

ΙΑΤΡΙΚΗ ΣΧΟΛΗ

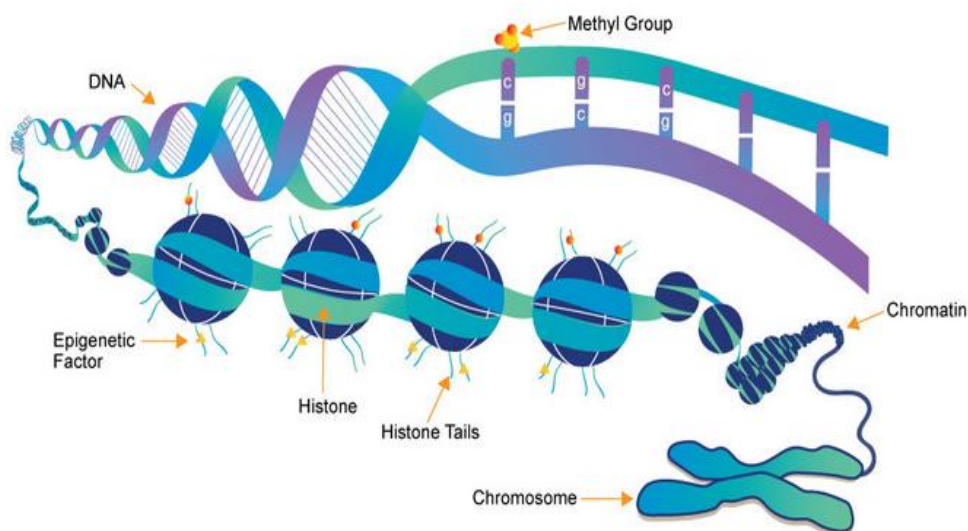
Α ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΗΣ ΑΝΑΤΟΜΙΚΗΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ: «Νεοπλασματική Νόσος στον Άνθρωπο:  
Έρευνα και Κλινικοπαθολογοανατομική Προσέγγιση στα Πλαίσια της  
Εξατομικευμένης Ιατρικής (Διάγνωση και Στοχευμένη Θεραπεία)»

Διευθυντής: Α.Χ Λάζαρης Καθ. Ιατρικής Σχολής ΕΚΠΑ

## ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

### Επιγενετικές Αλλαγές στο ουροθηλιακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης



**ΚΟΚΛΑ ΓΕΩΡΓΙΑ**

**ΜΕΤΑΠΤ. ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΜΔΕ: ΑΝΔΡΕΑΣ Χ. ΛΑΖΑΡΗΣ**

ΑΘΗΝΑ, ΔΕΚΕΜΒΡΙΟΣ 2020

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στη

## **ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΩΠΟ: ΔΙΑΓΝΩΣΗ, ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ ΚΑΙ ΕΡΕΥΝΑ**

που απονέμει η Ιατρική Σχολή του Εθνικού & Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.

### **Η ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ**

**ΒΑΘΜΙΔΑ**

**ΥΠΟΓΡΑΦΗ**

**Α.Χ ΛΑΖΑΡΗΣ**  
**(Επιβλέπων)**

**ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ**

**Χ. ΓΑΚΙΟΠΟΥΛΟΥ**

**ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ**

**Ι. ΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΥ**

**Ε.ΔΙ.Π**

## ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ

Στη γιαγιά μου, *Αθανασία*

Στην οικογένειά μου

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα απ' όλους ευχαριστώ τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Ανδρέα Χ. Λάζαρη και τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γακιοπούλου Χαρά και ιδιαίτερα τη Δρ. Γιαννοπούλου Ιωάννα για την εκπαίδευση, πολύτιμη καθοδήγηση, στήριξη και βοήθεια καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος. Ευχαριστώ επίσης την κα. Ελένη Παπασταμάτη και τον Δρ. Σωτήρη Μάιπα για τη διοικητική υποστήριξη. Εκτιμώ, επίσης, τους φίλους και συγγενείς που μου συμπαραστάθηκαν καθ' όλη τη διάρκεια συγγραφής της εργασίας. Τον αδερφό μου Βασίλη Κόκλα που πάντα ξέρει πώς να με κάνει να χαμογελάω και να βλέπω τα πράγματα από μια άλλη οπτική όταν αγχώνομαι ή νιώθω αδύναμη. Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους υπεραγαπημένους μου γονείς Παναγιώτη Κόκλα και Χρυσαιγή Δευτεραίου που ήταν συνοδοιπόροι στο «ταξίδι» αυτό και που ανέκαθεν είναι δίπλα μου και με ενθαρρύνουν σε όλες τις επιλογές μου, καθώς και σε όλες τις στιγμές, καλές ή κακές.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΑΦΙΕΡΩΣΕΙΣ	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ABSTRACT	9
I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
ΤΟΙΧΩΜΑ / ΧΙΤΩΝΕΣ	12
ΑΓΓΕΙΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΑ	14
2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΤΟΥ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ	15
2.1 Επιδημιολογία	16
2.1.1 Επιπτώσεις	16
2.1.2 Θνησιμότητα	18
2.1.3 Επιβίωση	19
2.2 Αιτιολογία του ουροθηλιακού καρκίνου ουροδόχου κύστης	21
2.2.1 Παράγοντες Κινδύνου	21
3. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΟΓΚΩΝ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ – ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	28
3.1 ΚΑΚΟΗΘΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ	33
Καρκίνωμα in situ - CIS	33
Θηλώδες ουροθηλιακό νεόπλασμα χαμηλού κακοήθους δυναμικού (PUNLMP)	34
Χαμηλόβαθμο θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα	35
Υψηλόβαθμο θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα	35
Διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα εντός του υποεπιθηλιακού συνδετικού ιστού (χορίου)	36
Διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα εντός του μυϊκού χιτώνα (Εξωστήρα Μυός)	36
3.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	37
Σημεία και συμπτώματα	37
3.3 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ	38

3.4 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑ TNM	39
II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	42
Εισαγωγή	43
Η μοριακή παθογένεση του ουροθηλιακού καρκινώματος	44
Η μοριακή βάση των πολλαπλών εστιών στο ουροθηλιακό καρκίνωμα	46
Φαινότυποι του ουροθηλιακού καρκινώματος και οι συμπεριφορές τους	47
Μηνυματοδοτικοί οδοί του ουροθηλιακού καρκινώματος	48
Μοριακή ταξινόμηση του ουροθηλιακού καρκινώματος	51
4. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΟ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ	57
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	57
4.2 Η DNA ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΣΤΟ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ	59
4.3 ΙΣΤΟΝΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ	66
4.3.1. Τροποποιήσεις Ιστονών	66
Ακετυλίωση Ιστονών	68
Μεθυλίωση Ιστονών	68
Φωσφορυλίωση Ιστονών	69
4.3.2. Αναδιαμόρφωση της χρωματίνης	70
Σύμπλοκα Αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης	70
Συγγραφείς	75
Διαγραφείς	76
Αναγνώστες	77
4.4 ΤΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ RNAS (NON-CODING RNAS) ΣΤΟ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ	78
4.4.1 Εισαγωγή	78
4.4.2 Μακρά μη κωδικά RNAs - Long non-coding RNAs (lncRNAs)	81
4.4.3 Μικρά μη κωδικά RNAs - micro RNAs (miRNAs)	83
MiRNAs με αρνητική ρύθμιση στο ουροθηλιακό καρκίνωμα (Downregulated)	87
MiRNAs με θετική ρύθμιση στο ουροθηλιακό καρκίνωμα (Upregulated)	88
4.4.4 Έκφραση των miRNAs σε NMIBC και MIBC	90

4.4.5 Άλλα μη κωδικά RNAs	91
5. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ	95
5.1 Ανοσοκυτταρικό περιβάλλον	95
6. ΤΡΕΧΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΟΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΟΥ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ	101
6.1 Η μεθυλίωση του DNA ως επιγενετικός βιοδείκτης στην υγρή βιοψία	102
6.2 Η μεθυλίωση των ιστονών ως επιγενετικός βιοδείκτης	103
6.3 Κυκλοφορούντα miRNAs ως αναδυόμενοι επιγενετικοί βιοδείκτες στην υγρή βιοψία	104
6.4 Εξωσωματικά miRNAs ως αναδυόμενοι επιγενετικοί βιοδείκτες	109
6.5 Επιγενετικές τροποποιήσεις ως θεραπευτικοί στόχοι	111
7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΚΕΨΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ	116
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	119

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το ουροθηλιακό καρκίνωμα αποτελεί την πιο κοινή νεοπλασία της ουροδόχου κύστης. Λόγω της υψηλής συχνότητας εμφάνισής του, του επιπολασμού, της υποτροπής και της θνησιμότητας του, παραμένει ένα άλυτο κλινικό και κοινωνικό πρόβλημα. Οι επιγενετικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένων της παρεκκλίνουσας μεθυλίωσης του DNA και ιστονικών τροποποιήσεων, της παρεκκλίνουσας αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και της απορρυθμισμένης έκφρασης των μη κωδικών RNA, συμβαίνουν κατά κόρον στο ουροθηλιακό καρκίνωμα ενώ σχετίζονται με στην παθογένεση και εξέλιξή του. Επομένως, αυτές οι επιγενετικές τροποποιήσεις έχειδειχθεί ότι κατέχουν προγνωστική διαγνωστική αξία. Επιπλέον, θεωρούνται εν δυνάμει θεραπευτικοί στόχοι για τη μελλοντική αντιμετώπιση του ουροθηλιακού καρκίνου. Σε αυτήν την ανασκόπηση, συνοψίζουμε τα πρόσφατα ευρήματα σε αυτές τις αναδυόμενες πτυχές, και ρίχνουμε φως στο τόσο σημαντικό, τελικά, επιγένομα με βλέψεις στην μελλοντική εφαρμογή του στον κλινικό χειρισμό της νόσου.



