντχερίνη και τη βιμεντίνη, κυτταροπλασματική και πυρηνική για το SNAIL και πυρηνική μόνο για το OCT4. Τα ιστογράμματα κατανομής συχνοτήτων για την ανοσοϊστοχημική έκφραση της E-καντχερίνης, της N-καντχερίνης, της βιμεντίνης, του SNAIL, του OCT4 και των NOTCH1,2,3 ως προς το ποσοστό των χρωματισμένων κύτταρων σε όλους τους ασθενείς είναι τα ακόλουθα (εικόνα).

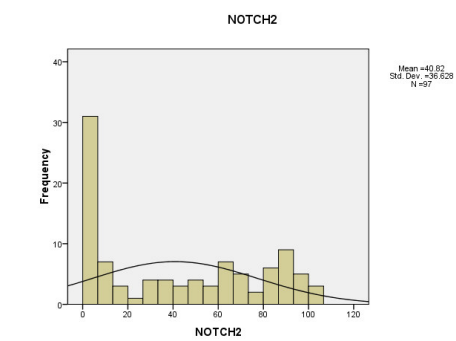




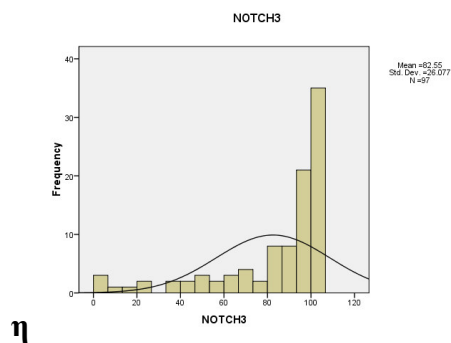
ε



στ



ζ

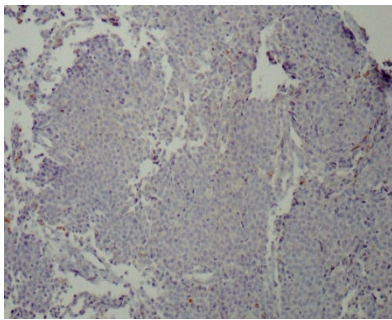


η

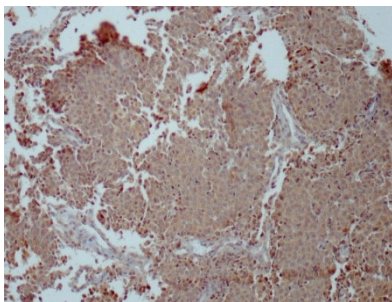
Εικόνα 7. Ιστογράμματα συχνοτήτων που δείχνουν την κατανομή έκφρασης (% των χρωματισμένων κυττάρων)

α: E-καντηρίνη, β: N-καντηρίνη, γ: Βιμεντίνη, δ: SNAIL, ε: OCT4, στ: NOTCH1, ζ: NOTCH2, η: NOTCH3

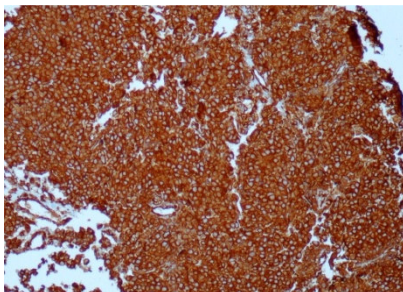
Από τους υπό μελέτη ασθενείς, 21 (21.2%) είχαν χαμηλή έκφραση E-καντχερίνης, 13 (13.8%) είχαν θετική έκφραση N-καντχερίνης, 23 (23.2%) βιμεντίνης και 60 (61.9%) θετική έκφραση SNAIL. Κανένας ασθενής δεν εμφάνισε θετική χρώση για το OCT4. Τον ανοσοϊστοχημικό ορισμό της EMT ως μερική απώλεια της έκφρασης της E-καντχερίνης με θετική έκφραση της N-καντχερίνης, της βιμεντίνης ή και των δυο και ταυτόχρονη έκφραση του SNAIL μεταγραφικού παράγοντα πληρούσαν μόνο 8 ασθενείς (8.1%). Αντιπροσωπευτική εικόνα ΚΑΠΕ με θετικό ανοσοϊστοχημικό EMT φαινότυπο είναι η ακόλουθη (Εικόνα 8).



α



β



γ

Εικόνα 8. Μία περίπτωση ΚΑΠΕ με θετικό EMT φαινότυπο (ανοσοϊστοχημικά)

α: χαμηλή έκφραση E-καντχερίνης β: υψηλή έκφραση SNAIL

γ: υψηλή έκφραση βιμεντίνης

Δεδομένης της έλλειψης στοιχείων σχετικά με το βέλτιστο τρόπο εκτίμησης της ανοσοϊστοχημικής έκφρασης των EMT δεικτών, χρησιμοποιήσαμε επιπλέον μία ημι-ποσοτική μέθοδο προσδιορισμού της χρώσης η οποία έχει χρησιμοποιηθεί και σε προηγούμενες μελέτες. Έτσι εκτός από το να μετρούμε μόνο το ποσοστό των χρωματισμένων κυττάρων, εισάγαμε και την ένταση της χρώσης ως μεταβλητή και αποκομίσαμε το H-score. Το H-score υπολογίστηκε ως το αποτέλεσμα του πολλαπλασιασμού του ποσοστού των χρωματισμένων κυττάρων επί την ένταση της χρώσης, η οποία προσδιορίστηκε ως 1, 2 ή 3 σταυροί¹⁵⁵.

Διεξάγαμε, αντιστοίχως, αναλύσεις κατανομής συχνοτήτων για να επιλέξουμε φυσικά cut-offs με βάση το H-score για κάθε ένα από τα υπό μελέτη βιομόρια, καταλήγοντας σε ελαφρώς διαφορετικά αποτελέσματα ως προς την εμφάνιση του EMT φαινοτύπου. 37 ασθενείς (37.4%) είχαν χαμηλή έκφραση της E-καντχερίνης, ενώ 23 (23.5%), 31 (31.3%), 47 (48.5%) και 0 είχαν θετική έκφραση N-καντχερίνης, βιμεντίνης, SNA1L και OCT4 αντίστοιχα. Ο EMT φαινότυπος με βάση τα αποτελέσματα της ανοσοϊστοχημικής χρώσης παρατηρήθηκε σε 16 ασθενείς (16%). Όταν συγκρίναμε τις EMT-θετικές περιπτώσεις με βάση το ποσοστό των χρωματισμένων κυττάρων με τις EMT-θετικές περιπτώσεις με βάση το H-score, παρατηρήσαμε ότι οι 8 επιπλέον περιπτώσεις είχαν ένα κοινό πρότυπο. Πρόκειται για καρκινώματα που εμφάνισαν απώλεια της έκφρασης της E-καντχερίνης, αυξημένη ένταση χρώσης της N-καντχερίνης (2+/3+) και χρώση της βιμεντίνης κάτω από το 40% των καρκινικών κυττάρων.

Πίνακας 10. Δεδομένα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (IHC) και EMT φαινότυπος

	E-καντχερίνη	N-καντχερίνη	Βιμεντίνη	SNAIL	OCT4	EMT positive
N	99	97	99	97	98	99
<i>IHC</i>						
<i>Cut-off (% χρωματισμένων κυττάρων)</i>	≤60%	≥40%	≥40%	≥85%	≥1%	
Περιπτώσεις (%)	21 (21.2)	13 (13.4)	23 (23.2)	60 (61.9)	0	8 (8.1)
Διάμεσος (Median)	90	0	0	90	0	
Διατεταρτημοριακό εύρος (Interquartile range)	65-95	0-10.38	0-25	65-100	0	
<i>H-Score</i>						
<i>H Score cut-off</i>	<140	>20	>20	>100		
Περιπτώσεις (%)	37 (37.4)	23 (23.5)	31 (31.3)	47 (48.5)	0	16 (16)
Διάμεσος (Median)	180	0	0	100	0	
Διατεταρτημοριακό εύρος (Interquartile range)	67-278	0-18.5	0-55	66-200	0	

H-score (0-300): % χρωματισμένα κύτταρα x ένταση της χρώσης

3.3 Συσχέτιση EMT φαινοτύπου με άλλα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

Η ύπαρξη EMT φαινότυπου συσχετίστηκε στατιστικώς σημαντικά με χαρακτηριστικά του όγκου που είχαν αρνητική προγνωστική αξία όπως το άρρεν φύλο, η πτωχή διαφοροποίηση και η παρουσία σπλαγγικών μεταστάσεων. Συγκεκριμένα, το 17.4% των ανδρών έφερε EMT-θετικούς όγκους ενώ καμία από τις γυναίκες ασθενείς δεν είχε EMT χαρακτηριστικά (χ^2 $p=0.002$). Επιπλέον, μόνο το 4.5% των μετρίως προς καλά διαφοροποιημένων όγκων είχαν EMT φαινότυπο (χ^2 $p=0.05$) σε σχέση με το 13.6% των χαμηλής διαφοροποίησης όγκων. Η EMT συσχετίστηκε επίσης και με την εντόπιση των μεταστάσεων σε σπλαγγικές εστίες. Συνολικά το 13.3% των ασθενών με σπλαγγικές μεταστάσεις ήταν EMT θετικοί σε σύγκριση με το 0.7% αυτών που δεν έφεραν σπλαγγικές εστίες (χ^2 $p=0.05$).

Διερευνήσαμε επίσης αν η έκφραση των μεσεγχυματικών δεικτών, η απώλεια του επιθηλιακού δείκτη E-καντχερίνη και η έκφραση του μεταγραφικού παράγοντα SNAIL συνδέονται μεταξύ τους ως συνεχείς μεταβλητές. Η αντιστρόφως ανάλογη σχέση της E-καντχερίνης με την N-καντχερίνη (Spearman's Rho correlation coefficient= -0.246, $p=0.015$) όπως και με τη βιμεντίνη (Spearman's Rho correlation coefficient= -0.324, $p=0.001$) ήταν στατιστικά σημαντική. Αυτά τα αποτελέσματα επιβεβαίωσαν τη βιολογική συνάφεια των παρατηρήσεών μας ότι η εμφάνιση της N-καντχερίνης και της βιμεντίνης στην επιφάνεια του κυττάρου και στο κυτταρόπλασμα είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την μείωση της έκφρασης της E-καντχερίνης, όπως ορίζεται ως βασικός μηχανισμός της EMT.

Στα πλαίσια μιας γενικότερης έρευνας πάνω στη δράση διαφόρων μονοπατιών μεταγωγής σήματος στα ΚΑΠΕ, παρατηρήσαμε μια στατιστικώς σημαντική σχέση του υποδοχέα NOTCH με την ανοσοϊστοχημική έκφραση συγκεκριμένων EMT βιοδεικτών. Από τις περιπτώσεις με υψηλή έκφραση του SNAIL, μόνο το 33% είχε χαμηλή έκφραση του NOTCH2, ενώ το 67% είχε υψηλή έκφραση του NOTCH2 (χ^2 $p=0.012$). Επιπροσθέτως, το πρότυπο έκφρασης της βιμεντίνης σχετιζόταν στατιστικώς σημαντικά με την έκφραση του NOTCH3. Συγκεκριμένα, από τις περιπτώσεις με υψηλή έκφραση της

βιμεντίνης, μόνο 9.5% είχε χαμηλή έκφραση του NOTCH3 ενώ το 90.5% είχε υψηλή έκφραση NOTCH3 (χ^2 $p=0.05$). Η επαγωγή του SNAIL από το NOTCH2 και η επαγωγή της βιμεντίνης από το NOTCH3 διατήρησαν την στατιστικώς σημαντική τους σχέση ακόμη και όταν αυτά τα βιομόρια μελετήθηκαν και ως συνεχείς μεταβλητές ($p<0.05$).

Πίνακας 11. Συσχετίσεις ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (% χρωματισμένων κυττάρων) μεταξύ διάφορων βιομορίων. Η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης θεωρήθηκε συνεχής μεταβλητή και το μη-παραμετρικό Spearman's Rho τεστ χρησιμοποιήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις

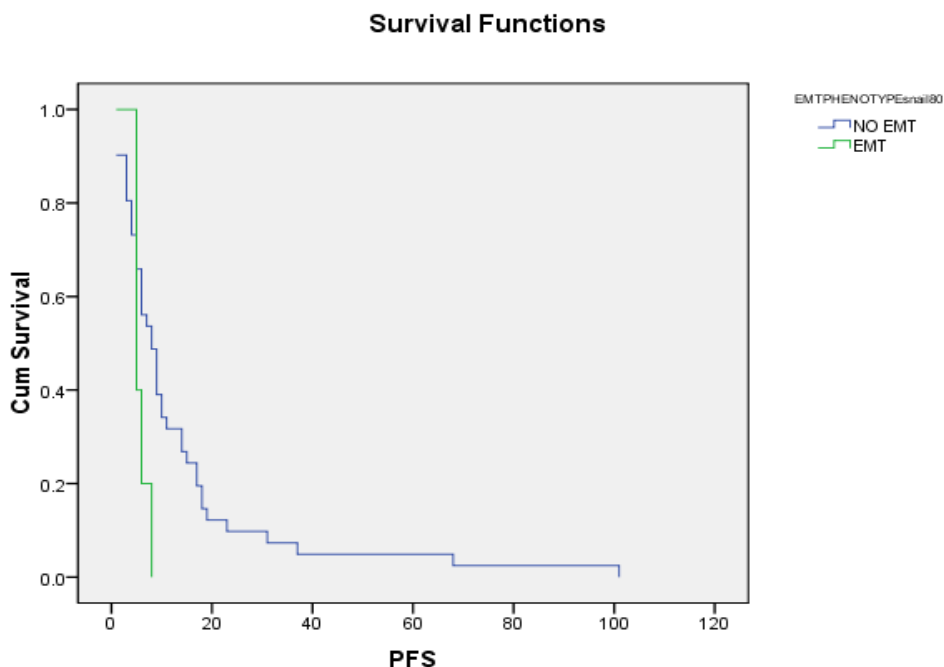
Spearman Rho test	N- καντχερίνη	Βιμεντίνη	SNAIL
E-καντχερίνη	-0.246 $p=0.015$	-0.324 $p=0.001$	
NOTCH2			0.240 $p=0.018$
NOTCH3		0.215 $p=0.036$	

3.4 Προγνωστική και προβλεπτική αξία

Κατά την περίοδο της ανάλυσης, ο διάμεσος χρόνος παρακολούθησης ήταν οι 40 μήνες. Αυτό το διάστημα, 47 ασθενείς (47%) εμφάνισαν πρόοδο νόσου και 61 (61%) πέθαναν. Η διάμεση ελεύθερη νόσου επιβίωση (PFS) ήταν 7 μήνες (95% confidence intervals CI= 4.761-9.239) ενώ η συνολική επιβίωση (OS) ήταν 12 μήνες (95% CI= 8.723-15.276).

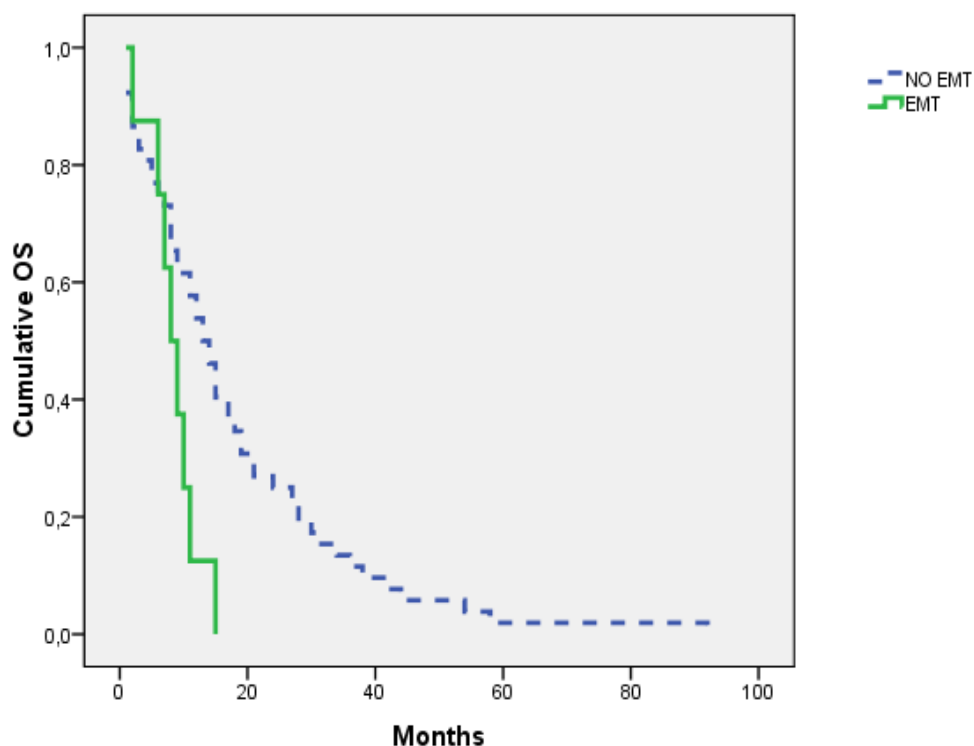
Από τους 8 ασθενείς που πληρούσαν τα κριτήρια του EMT φαινότυπου, οι 6 εμφάνισαν υποτροπή της νόσου ενώ και οι 8 πέθαναν. Αντιστοίχως, από

τους 92 ασθενείς οι οποίοι δεν έφεραν όγκους με EMT-θετικό φαινότυπο, οι 51 εμφάνισαν υποτροπή της νόσου και οι 54 κατέληξαν. Οι ασθενείς που έφεραν EMT-θετικούς όγκους έδειξαν μια τάση προς πρόωρη υποτροπή της νόσου με διάμεση PFS 5 μηνών (95% CI= 3.0-7.0) σε σχέση με τη διάμεση PFS 8 μηνών (95%CI= 5.31-10.69) αυτών που έφεραν EMT-αρνητικούς όγκους (log-rank $p=0.112$). Η διαφορά, ωστόσο, στην ολική επιβίωση ήταν στατιστικώς σημαντική με τους ασθενείς που έφεραν EMT-θετικούς όγκους να έχουν διάμεση OS 8 μήνες (95% CI= 5.226-10.772) χωρίς κανένας από αυτούς να συμπληρώσει το ένα έτος από τη διάγνωση. Αντιθέτως, οι ασθενείς που έφεραν EMT-αρνητικούς όγκους είχαν διάμεση OS 13 μήνες (95%CI= 9.859-16.141, log-rank $p=0.023$) και ποσοστό επιβίωσης στο 1 έτος 75%. Επιπλέον, ο EMT φαινότυπος δεν φάνηκε να προσδίδει προβλεπτική αξία ως απάντηση στη θεραπεία, δεδομένου ότι ο λόγος των ασθενών που απάντησαν προς αυτών που δεν απάντησαν ήταν παρόμοιος (περίπου 50%/ 50%), τόσο σε αυτούς που έφεραν EMT-θετικούς όσο και σε αυτούς που έφεραν EMT-αρνητικούς όγκους ($\chi^2 p=0.893$).



Εικόνα 9. Διάστημα ελεύθερο υποτροπής (PFS) αναλόγως του EMT φαινότυπου (% χρωματισμένων κυττάρων)

Overall Survival by tumoural EMT status

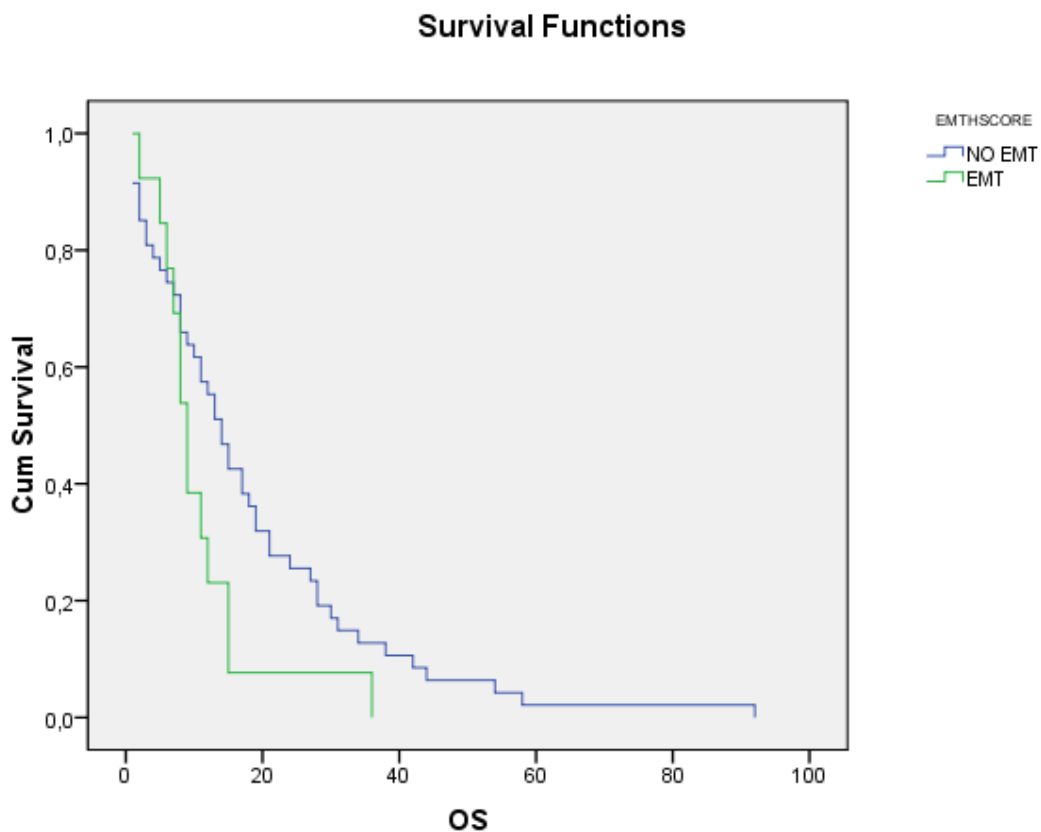


Εικόνα 10. Ολική επιβίωση (OS) αναλόγως του EMT φαινότυπου (% χρωματισμένων κυττάρων)

Επιπροσθέτως, θελήσαμε να μελετήσουμε αν ο EMT-φαινότυπος προσδίδει προγνωστική αξία συγκεκριμένα σε κάποιες κλινικοπαθολογοανατομικές υποομάδες των ΚΑΠΕ. Πράγματι, η υποομάδα των ασθενών με λεμφαδενικό ΚΑΠΕ μέσης γραμμής και EMT-αρνητικούς όγκους είχε OS 14 μήνες (95% CI= 12.3-15.6) σε σχέση με OS μόνο 10 μηνών (95% CI= 8.4-11.6) αυτών που είχαν EMT-θετικούς όγκους(log-rank $p=0.039$). Επίσης, ασθενείς με περιτοναϊκή καρκινωμάτωση είχαν αριθμητικώς υψηλότερη OS (21 μήνες) επί απουσίας EMT φαινοτύπου σε σχέση με OS 6 μηνών όταν είχαν όγκους με θετικό EMT φαινότυπο, παρ'όλο που αυτή η διαφορά δεν ήταν στατιστικώς σημαντική (log-rank $p=0.23$). Ωστόσο, δεδομένου του μικρου μεγέθους του δείγματος, δεν είναι σίγουρο αν η προγνωστική αξία του EMT φαινοτύπου στις ανωτέρω υποομάδες του ΚΑΠΕ

είναι ένα πραγματικό βιολογικό φαινόμενο ή ένα τυχαίο γεγονός που προέκυψε από επαναλαμβανόμενες στατιστικές συσχετίσεις.

Ανάλογες μελέτες εκπονήσαμε στηριζόμενοι στον ορισμό του EMT με βάση το H-score δεδομένου ότι σε αυτόν τον ορισμό συμπεριλαμβάνεται και η ένταση της ανοσοϊστοχημικής χρώσης αλλά και γιατί συντέλεσε στην αύξηση του αριθμού των EMT-θετικών περιπτώσεων. Οι μελέτες επιβίωσης απέδωσαν ανάλογα αποτελέσματα με τις προηγούμενες αναλύσεις χωρίς ωστόσο να βελτιώσουν την προγνωστική ισχύ. Οι ασθενείς με EMT-θετικούς όγκους με βάση το H-score είχαν διάμεση OS 9 μήνες (95% CI= 7.281-10.719) σε σχέση με την διάμεση OS 14 μηνών (95% CI= 10.648-17.352) αυτών που έφεραν EMT-αρνητικούς όγκους ($p=0.074$).



Εικόνα 11. Ολική επιβίωση (OS) αναλόγως του EMT φαινότυπου (H-score)

Πίνακας 12. Σύσχεση EMT φαινότυπου με κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

	EMT φαινότυπος		
	Παρουσία	Απουσία	p-Value
Χαρακτηριστικό n(90)			
Φύλο			
Άρρεν	8 (17.4)	38 (82.6)	0.002
Θήλυ	0 (0)	52 (100)	
Βαθμός διαφοροποίησης (Grade)			
Πτωχή διαφοροποίηση	6 (13.6)	38 (86.4)	0.05
Καλή διαφοροποίηση	2 (4.5)	42 (95.5)	
Μεταστάσεις			
Σπλαγχνικές	2 (13.3)	13 (86.7)	0.05
Μη-σπλαγχνικές	3 (5.1)	55 (94.9)	
Απάντηση/μη απάντηση στη θεραπεία (%)	52.9%/47.1%	50%/50%	0.893
PFS (μήνες)			
Διάμεση	5	8	0.112
95% CI	3.000-7.000	5.311-10.689	
OS (μήνες)			
Διάμεση	8	13	0.023
95% CI	5.226-10.772	9.859-16.141	
1-έτος (%)	0	75	
H-SCORE			
PFS			
Διάμεση (μήνες)	5	8	0.541
95% CI	5.658-6.342	5.415-10.585	
OS			
Διάμεση	9	14	0.074
95% CI	7.281-10.719	10.648-17.352	
1-έτος (%)	7.7	72.3	

PFS: Progress Free Survival, διάστημα ελεύθερο υποτροπής, OS: Overall Survival, ολική επιβίωση,

CI: Confidence Interval, διάστημα εμπιστοσύνης

Η μονοπαραγοντική ανάλυση (Univariate Cox regression) ανέδειξε μια μη-στατιστικώς σημαντική τάση αρνητικής πρόγνωσης σε ασθενείς με όγκους που έφεραν δυσμενή κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά όπως η προχωρημένη ηλικία, η πτωχη διαφοροποίηση και η παρουσία πολλαπλών μεταστατικών εστιών, κυρίως σπλαγγχικές, κατά τη διάγνωση.