## ABSTRACT

Urothelial carcinoma is the most common neoplasia of the bladder. Due to its high incidence, prevalence, recurrence and mortality, it remains an unsolved clinical and social problem. Epigenetic changes, such as aberrant DNA methylation and histone modification, aberrant chromatin remodeling, and deregulated expression of non-coding RNAs, occur predominantly in urothelial carcinoma and may be “driver” changes towards pathogenesis and progress of the disease. Therefore, an attempt is made to use these epigenetic modifications as potential biomarkers, which would be hopefully considered as therapeutic targets for future treatment of urothelial cancer. In this review, we summarize recent findings in these emerging aspects, and shed light on such an important, ultimately, epigenome, with a view to its use in the future clinical treatment of the disease.

# I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## 1. ΑΝΑΤΟΜΙΑ - ΙΣΤΟΛΟΓΙΑ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

Η ουροδόχος κύστη είναι κοίλο μυώδες όργανο, μεταξύ των δυο ουρητήρων και της ουρήθρας. Βρίσκεται στον υποπεριτοναϊκό χώρο της ελάσσονος πυέλου πίσω από την ηβική σύμφυση. Υποδέχεται και διατηρεί τα ούρα μεταξύ των ουρήσεων. Η χωρητικότητά της είναι  $2-3 \times 10^3 \text{ cm}^3$ , και έως  $4 \times 10^3 \text{ cm}^3$  σε παθολογικές καταστάσεις καθώς και σε ελάττωση του τόνου της. Συνήθως 200 – 300  $\text{cm}^3$  προκαλούν έπειξη για ούρηση.

Η ουροδόχος κύστη διακρίνεται στα εξής μέρη: πυθμένας, σώμα και κορυφή. Ο μέσος ομφαλοκυστικός σύνδεσμος αποτελεί υπόλειμμα του αποφραχθέντος ουραχού. Οι δυο πλάγιοι ομφαλοκυστικοί σύνδεσμοι αντιστοιχούν στις αποφραχθείσες ομφαλικές αρτηρίες του εμβρύου.

Οι δυο ουρητήρες εισέρχονται στο οπίσθιο τοίχωμα της ουροδόχου κύστης και μια νοητή γραμμή ενώνει τις εισόδους των ουρητήρων. Το περιτόναιο καλύπτει εν μέρει την ουροδόχο κύστη, από την άνω επιφάνειά της (κορυφή) μέχρι τις εισόδους των ουρητήρων.

Σε μεγάλη πλήρωση της ουροδόχου κύστης, η κορυφή της ανεβαίνει μεταξύ περιτοναίου και πρόσθιου κοιλιακού τοιχώματος. Έτσι καθίσταται ασφαλής η υπερηβική παρακέντηση χωρίς κίνδυνο τρώσης του περιτοναίου. Στον παρακυστίο χώρο πορεύονται αγγεία και νεύρα (Διαμαντοπούλου, 2014).

## ΤΟΙΧΩΜΑ / ΧΙΤΩΝΕΣ

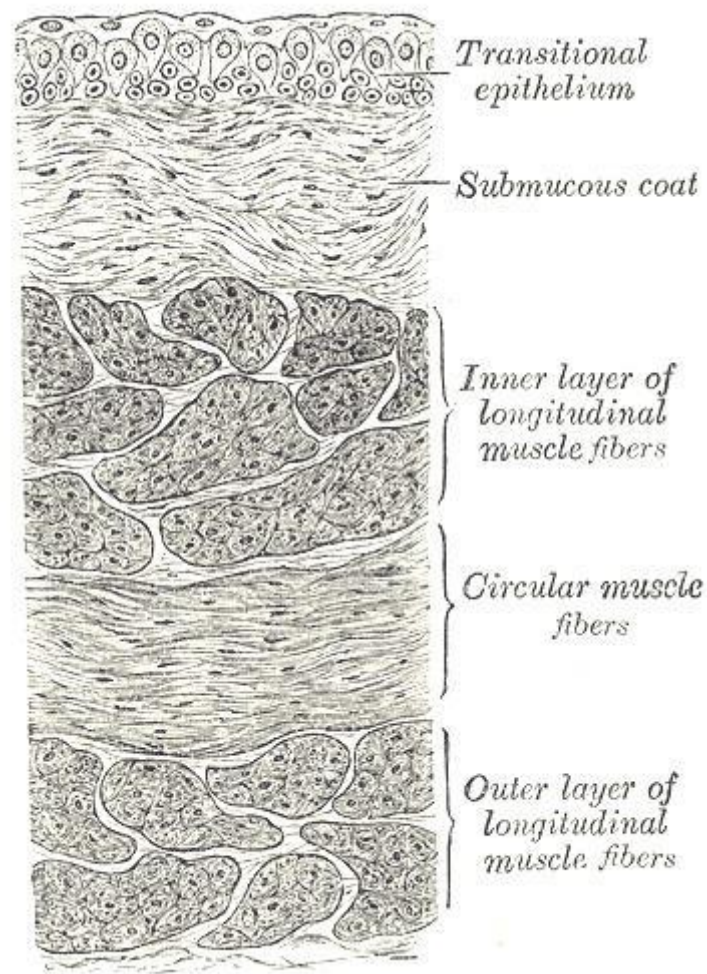
Το τοίχωμα της ουροδόχου κύστης διακρίνεται στους εξής χιτώνες:

- Βλεννογόνος,
- Υποβλεννογόνιος,
- Μυϊκός: έξω επιμήκης στοιβάδα, μέση κυκλωτερής, έσω επιμήκης και
- Ινώδης

Ο βλεννογόνος αποτελείται από το ουροθήλιο, ένα ειδικού τύπου επιθήλιο, για την προσαρμογή στο περιβάλλον των ούρων. Μια άλλη ονομασία είναι το μεταβατικό επιθήλιο. Το ουροθήλιο αποτελείται από 3-6 στιβάδες κυττάρων ανάλογα με τη διάταση της ουροδόχου κύστης. Τα κυπελλοειδή / ομπρελοειδή (Umbrella) κύτταρα καλύπτουν την ελεύθερη επιφάνεια του ουροθηλίου. Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο τα ομπρελοειδή κύτταρα παρουσιάζουν ασύμμετρες κυτταρικές μεμβράνες με ανώμαλη γωνιώδη επιφάνεια λόγω πρόσφυσης δύσκαμπτων τμημάτων και ποικιλίας των διακυττάρων συνδέσεων. Συμβάλλουν στην υποστήριξη του φραγμού αίματος / ούρων. Τα λοιπά ουροθηλιακά κύτταρα είναι μικρότερα, ομοιόμορφα, με κάθετο προσανατολισμό στη βασική μεμβράνη. Ανανεώνονται κατ' έτος. Η βασική στιβάδα των ουροθηλιακών κυττάρων κείται σε βασική μεμβράνη (**Εικόνα 1**).

Ο υποβλεννογόνος αποτελείται από α) το χόριο, δηλαδή τον χαλαρό συνδετικό ιστό κάτωθεν του ουροθηλίου ή αλλιώς υποεπιθηλιακό χώρο, β) τη βλεννογόνιο μυϊκή στιβάδα (λεπτές δέσμες λείων μυϊκών ινών προερχόμενων από το μυϊκό χιτώνα της ουροδόχου κύστης), που έχει ποικίλο πάχος και γ) το συνδετικό ιστό κάτωθεν της βλεννογονίου μυϊκής στιβάδας με συστοιχία μεγαλύτερων αγγείων. Ο μυϊκός χιτώνας αποτελείται από μεγάλες δέσμες μυϊκών ινών ανάμεικτες με χαλαρό συνδετικό ιστό. Διακριτές στοιβάδες παρατηρούνται μόνο στην περιοχή του έσω σφιγκτήρα. Στον αυχένα και στις ανώτερες μοίρες της ουροδόχου κύστης οι μυϊκές ίνες είναι πιο ομοιόμορφες και στενά συνδεδεμένες μεταξύ τους. Στην περιοχή του κυστικού τριγώνου δεν παρατηρούνται πτυχές, η

μέση στοιβάδα απουσιάζει, ενώ υπάρχει στενή σύνδεση της έσω στοιβάδας με το βλεννογόνο.



**Εικόνα 1: Ιστολογία ουροδόχου κύστης.** Εγκάρσια τομή του τοιχώματος της ουροδόχου κύστης: (από πάνω προς τα κάτω) μεταβατικό επιθήλιο, υποβλεννογόνος στοιβάδα, εσωτερική στοιβάδα διαμήκων μυϊκών ινών, κυκλικές μυϊκές ίνες, εξωτερική στοιβάδα διαμήκων μυϊκών ινών. Αναφέρεται από τους Gray's Anatomy Plates. Bolla SR, Odeluga N, Jetty R. Histology, Bladder. [Updated 2020 Apr 15]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020 Jan-. [Figure, The Urinary Bladder, Vertical section...] Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK540963/figure/article-18355.image.f1/>

#### ΑΓΓΕΙΑ ΚΑΙ ΝΕΥΡΑ

Οι αρτηρίες της ουροδόχου κύστης είναι η άνω κυστική, κλάδος της ομφαλικής αρτηρίας και η κάτω κυστική, κλάδος της έσω λαγόνιας αρτηρίας. Μικροί κλάδοι, εκφυόμενοι από τη μέση αιμορροϊδική αρτηρία, συμβάλλουν στην αγγείωση του πυθμένα της κύστης. Ένα λεπτό υποβλεννογόνο φλεβικό δίκτυο μεταχωρεί σε σχηματισμό πυκνών φλεβικών πλεγμάτων στο τοίχωμα της κύστης. Τα πλέγματα αυτά συνδέονται με το αιδοϊκό και το προστατικό φλεβώδες πλέγμα και εκβάλλουν με τις κυστικές φλέβες στην έσω λαγόνια φλέβα. Τα λεμφαγγεία της κύστης φέρονται στους πρόσθιους και πλάγιους κυστικούς λεμφαδένες και τα λεμφαγγεία του κυστικού τριγώνου στους έσω λαγόνιους λεμφαδένες.