Πίνακας 13. Κλινικοπαθολογοανατομικοί προγνωστικοί παράγοντες

	1-Έτος OS (%)	Διάμεση OS (μήνες)	95% CI	p-Value
Χημειοθεραπεία				
Μη πλατινούχος	45.8	7	4.13-9.87	0.029
Πλατινούχος	66.7	15	12.1-17.9	
Φύλο				
Άρρεν	43.3	9	6.3-11.68	0.0005
Θήλυ	64.5	17	8.27-25.73	
PS				
PS 0-1	70	14	10.9-17.1	0.001
PS \geq 2	42.9	5	0.51-9.5	

OS: Overall Survival, ολική επιβίωση, CI: confidence interval, διάστημα εμπιστοσύνης,

PS: Performance Status, φυσική κατάσταση

3.5 Πολυπαραγοντική ανάλυση

Η πολυπαραγοντική ανάλυση (Multivariate Cox regression) συμπεριέλαβε:

- την ηλικία
- το φύλο
- την κατηγοριοποιημένη φυσική κατάσταση (PS 0-1 vs PS \geq 2)
- την ΚΑΠΕ υποομάδα (σπλαγγχική vs περιτοναϊκή καρκινωμάτωση vs λεμφαδενικό ΚΑΠΕ μέσης γραμμής)
- τον αριθμό των μεταστατικών εστιών (1-2 vs \geq 3)
- τη θεραπεία με βάση την πλατίνα
- την παρουσία ή την απουσία EMT φαινότυπου

Τα αποτελέσματα ανέδειξαν ότι το θήλυ γένος, η κατηγορία φυσικής κατάστασης και η θεραπεία με βάση την πλατίνα είναι στατιστικώς σημαντικοί ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες της ολικής επιβίωσης. Συγκεκριμένα, σχετίζονται με μειωμένο κίνδυνο θανάτου οι γυναίκες (άρρεν φύλο με αναλογία κινδύνου hazard ratio HR=2.90, 95% CI= 1.520-5.541, $p=0.001$), το PS 0-1 (HR=0.455, 95% CI= 0.252-0.821, $p=0.009$) και η θεραπεία με πλατινούχα σκευάσματα (HR=0.749, 95% CI= 0.405-1.406, $p=0.048$).

**B. ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΕΠΙΘΗΛΙΑΚΟΥ ΠΡΟΣ
ΜΕΣΕΓΧΥΜΑΤΙΚΟΥ ΦΑΙΝΟΤΥΠΟΥ ΣΤΑ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΑ
ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΠΡΩΤΟΠΑΘΟΥΣ ΕΣΤΙΑΣ ΑΠΟ microRNA**

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μεταστάσεις αποτελούν την συχνότερη αιτία θανάτου των ασθενών με καρκίνο. Ο μεταστατικός καταρράκτης, μέσω μιας σειράς βημάτων, τελικά οδηγεί στο σχηματισμό δευτεροπαθών εστιών σε απομακρυσμένα όργανα. Μία βασική συμβάλλουσα διαδικασία είναι η EMT¹⁵¹. Η EMT περιγράφει μία αναστρέψιμη σειρά γεγονότων μέσω των οποίων το επιθηλιακό κύτταρο χάνει τις διακυτταρικές του συνδέσεις και αποκτά μεσεγχυματικούς χαρακτήρες. Σε αυτά τα γεγονότα συμπεριλαμβάνονται ο επαναπρογραμματισμός των κυτταρικών λειτουργιών όπως η απώλεια έκφρασης των επιθηλιακών πρωτεϊνών π.χ της E-καντχερίνης και η ενεργοποίηση της έκφρασης των μεσεγχυματικών δεικτών π.χ της N-καντχερίνης και της βιμεντίνης¹⁵⁶. Τα κύτταρα που έχουν υποστεί EMT, φαίνεται να αποκτούν ιδιότητες που τους επιτρέπουν να αποσπώνται από τον πρωτοπαθή όγκο, να εισέρχονται-μέσω της βασικής μεμβράνης-στην κυκλοφορία και τελικά να επαναποκτούν επιθηλιακό φαινότυπο (MET) ώστε να σχηματίσουν μετάσταση σε μία δευτεροπαθή εστία¹⁵⁷.

Ο Καρκίνος Αγνώστου Πρωτοπαθούς Εστίας (ΚΑΠΕ) ορίζεται ως ιστολογικά επιβεβαιωμένες μεταστάσεις επί απουσίας ανευρεθείσας πρωτοπαθούς εστίας παρά μία συγκεκριμένη διαγνωστική διαδικασία¹⁵⁷. Η EMT ως βιολογικό φαινόμενο φαίνεται να κατέχει πρωταρχικό ρόλο στην μεταστατική διασπορά των ΚΑΠΕ. Στο πρώτο μέρος της παρούσας μελέτης, άλλωστε, μελετήσαμε την ανοσοϊστοχημική έκφραση του EMT φαινοτύπου σε 100 ασθενείς με ΚΑΠΕ και παρά την χαμηλή επίπτωσή του (8-16%), δείξαμε ότι η ύπαρξή του έχει στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με πτωχή πρόγνωση των ασθενών¹⁵⁸.

Τα microRNAs (miRNA) αποτελούν μία εκτενή τάξη μη-κωδικοποιούντων RNA μορίων, μεγέθους 18-24 νουκλεοτιδίων, τα οποία μετά-μεταγραφικά ρυθμίζουν βασικές βιολογικές διαδικασίες όπως η διαφοροποίηση, η ανάπτυξη, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός και ο μεταβολισμός. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι τα μέλη της οικογένειας miR-200 (miR-200a,b,c, miR-141 και miR-429) και το miR-205 είναι βασικοί ρυθμιστές του επιθηλιακού χαρακτήρα σε ένα μεγάλο εύρος κυττάρων όπως τα λιπώδη, τα παγκρεατικά, τα κύτταρα του ήπατος και τους οσφρητικούς νευρώνες¹²⁶. Τα miRNAs της οικογένειας miR-200 κωδικοποιούνται σε δύο γονιδιακά συμπλέγματα που βρίσκονται σε δύο συγκεκριμένες γενετικές θέσεις: τα miR-200c και miR-141 στο χρωμόσωμα 12 και τα miR-200a, miR-200b και miR-429 στο χρωμόσωμα 1. Η

οικογένεια miR-200 ρυθμίζει τον επιθηλιακό χαρακτήρα των κυττάρων μέσω της επιλεκτικής καταστολής της οικογένειας μεταγραφικών παραγόντων ZEB (zinc finger E box-binding homeobox) ZEB1 και ZEB2, οι οποίοι καταστέλλουν τη μεταγραφή γονιδίων που περιέχουν E-box στοιχεία στους προαγωγείς τους, συμπεριλαμβανομένης και της E-καντχερίνης^{159,124}. Επιπλέον της miR-200 οικογένειας, φαίνεται ότι και το miR-205 στοχεύει τους ZEB1 και ZEB2 μέσω των 3' αμετάφραστων περιοχών τους¹²⁵. Ο ZEB1 φαίνεται να υπερεκφράζεται σε μη καλά διαφοροποιημένα κύτταρα που βρίσκονται στο διηθητικό μέτωπο κολο-ορθικών όγκων και έχει συσχετισθεί με EMT αλλαγές. Τόσο ο ZEB1 όσο και ο ZEB2 υπερεκφράζονται σε ένα μεγάλο αριθμό όγκων κι έχουν συσχετισθεί με αυξημένη επιθετικότητα και πτωχή πρόγνωση^{160,130}. Δεδομένων, λοιπόν, των ρυθμιστικών τους λειτουργιών, θελήσαμε να συγκρίνουμε την έκφραση μιας παγκόσμιας βιβλιοθήκης 982 miRNAs μεταξύ EMT-θετικών και EMT-αρνητικών όγκων ασθενών διεγνωσμένων με ΚΑΠΕ.

2. ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Ασθενείς

Ο υπό μελέτη πληθυσμός αποτελούνταν από 100 ασθενείς διεγνωσμένους με ΚΑΠΕ οι οποίοι αντιμετωπίστηκαν σε κέντρα της HeCOG (Hellenic Cooperative Oncology Group) όπως και στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο της Βαλένθια, Ισπανία. Όλοι οι ασθενείς είχαν υποβληθεί σε συγκεκριμένες διαγνωστικές πράξεις. Όλοι οι ασθενείς είχαν δώσει έγγραφη συγκατάθεση για τη χρήση των προσωπικών δεδομένων τους και του βιοπτικού τους υλικού. Το ερευνητικό πρόγραμμα είχε λάβει την έγκριση της Επιτροπής Ερευνών και Ηθικής του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων (16-1-2007/15) όπως και της Επιτροπής Βιοηθικής της Ιατρικής Σχολής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης (8-9-2010/A254).

2.2 Ιστικές μικροσυστοιχίες (Tissue Microarrays-TMAs)

Όπως έχει προαναφερθεί, 100 ιστικά μπλοκ παραφίνης (Formalin-fixed paraffin-embedded - FFPE) ασθενών με ΚΑΠΕ αναγνωρίστηκαν αναδρομικά. Ιστικοί κύλινδροι πάχους 1.5mm εισήχθησαν σε ένα ενιαίο μπλοκ παραφίνης με ειδικές ισαπέχουσες θέσεις υποδοχής δείγματος για ιστικές μικροσυστοιχίες και μελετήθηκαν για την ανοσοϊστοχημική έκφραση του επιφανειακού επιθηλιακού δείκτη E-καντχερίνη, των μεσεγχυματικών δεικτών N-καντχερίνη και βιμεντίνη και του EMT-επαγωγέα μεταγραφικού παράγοντα SNAIL¹⁶¹.

2.3 EMT φαινότυπος και ανοσοϊστοχημικά cut-offs

Ο EMT φαινότυπος ορίστηκε ως μερική απώλεια της έκφρασης της E-καντχερίνης, έκφραση οποιασδήποτε από την N-καντχερίνη/ βιμεντίνη και ταυτόχρονη έκφραση SNAIL, όπως προσδιορίστηκε από το ποσοστό των χρωματισμένων κυττάρων¹⁶¹.

- Μερική απώλεια της έκφρασης της E-καντχερίνης ορίστηκε όταν η χρώση παρατηρείται σε <60% των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για N-καντχερίνη ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε $\geq 40\%$ των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για βιμεντίνη ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε $\geq 40\%$ των καρκινικών κυττάρων
- Θετικά περιστατικά για SNAIL ήταν αυτά που η χρώση παρατηρείται σε >80% των καρκινικών κυττάρων

Επιπλέον, χρησιμοποιήσαμε και μία ημι-ποσοτική μέθοδο προσδιορισμού της χρώσης η οποία έχει χρησιμοποιηθεί και σε προηγούμενες μελέτες. Έτσι εκτός από το να μετρούμε μόνο το ποσοστό των χρωματισμένων κυττάρων, ενσωματώσαμε και την ένταση της χρώσης ως μεταβλητή και αποκομίσαμε το H-score¹⁵⁸.

2.4 Μικροεκτομή και απομόνωση RNA

Οι χρωματισμένες με αιματοξυλίνη&ηωσίνη τομές των αρχικών 100 ασθενών εκτιμήθηκαν από εξειδικευμένο παθολογοανατόμο ως προς το ποσοστό των καρκινικών κυττάρων που περιελάμβαναν. Τα μπλοκ παραφίνης που περιελάμβαναν >60% καρκινικά κύτταρα κόβονταν και τοποθετούνταν άμεσα σε eppendorfs. Τα μπλοκ που περιελάμβαναν <60% καρκινικά κύτταρα κόβονταν, τοποθετούνταν σε πλακίδια και γινόταν εκτομή μόνο του πλούσιου σε καρκινικό ιστό τμήματος ώστε να αποκλεισθούν περιοχές νέκρωσης, αιμορραγίας, ίνωσης και δεσμοπλαστικής αντίδρασης. Στη συνέχεια τοποθετούνταν σε eppendorfs. Ολικό RNA απομονώθηκε από 3 έως 10 πλακίδια-τομές πάχους 10 μm ανά ασθενή¹⁶¹.

Διαδικασία αφαίρεσης RNAses από πλακίδια Superfrost

- Βύθιση πλακιδίων για 5 δευτερόλεπτα σε καθαρή RNase ZAP (AMBION #9780)
- 2 συνεχόμενες πλύσεις σε DEPC (DiEthylPyroCarbonate) νερό
- Τοποθέτηση σε κλίβανο στους 37° C για 30 λεπτά

Αποπαραφίνωση

- Τοποθέτηση στον κλίβανο για 30 λεπτά στους 56° C
- Βύθιση για 10min σε 3 διαφορετικές ξυλόλες
- Βύθιση σε αιθανόλη 100% για 1 λεπτό
- Βύθιση σε αιθανόλη 96% για 1 λεπτό
- Βύθιση σε αιθανόλη 70% για 1 λεπτό
- Βύθιση και ανάσυρση των πλακιδίων 5-6 φορές σε RNase-free απεσταγμένο νερό

Πρωτόκολλο απομόνωσης ολικού RNA

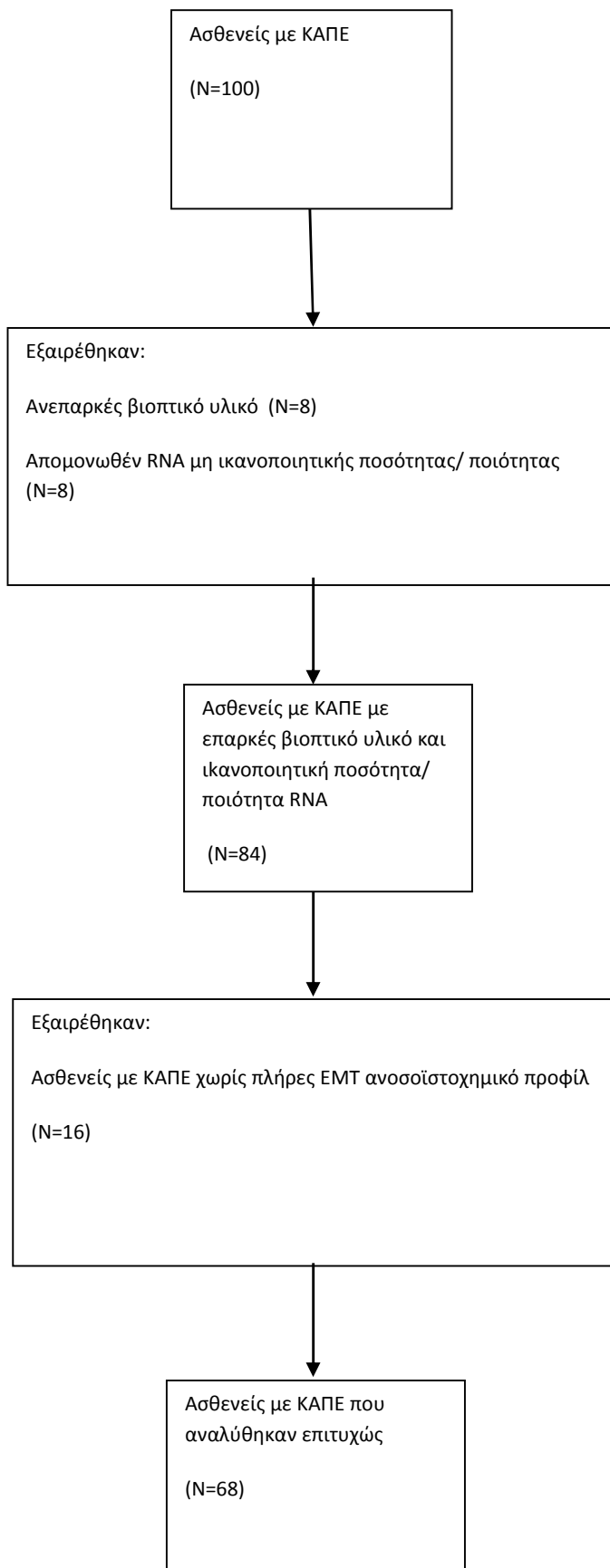
- Ετοιμάζουμε eppendorf με 110 μl DEPC νερό και 125 μl RNA digestion buffer [Tris/HCl (pH 7.4, 100mM), NaCl (20mM), ethylenediaminetetraacetic acid (pH 8.0, 40mM), 2% sodiumdodecyl sulfate (pH7.3)]
- Ξύνουμε την τομή και βάζουμε το δείγμα στο eppendorf

- Προσθέτουμε 15μl proteinase K (QIAGEN)
- Τοποθετούμε τα δείγματα στο υδατόλουτρο στους 56⁰C και αφήνουμε overnight
- Προσθέτουμε 750μl TRIZOL LS, αναμειγνύουμε με την πιπέτα, προσθέτουμε 1μl glucogen και κάνουμε quick spin
- Αφήνουμε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά
- Φυγοκεντρούμε στις 12000 στροφές για 10 λεπτά (στους 4⁰ C)
- Παίρνουμε το υπερκείμενο (430μl) και το τοποθετούμε σε νέο eppendorf
- Προσθέτουμε 200μl χλωροφόρμιο και αναμειγνύουμε σθεναρά για 30 δευτερόλεπτα
- Αφήνουμε για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκεντρούμε στις 12000 στροφές για 15 λεπτά (στους 4⁰ C)
- Παίρνουμε το υπερκείμενο (430μl) και το τοποθετούμε σε νέο eppendorf
- Προσθέτουμε 550μl φαινολικό οξύ:χλωροφόρμιο (pH:4.7) και αναμειγνύουμε σθεναρά για 1 λεπτό
- Φυγοκεντρούμε στις 12000 στροφές για 5 λεπτά (στους 4⁰ C)
- Παίρνουμε το υπερκείμενο (430μl) και το τοποθετούμε σε νέο eppendorf
- Προσθέτουμε 500μl ισοπροπανόλη και αναμειγνύουμε με ήπιες κινήσεις
- Αφήνουμε τα δείγματα για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου
- Φυγοκεντρούμε στις 12000 στροφές για 10 λεπτά (στους 4⁰ C)
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο προσέχοντας να μην διαταραχθεί το pellet
- Προσθέτουμε 1ml αιθανόλης 75%
- Φυγοκεντρούμε στις 8000 στροφές για 5 λεπτά (στους 4⁰ C)
- Αδειάζουμε όλο το υγρό και αφήνουμε τα δείγματα σκεπασμένα να στεγνώσουν για τουλάχιστον 30 λεπτά στους 37⁰ C
- Προσθέτουμε 80μl DEPC νερό και αναμειγνύουμε στο vortex
- Αφήνουμε στους 55⁰ C για 30 λεπτά
- Προσθέτουμε 1μl RNasin, 10μl 10x DNase διάλυμα και 5 μl turbo DNase

- Επωάζουμε τα δείγματα στους 37 °C για 40 λεπτά και προσθέτουμε 10μl DNase
- Επωάζουμε για άλλα 30 λεπτά και προσθέτουμε 100μl DEPC νερό
- Προσθέτουμε 200μl φαινολικό οξύ:χλωροφόρμιο και ανακινούμε σθεναρά ή στο vortex για 2 λεπτά
- Φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά
- Αφαιρούμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 20μl NH₄ Oac και 500μl αιθανόλη 100%
- Καταψύχουμε για 1 ώρα στους -20 °C
- Φυγοκεντρούμε σε μέγιστη ταχύτητα για 10 λεπτά
- Αφαιρούμε την 100% αιθανόλη και προσθέτουμε 1ml 75% αιθανόλη
- Φυγοκεντρούμε στη μέγιστη ταχύτητα για 5 λεπτά και αφαιρούμε την 75% αιθανόλη
- Γρήγορη φυγοκέντρωση ώστε να μετακινηθεί η υπολειπόμενη αιθανόλη στη βάση του eppendorf και αφαιρούμε και αυτή
- Αφήνουμε τα δείγματα να στεγνώσουν στον αέρα και προσθέτουμε 20μl DEPC νερό
- Θερμαίνουμε στους 55 °C για να επανακτήσουμε το pellet
- Αναλύουμε τη συγκέντρωση και την καθαρότητα του RNA φασματοφωτομετρία (NanoDrop 1000)

Μεταξύ των 100 ασθενών, οι 92 είχαν στα μπλοκ παραφίνης εναπομείναν καρκινικό βιοπτικό υλικό. Ικανοποιητική ποσότητα και ποιότητα RNA απομονώθηκε από τους 84 ώστε να χρησιμοποιηθεί στη συνέχεια στην microRNA πλατφόρμα, ενώ μεταξύ αυτών οι 68 είχαν ένα πλήρες ανοσοϊστοχημικό EMT προφίλ. Ακολουθεί το ανάλογο διάγραμμα CONSORT.

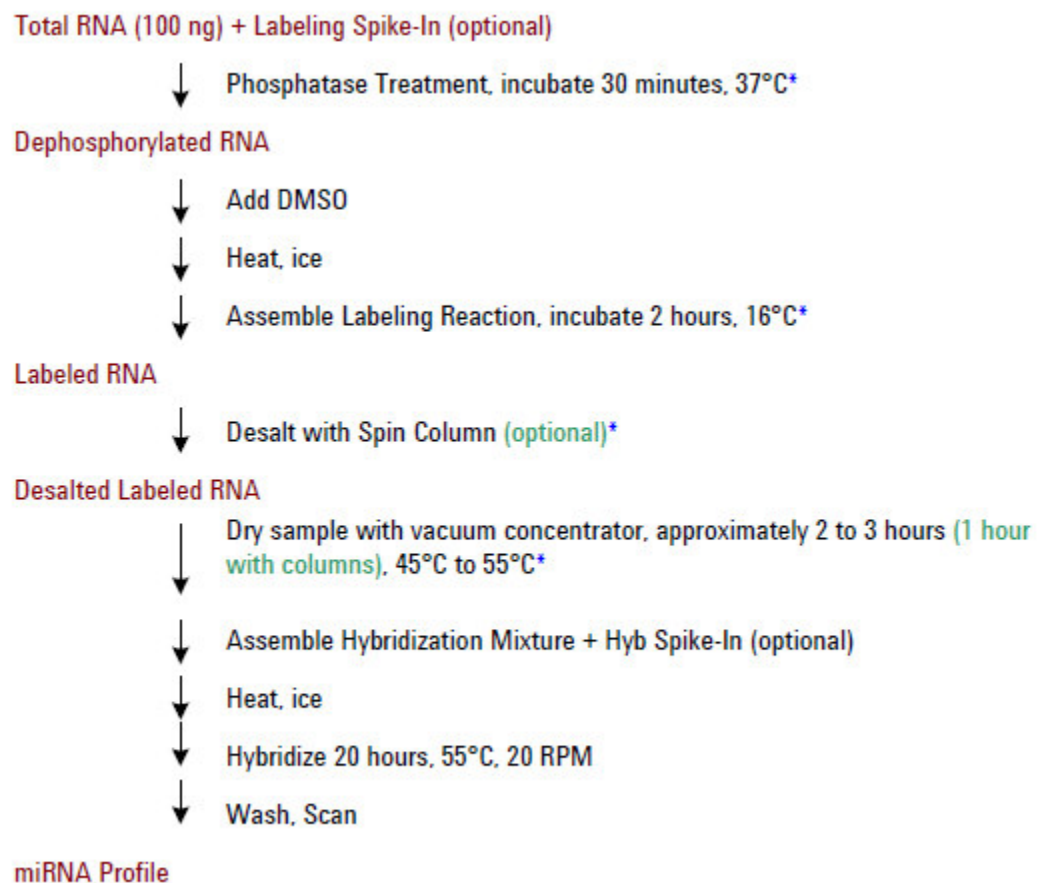
Σχήμα 3: CONSORT flow chart



2.5 MicroRNA μικροσυστοιχίες, πλατφόρμα και επεξεργασία σήματος

Χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένα σχεδιασμένες από την Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) μικροσυστοιχίες, οι οποίες περιέχουν 8 πανομοιότυπες υπό-συστοιχίες σε 8 x 15000 διάταξη. Μελετήθηκαν τα επίπεδα έκφρασης 982 γνωστών miRNAs. 0.37-1μg ολικού RNA σημάνθηκαν (labeling) με ένα RNA προσδέτη, p-rCrU-Cy/dye (BioSpring, Frankfurt, Germany; Cy3 or Cy5) στο 3' άκρο. Τα συνθετικά RNA υποβλήθηκαν σε spike-in πριν τη σήμανση. Ακολούθησε επώαση με το σημασμένο RNA για 12-16 ώρες στους 55 °C και στη συνέχεια πλύση κατά το πρωτόκολλο της Agilent.

Σχήμα 4: Αλγόριθμος προετοιμασίας δειγμάτων και επεξεργασίας της συστοιχίας



*The sample can be stored at -80°C after this step, if needed.

Οι συστοιχίες εξετάστηκαν (scanning) μέσω του Agilent DNA Microarray Scanner Bundle σε ανάλυση 5 μ m, dual pass 100% και 10% ισχύ laser. Οι εικόνες αναλύθηκαν με τη χρήση του Agilent Feature Extraction Software version 10.7.1.1. Οι εις τριπλούν κηλίδες συνδυάστηκαν ώστε να σχηματίσουν ένα μόνο σήμα χρησιμοποιώντας τον λογαριθμικό μέσο. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε λογαριθμικό περιβάλλον log₂. Η εξομάλυνση (normalization) κάθε δείγματος πραγματοποιήθηκε μέσω ενός διάνυσματος αναφοράς (reference vector R), το οποίο υπολογίστηκε λαμβάνοντας υπόψη τη διάμεση έκφραση ολόκληρου του υπό μελέτη συνόλου. Για το διάνυσμα κάθε δείγματος (S), ανευρέθηκε ένα πολυώνυμο δευτέρου βαθμού F, έτσι ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη συνοχή μεταξύ S και R, δηλαδή R=F(S). Αυτό εφαρμόστηκε σε ένα σύνολο σταθερών microRNAs, αντιθέτως αυτά που είχαν απομακρυσμένα οριακά δεδομένα δεν χρησιμοποιήθηκαν στην προσαρμογή του πολυωνύμου. Για κάθε δείγμα (στοιχείο S_i στο διάνυσμα S), η εξομαλυσμένη (λογαριθμική) τιμή M_i υπολογίστηκε μέσω την πολυωνυμικής μετατροπής F της αρχικής τιμής S_i, με τρόπο που η M_i=F(s_i).

Ακολούθως της απομόνωσης του RNA, 7 δείγματα RNA μαζί με ένα θετικό δείγμα ελέγχου (Positive Control-PC), υποβλήθηκαν σε σήμανση και υβριδισμό. Το θετικό δείγμα ελέγχου είναι ένα δείγμα RNA το οποίο τέθηκε ως δείγμα αναφοράς και πληρεί συγκεκριμένα κριτήρια ποιότητας (Quality Assurance-QA criteria): συσχέτιση κατά Pearson, διάμεσες διαφορές και έκφραση >300 microRNAs στη δυναμική φάση σε σχέση με τον υβριδισμό αναφοράς. Η QA για κάθε δείγμα βασίστηκε σε συγκεκριμένες παραμέτρους όπως ο αριθμός των microRNAs στη δυναμική φάση, η 98% εκατοστιαία έκφραση του microRNA, η συσχέτιση κατά Pearson μεταξύ των κορυφών του υβριδισμού και του υβριδισμού αναφοράς, η έκφραση των αρνητικών δειγμάτων ελέγχου και ο αριθμός των microRNAs με εμμένον τριπλό σήμα. Οι τιμές του σήματος του κάθε microRNA ελήφθησαν μετά από την προαναφερθείσα εξομάλυνση και τέθηκαν ως δεδομένα προς περαιτέρω ανάλυση και ταξινόμηση¹⁶².

Πρωτόκολλο σήμανσης (labeling reaction)

- Διαλύουμε το ολικό RNA σε 50μl RNase free νερό
- Βάζουμε 2μl από το διαλυμένο RNA σε ένα 1.5ml eppendorf και το διατηρούμε σε πάγο
- Προσθέτουμε 2μl Calf Intestinal Alkaline Phosphatase-CIP Master Mix (0.4μl 10X Calf Intestinal Phosphatase Buffer, 1.1μl Labeling Spike-in, 0.5 Calf Intestinal Phosphatase) ώστε η αντίδραση να γίνεται σε όγκο 4μl και αναμειγνύουμε με την πιπέτα
- Αποφωσφορυλιώνουμε το δείγμα τοποθετώντας το σε κινούμενο υδατόλουτρο στους 37⁰C για 30 λεπτά
- Προσθέτουμε 2.8μl 100% DMSO (Dimethyl Sulfoxide)
- Επωάζουμε το δείγμα στους 100⁰ C σε κινούμενο υδατόλουτρο για 7 λεπτά
- Μεταφέρουμε αμέσως το δείγμα σε κρύο νερό (0⁰ C)
- Προσθέτουμε 4.5μl Ligation master Mix (1μl 10X T4 RNA Ligase buffer, 3μl Cyanine3-pCp, 0.5μl T4 RNA Ligase-θερμοκρασία 37⁰C) έως ολικού όγκου αντίδρασης 11.3μl
- Αναμειγνύουμε με την πιπέτα και ήπιο spin
- Επωάζουμε στους 16⁰C σε κινούμενο υδατόλουτρο για δύο ώρες
- Στεγνώνουμε εντελώς τα δείγματα τοποθετώντας τα σε συμπυκνωτή κενού στους 55⁰C για 3 ώρες, ελέγχοντας τα κάθε 30 λεπτά

Πρωτόκολλο υβριδισμού

- Επαναφέρουμε το εντελώς στεγνό δείγμα προσθέτοντας 17μl RNase-free νερό
- Προσθέτουμε 1μl Hyb Spike-in διάλυμα
- Προσθέτουμε 4μl 10X GE Blocking Agent
- Προσθέτουμε 22.5μl 2X Hi-RPM Hybridization Buffer έως ολικού όγκου 45μl
- Αναμειγνύουμε με το vortex
- Επωάζουμε στους 100⁰C για 5 λεπτά
- Μεταφέρουμε αμέσως σε υδατόλουτρο στους 0⁰C

- Γρήγορη φυγοκέντρωση ώστε να ανασύρουμε και το ίζημα που πιθανώς υπάρχει στον πυθμένα του eppendorf
- Συναρμολογούμε το Agilent Microarray Hybridization Chamber
- Τοποθετούμε το συναρμολογημένο slide chamber σε ρότορα στον κλίβανο υβριδισμού στους 55°C στις 20rpm για 20 ώρες

Πλύσεις

- Αποσυναρμολόγηση με Gene Expression Buffer 1 σε θερμοκρασία δωματίου
- 1^η πλύση με Gene Expression Buffer 1 σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά
- 2^η πλύση με Gene Expression Buffer 2 στους 37°C για 5 λεπτά

Αφού ολοκληρωθούν οι πλύσεις, σκανάρουμε τα πλακίδια αμέσως ώστε να μην επηρεαστεί το σήμα από τα οξειδωτικά του περιβάλλοντος.

2.6 Στατιστική ανάλυση

Η έκφραση των 982 miRNAs μελετήθηκε σε κάθε δείγμα ΚΑΠΕ με την πλατφόρμα μικροσυστοιχιών που περιγράφηκε παραπάνω. Αναλύσαμε το προφίλ έκφρασης των miRNA σύμφωνα με τους δύο ορισμούς του EMT φαινότυπου: αρχικά με βάση το ποσοστό % των χρωματισμένων κυττάρων και στη συνέχεια με βάση το H-score. Οι τιμές p υπολογίστηκαν με βάση το two-sided unpaired t test στο εξομαλυσμένο λογαριθμικά τροποποιημένο μοντέλο του ληφθέντος σήματος ενώ τα επίπεδα σημαντικότητας ρυθμίστηκαν σε ποσοστό εσφαλμένης ανακάλυψης (false discovery rate-FDR) 0.1 ώστε να ανταποκριθούν στον έλεγχο πολλαπλών υποθέσεων (multiple hypothesis testing)¹⁶³. Η μεταβολή της έκφρασης κάθε miRNA υπολογίστηκε από το λόγο των διάμεσων τιμών του εξομαλυσμένου σήματος μεταξύ των ομάδων που έφεραν ή δεν έφεραν τον EMT φαινότυπο.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ασθενείς και χαρακτηριστικά του όγκου

Ο υπό μελέτη πληθυσμός αποτελούνταν από 68 ασθενείς διεγνωσμένους με ΚΑΠΕ (49% άνδρες), διάμεσης ηλικίας 62 ετών και με καλή φυσική κατάσταση (PS 0-1 στο 79.4%). Η ιστολογική διάγνωση ανέδειξε αδενοκαρκίνωμα στην πλειοψηφία των περιπτώσεων ενώ ο υψηλός ιστολογικός βαθμός-χαμηλής διαφοροποίησης καρκινώματα- αποτελούσε το 91%. Λεπτομερή επιδημιολογικά και κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά παρατίθεται στον πίνακα 14.

3.2 Ανοσοϊστοχημικός προσδιορισμός EMT φαινότυπου

Μεταξύ των 68 ασθενών, μόνο 5 έφεραν όγκους συμβατούς με τον ορισμό του EMT φαινότυπου με βάση το ποσοστό των χρωματισμένων κυττάρων. Η ανοσοϊστοχημική έκφραση των EMT δεικτών παρατίθεται στον πίνακα 15. Οι 5 EMT-θετικοί ΚΑΠΕ ασθενείς ήταν άνδρες, με καλή φυσική κατάσταση κατά τη διάγνωση και διάμεσης ηλικίας 58 ετών (εύρος 44-74). 2 από αυτούς ανήκαν στην σπλαγγχική υποομάδα του ΚΑΠΕ, 2 από αυτούς ανήκαν στο πλακώδες ΚΑΠΕ κεφαλής/τραχήλου και ένας στο ΚΑΠΕ μέσης γραμμής. Όλοι έλαβαν χημειοθεραπεία με βάση την πλατίνα και είχαν διάμεση ολική επιβίωση 10 μηνών (εύρος 2-15 μήνες).

Αντιστοίχως, 10 ασθενείς έφεραν όγκους συμβατούς με τον ορισμό του EMT φαινότυπου με βάση το H-score, εκ των οποίων 2 είχαν EMT θετικό φαινότυπο και με βάση το ποσοστό χρώσης των κυττάρων. Από τους 10 ασθενείς, οι 6 ήταν άνδρες και οι 4 γυναίκες με διάμεση ηλικία τα 67 έτη (εύρος 40-74) και με καλή φυσική κατάσταση κατά τη διάγνωση (PS 0-1: 9) παρ'όλο που έφεραν χαμηλής διαφοροποίησης όγκους (ιστολογικός βαθμός grade 2-3: 10) και εκεταμένη νόσο. Ιστολογική διάγνωση αδενοκαρκινώματος αποδόθηκε σε 4 ασθενείς, με τις διαγνώσεις πλακώδους καρκινώματος (3 ασθενείς) και διαυγοκυτταρικού καρκινώματος (2 ασθενείς) να ακολουθούν. Δύο ασθενείς ανήκαν στην σπλαγγχική υποομάδα του ΚΑΠΕ και 3 στη λεμφαδενική, 3 ανήκαν στο πλακώδες ΚΑΠΕ κεφαλής/τραχήλου, ενώ από τις εναπομείνουσες

Πίνακας 14: Ασθενείς και χαρακτηριστικά του όγκου

Χαρακτηριστικά	EMT+ (n=5)	EMT- (n=63)
Φύλο (Α/Θ)	5/0	28/35
Διάμεση ηλικία (Εύρος)	58 (44-74)	64 (35-85)
Βαθμός διαφοροποίησης		
Καλή διαφοροποίηση	0	5
Πτωχή διαφοροποίηση	5	57
Μεταστατικές εστίες		
1	0	11
2-3	4	35
>3	1	16
Υποομάδες ΚΑΠΕ		
Πλακώδες κεφαλής/ τραχήλου	2	16
Μασχαλιαίοι λεμφαδένες	-	9
Ορώδες περιτοναϊκό	-	13
Σπλαγγνικό	2	16
Μέσης γραμμής	1	9
Ιστολογία		
Διαυγοκυτταρικό	1	Διαυγοκυτταρικό 4
Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα	1	Αδιαφοροποίητο καρκίνωμα 7
Αδενοκαρκίνωμα	1	Αδενοκαρκίνωμα 24
Πλακώδες	2	Πλακώδες 16
		Θηλώδες 8
		Βλεννώδες 3
		Μικροκυτταρικό 1

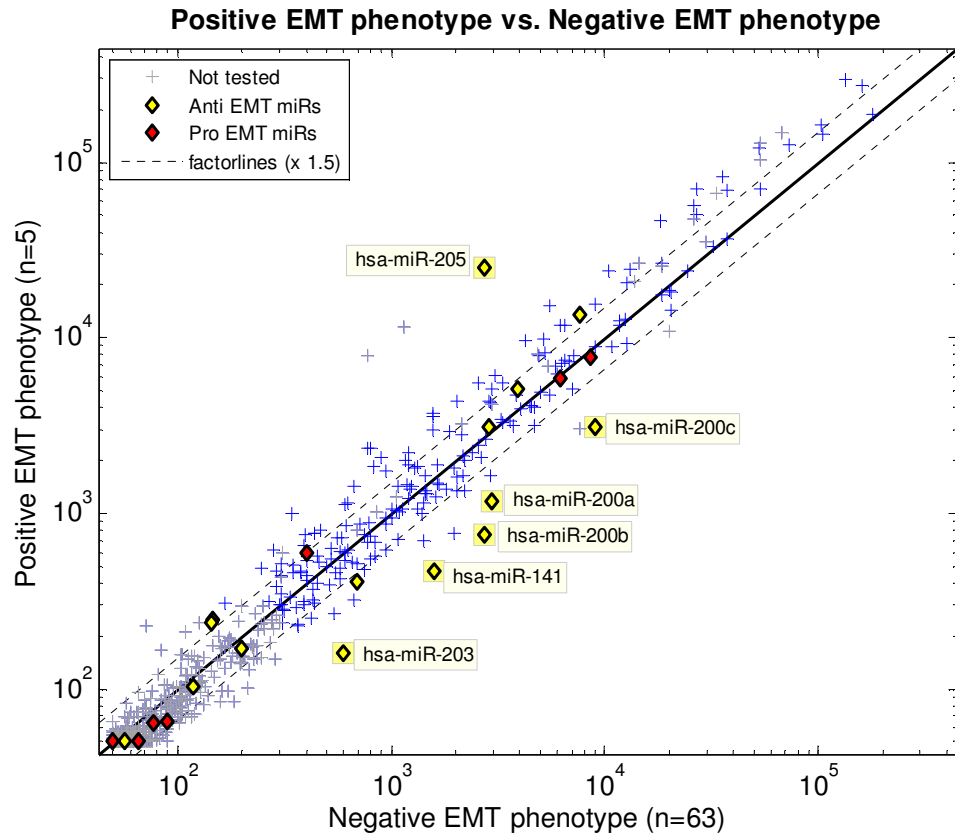
2 ασθενείς, η μία ασθενής είχε μασχαλιαία λεμφαδενοπάθεια και η άλλη περιτοναϊκή καρκινωμάτωση, αντιστοίχως. Η πλειοψηφία των ασθενών αντιμετωπίστηκε με πλατινούχα χημειοθεραπευτικά σχήματα και η διάμεση ολική επιβίωση ήταν 11.5 μήνες (εύρος 2-36 μήνες).

Πίνακας 15. Δεδομένα ανοσοϊστοχημικής έκφρασης (IHC) και EMT φαινότυπος

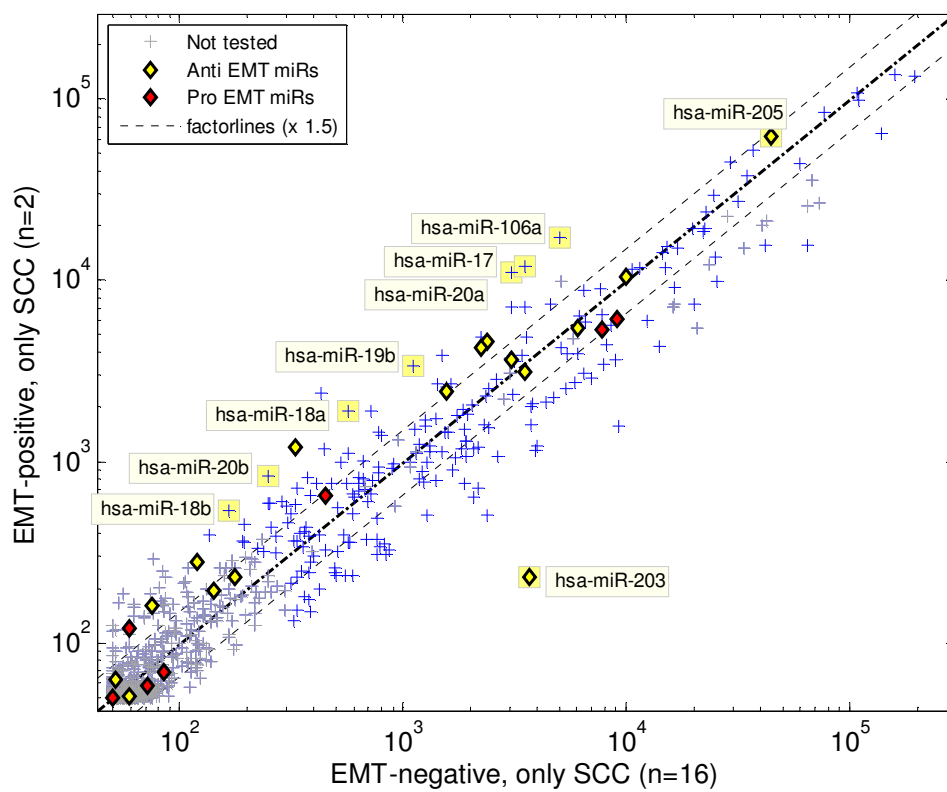
	E-καντχερίνη	N-καντχερίνη	Βιμεντίνη	SNAIL	OCT4	EMT positive
N	68	68	68	68	68	
IHC						
Cut-off (% ποσοστό χρωματισμένων κυττάρων)	≤60%	≥40%	≥40%	≥8.5%	≥1%	
Περιπτώσεις (%)	15 (22)	8 (11,7)	14 (20,5)	40 (58,8)	1 (1,4)	5 (7,3)
Διάμεσος (Median)	95	0	0	95	0	
Διατεταρτημοριακό εύρος (Interquartile range)						
H-Score						
H-Score cut-off	<140	>20	>20	>100		
Περιπτώσεις (%)	26 (38,2)	15 (22)	19 (27,9)	35 (51,4)	0	10 (14,7)
Διάμεσος (Median)	182,5	0	0	177,5	0	
Διατεταρτημοριακό εύρος (Interquartile range)						

3.3 Σύγκριση miRNA προφίλ μεταξύ EMT-θετικών και EMT-αρνητικών ασθενών (ορισμός με βάση το ποσοστό % των χρωματισμένων κυττάρων)

Στους προαναφερθέντες ασθενείς, τα miRNAs που καταστέλλουν τον EMT φαινότυπο, όπως τα miR-203, miR-141 και τα miR-200a,b,c εμφάνισαν 2.45-3.61 φορές χαμηλότερη έκφραση στους EMT-θετικούς ασθενείς, αν και δεν επετεύχθη στατιστική σημαντικότητα. Αντιθέτως, από το miR-205 λάβαμε ιδιαιτέρως αντιφατικά δεδομένα: παρουσίασε μια μη στατιστικώς σημαντική τάση για 9 φορές υψηλότερη έκφραση στους EMT-θετικούς ασθενείς (Εικόνα 12). Ωστόσο, δεδομένου ότι η έκφραση του miR-205 είναι γενικά αυξημένη σε πλακώδεις ιστούς, υποθέσαμε ότι αυτή η διαφορά της έκφρασής του σε σχέση με την υπόλοιπη miR-200 οικογένεια οφείλεται στην υπερίσχυση της πλακώδους υποομάδας του ΚΑΠΕ στους EMT-θετικούς σε σχέση με τους EMT-αρνητικούς ασθενείς. Υπήρχαν 2 ασθενείς με πλακώδη ιστολογία μεταξύ των EMT-θετικών ασθενών (40%) ενώ υπήρχαν 16 με πλακώδη χαρακτηριστικά στην ομάδα των EMT-αρνητικών ασθενών (25%). Η σύγκριση μόνο μεταξύ αυτών των ασθενών ανέδειξε μία έκφραση του miR-205 χωρίς αξιόλογη μεταβολή μεταξύ των EMT-θετικών και EMT-αρνητικών ασθενών ενώ και η οικογένεια miR-200 φάνηκε να μην διαδραματίζει κάποιο σημαντικό ρόλο (Εικόνα 13). Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήσαμε ένα αυστηρό ορισμό κατάταξης ενός ΚΑΠΕ όγκου στην πλακώδη κατηγορία. Για να θεωρηθεί ένα δείγμα πλακώδες θα έπρεπε να πληρεί ταυτόχρονα 2 κριτήρια: να υπάρχει κλινικοπαθολογοανατομική διάγνωση πλακώδους ιστολογίας αλλά και τουλάχιστον μία από τις miRview μοριακές διαγνώσεις να το κατάσσει στην πλακώδη υποομάδα. Κανένα άλλο miRNA δεν εμφάνισε πάνω από 1.5 φορά διαφορά έκφρασης αναλόγως του EMT φαινότυπου και αυτό ελήφθη ως το όριο (cut-off) μεταξύ αξιοσημείωτης διαφοράς έκφρασης και πειραματικού λάθους.



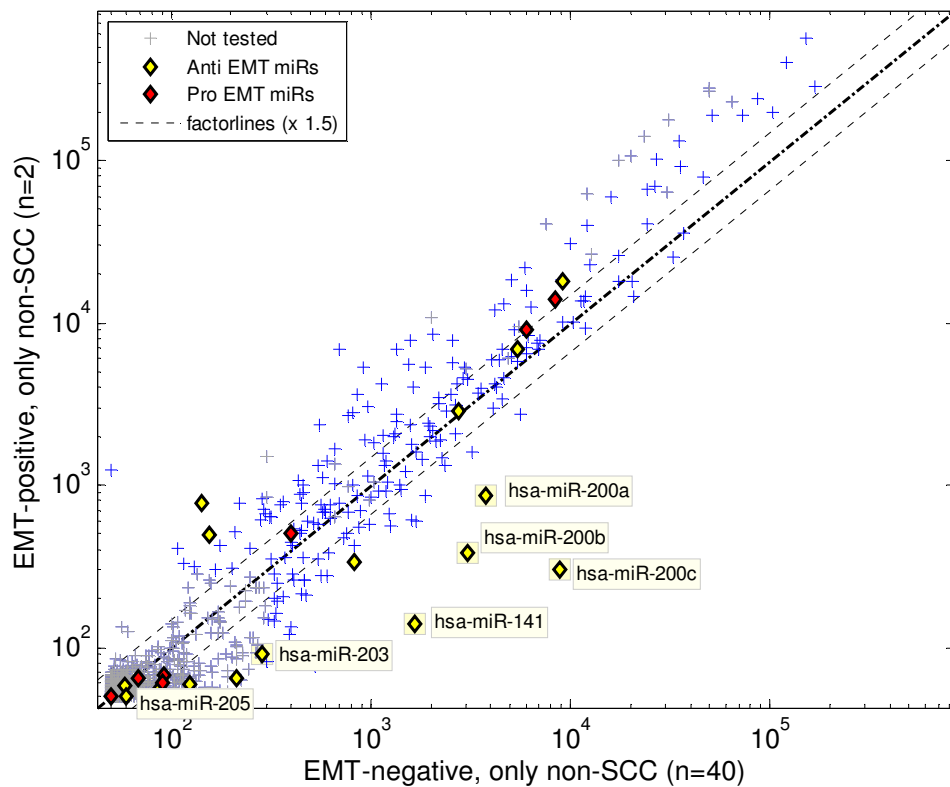
Εικόνα 12: MiRNA προφίλ έκφρασης σε EMT-θετικούς vs EMT-αρνητικούς ασθενείς (% χρωματισμένων κυττάρων)



Εικόνα 13: MiRNA προφίλ έκφρασης σε EMT-θετικούς vs EMT-αρνητικούς ασθενείς με πλακώδη ιστολογία (%ποσοστό χρωματισμένων κυττάρων)

3.4 MiRNA προφίλ σε ασθενείς μη πλακώδους ιστολογίας

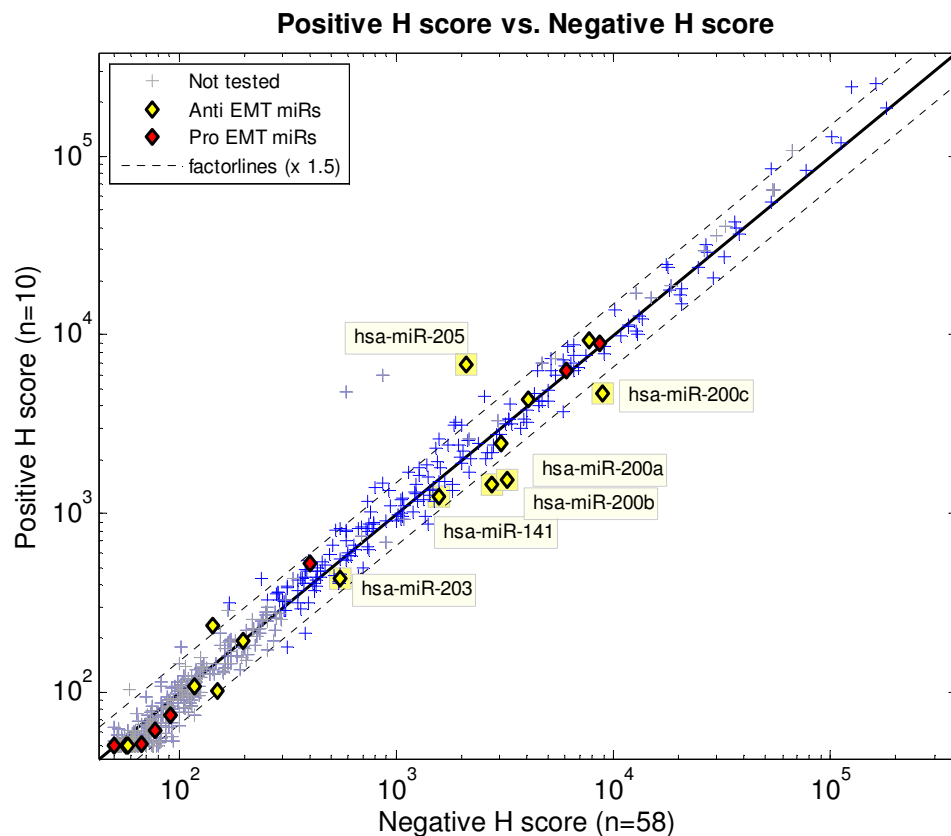
Εξαιρώντας τους ασθενείς με πλακώδη ιστολογία, εναπομένουν μόνο 2 με EMT-θετικό φαινότυπο και 40 με EMT-αρνητικό φαινότυπο. Μεταξύ αυτών πραγματοποιήσαμε σύγκριση του miRNA προφίλ έκφρασης. Τα miR-205, miR-203 και miR-200a,b,c παρουσίασαν μείωση της έκφρασής τους στους EMT-θετικούς ασθενείς (Εικόνα 14). Και πάλι οι διαφορές έκφρασης δεν ήταν στατιστικά σημαντικές, δεδομένου ότι το μικρό μέγεθος δείγματος είναι ιδιαίτερος περιοριστικός παράγοντας.



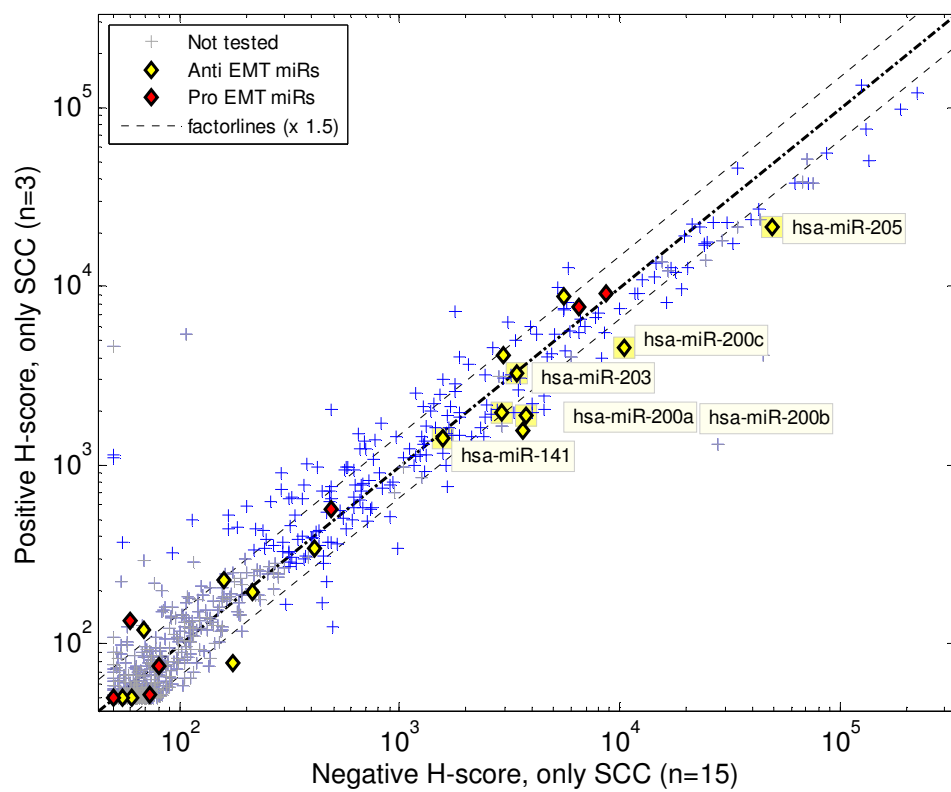
Εικόνα 14: MiRNA προφίλ έκφρασης σε EMT-θετικούς vs EMT-αρνητικούς ασθενείς με μη πλακώδη ιστολογία (%ποσοστό χρωματισμένων κυττάρων)

3.5 Σύγκριση miRNA προφίλ μεταξύ EMT-θετικών και EMT-αρνητικών ασθενών (ορισμός με βάση το H-score)

Πρόμοιο πρότυπο miRNA έκφρασης παρατηρήθηκε όταν η σύγκριση πραγματοποιήθηκε μεταξύ των EMT-θετικών και EMT-αρνητικών ασθενών με βάση τον ορισμό του H-score (Εικόνα 15). Στατιστική σημαντικότητα ούτε κι εδώ επετεύχθη. Ωστόσο, και πάλι αναδείχθηκε χαμηλή έκφραση των miRNAs που καταστέλλουν τον EMT φαινότυπο-miR-141, miR-203 και miR-200 οικογένεια-στους EMT-θετικούς ασθενείς, με 1.26-2.09 φορές χαμηλότερα επίπεδα έκφρασης (FDR>0.1). Παρατηρήθηκε εκ νέου αυξημένη έκφραση του miR-205 στους EMT-θετικούς ασθενείς αλλά αποδόθηκε στην ύπαρξη ασθενών που φέρουν πλακώδους ιστολογίας καρκινώματα και όχι στην ύπαρξη ή μη του EMT φαινοτύπου. Όταν από τη μελέτη εξαιρέθηκαν οι προαναφερθέντες ασθενείς, αυτή η υπερέκφραση του miR-205 δεν διατηρήθηκε (Εικόνα 16).