Η ουροδόχος κύστη νευρώνεται από νευρικές ίνες του κυστικού πλέγματος. Από αυτές, οι συμπαθητικές ίνες προέρχονται από την οσφυϊκή μοίρα του νωτιαίου μυελού και οι παρασυμπαθητικές ίνες από την ιερή μοίρα του παρασυμπαθητικού

## 2. ΕΠΙΔΗΜΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΚΙΝΔΥΝΟΥ ΤΟΥ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης (Bladder Cancer – BC), επίσης γνωστός ως ουροθηλιακό καρκίνωμα, είναι ο 10ος συχνότερος καρκίνος στον κόσμο, και η συχνότητά του αυξάνεται σταθερά, ειδικά στις ανεπτυγμένες χώρες. Δεν προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι το 90% των περιπτώσεων καρκίνου της ουροδόχου κύστης, ειδικά εκείνων του ανεπτυγμένου κόσμου, προκύπτουν από τα ουροθηλιακά κύτταρα, κυρίως στην ουροδόχο κύστη αλλά σε σπάνιες περιπτώσεις και σε άλλα σημεία του ουροποιητικού συστήματος. Οι εντοπισμένες μορφές ουροθηλιακού καρκίνου φέρουν μια εξαιρετική πρόγνωση, ενώ σε περίπτωση διήθησης του λείου μυός, τα ποσοστά επιβίωσης μειώνονται σημαντικά. Το πλακώδες καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης το οποίο ευθύνεται για το υπόλοιπο 10% των περιπτώσεων, είναι πιο διαδεδομένο στην Αφρική και πιθανώς σχετίζεται με την σχιστοσωμίαση (πρωτοζωική λοίμωξη).

Οι περισσότεροι όγκοι της ουροδόχου κύστης οφείλονται στην έκθεση σε περιβαλλοντικές και επαγγελματικές χημικές ουσίες, η κυριότερη από τις οποίες είναι μακράν ο καπνός (κάπνισμα). Το μεγαλύτερο ποσοστό ανδρών καπνιστών και η επαγγελματική έκθεση στους άνδρες μπορεί να βοηθήσει στην εξήγηση της μεταξύ των δύο φύλων διαφοράς στη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Ο σχετικός κίνδυνος καρκίνου της ουροδόχου κύστης λόγω έκθεσης σε καπνό είναι ο δεύτερος μετά από τον καρκίνο του πνεύμονα. Αν και το κάπνισμα έχει μειωθεί τις τελευταίες δεκαετίες στις ΗΠΑ, η θνησιμότητα από καρκίνο της ουροδόχου κύστης παρέμεινε σταθερή, κάτι το οποίο πιθανότατα οφείλεται σε «καθυστέρηση» εκδήλωσης από την προηγούμενη κατανάλωση καπνού. Στην πραγματικότητα, περίπου το 80% των περιπτώσεων καρκίνου της ουροδόχου κύστης διαγιγνώσκονται σε ενήλικες ηλικίας 65 ετών και άνω, γεγονός που αντικατοπτρίζει μια πορεία ασθένειας που απαιτεί δεκαετίες έκθεσης ή/και αναπτύσσεται δεκαετίες μετά την έκθεση. Ακόμη, κληρονομικές γενετικές

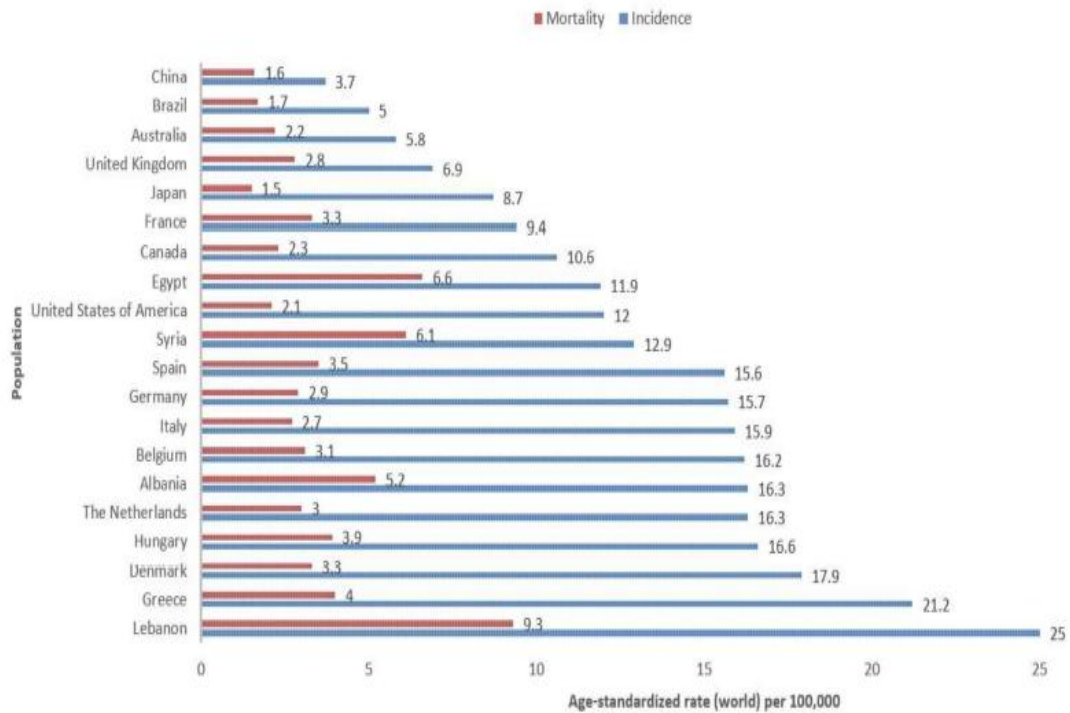
προδιαθέσεις έχουν εμπλακεί σε περίπου 7% των περιπτώσεων ουροθηλιακού καρκίνου (Saginala *et al.*, 2020).

## 2.1 Επιδημιολογία

### 2.1.1 Επιπτώσεις

Σύμφωνα με στοιχεία του GLOBOCAN, περίπου 550.000 άτομα διαγνώστηκαν με καρκίνο της ουροδόχου κύστης το 2018. Αυτό αντιπροσωπεύει περίπου το 3% όλων των νέων διαγνώσεων καρκίνου (**Εικόνα 2**). Οι χώρες με τα υψηλότερα ποσοστά ουροθηλιακού καρκινώματος βρίσκονται κατά πλειοψηφία στη Νότια και τη Δυτική Ευρώπη καθώς και στη Βόρεια Αμερική. **Η Ελλάδα έχει το υψηλότερο ποσοστό καρκίνου της ουροδόχου κύστης στους άνδρες**, ενώ ο Λίβανος έχει το υψηλότερο ποσοστό στις γυναίκες. Ωστόσο, η περιοχή με το υψηλότερο ποσοστό καρκίνου της ουροδόχου κύστης είναι η Νότια Ευρώπη όπου περίπου 26,5 / 100.000 άνδρες και 5,5 / 100.000 γυναίκες αναπτύσσουν την ασθένεια κάθε χρόνο. Οι περιοχές με τη χαμηλότερη συχνότητα εμφάνισης ουροθηλιακού καρκίνου περιλαμβάνουν τη Μέση Αφρική, Κεντρική Αμερική και Δυτική Αφρική, αποτελούμενη σε μεγάλο βαθμό από έθνη που είναι κάτω του μέσου όρου του δείκτη ανθρώπινης ανάπτυξης (Human Development Index - HDI), πιθανώς λόγω της χαμηλότερης έκθεσης στις βιομηχανικές χημικές ουσίες και της περιορισμένης πρόσβασης στον καπνό. Στην πραγματικότητα, η συχνότητα εμφάνισης του ουροθηλιακού καρκίνου έχει συσχετιστεί θετικά με τον HDI και, σε μικρότερο βαθμό, με το κατά κεφαλήν ΑΕΠ (Ακαθάριστο Εγχώριο Προϊόν).





30

**Εικόνα 2: Ραβδογράφημα που υποδεικνύει παγκοσμίως οι εκτιμώμενες αναλογίες επίπτωσης και θνησιμότητας από ουροθηλιακό καρκίνο το 2018. Κόκκινο: θνησιμότητα. Μπλε: επίπτωση. Τα δεδομένα ελήφθησαν από το Globocan 2018 (Saginala *et al.*, 2020).**

Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής (ΗΠΑ), το 2019 διαγνώσθηκαν περίπου 80.500 περιπτώσεις Ο.Κ., που αντιπροσωπεύει το 4,6% όλων των διαγνώσεων καρκίνου (μεγαλύτερη από τον παγκόσμιο μέσο όρο). Αυτό κάνει τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης την 6<sup>η</sup> πιο κοινή διάγνωση καρκίνου στις ΗΠΑ. Η συχνότητα εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης στις ΗΠΑ αυξήθηκε από 19,3 / 100.000 το 1975 σε 21,6 / 100.000 το 1987 και έκτοτε μειώθηκε σταθερά σε σχέση με τις τελευταίες δεκαετίες σε 18,1 / 100.000 το 2016. Σε πολλά ευρωπαϊκά έθνη, όπως η Γερμανία και η Βουλγαρία, τα ποσοστά εμφάνισης ουροθηλιακού καρκίνου συνέχισαν να αυξάνονται και αναμένεται να αυξηθούν ακόμη περισσότερο, λόγω μεγαλύτερης επικράτησης του καπνίσματος και γήρανσης του πληθυσμού. Άλλες χώρες έχουν σημειώσει σημαντική πρόοδο στην πρόληψη, με σχεδόν 11% μείωση της επίπτωσης στη Νέα Ζηλανδία τα τελευταία 10 χρόνια.