Εικόνα 15: MiRNA προφίλ έκφρασης σε EMT-θετικούς vs EMT-αρνητικούς ασθενείς (H-score)



Εικόνα 16: MiRNA προφίλ έκφρασης σε EMT-θετικούς vs EMT-αρνητικούς ασθενείς με μη πλακώδη ιστολογία (H-score)

Πίνακας 16: MiRNA έκφραση σε EMT-θετικούς και EMT-αρνητικούς ΚΑΠΕ ασθενείς

α) EMT ορισμός με βάση το % των χρωματισμένων κυττάρων

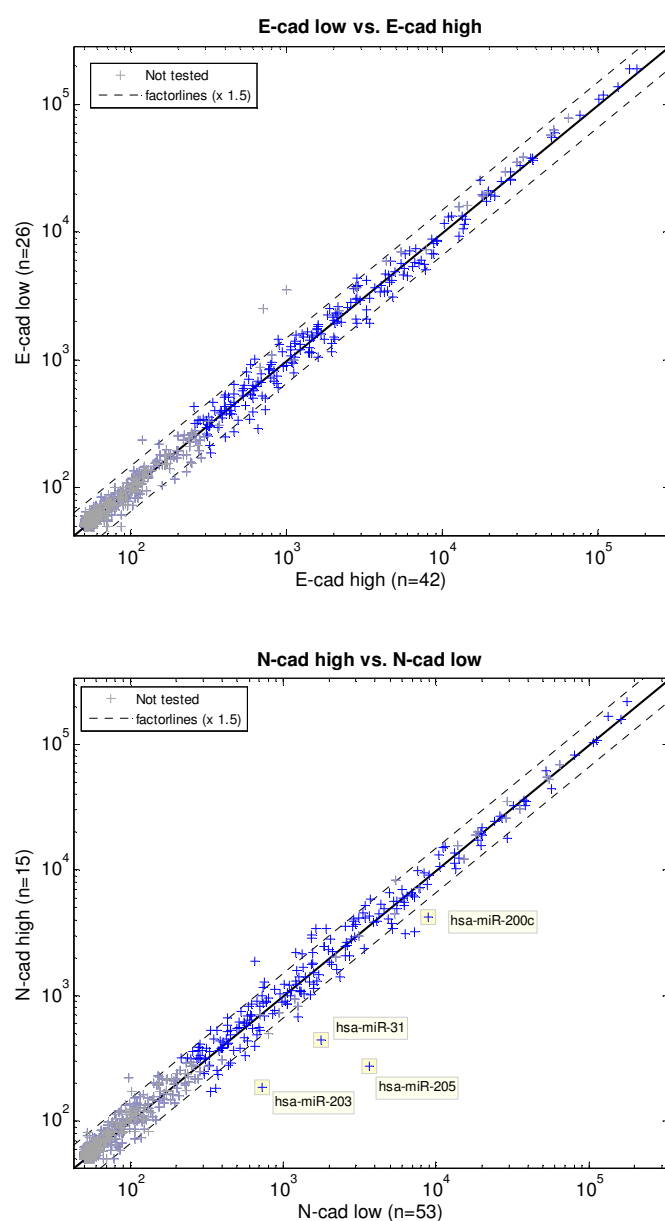
MicroRNA	Κατεύθυνση μεταβολής έκφρασης στους EMT-θετικούς ασθενείς (% κυττάρων)	Διάμεση μεταβολή έκφρασης	P-value	Ικανοποίηση FDR κριτηρίου
miR-141	Κάτω	3.46	0.07	Όχι
miR-203	Κάτω	3.64	0.13	Όχι
miR-205	Πάνω	9.08	0.59	Όχι
miR-200a	Κάτω	2.45	0.74	Όχι
miR-200b	Κάτω	3.61	0.34	Όχι
miR-200c	Κάτω	2.9	0.06	Όχι

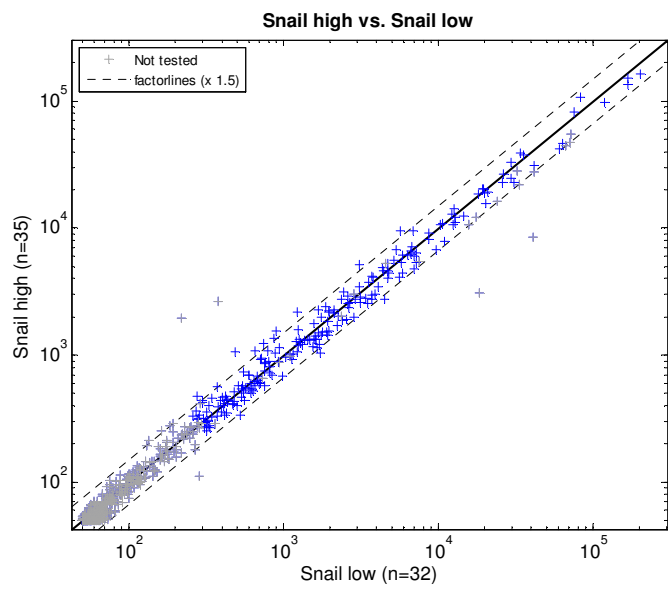
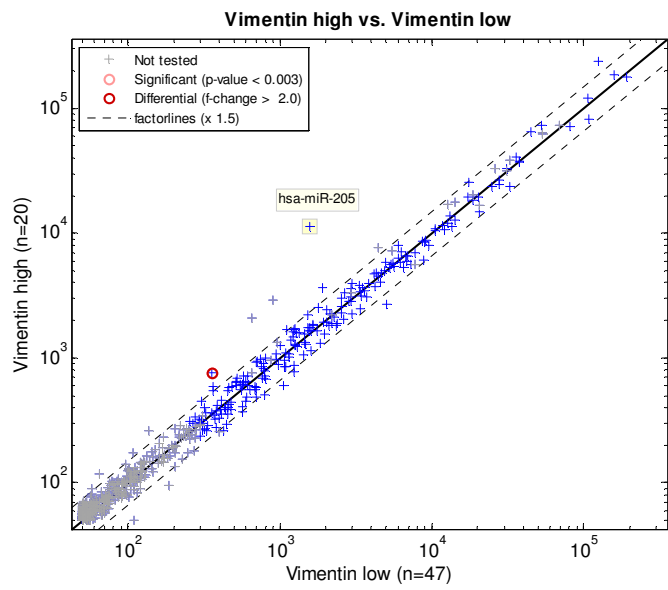
β) EMT ορισμός με βάση το H-score

MicroRNA	Κατεύθυνση μεταβολής έκφρασης στους EMT-θετικούς ασθενείς (H-score)	Διάμεση μεταβολή έκφρασης	P-value	Ικανοποίηση FDR κριτηρίου
miR-141	Κάτω	1.26	0.85	Όχι
miR-203	Κάτω	1.28	0.96	Όχι
miR-205	Πάνω	3.27	0.92	Όχι
miR-200a	Κάτω	2.09	0.29	Όχι
miR-200b	Κάτω	1.89	0.21	Όχι
miR-200c	Κάτω	1.88	0.86	Όχι

3.6 MiRNA προφίλ ανά βιομόριο

Μελετήσαμε επιπλέον την έκφραση των 982 miRNAs με βάση την ανοσοϊστοχημική έκφραση κάθε EMT δείκτη: E-cadherin, N-cadherin, Vimentin και Snail. Μη στατιστικά σημαντικές διαφορές ανευρέθησαν. Ωστόσο, τα miR-203, miR-200c και miR-205 που καταστέλλουν την έκφραση του EMT φαινότυπου, είχαν ποσοτικά χαμηλότερη έκφραση στους όγκους που είχαν υψηλή έκφραση της N-καντεχρίνης.





Εικόνα 17: MiRNA έκφραση ανά EMT δείκτη

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το Καρκίνωμα Αγνώστου Πρωτοπαθούς Εστίας (ΚΑΠΕ) αποτελεί πρότυπο νόσου που χαρακτηρίζεται από την πρώιμη διασπορά του πρωτοπαθούς όγκου σε απομακρυσμένες εντοπίσεις. Αυτή η μεταστατική διασπορά συμβαίνει νωρίς κατά την εξέλιξη της νόσου, πριν ακόμη η πρωτοπαθής εστία να λάβει ανιχνεύσιμες διαστάσεις. Επιπλέον, παράγεται γρήγορα ένα μεγάλο φορτίο όγκου και παρατηρείται αντίσταση στις αντινεοπλασματικές θεραπείες. Συνεπώς, θεωρήσαμε βιολογικά σημαντικό και κατάλληλο να μελετήσουμε την επίπτωση, τους συσχετισμούς και την πιθανή προγνωστική ικανότητα στο ΚΑΠΕ ενός φαινομένου, από τα πιο ουσιαστικά εμπλεκόμενα στην μεταστατική διασπορά, την Επιθηλιακή προς Μεσεγχυματική Μετατροπή (Epithelial to Mesenchymal Transition-EMT). Η EMT λαμβάνει χώρα κατά την εμβρυϊκή μορφογένεση στους πολυκύτταρους οργανισμούς, οπότε εμβρυϊκά μεσεγχυματικά κύτταρα σχηματίζονται και γίνονται πιο κινητικά ως αποτέλεσμα της απώλειας της επιθηλιακής πολικότητάς τους. Τα τελευταία χρόνια η EMT έχει αναγνωριστεί ως δυνητικός μηχανισμός εξέλιξης του καρκίνου. Κατά τη διάρκεια της ενεργοποίησης αυτού του μεταστατικού μηχανισμού, τα κύτταρα αποκτούν ιδιότητες προσκόλλησης, ενεργοποιούν μηχανισμούς πρωτεόλυσης και αυξημένης κινητικότητας, μεθίστανται και δημιουργούν εστίες σε απομακρυσμένες εντοπίσεις¹⁶⁴. Με την απόκτηση των EMT χαρακτηριστικών, τα κύτταρα χάνουν τις επιθηλιακές διακυτταρικές συνδέσεις τους, επαναδιαμορφώνουν την ακτίνη του κυτταροσκελετού και υποεκφράζουν πρωτεΐνες που προάγουν τη διακυτταρική σταθερότητα όπως την E-καντχερίνη και τη γ-κατενίνη. Αντιστοίχως, υπερεκφράζουν μεσεγχυματικούς δείκτες όπως η βιμεντίνη, η φιμπρονεκτίνη, η ακτίνη των λείων μυϊκών ινών (smooth muscle actin-SMA), το κολλαγόνο (τύπου I και II), η ειδική πρωτεΐνη των ινωδοβλαστών-1 (fibroblast-specific-protein-1), η N-καντχερίνη, ενώ παρατηρείται επίσης και αυξημένη ενεργοποίηση των μεταλλοπρωτεϊνών του στρώματος, όπως οι MMP-2, MMP-3 και MMP-9^{165,166}. Συγκεκριμένα, η αποσυναρμολόγηση των διακυτταρικών συνδέσεων και η μετεγκατάσταση της E-καντχερίνης και της β-κατενίνης από την κυτταρική μεμβράνη στον πυρήνα έχει ως αποτέλεσμα την επαγωγή της EMT^{167,168}.

Ο αρχικός ορισμός της EMT αναφερόταν στην οργανογένεση των εμβρύων¹⁵⁹. Παρά το γεγονός ότι η EMT πρωταρχικά αναγνωρίστηκε ως μια ζωτικής σημασίας διεργασία διαφοροποίησης και μορφογένεσης κατά την εμβρυογένεση, τώρα πια έχει αναγνωριστεί και σε διάφορες σημαντικές παθοφυσιολογικές καταστάσεις όπως η μετάσταση και η εξέλιξη των όγκων. Προσφάτως, μέσω *in vitro* πειραμάτων, η EMT

συσχετίστηκε και με την απόκτηση από τα κύτταρα ιδιοτήτων αρχέγονου πολυδύναμου δυναμικού (stem-cell-like phenotype). Τα επιθηλιακά κύτταρα που φέρουν αυτόν τον φαινότυπο αποκτούν ατρακτοειδές σχήμα, αποφεύγουν την απόπτωση και τον σχετικό με την αποίκις κυτταρικό θάνατο, εκφράζουν πληθώρα δεικτών εμβρυϊκής προέλευσης, έχουν την ικανότητα να σχηματίζουν αποικίες και μαμμοσφαιρίδια και τελικά επανακτούν την κυτταρική ετερογένεια του αρχικού όγκου από τον οποίο προήλθαν⁸². Ενδιαφέρουσα υπόθεση είναι ότι ίσως τα καρκινικά κύτταρα με αρχέγονο δυναμικό (cancer stem cells-CSC) να είναι αυτά που συμβάλλουν στην πολύπλοκη διαδικασία της EMT, οδηγώντας τελικά στην ανάπτυξη του όγκου¹⁶⁹. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες ανέδειξαν το γεγονός ότι η EMT συσχετίζεται με το μεταστατικό δυναμικό και την αντίσταση στη θεραπευτική αγωγή^{170,171,172}. Η EMT έχει δειχθεί ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο να προσδίδει στα καρκινικά κύτταρα ιδιότητες αντίστασης προς την συμβατική χημειοθεραπεία με πακλιταξέλη, βινκριστίνη και οξαλιπλατίνη¹⁷³. Επομένως, η διαλεύκανση των μηχανισμών που διέπουν την απόκτηση του EMT φαινότυπου από τα καρκινικά κύτταρα θα μπορούσε να οδηγήσει στον σχεδιασμό στοχευουσών θεραπευτικών προσεγγίσεων σε συνδυασμό με την συμβατική θεραπευτική για την αντιμετώπιση της κακοήθειας.

Μια πληθώρα μεταγραφικών παραγόντων που καταστέλλουν την έκφραση της E-καντχερίνης έχουν ενοχοποιηθεί ως πιθανοί επαγωγείς της EMT κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη και την καρκινογένεση. Αυτοί περιλαμβάνουν τον zinc-finger μεταγραφικό παράγοντα Snail και τους ομολόγους του (Snail1, Snail2/Slug, Snail3) όπως και μερικούς βασικούς helix-loop-helix μεταγραφικούς παράγοντες όπως οι Twist, ZEB1, ZEB2/SIP1 και TCF3/E47/E12. Πρέπει να αναγνωρίσουμε ότι η EMT είναι μια δυναμική διαδικασία η οποία πυροδοτείται από την αλληλεπίδραση εξωκυττάρων σημάτων (όπως το κολλαγόνο και το υαλουρονικό οξύ) με ενδοκρινείς παράγοντες όπως οι TGF-β (transforming growth factor-β), FGF (fibroblast growth factor), EGF (epidermal growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), οι ισομορφές των Wnt πρωτεϊνών, οι μεταλλοπρωτεάσες MMP, οι πρωτεΐνες μορφογένεσης των οστών (bone morphogenic proteins-BMP) και πολλούς άλλους. Μεταξύ αυτών των μονοπατιών μεταγωγής σήματος, έχει δειχθεί ότι τα μονοπάτια Wnt, TGF-β, Hedgehog και NF-κB (nuclear factor κB) είναι κριτικής σημασίας στην επαγωγή του EMT φαινότυπου^{105,174,175}. Επιπλέον, το μονοπάτι μεταγωγής σήματος Notch φαίνεται να παίζει ρόλο τόσο στην απόκτηση EMT χαρακτηριστικών κατά τη

φυσιολογική ανάπτυξη όσο και κατά την ογκογένεση. Η ενεργοποίηση του Notch στα ενδοθηλιακά κύτταρα οδηγεί σε μορφολογικές, φαινοτυπικές και λειτουργικές μεταβολές, συμβατές με μία μεσεγχυματική μετατροπή^{176,177,103}. Αυτές οι μεταβολές έγκεινται στην υποέκφραση ενδοθηλιακών δεικτών (E-καντχερίνη, Tie1, Tie2, platelet endothelial adhesion molecule 1 και ενδοθηλιακή NO-συνθετάση) και την υπερέκφραση μεσεγχυματικών δεικτών (α-SMA, φιμπρονεκτίνη και PDGF-R)¹⁷⁸. Επιπλέον, όπως έχει προαναφερθεί, η υπερέκφραση του Notch σε ενδοθηλιακά κύτταρα επάγει την έκφραση του SNAIL, αποφέροντας την εξασθένιση της έκφρασης της E-καντχερίνης, την απώλεια της σταθερότητας και την απόκτηση EMT χαρακτηρισμών¹⁰².

Ωστόσο, κεντρικό γεγονός της EMT παραμένει η υποέκφραση της E-καντχερίνης η οποία οδηγεί στην απώλεια της επαφής μεταξύ των κυττάρων και κατά συνέπεια στην απόκτηση από αυτά ενός μεσεγχυματικού φαινότυπου που χαρακτηρίζεται από υπερέκφραση της N-καντχερίνης και της βιμεντίνης. Ο μεταγραφικός παράγοντας SNAIL αποτελεί σημαντικό καταστολέα της έκφρασης της E-καντχερίνης και σημαντικό προαγωγό της EMT. Κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη ο SNAIL εκφράζεται ως απάντηση στην ενεργοποίηση του FGF. Εκτός όμως από την γαστριδίωση, ο SNAIL συμβάλλει και στην νευριδίωση και το σχηματισμό της σκληρά υπερώας μέσω της ρύθμισης της διακυτταρικής σταθερότητας, της αναδιοργάνωσης των δεσμοσωμάτων και της έκφρασης πρωτεασών^{83,179,180}. Επιπλέον, σε ογκογενετικό επίπεδο, ο SNAIL έχειδειχθεί ότι ρυθμίζει την έκφραση της E-καντχερίνης σε χαμηλότερα επίπεδα σε κυτταροκαλλιέργειες, σε γενετικά μεταλλαγμένα ποντίκια αλλά και σε διάφορους ανθρώπινους όγκους όπως στο ηπαροκυτταρικό καρκίνωμα¹⁸¹, στον καρκίνο του οισοφάγου, της καρδιάς και του σώματος του στομάχου¹⁸² και στον κολο-ορθικό καρκίνο¹⁸³. Η υπερέκφραση του SNAIL σε επιθηλιακούς όγκους τους καθιστά περισσότερο επιθετικούς όπως έχει υποδειχθεί από πειράματα στον καρκίνο του μαστού. Επιπλέον, η υψηλή έκφραση του SNAIL έχει συσχετισθεί με αυξημένη πιθανότητα υποτροπής και πτωχή επιβίωση στον καρκίνο του μαστού και του στομάχου¹⁸⁴.

Για την αναδρομική μας μελέτη 100 ασθενών διεγνωσμένων με ΚΑΠΕ, χρησιμοποιήσαμε ανοσοϊστοχημική χρώση (IHC) ιστικών μικροσυτοιχιών (TMAs), μελετώντας δύο κηλίδες (spots) για κάθε ασθενή ως προς την έκφραση EMT-ειδικών βιολογικών δεικτών, με στόχο να ελαχιστοποιήσουμε την επίδραση μίας πιθανής

τυχαίας δειγματοληψίας (random sampling) από περιοχές του όγκου με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Ο συνδυασμός της E-καντχερίνης, N-καντχερίνης, βιμεντίνης και SNAIL επιλέχθηκε με στόχο να οριστεί ένας πιο περίπλοκος αλλά ταυτόχρονα και πιο ασφαλής ορισμός του EMT φαινοτύπου, ενώ το OCT4 επιλέχθηκε ώστε να διερευνηθεί ο συσχετισμός της EMT με χαρακτηριστικά αρχέγονου πολυδύναμου δυναμικού. Στη συνέχεια, επιλέξαμε προοπτικά μια συγκεκριμένη τιμή cut-off για κάθε ένα δείκτη βασιζόμενοι σε καμπύλες κατανομών και ROC αναλύσεις λαμβάνοντας υπόψιν την σχετική βιβλιογραφία, αντί να εκτελέσουμε πολλαπλές, διερευνητικές αναλύσεις χρησιμοποιώντας πολλαπλά cut-offs. Επιπλέον, όπου ήταν δυνατό, αναλύσαμε τους συσχετισμούς των βιομορίων εξετάζοντάς τους ανωτέρω δείκτες ως συνεχείς και όχι ως κατηγορικές μεταβλητές. Ωστόσο, παρά αυτά τα προληπτικά μέτρα, δεν μπορούμε να είμαστε σίγουροι ότι τα συγκεκριμένα ανοσοϊστοχημικά cut-offs αντιπροσωπεύουν τα αληθή βιολογικά όρια και θα πρέπει να επιβεβαιωθεί η αξιοπιστία τους μέσω μεγαλύτερων σειρών ασθενών με ΚΑΠΕ.

Παρά τους μεθοδολογικούς περιορισμούς, που είναι συχνοί σε τέτοιες καινοτόμες μελέτες, δείξαμε ότι η έκφραση EMT-δεικτών είναι αντιστρόφως ανάλογη της έκφρασης επιθηλιακών δεικτών σε κύτταρα ασθενών με ΚΑΠΕ, ότι η EMT σχετίζεται με αρνητικά κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά (άρρεν φύλο, αναπλάσια, σπλαγγχνικές μεταστάσεις) και ότι έχει ισχυρά κακή προγνωστική αξία για την επιβίωση των ασθενών. Επιπλέον, δείξαμε μία πιθανή αιτιολογική συσχέτιση μεταξύ της ενεργοποίησης των NOTCH 2 και 3 και της επαγωγής του EMT φαινότυπου, όπως έχει δειχθεί και από άλλους ερευνητές^{185,186}. Συνεπώς, ο EMT φαινότυπος, όπως τον όρισαμε στην μελέτη μας, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης κατηγοριοποίησης των ασθενών σε υψηλού ή χαμηλού κινδύνου καθώς και δυνητικά ως θεραπευτικός στόχος έξυπνων φαρμάκων.

Τα ευρήματά μας, άλλωστε, σχετικά με την προγνωστική αξία της ύπαρξης EMT φαινοτύπου σε ασθενείς με ΚΑΠΕ, προσφέρουν επιπλέον στοιχεία στην ήδη υπάρχουσα γνώση ότι η EMT επιφέρει κακή πρόγνωση σε ασθενείς με όγκους γνωστής πρωτοπαθούς εστίας. Η υπερέκφραση των μεταγραφικών παραγόντων που επάγουν την EMT όπως των SNAIL, SLUG, TWIST, ZEB 1 και 2 σε συνδυασμό με την καταστολή της έκφρασης της E-καντχερίνης έχει ήδη συσχετισθεί με πτωχή πρόγνωση σε ασθενείς με καρκίνο του μαστού, των ωοθηκών και της μήτρας μέσω της απόκτησης επιθετικών χαρακτηριστικών, της δημιουργίας λεμφαδενικών μεταστάσεων και της

πρώιμης κακοήθους διήθησης άλλων οργάνων^{187,188,189,190}. Ωστόσο, παρά τις ισχυρές διαφορές στην επιβίωση μεταξύ των EMT-θετικών και EMT-αρνητικών ασθενών, είναι αναμφισβήτητο ότι ο EMT φαινότυπος είναι σπάνιος στον υπό μελέτη πληθυσμό μας: μόνο 8% των ασθενών με ΚΑΠΕ πληρούν τον ορισμό με βάση το ποσοστό των χρωματισμένων κυττάρων και 16% με βάση το H-score. Υποθέσεις που θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν αυτά τα ευρήματα είναι η αποδόμηση των πρωτεϊνών λόγω μη ικανοποιητικής προσκόλλησης (fixation), προβληματική επανάκτηση των αντιγόνων (antigen retrieval) ή ακόμη και υποεκτίμηση της πρωτεϊνικής χρώσης λόγω της παλαιότητας των βιοπτικών δειγμάτων (archival material). Άλλος δυνητικά περιοριστικός παράγοντας θα μπορούσε να είναι το γεγονός ότι οι ιστοικές μικροσυστοιχίες ελήφθησαν από το κέντρο του όγκου σε αντίθεση με πρόσφατες μελέτες που επισημαίνουν ότι οι EMT διαδικασίες λαμβάνουν χώρα στην περιφέρεια του όγκου, στο λεγόμενο διηθητικό μέτωπο (invasive front)^{191,192,193}. Πρόσφατες μελέτες σε καρκινικά κύτταρα του μαστού με αρχέγονο δυναμικό (Breast Cancer Stem Cells-BCSC) όπως και σε κύτταρα θηλώδους καρκινώματος του θυροειδούς ενισχύουν την υπόθεσή μας αυτή. Τα BCSC με μεσεγχυματικούς χαρακτήρες βρίσκονταν στο διηθητικό μέτωπο ενώ τα κύτταρα με επιθηλιακούς χαρακτήρες εδράζονταν πιο κεντρικά του όγκου. Η λεγόμενη «μεσεγχυματική κατάσταση» (Mesenchymal-like state) σχετίζεται με την έκφραση μεσεγχυματικών δεικτών και υψηλή διηθητική ικανότητα ενώ η «επιθηλιακή κατάσταση» (epithelial-like state) χαρακτηρίζεται από την έκφραση επιθηλιακών δεικτών, την σταθερότητα της κυτταρικής πολικότητας και εκτεταμένο πολλαπλασιασμό. Η κυτταρική πλαστικότητα (plasticity) είναι αυτή που επιτρέπει μια μετατροπή από τη μία κατάσταση στην άλλη μέσω ρυθμιστικών σημάτων από το μικροπεριβάλλον του όγκου¹⁹⁴. Επιπλέον σε κύτταρα θηλώδους καρκινώματος του θυροειδούς παρατηρήθηκε μείωση της έκφρασης της E-καντχερίνης στο διηθητικό μέτωπο, η οποία συσχετίστηκε με την απώλεια της πολικότητας και της συνοχής των κυττάρων, μορφολογικά χαρακτηριστικά ανάλογα της EMT. Η παρατήρηση ότι οι όγκοι με απώλεια της έκφρασης της E-καντχερίνης στο διηθητικό μέτωπο συσχετιζόνταν με πρώιμη λεμφαδενική συμμετοχή προσέδωσε-εκτός από μορφολογικά-και κλινικά χαρακτηριστικά EMT. Μια άλλη ενδιαφέρουσα παρατήρηση ήταν ότι τα κύτταρα των μεταστάσεων εμφάνισαν επανέκφραση της E-καντχερίνης. Αυτή η επανέκφραση επισημαίνει την ανάστροφη διαδικασία της EMT, την μεσεγχυματική προς επιθηλιακή μετατροπή (MET)¹⁹⁵. Αυτή η φαινοτυπική μετατροπή θεωρείται ως ένα βήμα προς τη δημιουργία των κατάλληλων συνθηκών για τα κύτταρα,

κάτω από τις οποίες μπορούν να σχηματίσουν μεταστάσεις σε ένα μικροπεριβάλλον διαφορετικό από αυτό του πρωτοπαθούς όγκου¹⁹⁶. Τέλος, η πολυπλοκότητα των μονοπατιών μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν την επαγωγή της EMT όπως και η αντιστρεψιμότητα του αποκτηθέντος μεσεγχυματικού φαινότυπου θέτουν σημαντικές προκλήσεις για τους ερευνητές. Αν η συστηματική διασπορά και η EMT συμβαίνουν κατά τα πρώιμα στάδια εξέλιξης του όγκου, όπως υποδεικνύει η πρόσφατη βιβλιογραφία, τότε κατά τη στιγμή της διάγνωσης μπορεί να είναι ήδη πολύ αργά για να ταυτοποιηθεί ένα τόσο ασταθές φαινόμενο¹⁹⁷.