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι τέσσερις φορές πιο συχνός στους άνδρες από τις γυναίκες, με αντίστοιχη συχνότητα 9,6 / 100.000 μεταξύ των ανδρών και 2,4 / 100.000 μεταξύ των γυναικών παγκοσμίως. Μεταξύ των ανδρών, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι το 6<sup>ο</sup> συχνότερο και το 9<sup>ο</sup> πιο θανατηφόρο νεόπλασμα. Αυτή η διαφορά μεταξύ των φύλων πιθανότατα αποδίδεται περισσότερο σε διαφορές μεταξύ τους στο κάπνισμα, κάτι που μπορεί επίσης να εξηγεί την αύξηση εμφάνισης του ουροθηλιακού καρκίνου. μεταξύ των γυναικών στον ανεπτυγμένο κόσμο. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, το 50% - 65% των περιπτώσεων ουροθηλιακού καρκίνου εκτιμάται ότι οφείλεται στο κάπνισμα, τον μεγαλύτερο παράγοντα κινδύνου της ασθένειας. Ο αποδιδόμενος κίνδυνος στο κάπνισμα έχει πρόσφατα γίνει παρόμοιος μεταξύ γυναικών και ανδρών. 90% των νέων διαγνώσεων ουροθηλιακού καρκίνου στις ΗΠΑ είναι σε άτομα ηλικίας 55 ετών και άνω, ενώ η μέση ηλικία διάγνωσης είναι τα 73 έτη.

### 2.1.2 Θνησιμότητα

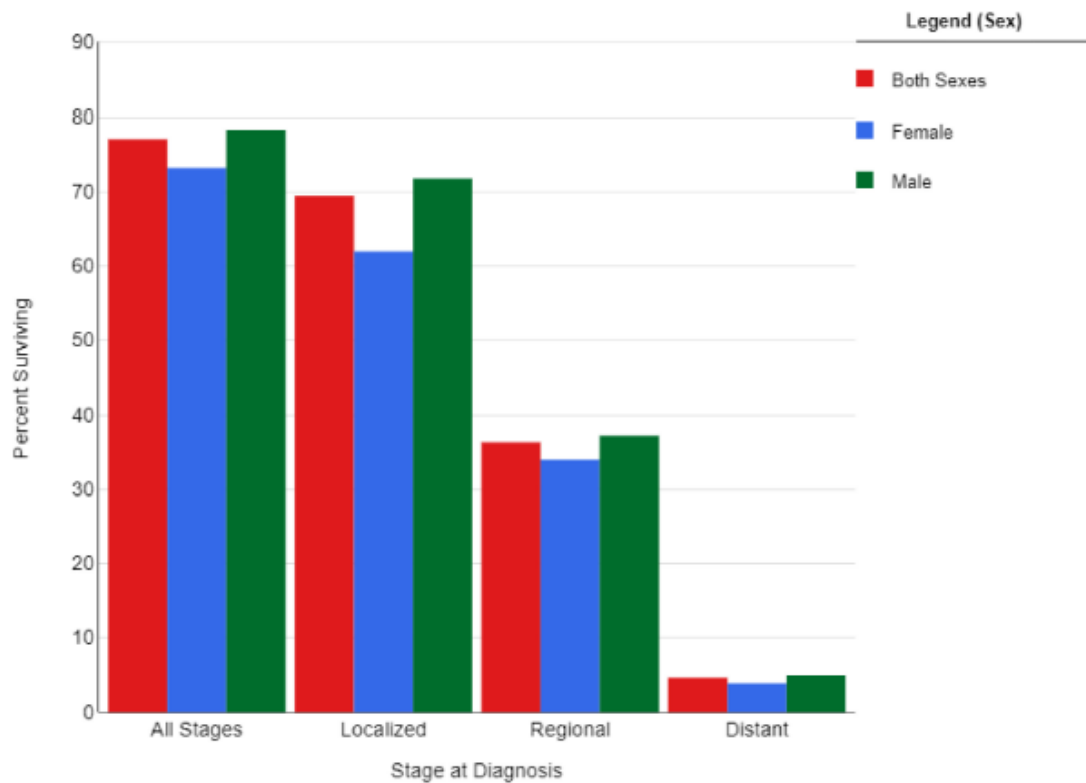
Ενώ ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι ο 10<sup>ος</sup> πιο συχνά εμφανιζόμενος σε όλο τον κόσμο και ο 5<sup>ος</sup> συχνότερος στο δυτικό κόσμο, είναι ο 13<sup>ος</sup> πιο θανατηφόρος και εκτιμάται ότι προκάλεσε σχεδόν 200.000 θανάτους το 2018. Ο αριθμός αυτός αποτελεί το 2,1% όλων των θανάτων από καρκίνο. Τα ποσοστά θνησιμότητας αντικατοπτρίζουν τα ποσοστά επίπτωσης ως προς την ανισότητα μεταξύ των φύλων, με θνησιμότητα 3,2 / 100.000 άνδρες, που είναι περίπου τέσσερις φορές μεγαλύτερο από αυτό των γυναικών παγκοσμίως (0,9 / 100.000). Ο σωρευτικός κίνδυνος του θανάτου από καρκίνο της ουροδόχου κύστης μεταξύ της γέννησης και της ηλικίας των 73 είναι 0,29% μεταξύ των ανδρών και 0,08% μεταξύ γυναικών. Η θνησιμότητα είναι μεγαλύτερη στη Βόρεια και Ανατολική Αφρική και στη Μέση Ανατολή, όπου η μόλυνση από σχιστόσωμα οδηγεί σε υψηλά ποσοστά επίπτωσης. Η υψηλότερη θνησιμότητα παρατηρείται στην Αίγυπτο στα 6,6 / 100.000.

Υπολογίζεται ότι 17.600 άτομα κατέληξαν από καρκίνο της ουροδόχου κύστης στις ΗΠΑ το 2019. Αυτό το ποσοστό αντιπροσωπεύει 2,9% όλων των θανάτων από καρκίνο, που είναι χαμηλότερο από την επίπτωση ως ποσοστό όλων των καρκίνων (4,6%), αντανακλώντας την επιβίωση άνω του μέσου όρου της νόσου (σε σχέση με άλλα καρκινώματα). Αν και η επίπτωση έχει μειωθεί τις τελευταίες δεκαετίες, η θνησιμότητα παρέμεινε σταθερή στο 4,4 / 100.000 από το 1987. Ωστόσο, το γεγονός αυτό αντιπροσωπεύει μια βελτίωση από την πρώτη καταγεγραμμένη θνησιμότητα στις ΗΠΑ το 1975 (5.5 / 100.000). Η πτώση της θνησιμότητας έχει σταματήσει τις τελευταίες δεκαετίες παρά τη βελτίωση των τεχνικών έγκαιρης διάγνωσης, εκτομής και στοχευμένης θεραπείας. Παγκοσμίως υπήρξε σημαντική μείωση της θνησιμότητας από ουροθηλιακό καρκίνο παρά την αύξηση της επίπτωσης. Ωστόσο, τα ποσοστά θνησιμότητας έχουν αυξηθεί σε αρκετές χώρες, όπως την Ισλανδία, το Εκουαδόρ και τις Φιλιππίνες (Saginala *et al.*, 2020).

### 2.1.3 Επιβίωση

Το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης στις ΗΠΑ είναι 77,1%. Η 5ετής επιβίωση είναι 95,8% μεταξύ των *in situ* περιπτώσεων (που αποτελούν το 51% όλων των διαγνώσεων), 69,5% για την τοπική νόσο (34% όλων των περιπτώσεων), 36,3% για την περιοχική νόσο (7% όλων των περιπτώσεων) και μόνο 4,6% επιβίωση για μεταστατική νόσο (5% όλων των περιπτώσεων) (**Εικόνα 3**). Αυτές οι στατιστικές αντικατοπτρίζουν την αποτελεσματικότητα της έγκαιρης διάγνωσης, καθώς και την κακή πρόγνωση του μεταστατικού ουροθηλιακού καρκίνου. Το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης στις ΗΠΑ έχει αυξηθεί τις τελευταίες 4 δεκαετίες από 71,9% το 1975 σε 79,3% το 2011. Το ποσοστό 10ετούς επιβίωσης στις ΗΠΑ είναι 70% και αυτό 15ετούς επιβίωσης είναι 65% (Saginala *et al.*, 2020).

**Urinary Bladder (Invasive & In Situ) Cancer  
5-Year SEER Relative Survival Rates, 2009-2015  
By Stage at Diagnosis and Sex  
All Races (includes Hispanic), All Ages**



**Εικόνα 3 :** Το ποσοστό 5ετούς επιβίωσης από καρκίνο της ουροδόχου κύστης (Διηθητικός & In Situ), την περίοδο 2009–2015 με βάση το στάδιο κατά τη διάγνωση και το φύλο στις ΗΠΑ. **Κόκκινο:** και τα 2 φύλα, **μπλε:** θήλυ, **πράσινο:** άρρεν. Πηγή δεδομένων: Αρχεία θνησιμότητας των ΗΠΑ, Εθνικό Κέντρο Στατιστικών Υγείας, CDC (Saginala *et al.*, 2020).

## 2.2 Αιτιολογία του ουροθηλιακού καρκίνου ουροδόχου κύστης

Το ουροθηλιακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης αντιπροσωπεύει το 90% των περιπτώσεων καρκίνου της ουροδόχου κύστης παγκοσμίως και είναι ιδιαίτερα κοινό στις ανεπτυγμένες χώρες. Σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με την έκθεση σε χημικές ουσίες (π.χ. επαγγελματική έκθεση) και το κάπνισμα, λόγω της άμεσης έκθεσης του ουροθηλίου. Αυτοί οι όγκοι δεν περιορίζονται, όμως, στο ουροθήλιο και διηθούν την υποβλεννογόνια στιβάδα, το χόριο και στη μυική στιβάδα. Μπορούν επίσης να εξαπλωθούν απευθείας σε παρακείμενες πυελικές δομές, συμπεριλαμβανομένων του προστάτη, της ουρήθρας, της μήτρας και του κόλπου. Η λεμφική μετάσταση εμφανίζεται στους θυρεοειδείς, τους προϊερούς, τους λαγόνιους και του παραορτικούς λεμφαδένες, ενώ η αιματογενής εξάπλωση συνήθως οδηγεί σε μεταστάσεις στο ήπαρ, τους πνεύμονες, τα οστά και επινεφρίδια και σχετίζεται με κακή πρόγνωση. Το 5% των παγκόσμιων περιπτώσεων καρκίνου της ουροδόχου κύστης προέρχονται από πλακώδη κύτταρα, και αυτές οι περιπτώσεις παρατηρούνται κυρίως στην Αφρική, πιθανώς λόγω της σχιστοσωμίας, μιας πρωτοζωϊκής λοίμωξης που προωθεί τη φλεγμονή. Τέλος, το υπόλοιπο 5% αποτελείται από σπάνιους υποτύπους όπως το αδενοκαρκίνωμα, το σάρκωμα, και μεταστατικά καρκινώματα στην ουροδόχο κύστη.

### 2.2.1 Παράγοντες Κινδύνου

#### □ Φύλο

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης είναι περίπου τέσσερις φορές πιο πιθανό να διαγνωστεί σε άνδρες από ό, τι σε γυναίκες παγκοσμίως. Η θνησιμότητα είναι επίσης περίπου τέσσερις φορές μεγαλύτερη στους άνδρες. Μεγάλο μέρος αυτής της ασυμφωνίας μπορεί να αποδοθεί στα διαφορετικά ποσοστά καπνίσματος, με τον σχετικό κίνδυνο θανάτου από ουροθηλιακό καρκίνο μεταξύ των καπνιστών να είναι ακόμη υψηλότερη στους άνδρες από τις γυναίκες (3,0 έναντι 2,4). Ορισμένες χώρες όπου το κάπνισμα είναι πολιτιστικά διαδεδομένο στις γυναίκες, εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλά ποσοστά ουροθηλιακού καρκίνου, με το Λίβανο να έχει τη μεγαλύτερη συχνότητα στις γυναίκες παγκοσμίως. Άλλοι υποθετικοί παράγοντες

προδιάθεσης στους άντρες περιλαμβάνουν την επαγγελματική έκθεση σε χημικά, την κατανάλωση αλκοόλ και κόκκινου κρέατος. Σε άνδρες και γυναίκες, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης εμφανίζεται περίπου 6 χρόνια νωρίτερα στους καπνιστές έναντι των μη καπνιστών (Saginala *et al.*, 2020).

#### □ **Ηλικία**

Ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης αποτελεί κατά κύριο λόγο μια νόσο μεγαλύτερης ηλικίας, με το 90% των διαγνώσεων σε άτομα άνω των 55 ετών, και 80% των διαγνώσεων άνω των 65 στις ΗΠΑ. Η μέση ηλικία για τη διάγνωση του καρκίνου της ουροδόχου κύστης στις ΗΠΑ είναι τα 73 έτη. Αυτό είναι μεγαλύτερο από τη μέση ηλικία διάγνωσης καρκίνου (ηλικίας 65-70 ετών), υποδεικνύοντας μια πορεία ασθένειας που απαιτεί δεκαετίες μετά την έκθεση σε μεταλλαξιγόνες ουσίες σε συνδυασμό με αντίσταση στους ογκοκατασταλτικούς κυτταρικούς μηχανισμούς για να καταλήξει στην εκδήλωση καρκίνου. Αν και εξαιρετικά σπάνια, ο ουροθηλιακός καρκίνος μπορεί να παρατηρηθεί σε παιδιά και νεαρούς ενήλικες, όπου συνήθως εμφανίζεται με χαμηλόβαθμης κακοήθειας, μη διηθητική ασθένεια (Saginala *et al.*, 2020).

#### □ **Κληρονομικοί και Γενετικοί Παράγοντες**

Ενώ οι μελέτες δεν κατάφεραν να αποκαλύψουν σημαντικές μεταλλάξεις γαμετικών κυττάρων που να συσχετίζονται με σποραδικό ουροθηλιακό καρκίνο, πολλοί γενετικοί τόποι έχουν βρεθεί να έχουν μια μέτρια συσχέτιση με αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης του ουροθηλιακού καρκίνου. Μεταξύ αυτών είναι το MYC που αποτελεί μόριο κυτταρικής σηματοδότησης και κοινό ογκογόνο, το NAT2 (N-acetyltransferase 2), ένας αργός ακετυλιωτής που λειτουργεί για την αποτοξίνωση των αρωματικών αμινών και το GSTM1 (Glutathione S-transferase M1) ένζυμο που εμπλέκεται στην αποτοξίνωση άλλων περιβαλλοντικών καρκινογόνων ουσιών. Τα

δύο τελευταία (NAT2 και GSTM1) φαίνεται, επίσης, να έχουν συνεργιστική καρκινογόνα δράση με το κάπνισμα.

Ενώ ο ουροθηλιακός καρκίνος συνήθως δεν θεωρείται κληρονομικός, ορισμένα καρκινικά σύνδρομα προδιαθέτουν τον κίνδυνο για εμφάνισή του. Ένα παράδειγμα είναι το σύνδρομο Cowden, όπου μια κληρονομική μετάλλαξη στο ογκοκατασταλτικό γονίδιο PTEN προδιαθέτει σε μια μεγάλη ποικιλία νεοπλασμάτων, συμπεριλαμβανομένου του πλακώδους ουροθηλιακού καρκινώματος. Δεύτερο παράδειγμα αποτελεί το σύνδρομο Lynch, όπου δυσλειτουργεί η επιδιόρθωση λαθών σε ζεύγη βάσεων του DNA κατά την αντιγραφή (Mismatch Repair – γονίδια MMR) και σχετίζεται με μη πολυποδικό καρκίνο του παχέος εντέρου, αλλά αυξάνει και τον κίνδυνο για άλλα καρκινώματα, μεταξύ αυτών και του ουροθηλιακού καρκίνου. Οι ασθενείς αυτοί είναι ιδιαίτερα ευαίσθητοι στην ανοσοθεραπεία.

Σωματικές μεταλλάξεις του υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα των ινοβλαστών **FGFR** παρατηρούνται σε έως και 20% των υποτροπιαζόντων ασθενών με ουροθηλιακό καρκίνο, με αποτέλεσμα την έγκριση του αναστολέα της τυροσινικής κινάσης Erdafitinib ως θεραπεία μεταγενέστερης γραμμής. Τέλος, όπως σε πολλά νεοπλάσματα, οι μεταλλάξεις του **p53** εμπλέκονται στην καρκινογένεση του ουροθηλιακού καρκινώματος και δύναται ακόμη να έχουν προγνωστική αξία (Malats *et al.*, 2005), (Saginala *et al.*, 2020) .

#### □ **Κάπνισμα**

Το κάπνισμα είναι μακράν ο κυριότερος παράγοντας κινδύνου για καρκίνο της ουροδόχου κύστης, που αντιπροσωπεύει περίπου 50–65% των νέων περιπτώσεων κάθε χρόνο. Έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο εμφάνισης ουροθηλιακού καρκίνου κατά 3 έως 4 φορές. Ο σχετικός κίνδυνος θνησιμότητας από καρκίνο της ουροδόχου κύστης λόγω καπνίσματος είναι δεύτερος μετά τον καρκίνο του πνεύμονα, που είναι η πρώτη αιτία θανάτου από καρκίνο στον κόσμο. Ο καπνός περιέχει γνωστές καρκινογόνες ουσίες όπως η β-ναφθυλαμίνη και οι πολυκυκλικοί

αρωματικοί υδρογονάνθρακες. Οι ουσίες αυτές προάγουν τη φλεγμονή και ο μεταβολισμός τους, στην ουροδόχο κύστη και σε όλο τον οργανισμό, καταλήγει σε μόνιμη γενετική μετάλλαξη. Τέτοιες μεταλλάξεις μπορούν να ενεργοποιήσουν τα ογκογονίδια ή να απενεργοποιήσουν τα ογκοκατασταλτικά γονίδια, προάγοντας την καρκινογένεση. Ορισμένοι κληρονομούμενοι πολυμορφισμοί που ταυτίζονται με ανώμαλα ένζυμα αποτοξίνωσης έχει δειχθεί ότι αυξάνουν την ευαισθησία στον καρκίνο μεταξύ των καπνιστών.

Η μεγαλύτερη ηλικία εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης υποδηλώνει μια περίοδο καθυστέρησης περίπου 30 ετών από την έναρξη του καπνίσματος ως τη διάγνωση του καρκίνου. Ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι η διακοπή του καπνίσματος μείωσε τον κίνδυνο για ουροθηλιακό καρκίνωμα κατά περίπου 40% μέσα σε μόλις 1-4 χρόνια και μετά από 20 περίπου έτη τείνει να είναι περίπου ίδιος με αυτόν των μη - καπνιστών, υποδηλώνοντας μια μη γραμμική σχέση μεταξύ της συχνότητας εμφάνισης και των ετών καπνίσματος. Μια μετα-ανάλυση 14 μελετών από τους Yan *et al.* έδειξε ότι υπήρχε 22% αυξημένος κίνδυνος καρκίνου της ουροδόχου κύστης από παθητικό κάπνισμα σε μη καπνιστές, σε σύγκριση με τον μη εκτεθειμένο πληθυσμό μη καπνιστών (Yan *et al.*, 2018), (Saginala *et al.*, 2020).