Η σημασία της σωστής και γρήγορης διάγνωσης ασθενών με ΚΑΠΕ είναι ουσιαστική δεδομένου ότι η προέλευση της κακοήθειας καθορίζει την βέλτιστη θεραπευτική αντιμετώπιση και συνεπώς μπορεί να έχει θετική επίδραση στην ολική επιβίωση. Η βασική διάγνωση του ΚΑΠΕ συνίσταται στην παθολογοανατομική εκτίμηση, τα ανοσοϊστοχημικά τεστ, το ιστορικό, την κλινική εμφάνιση και τις αντίστοιχες απεικονιστικές και ορολογικές εξετάσεις. Παρ'όλα αυτά, ο κλινικός γιατρός συχνά είτε αλλάζει την αρχική διάγνωση του όγκου προέλευσης είτε προσθέτει και άλλες πιθανές διαγνώσεις στην διαφορική του διάγνωση ανάλογα με την πορεία της νόσου, την ανταπόκριση στη θεραπεία και την τελική έκβαση¹⁹⁸. Δεδομένης της πληθώρας ανοσοϊστοχημικών χρώσεων καθώς και της δυσκολίας επιλογής της καταλληλότερης ανά περίπτωση, η εισαγωγή οποιουδήποτε πρόσθετου αντικειμενικού μέσου διάγνωσης θα μπορούσε να ορθολογικεύσει τον διαγνωστικό αλγόριθμο. Η ανοσοϊστοχημεία είναι ένα ισχυρό όπλο για τους ασθενείς με ΚΑΠΕ. Ωστόσο, παρά τη χρήση νέων ανοσοϊστοχημικών δεικτών και την εισαγωγή νέων αλγορίθμων οι οποίοι αύξησαν την ακρίβεια της ανοσοϊστοχημείας στο 60-88%, εξακολουθούν να εμπεριέχουν έντονα το υποκειμενικό στοιχείο. Η επιλογή, άλλωστε, του ανοσοϊστοχημικού πλαισίου αποτελεί μια υποκειμενική απόφαση η οποία μπορεί να επηρεαστεί από την φυσική πορεία της νόσου και την κλινική εικόνα του ασθενή^{199,200,201}. Ακόμα και η ερμηνεία των ανοσοϊστοχημικών αποτελεσμάτων είναι υποκειμενική οδηγώντας σε μεγάλες διακυμάνσεις μεταξύ των παθολογοανατομικών εκθέσεων. Επομένως, η ανάγκη για περισσότερη αντικειμενικότητα στις διαγνώσεις οδήγησε στην ανάπτυξη μοριακών μοντέλων. Η μοριακή διαγνωστική είναι ένα υψηλής σημασίας κλινικό όπλο που συμβάλλει σημαντικά στην απάντηση διαγνωστικών ερωτημάτων που απασχολούν τόσο τους παθολογοανατόμους όσο και τους κλινικούς ογκολόγους. Η mRNA και miRNA έκφραση έχουν χρησιμοποιηθεί

στην ανάπτυξη συγκεκριμένων μικροσυστοιχιών και αλγορίθμων που θα μπορούσαν δυνητικά να συνεισφέρουν στην διαγνωστική και θεραπευτική διαδικασία. Τα microRNA αποδείχθηκε ότι υπερτερούν έναντι του mRNA όταν χρησιμοποιείται βιοπτικό υλικό που έχει σταθεροποιηθεί σε παραφίνη (FFPE samples). Τα miRNAs αποου έχουν εξαχθεί από FFPE μπλοκ είναι πιο σταθερά σε σχέση με το mRNA και προσφέρουν παρόμοια αποτελέσματα με miRNA που έχουν εξαχθεί από φρέσκους κατεψυγμένους ιστούς^{202,203,204}.

Τα miRNAs αποτελούν μια τάξη μικρών, σταθερών, μη-κωδικοποιούντων RNAs και παρέχουν έναν ευρύ έλεγχο έκφρασης μέσω της μεταφραστικής καταστολής του mRNA. Τα miRNAs είναι ζωτικής σημασίας για τη ρύθμιση ενδοκυττάρων λειτουργιών ενώ ο ρόλος τους στην κακοήγη μετατροπή και τη μεταστάση βρίσκεται στο επίκεντρο ερευνητικών μελετών. Πάνω από 1400 miRNAs έχουν ανευρεθεί, των οποίων η απορρύθμιση έχει σημαντικές συνέπειες δεδομένου ότι ένα μόνο miRNA στοχεύει πολλά διαφορετικά γονίδια και μπορεί να προκαλέσει καταιγισμό μεταγωγής σημάτων και αναδραστική επίδραση, ταυτόχρονα. Η σκέψη ότι τα miRNAs είναι και σημαντικοί ρυθμιστές της EMT έχει μετασηματίσει τη συμβατική άποψη της εξέλιξης του καρκίνου, ενώ συγκεκριμένα miRNAs έχουν ταυτοποιηθεί ως ρυθμιστές τόσο της EMT όσο και της αντίστροφης διαδικασίας, της MET²⁰⁵. Η EMT επάγεται στα καρκινικά κύτταρα από εξωκυττάρια σήματα που προέρχονται από το στρώμα. Ο TGFβ φαίνεται να έχει κυρίαρχο ρόλο στην άμεση ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων SNAIL, ZEB και TWIST, οι οποίοι αποτελούν και τους βασικούς ρυθμιστές της EMT²⁰⁶. Ένα σημαντικό αριθμός μελετών έχει ασχοληθεί με την ανεύρεση των miRNAs που συμμετέχουν στην διαμεσολαβούμενη από τον TGFβ EMT. Τα miR-21 και miR-31 είναι αυτά που επάγονται περισσότερο σε κύτταρα LIM1863 ως απάντηση σε σήματα από τον TGFβ και TGFα, προωθώντας τη διεισδυτικότητά τους και τον μεταστατικό φαινότυπο²⁰⁷. Το miR-29a φάνηκε να στοχεύει την έκφραση την ρυθμιστικής πρωτεΐνης τριστετραπρόλινης (tristetraproline-TTP) και να μειώνει την έκφρασή της περίπου κατά 60%, οδηγώντας στην απώλεια της πολικότητας της βασικής μεμβράνης *in vitro* αλλά και στο σχηματισμό μεταστάσεων σε μοντέλα ποντικών, *in vivo*²⁰⁸. Επίσης, το miR-155, το οποίο έχει ανευρεθεί σε πολλούς όγκους είναι μεταγραφικός στόχος του μονοπατιού μεταγωγής σήματος TGFβ/SMAD4²⁰⁹. Στο επίπεδο ρύθμισης της έκφρασης της E-καντχερίνης, αρκετά miRNAs έχουν ταυτοποιηθεί ότι ρυθμίζουν τη μετάπτωση EMT σε MET

φαινότυπο και το αντίστροφο. Το miR-9 στοχεύει το γονίδιο της E-καντχερίνης CDH1 και προωθεί την εξέλιξη του καρκίνου του μαστού. Το miR-9 υπερεκφράζεται σε ασθενείς με μεταστατική νόσο του καρκίνου του μαστού σε σχέση με τους ασθενείς που δεν φέρουν μεταστάσεις. Επιπλέον, η έκτοπη έκφραση του miR-9 επάγει τον EMT φαινότυπο με μείωση της έκφρασης της E-καντχερίνης κατά 70% και με αντίστοιχη αύξηση της έκφρασης της βιμεντίνης²¹⁰. Το miR-194 είναι ακόμη ένα miRNA που εμπλέκεται στον άξονα EMT/MET. Το miR-194 έχει υψηλή έκφραση στα φυσιολογικά επιθηλιακά κύτταρα του γαστρεντερικού σωλήνα και του ήπατος. Η υπερέκφραση του miR-194 σε μεσεγχυματικά κύτταρα έχει ως αποτέλεσμα την αναστολή της μετάστασης²¹¹. Σε επίπεδο μεταγραφικών παραγόντων, ο TWIST επάγει το miR-10b, το οποίο υπερεκφράζεται σε μεταστατικά κύτταρα του καρκίνου του μαστού, ενώ η έκτοπη υπερέκφρασή του σε ανθρώπινες καρκινικές κυτταρικές σειρές του μαστού έχει συσχετισθεί με επιθετικότητα και το σχηματισμό μικρομεταστάσεων¹³³. Όσον αφορά τον άλλο ρυθμιστή της EMT, τον SNAIL, έχει παρατηρηθεί μια ισχυρή, χρονοεξαρτώμενη υπερέκφραση του miR-661, αντιστρόφως ανάλογη της έκφρασης των mRNA-στόχων που αναμενόταν να εκφράζονται κατά την SNAIL επαγόμενη EMT²¹². Ωστόσο, η πιο σημαντική miRNA ρύθμιση της EMT πραγματοποιείται μέσω της λειτουργικής σύνδεσης της miR-200 οικογένειας με την ZEB ομάδα μεταγραφικών παραγόντων. Η επαγόμενη υπερέκφραση του miR-200c σε κυτταρικές σειρές προωθεί τον επιθηλιακό φαινότυπο, την έκφραση της E-καντχερίνης και επαρκεί στο να αποτρέψει την TGFβ επαγόμενη EMT. Επιπλέον, η υπερέκφρασή του σε μεσεγχυματικά κύτταρα επάγει τη MET²¹³. Η miR-200 στοχεύει άμεσα το 3' UTR του ZEB mRNA, αναστέλλει την έκφραση του ZEB και προωθεί την επιθηλιακή διαφοροποίηση²¹⁴. Σημαντικό να αναφερθεί είναι ότι εκτός από τον κοινό επαγωγέα της οικογένειας miR-200, υπάρχουν και συγκεκριμένες περιοχές πρόσδεσης, μέσω των οποίων τα ZEB 1 και 2 ασκούν ανάστοφο έλεγχο στο επίπεδο της miR-200 διαμεσολαβούμενης μεταγραφής²¹⁵. Με βάση αυτά τα δεδομένα, υποθέτουμε ότι η miR-200 οικογένεια και η ZEB ομάδα μεταγραφικών παραγόντων συμμετέχουν σε μια διπλή ανάστροφη ανάδραση (double negative feedback loop) η οποία δρα στο να σταθεροποιεί την κυτταρική διαφοροποίηση σε απάντηση εξωκυττάριων σημάτων, τέτοιων ώστε η ισχυρή επαγωγή της miR-200 να προωθεί την επιθηλιακή διαφοροποίηση και να αναστέλλει την έκφραση των ZEB 1 και 2 ως μεσεγχυματικών μεταγραφικών παραγόντων αλλά και το αντίστροφο, δηλαδή η έκφραση των ZEB 1 και 2 να προάγει ένα μεσεγχυματικό πρότυπο γονιδιακής έκφρασης ενώ ταυτόχρονα

να καταστέλλει τη miR-200. Επομένως, σε μοριακό επίπεδο, η δημιουργία μεταστάσεων αποτελεί ένα δυναμικό πρόγραμμα κατά το οποίο η «πλαστικότητα» (plasticity) του φαινότυπου του όγκου αναλόγως του μικροπεριβάλλοντός του θεωρείται απαραίτητη για την μετέπειτα εξέλιξή του²¹⁶.

Εμείς ήδη μελετήσαμε την ύπαρξη και τους κλινικοπαθολογοανατομικούς συσχετισμούς του EMT φαινοτύπου σε ιστικές μικροσυστοιχίες που ελήφθησαν από μπλοκ παραφίνης 100 ασθενών με ΚΑΠΕ στηριζόμενοι σε ανοσοϊστοχημικά δεδομένα. Θέλοντας να προχωρήσουμε την έρευνά μας ένα βήμα περισσότερο, μελετήσαμε το πρότυπο έκφρασης 982 miRNAs στους EMT-θετικούς έναντι των EMT-αρνητικών ασθενών. Τα ευρήματά μας συνάδουν με αυτά της παγκόσμιας βιβλιογραφίας. Αν και στα αποτελέσματά μας δεν επετεύχθη στατιστική σημαντικότητα, κατορθώσαμε να δείξουμε μια τάση των miRNAs που καταστέλλουν την EMT (miR-200 οικογένεια και miR-203) να έχουν χαμηλότερη έκφραση στους EMT-θετικούς ασθενείς, τόσο όταν ο EMT φαινότυπος ορίζεται με βάση το ποσοστό των χρωματισμένων κυττάρων όσο και όταν ο EMT φαινότυπος ορίζεται με βάση το H-score. Επιπλέον, το γεγονός ότι τα miRNAs που καταστέλλουν την EMT είχαν υψηλότερη έκφραση τους όγκους με χαμηλή έκφραση της N-καντχερίνης υποδεικνύει ότι η παρατηρηθείσα τάση δεν ήταν τυχαίο εύρημα. Το miR-205 εμφάνισε μια τάση αυξημένης έκφρασης στους EMT-θετικούς ασθενείς, χωρίς και πάλι η τάση αυτή να είναι στατιστικώς σημαντική. Η υψηλή έκφραση του miR-205 αποδόθηκε στην ύπαρξη πλακώδους ιστολογίας, με την ειδικότητα των miRNAs προς συγκεκριμένους ιστούς να είναι ένα καλά μελετημένο φαινόμενο. Πιστεύουμε ότι το συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης που εμφάνισε το miR-205 στους EMT-θετικούς ασθενείς οφείλεται στην επικράτηση της πλακώδους ιστολογίας εντός αυτής της υποομάδας του υπό μελέτη πληθυσμού, δεδομένου ότι η αυξημένη έκφραση δεν επιβεβαιώθηκε όταν από τη μελέτη μας αφαιρέθηκαν οι ασθενείς με ΚΑΠΕ πλακώδους ιστολογίας.

Αντιστοίχως, το μικρό ποσοστό EMT-θετικών ασθενών αποτέλεσε το βασικό περιορισμό στη μελέτη μας, ο οποίος μας εμπόδισε από το να καταλήξουμε σε αδιάσειστα αποτελέσματα. Όπως έχει προαναφερθεί, η μεταβατική και αναστρέψιμη φύση της EMT, η τοπογραφική της δράση στο διηθητικό μέτωπο και το φαινόμενο της MET στις ήδη εγκατεστημένες μεταστάσεις εξηγούν την σπανιότητα του EMT φαινότυπου στην συγκεκριμένη κοορτή ασθενών. Δεν κατορθώσαμε να βρούμε άλλες διαφορές στην miR έκφραση μεταξύ EMT-θετικών και EMT-αρνητικών ασθενών

(δυνητικά MET-ασθενείς) εκτός από τις αριθμητικές διαφορές έκφρασης της miR-200 οικογένειας. Επιπλέον, ο μικρός αριθμός ασθενών με ΚΑΠΕ, μόνο 68, και ο ακόμη μικρότερος αριθμός EMT-θετικών ασθενών (5 ή 10 αναλόγως του χρησιμοποιούμενου ορισμού) δεν μας επέτρεψε να αναλύσουμε τα πρότυπα έκφρασης κάθε κλινικοπαθολογοανατομικής υποομάδας του ΚΑΠΕ ξεχωριστά.

Στόχος όμως κάθε μεταφραστικής έρευνας είναι να μεταφερθούν και να εφαρμοστούν τα αποτελέσματα στην καθημερινή κλινική πράξη. Δεδομένης της κλινικής σημασίας των EMT διεργασιών, η αναστολή της EMT αποτελεί μία ελκυστική θεραπευτική προσέγγιση η οποία θα μπορούσε δυνητικά να επηρεάσει την έκβαση της νόσου. Ωστόσο, η πολυπλοκότητα των μονοπατιών μεταγωγής σήματος που ρυθμίζουν την EMT όπως και η αναστρεψιμότητα του αποκτηθέντος μεσεγχυματικού φαινότυπου θέτουν σημαντικά εμπόδια. Παραμένει, επομένως, ασαφές όχι μόνο το ποιά μονοπάτια θα πρέπει να ανασταλούν-με τη μικρότερη δυνατή τοξικότητα έναντι των υγιών ιστών- αλλά και ποιοί όγκοι θα πρέπει να στοχευθούν και σε ποιά στάδιο της νόσου. Άλλωστε οι ομοιότητες μεταξύ της EMT και των φυσιολογικών προγραμμάτων πολυδύναμου αρχέγονου δυναμικού όπως και η αστάθεια του άξονα EMT/MET δημιουργούν ακόμη περισσότερες ανησυχίες όσον αφορά μια επιλεκτική στόχευση ή ακόμη και τη διάρκεια της κλινικής απάντησης στην στόχευση αυτή. Δυνητικά, οι πιο προφανείς θεραπευτικοί στόχοι θα ήταν οι υποδοχείς τυροσινικών κινασών, όπως οι MET, IGFR1 και η ERBB οικογένεια. Η Ταρστούζιμάμπη (Trastuzumab), η Ερλοτινίμπη (Erlotinib), η Μπεβασιζουμάμπη (Bevacizumab) που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά του καρκίνου του μαστού, του πνεύμονα και του εντέρου αποτελούν ελκυστικό πεδίο κλινικών μελετών. Ανάλογοι αναστολείς τυροσινικών κινασών που συμμετέχουν στην EMT, όπως οι MET και FGFR2 θα μπορούσαν να δοκιμαστούν. Το RAS μονοπάτι μεταγωγής σήματος μπορεί να προσφέρει θεραπευτικούς στόχους. Ήδη, οι αναστολείς της φαρνεσυλτρανσφεράσης (farnesyltransferase), η οποία θεωρείται απαραίτητη για την πρόσδεση του RAS στην μεμβράνη του κύτταρου, έχουν μελετηθεί σε διάφορους όγκους²¹⁷. Η απενεργοποίηση του Notch μονοπατιού μεταγωγής σήματος θα μπορούσε να έχει επίσης κλινική αξία. Άλλωστε το Notch αποτελεί τον πιο πρόσφατα αναγνωρισμένο γενετικό πρόγραμμα της ZEB/miR-200 EMT ρύθμισης. Δεδομένης της ενεργοποίησης του Notch από την ενζυμική δράση της γ-σεκρετάσης, αναστολείς της όπως ο DAPT έχουν δοκιμαστεί τόσο in vitro σε προστατικά καρκινικά κύτταρα, όσο και σε μοντέλα ποντικών αλλά

και σε Phase I μελέτες, με αρκετα ενθαρρυντικά αποτελέσματα. Ωστόσο μια σημαντική πρόκληση που πρέπει να αντιμετωπισθεί είναι η κυτταροτοξικότητα αυτών των παραγόντων στο γαστρεντερικό σωλήνα^{218,219,220}. Από μηχανιστικής άποψης ακόμη, η αναστολή του μονοπατιού TGF-β-Smad2/3 ενεργοποιεί την MET δυνητικά προσδίδει αντιμεταστατικές ιδιότητες στο κύτταρο. Ωστόσο μια πιθανή στόχευση του TGF-β μονοπατιού θα ήταν προβληματική δεδομένου ότι ο TGF-β θεωρείται ως «δίκωπο μαχαίρι» στην εξέλιξη του καρκίνου και αυτό γιατί ο TGF-β εμποδίζει την ανάπτυξη του όγκου στα αρχικά στάδια αλλά με την πρόοδο της νόσου, ενισχύει τη μετάσταση μέσω της ενεργοποίησης της EMT, οδηγώντας τελικά στο σχηματισμό νέων εστιών σε απομακρυσμένα όργανα²²¹. Επιπλέον, η αποκατάσταση της έκφρασης της E-καντχερίνης θα ήταν ένας πιθανός τρόπος αναστολής της EMT και η αναστολή αυτή θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσω της αναστολής του μεταγραφικού παράγοντα SNAIL. Ο SNAIL είναι ένας ελκυστικός στόχος ανάπτυξης θεραπευτικών παραγόντων τόσο γιατί παρεμβαίνει στη ρύθμιση της EMT όσο και γιατί μέσω της συνάφειας με τα CSC μπορεί να εμποδίσει την επανεμφάνιση του όγκου. Προσφάτως αναπτύχθηκε το σύμπλοκο Co (III)-DNA, Co(III)-E-box, το οποίο επάγει την εκλεκτική αναστολή των zinc finger πρωτεϊνών^{222,223}. Άλλη μελέτη εστίασε στην αναστολή της σύνδεσης του SNAIL με το p53. Ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο, το p53 προάγει τον κυτταρικό θάνατο, αναστέλλει την ανάπτυξη και την μετάσταση ως απάντηση στο κυτταρικό stress όπως η ενεργοποίηση ογκογονιδίων, η βλάβη του DNA, η υποξία κλπ. Ωστόσο, το p53 είναι συχνά μεταλλαγμένο σε πολλούς καρκίνους²²⁴. Επομένως, η επανενεργοποίηση του p53 αποτελεί ελπιδοφόρα θεραπευτική στρατηγική. Έχει δειχθεί ότι το p53 καταστέλλεται από K-Ras-μεταλλαγμένα καρκινικά κύτταρα μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με το SNAIL²²⁵. Βασιζόμενοι σε αυτές τις παρατηρήσεις, αναπτύχθηκαν δύο ειδικοί αναστολείς (GN25 και GN29) της p53-Snail σύνδεσης με στόχο την επαγωγή της έκφρασης του p53. Αυτοί εμφανίζουν K-ras εξαρτώμενη δράση που σημαίνει ότι δεν έχουν κυτταροτοξική επίδραση στα φυσιολογικά ή στα K-ras wild type κύτταρα²²⁶. Οι θεραπευτικές δυνατότητες όμως δεν ολοκληρώνονται με τη στόχευση του καρκινικού κυττάρου. Μια σοβαρή πρόκληση είναι και η στόχευση του στρωματικού κυττάρου ή του κυττάρου του διηθητικού μετώπου ως μια αντιμεταστατική προσέγγιση. Πράγματι, οι πρόσφατες μελέτες έχουν αναδείξει το κυτταρικό στρώμα ως σημαντικό διαμεσολαβητή της αγγειογένεσης, της φλεγμονής, της ανοσοποίησης και της EMT δημιουργώντας έτσι την ιδέα της «στρωματικής θεραπευτικής» (stromal therapeutics)²²⁷.

Πολλά σημαντικά ερωτήματα θα πρέπει να απαντηθούν προτού μεταφέρουμε τα εργαστηρικά ευρήματα στην κλινική πράξη. Πρώτον, θα πρέπει να συσχετισθούν τα *in vitro* παρατηρούμενα φαινόμενα με τα *in vivo* δεδομένα και τη φυσική πορεία της νόσου ώστε να ταυτοποιηθούν και να κατανοηθούν οι μηχανισμοί που οδηγούν στο σχηματισμό μακρομεταστάσεων. Δεύτερον, δεν έχει ακόμη καθοριστεί επαρκώς πόσο γενικευμένη είναι η EMT/MET ακολουθία στη δημιουργία δευτεροπαθών εστιών ούτε αν υφίσταται με τον ίδιο τρόπο στους διαφορετικούς τύπους καρκίνου. Αν υπάρχουν όλοι αυτοί οι προβληματισμοί στους συμπαγείς όγκους γνωστής πρωτοπαθούς εστίας, πόσο πιο πολύπλοκο είναι να διευκρινιστούν οι ανάλογοι μηχανισμοί σε μια οντότητα με τόσο ιδιαίτερα βιολογικά χαρακτηριστικά όπως το ΚΑΠΕ. Η βασική θεραπευτική προσέγγιση των ασθενών με ΚΑΠΕ τα τελευταία 15 χρόνια ήταν η εμπειρική χημειοθεραπεία. Στις μέρες μας, η πρόοδος της ανοσοϊστοχημείας και η εμφάνιση των μελετών έκφρασης του γονιδιακού προφίλ (gene expression profiling), παρέχουν τα απαραίτητα διαγνωστικά μέσα για τον ακριβή προσδιορισμό του ιστού προέλευσης στην πλειονότητα των ασθενών. Πρόσφατες μελέτες έχουν πιστοποιήσει τη δυνατότητα των μοριακών συστοιχιών να συνδράμουν την βασική παθολογοανατομική διάγνωση και μία μεγάλη προοπτική μελέτη ανέδειξε το όφελος στην επιβίωση των ασθενών που έλαβαν θεραπεία με βάση το μοριακό προφίλ του όγκου σε σχέση με αυτούς που έλαβαν εμπειρική χημειοθεραπεία. Επομένως φαίνεται ότι η εποχή που όλοι οι ασθενείς λάμβαναν πανομοιότυπα σχήματα έχει έρθει στο τέλος της. Περαιτέρω μοριακές αναλύσεις θα συντελούσαν ακόμη περισσότερο στην παροχή μιας θεραπείας κατάλληλα προσαρμοσμένης στο γονιδιακό προφίλ του όγκου-και του ασθενούς²²⁸. Οι μελέτες με στοχευτικούς παράγοντες όμως σε ασθενείς με ΚΑΠΕ είναι δυστυχώς λιγοστές. Σε μία μελέτη, 60 ασθενείς με ΚΑΠΕ έλαβαν ως θεραπεία πρώτης γραμμής καρμποπλατίνα και παλκιταξέλη, με την προσθήκη ή όχι μπεβασιζουμάμπης και ερλοτινίμπης ως θεραπεία συντήρησης. 53% των ασθενών απάντησαν (RR) σε αυτή την αγωγή και η ολική επιβίωση (OS) άγγιξε τους 13 μήνες²²⁹. Σε μια άλλη μελέτη, 47 ασθενείς με ΚΑΠΕ έλαβαν μπεβασιζουμάμπη και ερλοτινίμπη ως θεραπεία δεύτερης γραμμής, με απάντηση μόνο 10% και ολική επιβίωση 7 μήνες²³⁰. Άλλες κλινικές μελέτες συνδυασμού ή μη των παραδοσιακών χημειοθεραπευτικών σχημάτων με στοχευτικούς παράγοντες όπως ο Everolimus (mTOR αναστολέας), το Belinostat (HDAC αναστολέας) ή η σετουξιμάμπη (Cetuximab-μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του EGFR) διεξάγονται ακόμη ενώ ο σχεδιασμός τους στηρίζεται κυρίως σε δεδομένα μελετών που διενεργήθηκαν σε ασθενείς με όγκους γνωστής πρωτοπαθούς εστίας.