#### □ Περιβαλλοντική και επαγγελματική έκθεση

Ο δεύτερος μεγαλύτερος παράγοντας κινδύνου για καρκίνο της ουροδόχου κύστης είναι η επαγγελματική έκθεση σε καρκινογόνες ουσίες, συμπεριλαμβανομένων αρωματικών αμινών, πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και χλωριωμένων υδρογονανθράκων. Αυτές οι ενώσεις απαντώνται συνήθως στη βιομηχανική παραγωγή βαφών, προϊόντων μετάλλου, καουτσούκ ή πετρελαίου. Μεταξύ εκείνων στη βιομηχανία καουτσούκ, μια αυξημένη θνησιμότητα κατά 253 φορές αναφέρθηκε για όσους βρίσκονται στον τομέα «αποθήκευσης και αποστολής» και κατά 159 φορές για όσους έχουν «γενική εργασία» στη βιομηχανία. Άλλα επαγγέλματα που εμπλέκονται σε ένα μεγαλύτερο κίνδυνο καρκίνου της ουροδόχου κύστης περιλαμβάνουν πυροσβέστες, κομμωτές



και αγρότες που χρησιμοποιούν μυκητοκτόνα. Συνολικά, εκτιμάται ότι οι επαγγελματικές εκθέσεις ευθύνονται για το 18% των περιπτώσεων καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Παρά το γεγονός ότι έκθεση για 2 χρόνια φαίνεται να είναι επαρκής για να αυξήσει τον κίνδυνο εμφάνισης ουροθηλιακού καρκίνου, η ασθένεια συχνά δεν αναπτύσσεται μέχρι δεκαετίες μετά την έκθεση.

Μια μεγάλη προοπτική μελέτη παρατήρησης από τη Χιλή έδειξε ότι η έκθεση στο αρσενικό (Ars), ένα φυσικά παρατηρούμενο μέταλλο στον αέρα, το έδαφος και το νερό, αύξησε επίσης τον κίνδυνο ουροθηλιακού καρκίνου (Marshall *et al.*, 2007). Επιπλέον, μια άλλη μελέτη από τη Φινλανδία διαπίστωσε ότι η έκθεση σε χαμηλή συγκέντρωση αρσενικού (0,5 g / L) και καπνού είχε συνεργιστική επίδραση στην αύξηση του κινδύνου καρκίνου της ουροδόχου κύστης (Kurttio *et al.*, 1999). Άλλες καρκινογόνες ουσίες στην παροχή νερού, όπως παραπροϊόντα απολύμανσης ή νιτρικά άλατα, μαζί με μέταλλα στη διατροφή όπως το σελήνιο και ο ψευδάργυρος, θα μπορούσαν επίσης να τροποποιήσουν τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης (Saginala *et al.*, 2020).

#### Κατανάλωση αλκοόλ

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι το αλκοόλ μπορεί να αυξήσει ελαφρώς τον κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του ουροθηλίου, αν και αυτή η αύξηση δεν έχει αποδειχθεί στατιστικά σημαντική (Maurice P. A. Zeegers, *et al.* 2001). Το αλκοόλ εμπλέκεται κυρίως στην ανάπτυξη άλλων καρκίνων, όπως το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα και το καρκίνωμα παχέος εντέρου (Saginala *et al.*, 2020).

#### Κόκκινο κρέας

Μια πρόσφατη μετα-ανάλυση διαπίστωσε ότι η υψηλή πρόσληψη κόκκινου και επεξεργασμένου κρέατος αύξησε τον κίνδυνο κατά 17% και 10%, αντίστοιχα (Wang and Jiang, 2012). Μια διαφορετική ανασκοπική μελέτη διαπίστωσε αύξηση 22% για επεξεργασμένα κρέατα, αλλά καμία στατιστικά σημαντική αύξηση από τα κόκκινα

κρέατα. Η απόκλιση αποδόθηκε στα διαφορετικά επίπεδα καθορισμού της υψηλής κατανάλωσης κρέατος (Li *et al.*, 2014). Έχει αποδειχθεί ότι οι νιτροζαμίνες από νιτρικά άλατα στα επεξεργασμένα κρέατα προκαλούν άμεσα την ανάπτυξη όγκων της ουροδόχου κύστης σε τρωκτικά (Sun *et al.*, 2015). Μάλιστα, ως γνωστόν, το κόκκινο και επεξεργασμένο κρέας εμπλέκεται έντονα στην εμφάνιση καρκίνου του παχέος εντέρου, οδηγώντας τον Διεθνή Οργανισμό Έρευνας Καρκίνου (International Agency for Cancer Research) στον χαρακτηρισμό του μεταποιημένου κρέατος ως καρκινογόνου ομάδας 1 και του κόκκινου κρέατος ως πιθανού καρκινογόνου, το 2015 (Adeyeye *et al.*, 2018). Εν τω μεταξύ, η κατανάλωση πουλερικών και χοιρινού κρέατος δεν έχει αποδειχθεί ότι αυξάνει τον κίνδυνο καρκίνου της ουροδόχου κύστης (Lippi, *et al.*, 2016) (Saginala *et al.*, 2020).

#### □ Παχυσαρκία

Μιά μετα-ανάλυση 15 κοορτών διαπίστωσε ότι η προ-παχυσαρκία αυξάνει τον κίνδυνο καρκίνου της ουροδόχου κύστης κατά 7% ενώ η παχυσαρκία αυξάνει τον κίνδυνο κατά 10%. Μια γραμμική σχέση μεταξύ ΔΜΣ (Δείκτης Μάζας Σώματος) και κινδύνου ουροθηλιακού καρκίνου αποκαλύφθηκε με αύξηση βάρους 5 kg / m<sup>2</sup> που σχετίζεται με αύξηση κατά 4,2% του κινδύνου εμφάνισης καρκίνου, ανεξάρτητα από άλλους παράγοντες όπως το κάπνισμα, τη σωματική δραστηριότητα, το αλκοόλ ή τη διατροφή (Sun *et al.*, 2015). Αν και η παχυσαρκία σχετίζεται με πολλές μορφές καρκίνου, ο βιολογικός μηχανισμός που εξηγεί τη συσχέτιση δεν είναι καλά διευκρινισμένος. Η παχυσαρκία αυξάνει την παραγωγή ινσουλίνης και του αυξητικού παράγοντα τύπου ινσουλίνης 1 (Insulin – like Growth Factor – 1 - IGF-1) μόρια που τροποποιούν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την αγγειογένεση και την απόπτωση. Η παχυσαρκία προάγει, επίσης, τη χρόνια φλεγμονή μεταβάλλοντας τα επίπεδα των κυτοκινών, ξεκινώντας έτσι έναν «άνοσο – καταρράκτη» που τελικά προάγει την καρκινογένεση. Τέλος, η σωματική δραστηριότητα φαίνεται να έχει προστατευτική δράση κατά του ουροθηλιακού καρκίνου ανεξαρτήτως παχυσαρκίας (Saginala *et al.*, 2020).

#### □ Παθογόνοι μικροοργανισμοί

Η πρωτοζωική σχιστοσωμίαση μολύνει περίπου 240 εκατομμύρια ανθρώπους παγκοσμίως από την έκθεση σε γλυκά νερά και έρχεται δεύτερη μετά την ελονοσία στις ασθένειες που προκαλούνται από τροπικό παθογόνο. Στην πραγματικότητα, το πλακώδες καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης είναι η δεύτερη πιο κοινή μορφή καρκίνου σε περιοχές της Μέσης Ανατολής και της Αφρικής όπου η σχιστοσωμίαση είναι ενδημική (μετά από τον καρκίνο του ήπατος, που σχετίζεται επίσης με το παθογόνο). Σε αυτές τις περιοχές, η μέση ηλικία εμφάνισης καρκίνου της ουροδόχου κύστης είναι μεταξύ 40-49 ετών (σε αντίθεση με τη μέση ηλικία των 70 ετών στο μεγαλύτερο μέρος του ανεπτυγμένου κόσμου). Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι ακόμη και αυτές οι περιοχές κατέδειξαν 4-5 φορές μεγαλύτερο κίνδυνο εμφάνισης ουροθηλιακού καρκίνου στους άνδρες από τις γυναίκες, πιθανώς λόγω της μετάδοσης της σχιστοσωμίας μέσω γεωργικών δραστηριοτήτων που συνήθως πραγματοποιούνται από άνδρες. Η λοίμωξη από σχιστόσωμα της ουροδόχου κύστης έχει αποδειχθεί ότι προκαλεί επιμόλυνση από βακτήρια που παράγουν καρκινογόνα (π.χ. N-νιτροζο-ενώσεις). Η μόλυνση προάγει επίσης φλεγμονή, προκαλώντας ενδογενή σύνθεση N-νιτροζαμινών καθώς και ελεύθερων ριζών οξυγόνου που καταστρέφουν το DNA. Η πορεία της νόσου φαίνεται να συμβαίνει πολύ ταχύτερα από την αντίστοιχη προκαλούμενη από τον καπνό ή τη χημική έκθεση και μπορεί να προληφθεί με έλεγχο παρασίτων μέσω του αντι-ελμινθικού παράγοντα, praziquantel (Saginala *et al.*, 2020).