Μελλοντικά, με την ταυτοποίηση του ρόλου της EMT/MET στο ΚΑΠΕ, επιπλέον μοριακοί παράγοντες θα μπορούσαν να διευρύνουν το θεραπευτικό μας φάσμα.

Συμπερασματικά, η διασπορά των καρκινικών κυττάρων από τον πρωτοπαθή όγκο σε δευτεροπαθείς εστίες αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα της εξέλιξης του καρκίνου, ο οποίος επιβαρύνει την φυσική πορεία της νόσου αναστέλοντας την αποτελεσματικότητα της θεραπείας και μειώνοντας την προσδοκώμενη επιβίωση. Πρόσφατα ξεκινήσαμε να αποκωδικοποιούμε τους μηχανισμούς αυτής της διασποράς και να αναγνωρίζουμε πιθανούς θεραπευτικούς στόχους που θα μπορούσαν να εμποδίσουν ή τουλάχιστον να περιορίσουν τη δημιουργία μεταστάσεων. Όσο διευκρινίζονται οι μηχανισμοί εξάπλωσης του επιθηλιακού καρκίνου, τόσο περισσότερες ομοιότητες εντοπίζονται μεταξύ των αναπτυξιακών και των διηθητικών μονοπατιών μεταγωγής σήματος. Αυτές οι ομοιότητες οδήγησαν στην υπόθεση ότι κατά την ογκογένεση ενεργοποιούνται με ανορθόδοξο τρόπο αναπτυξιακά μονοπάτια τα οποία, τελικά, συμβάλλουν στην εξέλιξη του όγκου. Η EMT είναι ένας μηχανισμός ζωτικής σημασίας κατά τη φυσιολογική ανάπτυξη. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι τα καρκινικά κύτταρα ενεργοποιούν εμβρυϊκά μονοπάτια ως έναν μηχανισμό προαγωγής της κινητικότητάς τους και της διηθητικής τους ικανότητας. Επομένως, κατά την EMT επανενεργοποιούνται αναπτυξιακά προγράμματα που προσδίδουν ογκογόνες ιδιότητες στα κύτταρα και συμβάλλουν στην εξέλιξη του καρκίνου. Αυτή η επανενεργοποίηση των εμβρυϊκών προγραμμάτων, τα οποία είναι δυνητικά μη λειτουργικά κατά την ενήλικη ζωή, προσφέρει την δυνατότητα να στοχευθούν εκλεκτικά συγκεκριμένα μονοπάτια μεταγωγής σήματος εντός των καρκινικών κυττάρων με όσο το δυνατόν λιγότερες παρενέργειες. Η έρευνά μας αποτελεί την πρώτη προσπάθεια να μελετηθεί η EMT σε μία νόσο-πρότυπο της μεταστατικής διασποράς όπως είναι το ΚΑΠΕ και είναι αυτή που όρισε την EMT ως αρνητικό προγνωστικό παράγοντα για την έκβαση των ασθενών. Επιπλέον, πρώτοι προσπαθήσαμε να συγκρίνουμε το miRNA προφίλ έκφρασης μεταξύ των EMT-θετικών και EMT-αρνητικών ασθενών με ΚΑΠΕ. Θεωρητικά, η αποκατάσταση της φυσιολογικής λειτουργίας της miR-200 οικογένειας μέσω miR-αναλόγων θα μπορούσε να «παγώσει» τη μεταστατική διαδικασία και να «σταθεροποιήσει» τον όγκο. Μελέτες σε μεγαλύτερο αριθμό και πιο ομογενή πληθυσμό ασθενών με ΚΑΠΕ θα πρέπει να διεξαχθούν ώστε να ξεπεραστούν οι μεθοδολογικές δυσκολίες και να συγκεντρωθούν περισσότερα δεδομένα για τους μοριακούς μηχανισμούς που διέπουν την EMT. Η επιβεβαίωση του ρυθμιστικού της

ρόλου στην εξέλιξη του καρκίνου και ο προσδιορισμός της ακριβούς δράσης της miR-200 οικογένειας έχουν ως απώτερο σκοπό την ανεύρεση νέων στοχευτικών θεραπευτικών σχημάτων. Κρίνοντας από τους ρυθμούς της διεξαγόμενης έρευνας προς αυτήν την κατεύθυνση, τα πειραματικά δεδομένα θα ενσωματωθούν στην κλινική πρακτική στο εγγύς μέλλον.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή. Η Επιθηλιακή Μεσεγγυματική Μετατροπή (EMT) αναφέρεται στις φαινοτυπικές αλλαγές που υφίσταται ένα επιθηλιακό κύτταρο οι οποίες το καθιστούν χαλαρό από επιθηλιακές συνδέσεις, ευκίνητο και επιθετικό. Η EMT έχει συσχετισθεί με αυξημένο στάδιο, επιθετικότητα, μεταστατικότητα και πτωχή πρόγνωση σε ασθενείς με συμπαγείς όγκους. Στόχος της συγκεκριμένης μελέτης είναι να αναδείξουμε την ενεργοποίηση της EMT σε ένα τύπο όγκων οι οποίοι είναι κατεξοχήν μεταστατικοί, στα καρκινώματα αγνώστου πρωτοπαθούς εστίας (ΚΑΠΕ), και να αποδείξουμε ότι η ύπαρξη του EMT φαινότυπου συσχετίζεται με αρνητική προγνωστική αξία για τον ασθενή. Επιπροσθέτως επιδιώξαμε να συγκρίνουμε την έκφραση μιας «βιβλιοθήκης» από 982 microRNAs (miR), σε EMT + έναντι EMT – όγκους ασθενών με ΚΑΠΕ ώστε να εξετάσουμε την συμβολή τους στον EMT φαινότυπο.

Μέθοδοι. Ιστικοί κύλινδροι 1.5mm από 100 ΚΑΠΕ φορτώθηκαν σε ιστικές μικροσυστοιχίες σε δύο αντίγραφα και μελετήθηκαν για ανοσοϊστοχημική έκφραση E-cadherin (ECADH- Zymed, dilution 1:30), N-Cadherin (NCADH-Zymed, dilution 1:30), Vimentin (VMN-Zymed, dilution 1:30), Snail (SNL-Abcam, dilution 1:10). Ο EMT φαινότυπος ορίστηκε ως απώλεια έκφρασης της E-cadherin, έκφραση οποιασδήποτε από τις N-cadherin, Vimentin και ταυτόχρονη έκφραση SNAIL, όπως υπολογίστηκε από το ποσοστό των χρωματισμένων κυττάρων. Πλήρη κλινικοπαθολογοανατομικά στοιχεία καταγράφηκαν ηλεκτρονικά για στατιστική ανάλυση. Στη συνέχεια, μελετήσαμε την έκφραση των 982 microRNAs σε 68 ΚΑΠΕ από τα οποία ελήφθη επαρκής ποσότητα RNA χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα miRview mets2, Rosetta Genomics και συγκρίναμε έκφραση σε EMT+ (N=5 με βάση το % των χρωματισμένων κυττάρων ή N=10 με βάση την ημιποσοτική μέθοδο του H-score) έναντι EMT- περιπτώσεων.

Αποτελέσματα. Ο υπό μελέτη πληθυσμός αποτελούνταν από 100 ασθενείς με ΚΑΠΕ (47 άνδρες, 53 γυναίκες) διάμεσης ηλικίας 65 χρόνων και με καλή φυσική κατάσταση (PS 0-1 σε 75%). Η ιστολογική διάγνωση ήταν αδenoκαρκίνωμα στο 60% των ασθενών, πλακώδες καρκίνωμα στο 22% και μη διαφοροποιημένο καρκίνωμα στο 17% με χαμηλό βαθμό διαφοροποίησης στο 50% των περιπτώσεων. Οι

κλινικοπαθολογοανατομικές υποομάδες ήταν 30% σπλαγγινικές μεταστάσεις, 8% λεμφαδενικές μεταστάσεις μασχάλης, περιτοναϊκή καρκινωμάτωση 22% και λεμφαδενική νόσος 40%. Η θεραπεία αποτελούνταν από παρηγορητική χημειοθεραπεία (σχήματα με βάση την πλατίνα στο 55%). Η διάμεση ελεύθερη νόσου επιβίωση(PFS) καθώς και η ολική επιβίωση (OS) ήταν 7 και 12 μήνες αντίστοιχα. Μέσω μελέτης κατανομών συχνοτήτων και φυσικών ορίων έκφρασης των ανοσοϊστοχημικών δεικτών, ο EMT φαινότυπος ορίστηκε ως απώλεια έκφρασης της E-cadherin (αρνητική, όταν εκφράζεται σε <60% των καρκινικών κυττάρων), έκφραση N-cadherin ή Vimentin (θετική, όταν εκφράζονται σε >40% των καρκινικών κυττάρων) και έκφραση Snail (θετική, όταν εκφράζεται σε >80% των καρκινικών κυττάρων). Τον ορισμό αυτό πληρούσαν 8 ασθενείς (8%) και ο EMT φαινότυπος αποδείχθηκε στατιστικά σημαντικός παράγοντας φτωχής επιβίωσης (EMT- διάμεση επιβίωση 13 μήνες σε σχέση με EMT+ διάμεση επιβίωση 8 μήνες, logrank $p=0.023$). Επιπλέον, η ύπαρξη EMT φαινότυπου έδειξε στατιστικώς σημαντική συσχέτιση με το άρρεν φύλο, τη χαμηλή διαφοροποίηση του όγκου και την εμφάνιση σπλαγγινικών μεταστάσεων ($p<0.05$). Άλλοι προγνωστικοί παράγοντες φτωχής επιβίωσης αναδείχθηκαν το άρρεν φύλο, η κακή φυσική κατάσταση κατά τη διάγνωση και η μη θεραπευτική αντιμετώπιση με βάση την πλατίνα ($p<0.05$).

Στο δεύτερο μέρος της μελέτης μας, ο υπό μελέτη πληθυσμός αποτελούνταν από 68 ασθενείς με ΚΑΠΕ. Σε αυτούς τους ασθενείς, τα EMT-κατασταλτικά miRNAs miR-141, miR203 και miR200a,b,c παρουσίασαν 2.45-3.64 φορές μειωμένη έκφραση σε EMT+ περιπτώσεις, χωρίς ωστόσο να επιτευχθεί στατιστική σημαντικότητα (False Discovery Rate, $FDR>0.1$). Η έκφραση του miR205 παρουσιάστηκε αυξημένη στις EMT + περιπτώσεις αλλά αυτή η διαφορά οφείλονταν στην παρουσία όγκων με πλακώδη ιστολογία. Επιπλέον, συγκρίθηκε η έκφραση 982 microRNA στα περιστατικά ανάλογα με την ανοσοϊστοχημική έκφραση κάθε μιας πρωτεΐνης εκ των E-cadherin, N-Cadherin, Vimentin, Snail. Αν και δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές είναι αξιοσημείωτο ότι τα miR 203, 200c και 205 που καταστέλλουν την έκφραση του EMT φαινότυπου είχαν αυξημένη έκφραση στους όγκους με χαμηλή έκφραση N-cadherin.

Συμπεράσματα. Ο EMT φαινότυπος δεν ανευρίσκεται συχνά σε έναν τόσο ετερογενή πληθυσμό όπως τα ΚΑΠΕ, ωστόσο επηρεάζει-στατιστικώς σημαντικά-αρνητικά την επιβίωση των ασθενών πιθανόν μέσω πρόωρης συστηματικής διασποράς και

αναπλασίας. Επιπλέον, η μελέτη έκφρασης 982 miRNAs σε EMT+ vs EMT- ΚΑΠΕ δημιουργεί ενδείξεις ότι τα miR141, miR203, miR200a,b,c καταστέλλουν τον EMT φαινότυπο και είναι αυξημένα στις EMT- περιπτώσεις. Αυτές οι ενδείξεις απαιτούν περαιτέρω επιβεβαίωση σε ένα μεγαλύτερο αριθμό ασθενών με απώτερο σκοπό τη θεραπευτική τους στόχευση.

SUMMARY IN ENGLISH

CUP is a model disease for early dissemination of the primary tumour to distant sites. The metastatic spread occurs early during the disease course before the primary reaches a detectable size, produces a high tumour burden and is related to resistance to antineoplastic therapies. Consequently, we considered it biologically relevant and appropriate to investigate the incidence, correlations and prognostic utility in CUP of one of the pivotal phenomena implicated in metastatic dissemination, the EMT. EMT occurs during embryonic morphogenesis in multicellular organisms, in which embryonic mesenchymal cells are formed and become motile following the loss of epithelial cell polarity. In recent years, EMT has also been recognised as a potential mechanism for cancer progression. During progression to metastatic competence, carcinoma cells acquire altered adhesive properties, activate proteolysis and motility programmes, metastasize and establish deposits at distant sites.

A central event in EMT is the down-regulation of E-cadherin that leads to the loss of cell–cell contact and the consecutive progression of cells towards a mesenchymal-like phenotype with up-regulation of N-cadherin and vimentin. The transcription factor SNAIL is a major suppressor of E-cadherin and a strong inducer of EMT. SNAIL has been shown to down-regulate E-cadherin in cell cultures, transfection and knock-out experiments in transgenic mice and in different types of human tumours, e.g. hepatocellular carcinomas, carcinoma from the esophagus, cardia and stomach, and colorectal carcinomas. Expression of SNAIL in epithelial tumours increases their aggressiveness, as seen in experimentally induced breast tumours. Moreover, high SNAIL expression correlated with an increased risk of tumour relapse and poor survival rates in human breast and gastric cancer. Recently, EMT has been linked to the acquisition of a stem cell-like phenotype as seminal *in vitro* experiments showed that epithelial cells induced to undergo EMT become spindle shaped, evade apoptosis and anoikis-related death, express a battery of stemness markers and have the ability to create colonies and mammospheres that re-acquire the cellular heterogeneity of the initial tumour from which they were harvested.

Our retrospective analysis of 100 patients with CUP used IHC staining of TMAs, examining two cores for each patient for specific EMT biomarkers in order to minimize the impact of random sampling from tumour areas with unique characteristics. The combination of E-cadherin, N-cadherin, vimentin and SNAIL was selected in order to define a more complex but also more secure definition of the EMT phenotype, whereas OCT4 was selected in order to explore its relation to stem-like features.

The EMT phenotype was defined as partial loss of E-cadherin expression with simultaneous expression of N-cadherin/vimentin along with concomitant expression of SNAIL, as assessed by the percentage of staining tumour cells. Since there is no validated scoring system for interpreting IHC staining for the biomolecules under study, and given the fact that there is no previous experience with these in CUP, IHC cut-off values were defined prospectively, based on distributional analyses in frequency histograms. In particular, IHC staining evaluation was based on the following cut-offs: partial loss of E-cadherin expression when staining was seen in <60% of tumour cells; positive cases for N-cadherin and vimentin expression were those tumours in which staining was seen in $\geq 40\%$ of tumour cells; positive by SNAIL expression was established when staining was seen in $\geq 80\%$ of tumour cells; while positive cases for OCT4 were those with staining in at least 1% of tumour cells. For NOTCH protein expression, IHC staining was considered to be positive based on the following cut-offs: NOTCH1 staining in $\geq 5\%$ of tumour cells, NOTCH2 $>20\%$, NOTCH3 $>80\%$. In view of the lack of data on the optimal way to assess IHC expression of EMT markers, we sought to explore a semi-quantitative method of IHC biomolecule staining, previously used in other studies. In addition to counting the percentage of staining cells, we also evaluated the staining intensity and derived the H-score. We prospectively selected one cut-off value only for each biomarker based on distributional and ROC analyses and taking into account the relevant literature rather than perform multiple, exploratory analyses using multiple cut-offs. Moreover, when possible we analysed correlations of biomolecules by examining them as continuous variables rather than as categorical ones. An EMT phenotype was seen in 8 cases (8.1%) and was strongly associated with poor OS (median OS EMT⁻ =13 months vs. median OS EMT⁺ = 8 months, $p=0.023$). When we used staining intensity (H-Score), an EMT phenotype was observed for 16 patients and carried borderline adverse prognostic utility for outcome (median OS 9 vs. 14 months, $p=0.07$). The presence of EMT phenotype correlated significantly with male

gender, high grade and presence of visceral metastases (χ^2 $p < 0.05$), while EMT mediator expression was correlated to high NOTCH 2/3 expression. Other factors prognostic for poor survival were male gender, PS \geq 2, non-platinum therapy (χ^2 $p < 0.05$). However, despite these robust differences in survival according to EMT status, it is indisputable that the EMT phenotype is quite rare in our group of patients, with an incidence of only 8% based on staining cell percentage and 16% based on the H-Score. Amongst hypotheses that could interpret this finding, we could cite protein degradation in the tumour block by inadequate fixation, problematic antigen retrieval or even protein staining underestimation in old archival material derived from biopsied metastases. Another factor limiting the EMT rate may be that TMAs were obtained from the centre of the tumour in contrast to recent studies suggesting that EMT processes take place at the periphery of the tumour, the invasive front. Finally, the complexity of the signalling networks that regulate the induction of EMT and the reversibility of the acquired mesenchymal phenotype also pose significant challenges.

To take one step further, among the aforementioned 100 CUP Patients, in 68 CUP cases immunohistochemically characterised as EMT-positive (n=5 by % of cells or n=10 by a semiquantitative H-score) or EMT-negative, we studied the global expression profile of 982 microRNAs by means of microarray technology. We aimed to screen for miRNA differentially expressed by EMT status in order to study their role in the regulation of the EMT phenotype in cancer of unknown primary.

MicroRNAs (miRNA) are an extensive class of 18-24 nucleotide-long, highly conserved non-coding RNA molecules that post-transcriptionally regulate key biological processes, including differentiation and development, cellular proliferation and metabolism. Therefore, miRNA expression has been associated with both oncogenic and tumour suppressive activity and in addition, miRNAs were discovered to possess regulatory pro- and anti-metastatic effects. Recent studies have shown that the members of the miR-200 family (miR-200a,b,c miR-141 and miR-429) and miR-205 are essential regulators of the epithelial character of cells, in a wide array of cell types and tissues including adipocytes, pancreatic cells, hepatocytes and olfactory neurons. The miR-200 family regulates the epithelial character of cells through the targeted silencing of the zinc finger E box-binding homeobox (ZEB) family of transcriptional factors ZEB1 and ZEB2 which repress the transcription of genes containing E-box elements in their promoters, including E-cadherin. In addition to the

miR-200 family, miR-205 has been shown to target ZEB1 and ZEB2 through their 3' untranslated regions. Even though our results were not statistically significant, we showed a tendency of the EMT-repressor miRNAs of the miR-200 family and miR-203 to be downregulated in the EMT positive cases both when the EMT phenotype definition is based on the percentage of staining cells (2.45-3.64-fold lower expression level) and on the H-score (1.26-2.09-fold lower expression levels). Furthermore, the fact that the EMT-suppressor miRNAs were upregulated in the N-cadherin-low tumours suggests that the observed trend was probably not due to chance. In our data, miR-205 showed a trend of upregulation in EMT positive cases, which was not statistically significant. High miR-205 expression is seen in squamous tissues, the tissue specificity of miRNAs being a well-studied phenomenon. We believe that the increased expression of miR-205 in EMT-positive cases could be explained by the preponderance of squamous histology in this group, as it did not persist when we excluded squamous CUP from the analysis by EMT status.

To conclude, our work is the first to examine EMT in a model disease for metastatic dissemination such as CUP and established EMT as having an adverse prognostic significance for patient outcome. Furthermore, a global miR expression profiling in EMT-positive vs EMT-negative CUP cases is innovative. Studies of larger and more homogeneous populations of patients with CUP are warranted in order to accumulate more data on the molecular mechanisms underlying EMT, solve methodological issues, confirm the importance of this process in cancer and examine the potential regulatory role of the miR-200 family members in EMT, as well as their candidacy as therapeutic targets.

ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

1. “Epithelial-mesenchymal transition in Cancer of Unknown Primary”.
A.Stoyianni, A. Goussia, G. Pentheroudakis, V. Siozopoulou, A. Cervantes, M. Bobos, S. Bellou, T.Fotsis, V. Malamou-Mitsi, N. Pavlidis. *Clinical Trial and Applied Research in Oncology Group (CARING), University of Ioannina, Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG) Athens, Greece, Incliva University of Valencia, Spain.* (ECCO/ESMO Congress Stocholm October 2011, Abstract no. 1132 - Poster).
2. «Επιθηλιακή προς Μεσεγγυματική μετατροπή σε Καρκινώματα Αγνώστου Πρωτοπαθούς Εστίας και μελέτη έκφρασης 733 microRNAs». **Στογιάννη Αικατερίνη**, Γούσια Άννα, Spector Yael, Aharonov Ranit, Σιωζοπούλου Βασιλική, Μαλάμου-Μήτση Βασιλική, Πενθερουδάκης Γεώργιος, Παυλίδης Νικόλαος. *Τμήμα Παθολογικής Ογκολογίας, Ιατρική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, ΠΠΓΝΙ, Τμήμα Παθολογικής Ανατομίας, Ιατρική Σχολή Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, ΠΠΓΝΙ, Rosetta Genomics, RnD Laboratory, Rehovot, Israel.* (19^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Κλινικής Ογκολογίας , Απρίλιος 2013, Αθήνα - υπό μορφή προφορικής ανακοίνωσης).

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

1. [Immunohistochemical study of the epithelial-mesenchymal transition phenotype in cancer of unknown primary: incidence, correlations and prognostic utility.](#)

Anticancer Res. 2012 Apr;32(4):1273-81.PMID:22493359

Aikaterini Stoyianni^{1,6}, Anna Goussia³, George Pentheroudakis^{1,2}, Vassiliki Siozopoulou³, Elli Ioachim⁷, Dimitrios Krikelis^{1,8}, Vassilios Golfopoulos¹, Andres Cervantes⁵, Mattheos Bobos⁴, Theodoros Fotsis⁶, Sofia Bellou⁶, Georgios Fountzilas^{2,8}, Vassiliki Malamou-Mitsi³ and Nicholas Pavlidis^{1,2}.

¹Department of Medical Oncology, Medical School, University of Ioannina, Greece;

²Hellenic Cooperative Oncology Group, Athens, Greece;

³Department of Pathology, Medical School, University of Ioannina, Greece;

⁴Department of Pathology, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki, Greece;

⁵Department of Medical Oncology, Institute of Health Research Hospital Clinic of Valencia (INCLIVA), University of Valencia, Valencia, Spain;

⁶Institute of Biomedical Research, FORTH-BRI, Ioannina, Greece;

⁷Department of Pathology, Xatzikosta General Hospital, Ioannina, Greece;

⁸Department of Medical Oncology, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki, Papageorgiou Hospital, Thessaloniki, Greece

Abstract

Background: The epithelial to mesenchymal transition (EMT) has been associated with metastatic dissemination and poor outcome in several solid tumour types. Our aim was to study its incidence and prognostic significance in cancer of unknown primary (CUP).

Patients and Methods: One hundred tumours of CUP were loaded in tissue microarrays and studied for immunohistochemical (IHC) expression of E-cadherin, N-cadherin, vimentin, the EMT transcription factor (SNAIL) and the stem cell marker octamer-binding transcription marker 4(OCT4). An EMT phenotype was defined as low expression of E-cadherin, expression of N-cadherin with/without vimentin with concomitant expression of SNAIL, as assessed by percentage of staining tumour cells.

Results: Among 100 CUP cases, the histological diagnosis was adenocarcinoma in 55, squamous carcinoma in 20 and undifferentiated carcinoma in 15, with a high grade seen in 46. Therapy consisted of palliative chemotherapy, mostly platinum based. The median progression-free survival and overall survival (OS) were 7 and 12 months respectively. Distributional studies resulted in selection of IHC cut-offs for E-cadherin (negative when expression in <60% of tumour cells), N-cadherin, vimentin (positive when expression in $\geq 40\%$ of tumour cells), SNAIL (positive when staining in $\geq 80\%$ of tumour cells). An EMT phenotype was seen in 8 cases (8.1%) and was strongly associated with poor OS (median OS EMT⁻ = 13 months vs. median OS EMT⁺ = 8 months, $p=0.023$). When we used staining intensity (H-Score), an EMT phenotype was observed for 16 patients and carried borderline adverse prognostic utility for outcome (median OS 9 vs. 14 months, $p=0.07$). The presence of EMT phenotype correlated significantly with male gender, high grade and presence of visceral metastases ($\chi^2 p<0.05$), while EMT mediator expression was correlated to high NOTCH 2/3 expression. Other factors prognostic for poor survival were male gender, PS ≥ 2 , non-platinum therapy ($\chi^2 p<0.05$).

Conclusions: EMT is infrequently seen in tumours of CUP. However, an adverse prognostic significance for patient outcome has been identified and may warrant studies of therapeutic targeting.

2. [Insights into the epithelial mesenchymal transition phenotype in cancer of unknown primary from a global microRNA profiling study.](#)

Clin Transl Oncol. 2013 Nov 27. PMID:24282096

Aikaterini Stoyianni¹, George Pentheroudakis¹, Hila Benjamin², Andres Cervantes³, Karin Ashkenazi², George Lazaridis⁴, Nicholas Pavlidis¹, Yael Spector²

¹ Department of Medical Oncology, Medical School, University of Ioannina, Greece

²Rosetta Genomics, Rehovot, Israel

³ Department of Hematology and Medical Oncology, Institute of Health Research INCLIVA, Hospital Clínico Universitario, University of Valencia, Spain, email:andres.cervantes@uv.es

⁴ Department of Medical Oncology, “Papageorgiou” Hospital, School of Medicine, Aristotle University, Thessaloniki, Greece

Abstract

Purpose. We sought to study the micro-RNA regulation of Epithelial Mesenchymal Transition (EMT), the acquisition of migratory, mesenchymal-like properties of epithelial cells, in Cancer of Unknown Primary (CUP).

Patients and Methods. We studied the global expression profile of 982 microRNAs by means of microarray technology in 68 CUP cases immunohistochemically characterised as EMT-positive (n=5 by % of cells or n=10 by a semiquantitative H-score) or EMT-negative.

Results. EMT-suppressive miRNAs such as miR-203 and members of the miR-200 family (miR-200a,b,c and miR-141) presented a 2.45 to 3.64-fold lower expression level in the EMT-positive cases without, however, reaching statistical significance. MiR-205, a squamous tissue-specific marker, was very variable in the data set. Excluding CUP cases with squamous cell histology, miR-205, miR-203 and the miR-200 family exhibited a trend of downregulation in EMT-positive cases. A similar pattern of miRNA expression was detected when the

comparison took place between EMT-positive vs EMT-negative cases according to the H-score, with non-significant downregulation of the EMT-suppressive miR-203 and miR-200 family in EMT-positive cases, with 1.26-2.09-fold lower expression levels. Moreover, miR-203, miR-205 and miR-200c were numerically downregulated in those tumours with high expression of the EMT marker N-cadherin.

Conclusions. The EMT-suppressive miR-203 and miR-200 family were consistently but non-significantly downregulated in CUP with the EMT phenotype. A larger study is warranted in order to further explore the role of microRNAs in CUP and to examine their potential for therapeutic restoration.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ Pavlidis N, Briasoulis E, Hainsworth J, Greco FA. Diagnostic and therapeutic management of cancer of an unknown primary. *Eur J Cancer*. 2003 Sep;39(14):1990-2005.
- ² Jordan WE 3rd, Shildt RA. Adenocarcinoma of unknown primary site. The Brooke Army Medical Center experience. *Cancer*. 1985 Feb 15;55(4):857-60.
- ³ Califano J, Westra WH, Koch W, Meiningner G, Reed A, Yip L, Boyle JO, Lonardo F, Sidransky D. Unknown primary head and neck squamous cell carcinoma: molecular identification of the site of origin. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Apr 7;91(7):599-604.
- ⁴ Holmes FF, Fouts TL. Metastatic cancer of unknown primary site. *Cancer*. 1970 Oct;26(4):816-20.
- ⁵ Frost P, Raber MN, Abbruzzese JL. Unknown Primary tumors as a unique clinical and biological entity: a hypothesis. *Cancer Bull* 1989; 41:139-14.
- ⁶ Abbruzzese JL, Abbruzzese MC, Lenzi R, Hess KR, Raber MN. Analysis of a diagnostic strategy for patients with suspected tumors of unknown origin. *J Clin Oncol*. 1995 Aug;13(8):2094-103.
- ⁷ Levi F, Te VC, Erler G, Randimbison L, La Vecchia C. Epidemiology of unknown primary tumours. *Eur J Cancer*. 2002 Sep;38(13):1810-2.
- ⁸ Muir C. Cancer of unknown primary site. *Cancer*. 1995 Jan 1;75(1 Suppl):353-6.
- ⁹ Coates M, Armstrong B. NSW Central Cancer Registry. *Cancer in New South Wales. Incidence and Mortality*. NSW Cancer Council, 1995
- ¹⁰ Visser O, Coebergh JWW, Schouten LJ. *Incidence of Cancer in the Netherlands 1993*. Utrecht, The Netherlands cancer Registry, 1993
- ¹¹ Gatta G, Mallone S, van der Zwan JM, Trama A, Siesling S, Capocaccia R; EURO CARE Working Group. Cancer prevalence estimates in Europe at the beginning of 2000. *Ann Oncol*. 2013 Jun;24(6):1660-6. doi: 10.1093/annonc/mdt030. Epub 2013 Apr 3.

-
- ¹² Greco FA, Hainsworth JD. Cancer of unknown primary site. In DeVita TV, Hellman S, Rosenberg SA, eds *Cancer: Principles and Practice of Oncology* 4th edn. Philadelphia, J.B. Lippincott Co, 1997; 2423-2443.
- ¹³ Nystrom JS, Weiner JM, Heffelfinger-Juttner J, Irwin LE, Bateman JR, Wolf RM. Metastatic and histologic presentations in unknown primary cancer. *Semin Oncol.* 1977 Mar;4(1):53-8.
- ¹⁴ Briasoulis E, Pavlidis N. Cancer of Unknown Primary Origin. *Oncologist.* 1997;2(3):142-152
- ¹⁵ Abbruzzese JL, Abbruzzese MC, Hess KR, Raber MN, Lenzi R, Frost P. Unknown primary carcinoma: natural history and prognostic factors in 657 consecutive patients. *J Clin Oncol.* 1994 Jun;12(6):1272-80.
- ¹⁶ Ayoub JP, Hess KR, Abbruzzese MC, Lenzi R, Raber MN, Abbruzzese JL. Unknown primary tumors metastatic to liver. *J Clin Oncol.* 1998 Jun;16(6):2105-12.
- ¹⁷ Lazaridis G, Pentheroudakis G, Fountzilas G, Pavlidis N. Liver metastases from cancer of unknown primary (CUPL): a retrospective analysis of presentation, management and prognosis in 49 patients and systematic review of the literature. *Cancer Treat Rev.* 2008 Dec;34(8):693-700.
- ¹⁸ Richardson RL, Greco FA, Wolff S, et al. Extragonadal germ cell malignancy: value of tumor markers in metastatic carcinoma in young men. *Proc Am Soc Clin Oncol* 1979;20:204.
- ¹⁹ Richardson RL, Schoumacher RA, Fer MF, Hande KR, Forbes JT, Oldham RK, Greco FA. The unrecognized extragonadal germ cell cancer syndrome. *Ann Intern Med.* 1981 Feb;94(2):181-6.
- ²⁰ Pentheroudakis G, Stoyianni A, Pavlidis N. Cancer of unknown primary patients with midline nodal distribution: midway between poor and favourable prognosis? *Cancer Treat Rev.* 2011 Apr;37(2):120-6.
- ²¹ Ellerbroek N, Holmes F, Singletary E, Evans H, Oswald M, McNeese M. Treatment of patients with isolated axillary nodal metastases from an occult primary carcinoma consistent with breast origin. *Cancer* 1990;66:1461-1467.
- ²² Foroudi F, Tiver KW. Occult breast carcinoma presenting as axillary metastases. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:143-147.
- ²³ Vlastos G, Jean ME, Mizza AN, Mirza NQ, Kuerer HM, Ames FC, Hunt KK, Ross MI, Buchholz TA, Buzdar AU, Singletary SE. Feasibility of breast presentation

in the treatment of occult primary carcinoma presenting with axillary metastases. *Ann Surg Oncol* 2001;8:425–431.

²⁴ Jackson B, Scott-Conner C, Moulder J. Axillary metastases from occult breast carcinoma: diagnosis and management. *Am Surg* 1995;61:431–434.

²⁵ Pentheroudakis G, Lazaridis G, Pavlidis N. Axillary nodal metastases from carcinoma of unknown primary (CUPAx): a systematic review of published evidence. *Breast Cancer Res Treat.* 2010 Jan;119(1):1-11.

²⁶ Grau C, Johansen LV, Jakobsen J, Geertsen P, Andersen E, Jensen BB. Cervical lymph node metastases from unknown primary tumours. Results from a national survey by the Danish Society for Head and Neck Oncology. *Radiother Oncol* 2000; 55:121–129.

²⁷ Nieder C, Gregoire V, Ang KK. Cervical lymph node metastases from occult squamous cell carcinoma: cut down a tree to get an apple? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50:727–733.

²⁸ Guarischi A, Keane TJ, Elhakim T. Metastatic inguinal nodes from an unknown primary neoplasm. A review of 56 cases. *Cancer* 1987;19:572–577.

²⁹ Casciato DA, Tabbarah HJ. Metastases on unknown origin. In Haskell CM, ed. *Cancer Treatment*, 3rd edn. Philadelphia, WB Saunders, 1990;798–814.

³⁰ Chen KT, Flam MS. Peritoneal papillary serous carcinoma with long-term survival. *Cancer* 1986;58:1371–1373.

³¹ Pentheroudakis G, Pavlidis N. Serous papillary peritoneal carcinoma: unknown primary tumour, ovarian cancer counterpart or a distinct entity? A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2010 Jul;75(1):27-42.

³² Chu DZ, Lang NP, Thompson C, Osteen PK, Westbrook KC. Peritoneal carcinomatosis in nongynecologic malignancy. *Cancer* 1989;63:364–367.

³³ Tell DT, Khoury JM, Taylor HG, Veasey SP. Atypical metastasis from prostate cancer: clinical utility of the immunoperoxidase technique for prostate specific antigen. *JAMA* 1985;253:3574–3579.

³⁴ Nguyen LN, Maor MH, Oswald MJ. Brain metastases as the only manifestation of an undetected primary tumor. *Cancer* 1998;83:2181–2184.

³⁵ Wen PY, Loeffler JS. Management of brain metastases. *Oncology* 1999;13:941–954.

³⁶ Spigel DR, Hainsworth JD, Greco FA. Neuroendocrine carcinoma of unknown primary site. *Semin Oncol.* 2009 Feb;36(1):52-9.

³⁷ Stoyianni A, Pentheroudakis G, Pavlidis N. Neuroendocrine carcinoma of unknown primary: a systematic review of the literature and a comparative study with other neuroendocrine tumors. *Cancer Treat Rev.* 2011 Aug;37(5):358-65

-
- ³⁸ Egberts F, Bergner I, Krüger S, Haag J, Behrens HM, Hauschild A, Röcken C. Metastatic melanoma of unknown primary resembles the genotype of cutaneous melanomas. *Ann Oncol*. 2014 Jan;25(1):246-50.
- ³⁹ Pavlidis N, Fizazi K. Carcinoma of unknown primary (CUP). *Crit Rev Oncol Hematol*. 2009 Mar;69(3):271-8.
- ⁴⁰ Fizazi K, Greco FA, Pavlidis N, Pentheroudakis G; ESMO Guidelines Working Group. Cancers of unknown primary site: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2011 Sep;22 Suppl 6:vi64-8.
- ⁴¹ Karsell PR, Sheedy PF 2nd, O'Connell MJ. Computed tomography in search of cancer of unknown origin. *JAMA*. 1982 Jul 16;248(3):340-3.
- ⁴² Culine S, Kramar A, Saghatchian M, Bugat R, Lesimple T, Lortholary A, Merrouche Y, Laplanche A, Fizazi K; French Study Group on Carcinomas of Unknown Primary. Development and validation of a prognostic model to predict the length of survival in patients with carcinomas of an unknown primary site. *J Clin Oncol*. 2002 Dec 15;20(24):4679-83.
- ⁴³ Pavlidis N, Pentheroudakis G, Plataniotis G. Cervical lymph node metastases of squamous cell carcinoma from an unknown primary site: a favourable prognosis subset of patients with CUP. *Clin Transl Oncol*. 2009 Jun;11(6):340-8.
- ⁴⁴ Pentheroudakis G, Greco FA, Pavlidis N. Molecular assignment of tissue of origin in cancer of unknown primary may not predict response to therapy or outcome: a systematic literature review. *Cancer Treat Rev*. 2009 May;35(3):221-7.
- ⁴⁵ Pavlidis N. Forty years experience of treating cancer of unknown primary. *Acta Oncol*. 2007;46(5):592-601.
- ⁴⁶ Golfopoulos V, Pentheroudakis G, Salanti G, Nearchou AD, Ioannidis JP, Pavlidis N. Comparative survival with diverse chemotherapy regimens for cancer of unknown primary site: multiple-treatments meta-analysis. *Cancer Treat Rev*. 2009 Nov;35(7):570-3.
- ⁴⁷ Massard C, Voigt JJ, Laplanche A, Culine S, Lortholary A, Bugat R, Theodore C, Priou F, Kaminsky MC, Lesimple T, Pivot X, Coudert B, Douillard JY, Merrouche Y, Fizazi K. Carcinoma of an unknown primary: are EGF receptor, Her-2/neu, and c-Kit tyrosine kinases potential targets for therapy? *Br J Cancer*. 2007 Oct 8;97(7):857-61.
- ⁴⁸ Varadhachary GR, Raber MN, Matamoros A, Abbruzzese JL. Carcinoma of unknown primary with a colon-cancer profile-changing paradigm and emerging definitions. *Lancet Oncol*. 2008 Jun;9(6):596-9.

-
- ⁴⁹ Greco FA, Spigel DR, Yardley DA, Erlander MG, Ma XJ, Hainsworth JD. Molecular profiling in unknown primary cancer: accuracy of tissue of origin prediction. *Oncologist*. 2010;15(5):500-6.
- ⁵⁰ Greco FA, Erlander MG. Molecular classification of cancers of unknown primary site. *Mol Diagn Ther*. 2009 Dec 1;13(6):367-73.
- ⁵¹ Jallepalli PV, Lengauer C. Chromosome segregation and cancer: Cutting through the mystery. *Nat Rev Cancer* 2001;1:109–117.
- ⁵² Bell CW, Pathak S, Frost P. Unknown primary tumors: establishment of cell lines, identification of chromosomal abnormalities, and implications for a second type of tumor progression. *Cancer Res* 1989;49:4311–5.
- ⁵³ Abbruzzese JL, Lenzi R, Raber MN, Pathak S, Frost P. The biology of unknown primary tumors. *Semin Oncol* 1993;20:238–43.
- ⁵⁴ Wessendorf S, Fritz B, Wrobel G, Nessling M, Lampel S, Göttel D, Kuepper M, Joos S, Hopman T, Kokocinski F, Döhner H, Bentz M, Schwäenen C, Lichter P. Automated screening for genomic imbalances using matrix-based comparative genomic hybridization. *Lab Invest* 2002;82:47–60.
- ⁵⁵ Pavlidis N, Briasoulis E, Bai M, Fountzilas G, Agnantis N. Overexpression of C-myc, Ras and C-erbB-2 oncoproteins in carcinoma of unknown primary origin. *Anticancer Res* 1995;15:2563–2567.
- ⁵⁶ Hainsworth JD, Lenington WJ, Greco FA. Overexpression of Her-2 in patients with poorly differentiated carcinoma or poorly differentiated adenocarcinoma of unknown primary site. *J Clin Oncol* 2000;18:632–635.
- ⁵⁷ Fizazi K, Voigt JJ, Lesimple T. Carcinoma of unknown primary (CUP): Are the tyrosine kinase receptors HER-2, EGF-R, and c-Kit suitable targets for therapy? *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003;22:3549.
- ⁵⁸ Rashid A, Hess KR, Lenzi R. Overexpression and prevalence of molecular markers in patients with cancer of unknown primary (CUP). *Proc Am Soc Clin Oncol* 2005;24:968.
- ⁵⁹ Baselga J, Arteaga CL. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J Clin Oncol* 2005;23:2445–2459.
- ⁶⁰ Dova L, Georgiou I, Vartholomatos G et al. EGFR and C-KIT/CD117 gene mutational screening and oncoprotein expression in patients with cancer of unknown primary: Implications for molecular pathophysiology and therapy. *Eur J Cancer* 2005;41:424.
- ⁶¹ Debiec-Rychter M, Dumez H, Judson I, Wasag B, Verweij J, Brown M, Dimitrijevic S, Sciot R, Stul M, Vranck H, Scurr M, Hagemeyer A, van Glabbeke M, van Oosterom AT; EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. Use of c-KIT/PDGFRα mutational

analysis to predict the clinical response to imatinib in patients with advanced gastrointestinal stromal tumours entered on phase I and II studies of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer* 2004; 40:689–695.

⁶² Briasoulis E, Tsokos M, Fountzilas G, Bafaloukos D, Kosmidis P, Samantas E, Skarlos D, Nicolaides C, Pavlidis N. Bcl2 and p53 protein expression in metastatic carcinoma of unknown primary origin: Biological and clinical implications. A Hellenic Cooperative Oncology Group study. *Anticancer Res* 1998;18:1907–1914.

⁶³ Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49–53.

⁶⁴ Bar-Eli M, Abbruzzese JL, Lee-Jackson D, Frost P. p53 gene mutation spectrum in human unknown primary tumors. *Anticancer Res* 1993;13:1619–1623.

⁶⁵ Vousden KH, Woude GF. The ins and outs of p53. *Nat Cell Biol* 2000;2: E178–E180.

⁶⁶ Yoshida BA, Sokoloff MM, Welch DR, Rinker-Schaeffer CW. Metastasis-suppressor genes: A review and perspective on an emerging field. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1717–1730.

⁶⁷ Navenot JM, Wang Z, Chopin M, Fujii N, Peiper SC. Kisspeptin-10-induced signaling of GPR54 negatively regulates chemotactic responses mediated by CXCR4: A potential mechanism for the metastasis suppressor activity of kisspeptins. *Cancer Res* 2005;65:10450–10456.

⁶⁸ Dova L, Golfinopoulos V, Pentheroudakis G, Georgiou I, Pavlidis N. The metastatic potential of cancer of unknown primary is independent of the KiSS-1 metastasis suppressor gene: A study of 50 patients. *Forum of Clinical Oncology* 2006; 1:Abstract EA23.

⁶⁹ Naresh KN. Do metastatic tumours from an unknown primary reflect angiogenic incompetence of the tumour at the primary site?—a hypothesis. *Med Hypotheses* 2002;59:357–360.

⁷⁰ Van de Wouw AJ, Jansen RL, Griffioen AW, Hillen HF. Clinical and immunohistochemical analysis of patients with unknown primary tumour. A search for prognostic factors in UPT. *Anticancer Res* 2004;24:297–301.

⁷¹ Karavasilis V, Malamou-Mitsi V, Briasoulis E, Tsanou E, Kitsou E, Kalofonos H, Fountzilas G, Fotsis T, Pavlidis N. Angiogenesis in cancer of unknown primary: Clinicopathological study of CD34, VEGF and TSP-1. *BMC Cancer* 2005;5:25–32.

⁷² Karavasilis V, Malamou-Mitsi V, Briasoulis E, Tsanou E, Kitsou E, Kalofonos H, Fountzilas G, Fotsis T, Pavlidis N. Matrix metalloproteinases in carcinoma of unknown primary. *Cancer* 2005;104:2282–2287.

-
- ⁷³ Dennis JL, Vass JK, Wit EC, Keith WN, Oien KA. Identification from public data of molecular markers of adenocarcinoma characteristic of the site of origin. *Cancer Res* 2002;62:5999–6005.
- ⁷⁴ Su AI, Welsh JB, Sapinoso LM, Kern SG, Dimitrov P, Lapp H, Schultz PG, Powell SM, Moskaluk CA, Frierson HF Jr, Hampton GM. Molecular classification of human carcinomas by use of gene expression signatures. *Cancer Res* 2001;61:7388–7393.
- ⁷⁵ Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, Mukherjee S, Yeang CH, Angelo M, Ladd C, Reich M, Latulippe E, Mesirov JP, Poggio T, Gerald W, Loda M, Lander ES, Golub TR. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:15149–15154.
- ⁷⁶ Tothill RW, Kowalczyk A, Rischin D, Bousioutas A, Haviv I, van Laar RK, Waring PM, Zalberg J, Ward R, Biankin AV, Sutherland RL, Henshall SM, Fong K, Pollack JR, Bowtell DD, Holloway AJ. An expression-based site of origin diagnostic method designed for clinical application to cancer of unknown origin. *Cancer Res* 2005;65:4031–4040.
- ⁷⁷ Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* 2005;233(3):706–20.
- ⁷⁸ Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer* 2009;9(4):265–73.
- ⁷⁹ Jechlinger M, Grunert S, Tamir IH, Janda E, Lüdemann S, Waerner T, Seither P, Weith A, Beug H, Kraut N. Expression profiling of epithelial plasticity in tumor progression. *Oncogene* 2003;22:7155–69.
- ⁸⁰ Smit M, Peeper DS. Epithelial-mesenchymal transition and senescence: two cancer-related processes are crossing paths. *Aging (Albany NY)* 2010;2(10):735–41.
- ⁸¹ Gregory P, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ. Micro RNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle* 2008;7(20):3112–8.
- ⁸² Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA. The Epithelial-Mesenchymal Transition Generates Cells with Properties of Stem Cells. *Cell* 2008;133(4):704–15.
- ⁸³ Ciruna B, Rossant J. FGF signaling regulates mesoderm cell fate specification and morphogenetic movement in the primitive streak. *Dev Cell* 2005;8(2):179–92.
- ⁸⁴ Lehmann K, Janda E, Pierreux CE, Rytömaa M, Schulze A, McMahon M, Hill CS, Beug H, Downward J. Raf induces TGF- β production while blocking its apoptotic but not invasive responses: a mechanism leading to increased malignancy in epithelial cells. *Genes Dev* 2000;14:2610–22.

-
- ⁸⁵ Oft M, Peli J, Rudaz C, Schwarz H, Beug H, Reichmann E. TGF- β 1 and Ha-Ras collaborate modulating the phenotypic plasticity and invasiveness of epithelial tumour cells. *Genes Dev* 1996;10:2462-77.
- ⁸⁶ Cui W, Fowlis DJ, Bryson S, Duffie E, Ireland H, Balmain A, Akhurst RJ. TGF- β 1 inhibits the formation of benign skin tumors but enhances progression to invasive spindle cell carcinomas in transgenic mice. *Cell* 1996;86:531-42.
- ⁸⁷ Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M, Ozdamar B, Bose R, Barrios-Rodiles M. Regulation of the polarity protein Par6 by TGF β receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* 2005;307:1603-9.
- ⁸⁸ Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB 3rd, Hamilton SR. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N.Eng.J.Med* 2001;344:1196-1206.
- ⁸⁹ Vincan E, Barker N. The upstream components of the Wnt signaling pathway in the dynamic EMT and MET associated with colorectal cancer progression. *Clin Exp Metastasis* 2008;25:657-63.
- ⁹⁰ Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Med* 2004; 10:789-99.
- ⁹¹ Lombaerts M, Middeldorp JW, Van der Weide E, Philippo K, van Wezel T, Smit VT, Cornelisse CJ, Cleton-Jansen AM. E-cadherin transcriptional downregulation by promoter methylation but not mutation is related to epithelial-to mesenchymal transition in breast cancer cell lines. *Br J Cancer* 2006;94:661-71.
- ⁹² Aguilera O, Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Herranz M, Espada J, García JM, Muñoz A, Esteller M, González-Sancho JM. Epigenetic inactivation of the Wnt antagonist DICKKOPF-1(DKK1) gene in human colorectal cancer. *Oncogene* 2006;25:4116-21.
- ⁹³ Comoglio PM. Pathway specificity for Met signaling. *Nature Cell Biol* 2001;3:E161-2.
- ⁹⁴ Maina F, Pante G, Helmbacher F, Andres R, Porthin A, Davies AM, Ponzetto C, Klein R. Coupling Met to specific pathways results in distinct developmental outcomes. *Mol. Cell.* 2001;7:1293-1306.
- ⁹⁵ Boccaccio C, Ando M, Tamagnone L, Bardelli A, Michieli P, Battistini C, Comoglio PM. Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature* 1998;391:285-8.
- ⁹⁶ Di Renzo MF, Olivero M, Ferro S, Prat M, Bongarzone I, Pilotti S, Belfiore A, Costantino A, Vigneri R, Pierotti MA. Overexpression of the c-MET/HGF receptor gene in human thyroid carcinomas. *Oncogene* 1992;7(12):2549-53.
- ⁹⁸ Di Renzo MF, Poulson R, Olivero M, Comoglio PM, Lemoine NR. Expression of the Met/hepatocyte growth factor receptor in human pancreatic cancer. *Cancer Res* 1995;55(5):1129-38.

-
- ⁹⁹ Di Renzo MF, Olivero M, Giacomini A, Porte H, Chastre E, Mirossay L, Nordlinger B, Bretti S, Bottardi S, Giordano S. Overexpression and amplification of the met/HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1995 ;1(2):147-54.
- ¹⁰⁰ Di Renzo MF, Olivero M, Martone T, Maffe A, Maggiora P, Stefani AD, Valente G, Giordano S, Cortesina G, Comoglio PM. Somatic mutations of the MET oncogene are selected during metastatic spread of human HNSC carcinomas. *Oncogene* 2000;16;19(12):1547-55.
- ¹⁰¹ Miele L. Notch signaling. *Clin Cancer Res* 2006;12:1074-9.
- ¹⁰² Timmerman LA, Greco-Bessa J, Raya A, Bertrán E, Pérez-Pomares JM, Díez J, Aranda S, Palomo S, McCormick F, Izpisua-Belmonte JC, de la Pompa JL. Notch promotes epithelial- mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* 2004; 18:99-115.
- ¹⁰³ Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, Bottinger EP. Integration of TGFG-beta/Smad and jagged1-/Notch signaling in epithelial to mesenchymal transition. *EMBO J* 2004;23:1155-65.
- ¹⁰⁴ Billottet C, Elkhatib N, Thiery J, Jouanneau J. Targets of Fibroblast growth factor 1 (FGF-1) and FGF-2 signaling involved in the invasive and tumorigenic behavior of carcinoma cells. *Mol Biol Cell* 2004;15:4725-34.
- ¹⁰⁵ Kong D, Wang Z, Sarkar SH, Li Y, Banerjee S, Saliganan A, Kim HR, Cher ML, Sarkar FH. Platelet-derived growth factor-D overexpression contributes to epithelial-mesenchymal transition of PC3 prostate cells. *Stem Cells* 2008;26:1425-35.
- ¹⁰⁶ Shioiri M, Shida T, Koda K, Oda K, Seike K, Nishimura M, Takano S, Miyazaki M. Slug expression is an independent prognostic parameter for poor survival in colorectal carcinoma patients. *Br J Cancer* 2006;94:1816-22.
- ¹⁰⁷ Kardhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA. Hedgehog signaling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. *Nature* 2004;431:707-12.
- ¹⁰⁸ Xie L, Law BK, Chytil AM, Brown KA, Aakre ME, Moses HL. Activation of the Erk pathway is required for TGF- β 1-induced EMT in vitro. *Neoplasia* 2004;6:603-10.
- ¹⁰⁹ Gort EH, Groot AJ, Van Der Wall E, van Diest PJ, Vooijs MA. Hypoxic regulation of metastasis via hypoxia-inducible factors. *Curr Mol Med* 2008;8:60-7.
- ¹¹⁰ Cannito S, Novo E, Compagnone A, van Diest PJ, Vooijs MA. Redox mechanisms switch on hypoxia-dependent epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. *Carcinogenesis* 2008;29:2267-78.
- ¹¹¹ Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 1998;153:333-9.