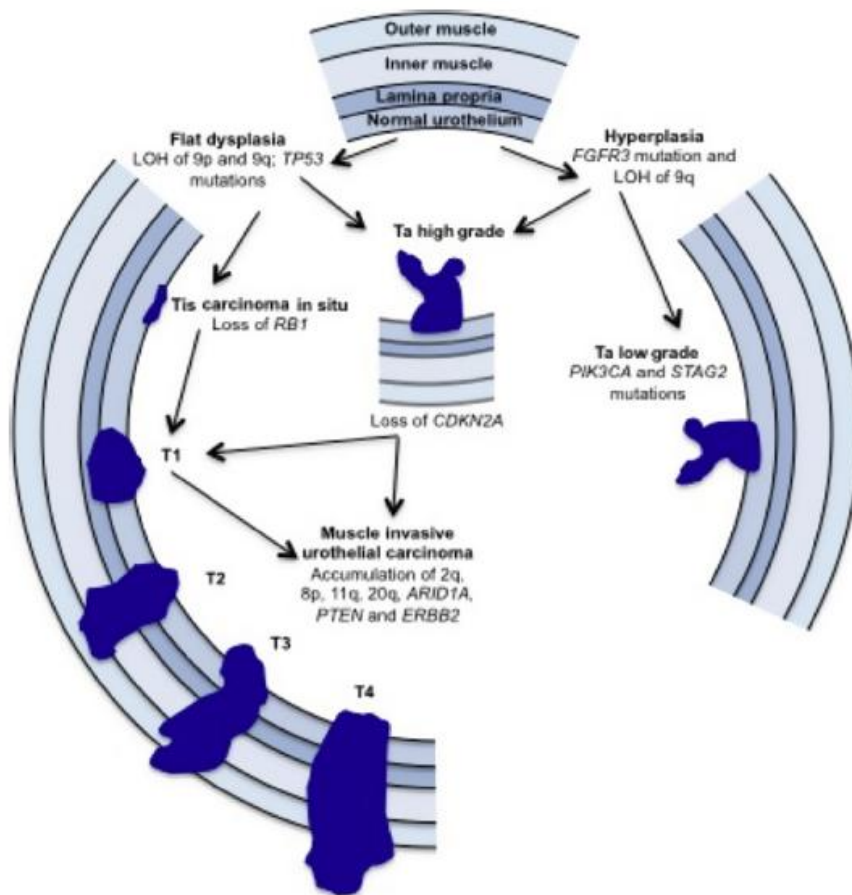
### 3. ΠΑΘΟΛΟΓΟΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΩΝ ΟΓΚΩΝ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΕΩΣ – ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Οι πρωτοπαθείς όγκοι της ουροδόχου κύστης κατηγοριοποιούνται ανάλογα με το είδος των κυττάρων από τα οποία προέρχονται, μετά από μικροσκοπική παρατήρηση του ιστοτεμαχίου της βιοψίας. Οι **βασικοί ιστολογικοί τύποι** είναι οι εξής:

- **Ουροθηλιακό καρκίνωμα:** Αποτελεί το συχνότερο τύπο καρκίνου της κύστης με ποσοστό 90% επί των καρκίνων ουροδόχου κύστης στις χώρες του Δυτικού κόσμου. Με αυτόν τον τύπο ασχολείται και η παρούσα μελέτη. Εναλλακτικά, αναφέρεται και ως καρκίνωμα μεταβατικών κυττάρων, διότι προέρχεται από τα κύτταρα του μεταβατικού επιθηλίου / ουροθηλίου που καλύπτει το εσωτερικό τοίχωμα της ουροδόχου κύστης. Οι όγκοι της κύστης από μεταβατικό επιθήλιο, μονήρεις ή πολλαπλοί συνήθως παρουσιάζουν μορφή θηλώματος, με λεπτή βάση που επικάθεται στην επιφάνεια της κύστης και με πολλαπλές προεκβολές που προσδίδουν θυσανωτή όψη. Αυτοί ακολουθούν το θηλώδες πρότυπο και συνηθίζουν να είναι επιφανειακοί, χωρίς όμως αυτό να είναι απαραίτητο πάντα, καθώς υπεισέρχονται στοιχεία για το βαθμό κακοήθειας. Σπανιότερα, οι όγκοι δεν ακολουθούν το θηλώδες πρότυπο, αλλά εμφανίζονται συμπαγείς, με ευρεία βάση πρόσφυσης, ανάπτυξη κυρίως κατά πλάτος και ανώμαλη επιφάνεια. Οι μη θηλώδεις όγκοι συνηθίζουν να είναι διηθητικοί και να αποτελούνται από πτωχά διαφοροποιημένα κύτταρα.
- **Πλακώδες καρκίνωμα:** Αποτελεί μόλις το 4% των νεοπλασμάτων της κύστης και συνήθως έχει άμεση σχέση με το χρόνιο ερεθισμό του οργάνου και με την ύπαρξη χρόνιου ιστορικού λοιμώξεων και περιβάλλοντος φλεγμονής. Μπορεί να προκληθεί με παρουσία μόνιμου καθετήρα ή λίθων στην κύστη. Σχετίζεται άμεσα με τη σχιστοσωμίαση όπως έχει αναφερθεί παραπάνω. Σχεδόν όλα τα καρκινώματα αυτού του τύπου είναι διηθητικά.

- **Αδενοκαρκίνωμα:** Πολύ σπάνιος τύπος που αποτελεί το <1% των καρκινωμάτων της κύστης. Σχετίζεται και αυτός με έδαφος χρόνιας φλεγμονής και παρουσία αδενικών στοιχείων στην κύστη. Συνήθως τα αδενοκαρκινώματα του θόλου της κύστης οφείλονται σε εμβρυολογικά κατάλοιπα αδενικών κυττάρων που παραμένουν μετά τη φυσιολογική εξαφάνιση του ουραχού (χορδή που συνδέει την κύστη με τον ομφαλό). Εμφαίνεται κυρίως σε νεότερους ασθενείς και σχεδόν όλα τα καρκινώματα αυτού του τύπου είναι διηθητικά.
- **Μικροκυτταρικό καρκίνωμα:** Εξαιρετικά σπάνιο (<1% του συνόλου των όγκων της κύστης).
- **Μεταστατικές νεοπλασίες:** συνήθως από καρκίνο νεφρού, προστάτη, ωοθηκών ή εντέρου (και με αντίθετη σειρά από την κύστη στα προαναφερθέντα όργανα).
- **Καρκίνωμα in situ (CIS):** Πρώιμη μορφή καρκίνου που συνήθως εμφανίζεται σε επιθηλιακού ιστούς, όπως το ουροθήλιο. Παρουσιάζει έντονη κυτταρική πολυμορφία, μικρή κυτταρική διαφοροποίηση και παρά το γεγονός ότι έχει χαρακτηριστικά κακοήθειας, ιστολογικά δε φαίνεται να διηθεί τη βασική μεμβράνη. Παρακάτω αναφέρεται αναλυτικότερα.
- **Άλλοι όγκοι με επιθηλιακή (καρκινοσάρκωμα, μελάνωμα κ.τ.λ.) ή και μη επιθηλιακή προέλευση (φαιοχρωμοκύτωμα, πρωτοπαθές λέμφωμα κ.τ.λ.).**

Για τη διαδικασία της καρκινογένεσης του ουροθηλιακού καρκίνου θεωρείται σημαντική η πορεία μέσω των **δύο διακριτών οδών:** α) της οδού με το **θηλώδες πρότυπο ανάπτυξης** που χαρακτηρίζει μονήρεις ή πολλαπλούς όγκους, που συνήθως παρουσιάζουν μορφή θηλώματος, με λεπτή βάση, το οποίο επικάθεται στην επιφάνεια της κύστης και με πολλαπλές προεκβολές με θυσανωτή όψη και β) της οδού με το μη-θηλώδες πρότυπο, που χαρακτηρίζει κυρίως συμπαγείς όγκους με εκτεταμένη βάση πρόσφυσης, ανάπτυξη κατά πλάτος και ανώμαλη μορφολογική επιφάνεια (**Εικόνες 4, 7**).



Εικόνα 4: Σταδιοποίηση του ουροθηλιακού καρκινώματος της ουροδόχου κύστης σύμφωνα με το σύστημα TNM (Tumor – Nodes – Metastasis) καθώς και τα 2 διαφορετικά μοριακά μονοπάτια μεταλλάξεων που οδηγούν στην ογκογένεση (Knowles και Hurst): Οι όγκοι T1 διηθούν τη βασική μεμβράνη, οι T2 τον μυϊκό ιστό, οι T3 διηθούν τον περικυστικό λιπώση ιστό και οι T4 τους παρακείμενους ιστούς και όργανα. Απεικονίζονται τα μόρια «οδηγοί» στην ανάπτυξη των 2 διαφορετικών ογκογενετικών οδών. LOH = loss of heterozygosity (Απώλεια Ετεροζυγωτίας) (Bertz *et al.*, 2017).

Η ταξινόμηση της WHO/ISUP Consensus (2016) προκύπτει από την συναίνεση των WHO (World Health Organisation) και ISUP (International Society of Urologic Pathologists) σε μια προσπάθεια για την ανάπτυξη ενός παγκόσμια αποδεκτού συστήματος ταξινόμησης της νεοπλασίας της ουροδόχου κύστης. Έτσι, τα ουροθηλιακά νεοπλάσματα της ουροδόχου κύστης ταξινομούνται σύμφωνα με τις WHO και ISUP 2016 ως εξής:

### ***Υπερπλασία του ουροθηλίου***

- α. Επίπεδη υπερπλασία,
- β. Θηλώδης υπερπλασία

### ***Επίπεδες αλλοιώσεις με κυτταρική ατυπία***

- α. Αντιδραστική (φλεγμονώδης) ατυπία
- β. Δυσπλασία (χαμηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία)
- γ. Καρκίνωμα in situ (υψηλόβαθμη ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία)

### ***Θηλώδη νεοπλάσματα***

- α. Θήλωμα
- β. Ανάστροφο θήλωμα
- γ. Θηλώδες ουροθηλιακό νεόπλασμα χαμηλού δυναμικού κακοήθειας (Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential – PUNLMP)
- δ. Θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα χαμηλού βαθμού κακοήθειας
- ε. Θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα υψηλού βαθμού κακοήθειας

### Διηθητικά νεοπλάσματα

Το διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα μπορεί να παρουσιάζει τις εξής διαφοροποιήσεις: πλακώδη, αδενική και τροφοβλαστική. Οι ιστολογικές ποικιλίες είναι: τύπου φωλεών, μικροκυστικό, μικροθηλώδες, τύπου λεμφοεπιθηλιώματος, τύπου λεμφώματος, πλασματοκυτταροειδές, σαρκωματοειδές, γιγαντοκυτταρικό, φτωχά διαφοροποιημένο, πλούσιο σε λιπίδια και διαυγοκυτταρικό (Διαμαντοπούλου, 2014).