-
- ¹¹² Blanco MJ, Moreno-Bueno G, Sarrío D, Locascio A, Cano A, Palacios J, Nieto MA. Correlation of Snail expression with histological grade and lymph node status in breast carcinomas. *Oncogene* 2002;21(20):3241-6.
- ¹¹³ Naber HP, Drabsch Y, Snaar-Jagalska BE, ten Dijke P, van Laar T. Snail and Slug, key regulators of TGF- β -induced EMT, are sufficient for the induction of single-cell invasion *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 May 24;435(1):58-63. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.04.037. Epub 2013 Apr 22.
- ¹¹⁴ Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschuere K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F. The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 2001;7(6):1267-78.
- ¹¹⁵ Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, Fauvet F, Puisieux I, Doglioni C, Piccinin S, Maestro R, Voeltzel T, Selmi A, Valsesia-Wittmann S, Caron de Fromental C, Puisieux A. Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell.* 2008 Jul 8;14(1):79-89. doi: 10.1016/j.ccr.2008.06.005.
- ¹¹⁶ Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004;117:927-39.
- ¹¹⁷ Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Lubber B, Busch R, Höfler H, Becker KF. Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol* 2002;161:1881-91.
- ¹¹⁸ Hoek K, Rimm DL, Williams KR, Zhao H, Ariyan S, Lin A, Kluger HM, Berger AJ, Cheng E, Trombetta ES, Wu T, Niinobe M, Yoshikawa K, Hannigan GE, Halaban R. Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas. *Cancer Res* 2004;64: 5270-82.
- ¹¹⁹ Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S, Garin E, Jallas AC, Combaret V, Krause A, Leissner P, Puisieux A. Oncogenic cooperation between H-Twist and NMyC overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 2004;6:625-30.
- ¹²⁰ Cubillo E, Diaz-Lopez A, Cuevas EP, Moreno-Bueno G, Peinado H, Montes A, Santos V, Portillo F, Cano A. E47 and Id1 interplay in epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One.* 2013;8(3):e59948.
- ¹²¹ Cano A, Nieto MA. Non-coding RNAs take centre stage in epithelial-to-mesenchymal transition. *Trends Cell Biol.* 2008 Aug;18(8):357-9. doi: 10.1016/j.tcb.2008.05.005. Epub 2008 Jun 26.
- ¹²² Cong N, Du P, Zhang A, Shen F, Su J, Pu P, Wang T, Zjang J, Kang C, Zhang Q. Downregulated microRNA-200a promotes EMT and tumor growth through the wnt/ β -

catenin pathway by targeting the E-cadherin repressors ZEB1/ZEB2 in gastric adenocarcinoma. *Oncol Rep.* 2013 Apr;29(4):1579-87

¹²³ Hurteau GJ, Carison JA, Roos E, Brock GJ. Stable expression of miR-200c alone is sufficient to regulate TCF8 (ZEB1) and restore E-cadherin expression. *Cell Cycle* 2009;8:2064-9.

¹²⁴ Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, Farshid G, Vadas MA, Khew-Goodall Y, Goodall GJ. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol.* 2008 May;10(5):593-601.

¹²⁵ Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev.* 2008 Apr 1;22(7):894-907.

¹²⁶ Beltran M, Puig I, Peña C, García JM, Alvarez AB, Peña R, Bonilla F, de Herreros AG. A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes Dev.* 2008 Mar 15;22(6):756-69. doi: 10.1101/gad.455708.

¹²⁷ Iorio MV, Visone R, Di Leva G, Donati V, Petrocca F, Casalini P, Taccioli C, Volinia S, Liu CG, Alder H, Calin GA, Ménard S, Croce CM. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res* 2007;67:8699-707.

¹²⁸ Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, Jiang J, Schmittgen TD, Patel T. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006;130:2113-29.

¹²⁹ Sempere LF, Christensen M, Silahatoglu A, Bak M, Heath CV, Schwartz G, Wells W, Kauppinen S, Cole CN. Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Res* 2007;67:11612-20.

¹³⁰ Gottardo F, Liu CG, Ferracin M, Calin GA, Fassin M, Bassi P, Sevignani C, Byrne D, Negrini M, Pagano F, Gomella LG, Croce CM, Baffa R. Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers. *Urol Oncol* 2007;25:387-92.

¹³¹ Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature.* 2007 Oct 11;449(7163):682-8.

¹³² Dunbier A, Guilford P. Hereditary diffuse gastric cancer. *Adv Cancer Res* 2001;83:55-65.

¹³³ Schrader KA, Masciari S, Boyd N, Wiyrick S, Kaurah P, Senz J, Burke W, Lynch HT, Garber JE, Huntsman DG. Hereditary diffuse gastric cancer: association with lobular breast cancer. *Fam Cancer* 2008;7:73-82.

-
- ¹³⁴ Berx G, Cleton-Jansen AM, Strumane K, de Leeuw WJ, Nollet F, van Roy F, Cornelisse C. E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene*. 1996 Nov 7;13(9):1919-25.
- ¹³⁵ Bloushtain-Qimron N, Yao J, Snyder EL, Shipitsin M, Campbell LL, Mani SA, Hu M, Chen H, Ustyansky V, Antosiewicz JE, Argani P, Halushka MK, Thomson JA, Pharoah P, Porgador A, Sukumar S, Parsons R, Richardson AL, Stampfer MR, Gelman RS, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Polyak K. Cell type-specific DNA methylation patterns in the human breast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 16;105(37):14076-81.
- ¹³⁶ Shipitsin, M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, Nikolskaya T, Serebryiskaya T, Beroukhim R, Hu M, Halushka MK, Sukumar S, Parker LM, Anderson KS, Harris LN, Garber JE, Richardson AL, Schnitt SJ, Nikolsky Y, Gelman RS, Polyak K. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell* 2007;11:259–73.
- ¹³⁷ Ateeq B, Unterberger A, Szyf M, Rabbani SA. Pharmacological inhibition of DNA methylation induces proinvasive and prometastatic genes in vitro and in vivo. *Neoplasia*. 2008 Mar;10(3):266-78.
- ¹³⁸ Guo Y, Pakneshan P, Gladu J, Slack A, Szyf M, Rabbani SA. Regulation of DNA methylation in human breast cancer. Effect on the urokinase-type plasminogen activator gene production and tumor invasion. *J Biol Chem*. 2002 Nov 1;277(44):41571-9.
- ¹³⁹ Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 1977;461–3.
- ¹⁴⁰ Mani SA, Yang J, Brooks M, Schwaninger G, Zhou A, Miura N, Kutok JL, Hartwell K, Richardson AL, Weinberg RA. Mesenchyme Forkhead 1 (FOXC2) plays a key role in metastasis and is associated with aggressive basal-like breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:10069–74.
- ¹⁴¹ Molofsky AV, He S, Bydon M, Morrison SJ, Pardoll R. Bmi-1 promotes neural stem cell self-renewal and neural development but not mouse growth and survival by repressing the p16Ink4a and p19Arf senescence pathways. *Genes Dev*. 2005;19:1432–7.
- ¹⁴² Xu MH, Gao X, Luo D, Zhou XD, Xiong W, Liu GX. EMT and Acquisition of Stem Cell-Like Properties Are Involved in Spontaneous Formation of Tumorigenic Hybrids between Lung Cancer and Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*. 2014 Feb 6;9(2):e87893.
- ¹⁴³ Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1559-64.

-
- ¹⁴⁴ Chaffer CL, Thompson EW, Williams ED. Mesenchymal to epithelial transition in development and disease. *Cells Tissues Organs*. 2007;185(1-3):7-19.
- ¹⁴⁵ Graff JR, Gabrielson E, Fujii H, Baylin SB, Herman JG. Methylation patterns of the E-cadherin 5' CpG island are unstable and reflect the dynamic, heterogeneous loss of E-cadherin expression during metastatic progression. *J Biol Chem*. 2000 Jan 28;275(4):2727-32.
- ¹⁴⁶ Milella M, Kornblau SM, Estrov Z, Carter BZ, Lapillonne H, Harris D, Konopleva M, Zhao S, Estey E, Andreeff M. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* 2001;108(6):851-9.
- ¹⁴⁷ Lee CG, McCarthy S, Gruidl M, Timme C, Yeatman TJ. MicroRNA-147 Induces a Mesenchymal-To-Epithelial Transition (MET) and Reverses EGFR Inhibitor Resistance. *PLoS One*. 2014 Jan 15;9(1):e84597.
- ¹⁴⁸ Franco-Chuaire ML, Magda Carolina SC, Chuaire-Noack L. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): principles and clinical impact in cancer therapy *Invest Clin*. 2013 Jun;54(2):186-205.
- ¹⁴⁹ Geiger TR and Peeper DS: Metastasis mechanisms. *Biochim Et Biophys Acta* 2009;1796: 293-308.
- ¹⁵⁰ Micalizzi DS, Farabaugh SM and Ford HL: Epithelialmesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2010;15(2): 117-134.
- ¹⁵¹ Thiery JP: Epithelial mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 2003;15(6): 740-746.
- ¹⁵² Kondo M, Wagers AJ, Manz MG, Prohaska SS, Scherer DC, Beilhack GF, Shizuru JA and Weissman IL: Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu Rev Immunol* 2003;21: 759-806.
- ¹⁵³ McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M and Clark GM; Statistics Subcommittee of the NCI-EORTC Working Group on Cancer Diagnostics: Reporting recommendations for tumor marker prognostic studies. *J Clin Oncol* 2005;23: 9067-9075.
- ¹⁵⁴ Thiery JP: Epithelial mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2002;2(6): 442-454.
- ¹⁵⁵ Fountzilias G, Kourea HP, Bobos M, Televantou D, Kotoula V, Papadimitriou C, Papazisis KT, Timotheadou E, Efstratiou I, Koutras A, Pentheroudakis G, Christodoulou C, Aravantinos G, Miliaras D, Petraki K, Papandreou CN, Papakostas P, Bafaloukos D, Repana D, Razis E, Pectasides D and Dimopoulos AM: Paclitaxel and bevacizumab as first line combined treatment in patients with metastatic breast cancer: the Hellenic Cooperative Oncology Group experience with biological marker evaluation. *Anticancer Res* 2011;31(9): 3007-3018.

-
- ¹⁵⁶ Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial–mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:131–42.
- ¹⁵⁷ Pavlidis N, Pentheroudakis G. Cancer of unknown primary site. *Lancet.* 2012 Apr 14;379(9824):1428-35.
- ¹⁵⁸ Stoyianni A, Goussia A, Pentheroudakis G, Siozopoulou V, Ioachim E, Krikelis D, Golfopoulos V, Cervantes A, Bobos M, Fotsis T, Bellou S, Fountzilias G, Malamou-Mitsi V, Pavlidis N. Immunohistochemical study of the epithelial–mesenchymal transition phenotype in cancer of unknown primary: incidence, correlations and prognostic utility. *Anticancer Res.* 2012;32(4):1273–8.
- ¹⁵⁹ Dykxhoorn DM, Wu Y, Xie H, Yu F, Lal A, Petrocca F, Martinvalet D, Song E, Lim B, Lieberman J. MiR-200 enhances mouse breast cancer cell colonization to form distant metastases. *PLoS ONE.* 2009;4:e7181.
- ¹⁶⁰ Mezzanzanica D, Bagnoli M, De Cecco L, Valeri B, Canevari S. Role of microRNAs in ovarian cancer pathogenesis and potential clinical implications. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Aug;42(8):1262-72.
- ¹⁶¹ Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, Benjamin H, Shabes N, Tabak S, Levy A, Lebanony D, Goren Y, Silberschein E, Targan N, Ben-Ari A, Gilad S, Sion-Vardy N, Tobar A, Feinmesser M, Kharenko O, Nativ O, Nass D, Perelman M, Yosepovich A, Shalmon B, Polak-Charcon S, Fridman E, Avniel A, Bentwich I, Bentwich Z, Cohen D, Chajut A, Barshack I. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol.* 2008 Apr;26(4):462-9. doi: 10.1038/nbt1392. Epub 2008 Mar 23.
- ¹⁶² Meiri E, Mueller WC, Rosenwald S, Zepeniuk M, Klinke E, Edmonston TB, Werner M, Lass U, Barshack I, Feinmesser M, Huszar M, Fogt F, Ashkenazi K, Sanden M, Goren E, Dromi N, Zion O, Burnstein I, Chajut A, Spector Y, Aharonov R. A second-generation microRNA-based assay for diagnosing tumor tissue origin. *Oncologist.* 2012;17(6):801–12.
- ¹⁶³ Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res.* 2009;125(1–2):279–84.
- ¹⁶⁴ Gotzmann J, Mikula M, Eger A, Schulte-Hermann R, Foisner R, Beug H, Mikulits W. Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat Res* 2004;566(1): 9-20.
- ¹⁶⁵ Min C, eddy SF, Sherr DH, Sonnenschein GE. NK-kappaB and epithelial to mesenchymal transition of cancer. *J Cell Biochem.* 2008;104:733-44.
- ¹⁶⁶ Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cell polarity in EMT and cancer. *Oncogene* 2008;27:6958-69.

-
- ¹⁶⁷ Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res.* 2006;66:8319-26.
- ¹⁶⁸ Klymkowsky MW, Savanger P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am J Pathol* 2009;174:1588-93.
- ¹⁶⁹ Prindull G. Hypothesis: cell plasticity, linking embryonal stem cells to adult stem cell reservoirs and metastatic cancer cells? *Exp Hematol.* 2005;33:738-46.
- ¹⁷⁰ Wang Z, Li Y, Kong D, Banerjee S, Ahmad A, Azmi AS, Ali S, Abbruzzese JL, Gallick GE, Sarkar FH. Acquisition of epithelial-mesenchymal transition phenotype of gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells is linked with activation of the notch signaling pathway. *Cancer Res.* 2009;15;69(6):2400-7.
- ¹⁷¹ Fuchs BC, Fujii T, Dorfman JD, Goodwin JM, Zhu AX, Lanuti M, Tanabe KK. Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res.* 2008;68(7):2391-9.
- ¹⁷² Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang LH. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res.* 2007;67:1979-87.
- ¹⁷³ Sabbah M, Emami S, Redeuilh G, Julien S, Prévost G, Zimmer A, Ouelaa R, Bracke M, De Wever O, Gespach C. Molecular signature and therapeutic perspective of the epithelial-to-mesenchymal transitions in epithelial cancers. *Drug Resist Updat.* 2008;11:123-51.
- ¹⁷⁴ Moustakas A, Heldin CH. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci.* 2007;98:1512-20.
- ¹⁷⁵ Zavadil J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene.* 2005;24:5764-74.
- ¹⁷⁶ Niessen K, Fu Y, Chang L, Hoodless PA, McFadden D, Karsan A. Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *J Cell Biol.* 2008;182:315-25.
- ¹⁷⁷ Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, et al. Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev.* 2004;18:99-115.
- ¹⁷⁸ Nosedá M, McLean G, Niessen K, Chang L, Pollet I, Montpetit R, Shahidi R, Dorovini-Zis K, Li L, Beckstead B, Durand RE, Hoodless PA, Karsan A. Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation. *Circ Res.* 2004; 94:910-7.

-
- ¹⁷⁹ Savagner P¹, Yamada KM, Thiery JP. The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol.* 1997 Jun 16;137(6):1403-19.
- ¹⁸⁰ Jordà M¹, Olmeda D, Vinyals A, Valero E, Cubillo E, Llorens A, Cano A, Fabra A. Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci.* 2005 Aug 1;118(Pt 15):3371-85.
- ¹⁸¹ Jiao W, Miyazaki K, Kitajima Y. Inverse correlation between E-cadherin and SNAIL expression in hepatocellular carcinoma cell lines in vitro and in vivo. *Br J Cancer* 2002;86(1): 98-101.
- ¹⁸² Rosivatz E, Becker KF, Kremmer E, Schott C, Blechschmidt K, Hofler, Sarbia M. Expression and nuclear localization of SNAIL, an E-cadherin repressor, in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *Virchows Arch* 2006;448(3): 277-287.
- ¹⁸³ Roy HK, Smyrk TC, Koetsier J, Victor TA, Wali RK. The transcriptional repressor SNAIL is overexpressed in human colon cancer. *Dig Dis Sci* 2005;50(1): 42-46.
- ¹⁸⁴ Moody SE, Perez D, Pan TC, Pan TC, Sarkisian CJ, Portocarrero CP, Sterner CJ, Notorfrancesco KL, Cardiff RD, Chodosh LA. The transcriptional repressor SNAIL promotes mammary tumor recurrence. *Cancer Cell* 2005;8(3): 197-209.
- ¹⁸⁵ Bao B, Wang Z, Ali S, Kong D, Li Y, Ahmad A, Banerjee S, Azmi AS, Miele L, Sarkar FH. Notch-1 induces epithelial-mesenchymal transition consistent with cancer stem cell phenotype in pancreatic cancer cells. *Cancer Lett* 2011;307(1): 26-36.
- ¹⁸⁶ Takebe N, Warren RQ, Ivy SP. Breast cancer growth and metastasis: interplay between cancer stem cells, embryonic signaling pathways and epithelial-to-mesenchymal transition. *Breast Cancer Res* 2011;13(3): 211.
- ¹⁸⁷ Martin TA, Goyal A, Watkins G, Jiang WG. Expression of the transcription factors SNAIL, SLUG, and TWIST and their clinical significance in human breast cancer. *Ann Surg Oncol* 2005;12(6): 488-496.
- ¹⁸⁸ Elloul S, Elstrand MB, Nesland JM, Trope CG, Kvalheim G, Goldberg I, Reich R, Davidson B. SNAIL, SLUG and SMUG-interacting protein 1 as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma. *Cancer* 2005;103(8): 1631-1643.
- ¹⁸⁹ Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, Hung MC. Dual regulation of SNAIL by GSK-3beta-mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2004;6(10): 931-940.

-
- ¹⁹⁰ Come C, Magnino F, Bibeau F, De Santa Barbara P, Becker KF, Theillet C, Savagner P: SNAIL and SLUG play distinct roles during breast carcinoma progression. *Clin Can Res* 2006;12(18):5395-5402.
- ¹⁹¹ Christofori G: New signals from the invasive front. *Nature* 2006;441(7092): 444-450.
- ¹⁹² Liang X: EMT: new signals from the invasive front. *Oral Oncol* 2011;47(8): 686-687
- ¹⁹³ Bryne M, Boysen M, Alfsen CG, Abeler VM, Sudbo J, Nesland JM, Kristensen GB, Piffko J and Bankfalvi A: The invasive front of carcinomas. The most important area for tumour prognosis? *Anticancer Res* 1998;18(6B): 4757-4764.
- ¹⁹⁴ Liu S, Cong Y, Wang D, Sun Y, Deng L, Liu Y, Martin-Trevino R, Shang L, McDermott SP, Landis MD, Hong S, Adams A, D'Angelo R, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Clouthier SG, Birnbaum D, Wong ST, Zhan M, Chang JC, Wicha MS. Breast Cancer Stem Cells Transition between Epithelial and Mesenchymal States Reflective of their Normal Counterparts. *Stem Cell Reports*. 2013;2(1):78-91.
- ¹⁹⁵ Nakamura M, Onoda N, Noda S, Kashiwagi S, Aomatsu N, Kurata K, Kawajiri H, Takashima T, Ishikawa T, Hirakawa K. E-cadherin expression and cell proliferation in the primary tumor and metastatic lymph nodes of papillary thyroid microcarcinoma *Mol Clin Oncol*. 2014;226–232.
- ¹⁹⁶ Hugo H, Ackland ML, Blick T, Lawrence MG, Clements JA, Williams ED, Thompson EW. Epithelial - mesenchymal and mesenchymal - epithelial transitions in carcinoma progression. *J Cell Physiol*. 2007;213:374–383.
- ¹⁹⁷ Husemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, Forni G, Eils R, Fehm T, Riethmuller G and Klein CA: Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell* 2008;13(1): 58-68.
- ¹⁹⁸ Pentheroudakis G, Pavlidis N, Fountzilias G, Krikelis D, Goussia A, Stoyianni A, Sanden M, St Cyr B, Yerushalmi N, Benjamin H, Meiri E, Chajut A, Rosenwald S, Aharonov R, Spector Y. Novel microRNA-based assay demonstrates 92% agreement with diagnosis based on clinicopathologic and management data in a cohort of patients with carcinoma of unknown primary. *Mol Cancer*. 2013 Jun 10;12:57
- ¹⁹⁹ Anderson GG, Weiss LM: Determining tissue of origin for metastatic cancers: meta-analysis and literature review of immunohistochemistry performance. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2010;18:3–8.
- ²⁰⁰ Dennis JL, Hvidsten TR, Wit EC, Komorowski J, Bell AK, Downie I, Mooney J, Verbeke C, Bellamy C, Keith WN, Oien KA: Markers of adenocarcinoma characteristic of the site of origin: development of a diagnostic algorithm. *Clin Cancer Res* 2005;11:3766–3772.

-
- ²⁰¹ Oien KA, Dennis JL: Diagnostic work-up of carcinoma of unknown primary: from immunohistochemistry to molecular profiling. *Ann Oncol* 2012;23(Suppl 10):x271–x277.
- ²⁰² Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, Benjamin H, Shabes N, Tabak S, Levy A, Lebanony D, Goren Y, Silberschein E, Targan N, Ben-Ari A, Gilad S, Sion-Vardy N, Tobar A, Feinmesser M, Kharenko O, Nativ O, Nass D, Perelman M, Yosepovich A, Shalmon B, Polak-Charcon S, Fridman E, Avniel A, Bentwich I, Bentwich Z, Cohen D, Chajut A, Barshack I. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol* 2008;26:462–469.
- ²⁰³ Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, Guenther SM, O'Leary JJ, Sheils O. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnol* 2007;7:36.
- ²⁰⁴ Liu A, Tetzlaff MT, Vanbelle P, Elder D, Feldman M, Tobias JW, Sepulveda AR, Xu X. MicroRNA expression profiling outperforms mRNA expression profiling in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Int J Clin Exp Pathol* 2009;2:519–527.
- ²⁰⁵ Bullock MD, Sayan AE, Packham GK, Mirnezami AH. MicroRNAs: critical regulators of epithelial to mesenchymal (EMT) and mesenchymal to epithelial transition (MET) in cancer progression. *Biol Cell*. 2012 Jan;104(1):3-12.
- ²⁰⁶ Kalluri, R. and Weinberg, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* 2009;119, 1420–1428.
- ²⁰⁷ Cottonham, C.L., Kaneko, S. and Xu, L. miR-21 and miR-31 converge on TIAM1 to regulate migration and invasion of colon carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 2010;285, 35293–35302.
- ²⁰⁸ Gebeshuber, C.A., Zatloukal, K. and Martinez, J. miR-29a suppresses tristetraprolin, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *EMBO Rep.* 2009;10, 400–405.
- ²⁰⁹ Kong, W., Yang, H., He, L., Zhao, J.J., Coppola, D., Dalton, W.S. and Cheng, J.Q. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol. Cell. Biol.* 2008;28, 6773–6784.
- ²¹⁰ Ma, L., Young, J., Prabhala, H., Pan, E., Mestdagh, P., Muth, D., Teruya-Feldstein, J., Reinhardt, F., Onder, T.T., Valastyan, S., Westermann, F., Speleman, F., Vandesompele, J. and Weinberg, R.A. miR-9, a MYC/MYCN-activated microRNA, regulates E-cadherin and cancer metastasis. *Nat. Cell Biol.* 2010;12, 247–256.
- ²¹¹ Meng, Z., Fu, X., Chen, X., Zeng, S., Tian, Y., Jove, R., Xu, R. And Huang, W. miR-194 is a marker of hepatic epithelial cells and suppresses metastasis of liver cancer cells in mice. *Hepatology* 2010;52, 2148–2157.

-
- ²¹² Vetter, G., Saumet, A., Moes, M., Vallar, L., Le Behec, A., Laurini, C., Sabbah, M., Arar, K., Theillet, C., Lecellier, C.H. and Friederich, E. miR-661 expression in SNAI1-induced epithelial to mesenchymal transition contributes to breast cancer cell invasion by targeting Nectin-1 and StarD10 messengers. *Oncogene* 2010;29,4436–4448.
- ²¹³ Korpala, M., Lee, E.S., Hu, G. and Kang, Y. The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *J. Biol. Chem.* 2008;283, 14910–14914.
- ²¹⁴ Korpala, M., Ell, B.J., Buffa, F.M., Ibrahim, T., Blanco, M.A., Celia-Terrassa, T., Mercatali, L., Khan, Z., Goodarzi, H., Hua, Y., Wei, Y., Hu, G., Garcia, B.A., Ragoussis, J., Amadori, D., Harris, A.L. and Kang, Y. Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nat. Med.* 2011;17, 1101–1108.
- ²¹⁵ Bracken, C.P., Gregory, P.A., Kolesnikoff, N., Bert, A.G., Wang, J., Shannon, M.F. and Goodall, G.J. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 2008;68, 7846–7854.
- ²¹⁶ Brabletz, S. and Brabletz, T. The ZEB/miR-200 feedback loop—a motor of cellular plasticity in development and cancer? *EMBO Rep.* 2010;11, 670–677.
- ²¹⁷ Dinsmore CJ, Zartman CB, Bergman JM, Abrams MT, Buser CA, Culberson JC, Davide JP, Ellis-Hutchings M, Fernandes C, Graham SL, Hartman GD, Huber HE, Lobell RB, Mosser SD, Robinson RG, Williams TM. Macrocyclic piperazinones as potent dual inhibitors of farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase-I. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004 Feb 9;14(3):639-43.
- ²¹⁸ O'Neil J, Calvo J, McKenna K, et al. Activating Notch1 mutations in mouse models of T-ALL. *Blood.* 2006;107:781–5.
- ²¹⁹ Zhang Y, Wang Z, Ahmed F, Banerjee S, Li Y, Sarkar FH. Down-regulation of Jagged-1 induces cell growth inhibition and S phase arrest in prostate cancer cells. *Int J Cancer.* 2006;119:2071–7.
- ²²⁰ Shih I, Wang TL. Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer Res.* 2007;67:1879–82.
- ²²¹ Akhurst RJ, Derynck R. TGF-beta signaling in cancer--a double-edged sword. *Trends Cell Biol.* 2001;11:S44–51.
- ²²² Harney AS, Lee J, Manus LM, Wang P, Ballweg DM, LaBonne C, Meade TJ. Targeted inhibition of Snail family zinc finger transcription factors by oligonucleotide-Co(III) Schiff base conjugate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2009;106(33):13667–13672.
- ²²³ Harney AS, Meade TJ, LaBonne C. Targeted inactivation of Snail family EMT regulatory factors by a Co(III)-Ebox conjugate. *PLoS. One.* 2012;7(2):e32318.

-
- ²²⁴ Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88(3):323–331.
- ²²⁵ Lee SH, Lee SJ, Chung JY, Jung YS, Choi SY, Hwang SH, Choi D, Ha NC, Park BJ. p53, secreted by K-Ras-Snail pathway, is endocytosed by K-Ras-mutated cells; implication of target-specific drug delivery and early diagnostic marker. *Oncogene*. 2009;28(19):2005–2014.
- ²²⁶ Lee SH, Shen GN, Jung YS, Lee SJ, Chung JY, Kim HS, Xu Y, Choi Y, Lee JW, Ha NC, Song GY, Park BJ. Antitumor effect of novel small chemical inhibitors of Snail-p53 binding in K-Ras-mutated cancer cells. *Oncogene*. 2010;29(32):4576–4587.
- ²²⁷ Joyce JA, Pollard JW. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:239–52.
- ²²⁸ Greco FA. Cancer of unknown primary site: evolving understanding and management of patients. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2012 Aug;10(8):518-24.
- ²²⁹ Hainsworth JD, Spigel DR, Thompson DS, et al. Paclitaxel/carboplatin plus bevacizumab/erlotinib in the first-line treatment of patients with carcinoma of unknown primary site. *Oncologist* 2009;14: 1189–97.
- ²³⁰ Hainsworth JD, Spigel DR, Farley C, Thompson DS, Shipley DL, Greco FA. Phase II trial of bevacizumab and erlotinib in carcinomas of unknown primary site: the Minnie Pearl Cancer Research Network. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1747–52.