### WHO classification of tumours of the urothelial tract

<b>Urothelial tumours</b>		<b>Neuroendocrine tumours</b>	
<i>Infiltrating urothelial carcinoma</i>	8120/3	Small cell neuroendocrine carcinoma	8041/3
Nested, including large nested		Large cell neuroendocrine carcinoma	8013/3
Microcystic		Well-differentiated neuroendocrine tumour	8240/3
Micropapillary	8131/3	Paraganglioma	8693/1
Lymphoepithelioma-like	8082/3		
Plasmacytoid / signet ring cell / diffuse		<b>Melanocytic tumours</b>	
Sarcomatoid	8122/3	Malignant melanoma	8720/3
Giant cell	8031/3	Naevus	8720/0
Poorly differentiated	8020/3	Melanosis	
Lipid-rich			
Clear cell		<b>Mesenchymal tumours</b>	
<i>Non-invasive urothelial neoplasms</i>		Rhabdomyosarcoma	8900/3
Urothelial carcinoma in situ	8120/2	Leiomyosarcoma	8890/3
Non-invasive papillary urothelial carcinoma, low-grade	8130/2	Angiosarcoma	9120/3
Non-invasive papillary urothelial carcinoma, high-grade	8130/2	Inflammatory myofibroblastic tumour	8825/1
Papillary urothelial neoplasm of low malignant potential	8130/1	Perivascular epithelioid cell tumour	
Urothelial papilloma	8120/0	Benign	8714/0
Inverted urothelial papilloma	8121/0	Malignant	8714/3
Urothelial proliferation of uncertain malignant potential		Solitary fibrous tumour	8815/1
Urothelial dysplasia		Leiomyoma	8890/0
<b>Squamous cell neoplasms</b>		Haemangioma	9120/0
Pure squamous cell carcinoma	8070/3	Granular cell tumour	9580/0
Verrucous carcinoma	8051/3	Neurofibroma	9540/0
Squamous cell papilloma	8052/0		
<b>Glandular neoplasms</b>		<b>Urothelial tract haematopoietic and lymphoid tumours</b>	
Adenocarcinoma, NOS	8140/3		
Enteric	8144/3	<b>Miscellaneous tumours</b>	
Mucinous	8480/3	Carcinoma of Skene, Cowper, and Littre glands	8140/3
Mixed	8140/3	Metastatic tumours and tumours extending from other organs	
Villous adenoma	8261/0	Epithelial tumours of the upper urinary tract	
<b>Urachal carcinoma</b>	8010/3	Tumours arising in a bladder diverticulum	
<b>Tumours of Müllerian type</b>		Urothelial tumours of the urethra	
Clear cell carcinoma	8310/3		
Endometrioid carcinoma	8380/3		

The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) (917A). Behaviour is coded /0 for benign tumours; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; and /3 for malignant tumours. The classification is modified from the previous WHO classification (7564), taking into account changes in our understanding of these lesions.

Εικόνα 5: Ταξινόμηση των όγκων της ουροθηλιακής οδού σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας 2016 (WHO – World Health Organization) (Humphrey *et al.*, 2016).

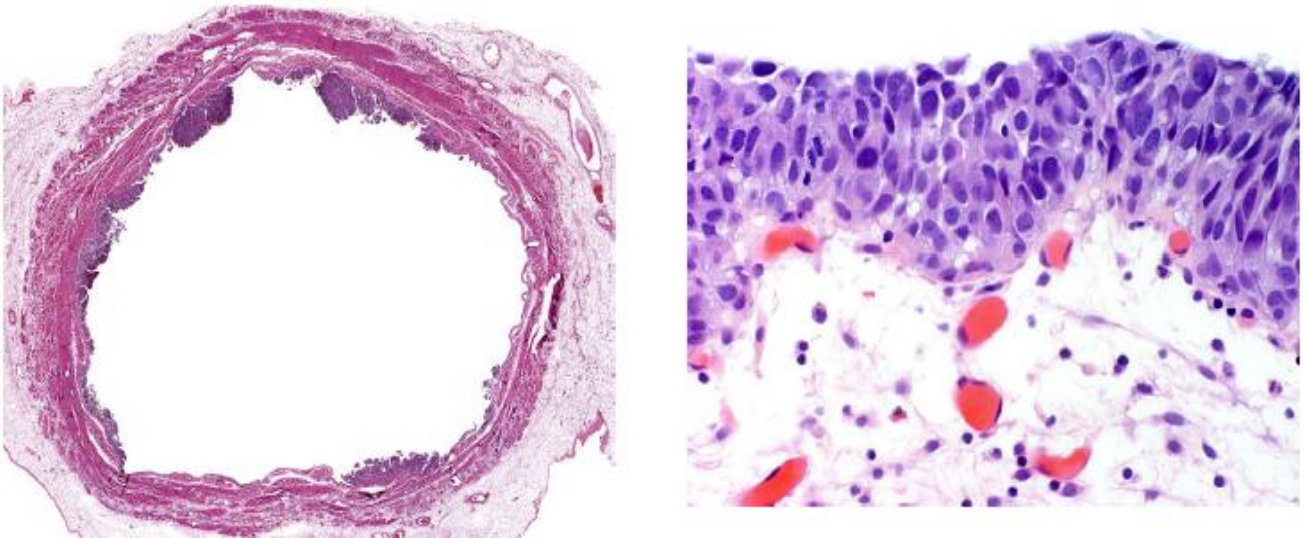


### 3.1 ΚΑΚΟΗΘΗ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

#### Καρκίνωμα in situ - CIS

Το CIS είναι μια επίπεδη αλλοίωση του ουροθηλίου, που υποδηλώνει πρόδρομο διηθητικό καρκίνωμα. Χαρακτηρίζεται από την παρουσία κυττάρων με μεγάλους, ανώμαλους, υπερχρωματικούς πυρήνες, που μπορεί να βρίσκονται σε όλο το πάχος του επιθηλίου ή/και σε μέρος μόνο αυτού. Οι μιτώσεις παρατηρούνται συχνά στο μέσο και ανώτερο ουροθήλιο. Εξ ορισμού, όλα τα CIS είναι υψηλόβαθμες κακοήθεις αλλοιώσεις. Το CIS δεν υποκατηγοριοποιείται μέσω βαθμοποίησης (**Εικόνα 6**). Το μέγεθος των καρκινικών κυττάρων του CIS είναι, συνήθως 5 φορές μεγαλύτερο από το μέγεθος των λεμφοκυττάρων, σε αντίθεση με το φυσιολογικό ουροθήλιο, που είναι μόνο 2 φορές μεγαλύτερο από το μέγεθος των λεμφοκυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα εκφράζουν συχνά την κυτοκερατίνη 20 (CK20) και την p53.

Το CIS συχνά υποδιαγιγνώσκεται, επειδή εμφανίζει ιδιαιτερότητες σε σχέση με in situ καρκινώματα άλλων οργάνων και συγκεκριμένα: α) η κυτταρολογική ανωμαλία δεν χρειάζεται να περιλαμβάνει όλο το πάχος του ουροθηλίου β) πρότυπα του CIS περιλαμβάνουν αυτά με διάσπαρτα κύτταρα CIS, παζετοιδή επέκταση του CIS και περιπτώσεις όπου το εύθραυστο επιθήλιο μπορεί να διακοπεί είτε αυθόρμητα είτε λόγω βιοψίας, έτσι ώστε μόνο λίγα υπολειπόμενα καρκινικά κύτταρα να παραμένουν στην επιφάνεια (clinging CIS) γ) τα κύτταρα CIS δεν έχουν απαραίτητα υψηλή αναλογία πυρήνα / κυτταροπλάσματος και δ) μια κυτταρική στοιβάδα ομπρελλοειδών κυττάρων μπορεί να είναι ακόμη παρούσα στο CIS (Διαμαντοπούλου, 2014), (Akhtar *et al.*, 2019A).



**Εικόνα 6:** **Αριστερά:** εγκάρσια τομή θηλώδους ουροθηλιακού όγκου σταδίου pT<sub>4</sub> (μη διηθητικό θηλώδες καρκίνωμα), και **δεξιά:** επιμήκης τομή καρκινώματος in situ (Magers *et al.*, 2019).

Θηλώδες ουροθηλιακό νεόπλασμα χαμηλού κακοήθους δυναμικού (PUNLMP)

Πρόκειται για θηλώδη ουροθηλιακό όγκο, που προσομοιάζει στο εξωφυτικό ουροθηλιακό θήλωμα. Παρουσιάζει ομαλή διεύθετηση των κυττάρων σε θηλές με ελάχιστες αρχιτεκτονικές ανωμαλίες και ελάχιστη πυρηνική ατυπία, ανεξάρτητα του αριθμού των κυτταρικών στοιβάδων.

Το ουροθήλιο στα PUNLMs είναι πολύ παχύτερο από ότι στα θηλώματα και/ή οι πυρήνες είναι σημαντικά διογκωμένοι και ελαφρά υπερχρωματικοί. Οι μιτώσεις είναι σπάνιες, συνήθως περιοριζόμενες στη βασική στοιβάδα. Το νεόπλασμα αυτό δεν συσχετίζεται με διήθηση, ούτε με μεταστάσεις. Παρ' όλα αυτά, είναι κλινικά σημαντική αλλοίωση, επειδή αυτοί οι ασθενείς βρίσκονται σε αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης υποτροπιαζουσών ή νέων θηλωδών αλλοιώσεων. Αυτές οι νέες αλλοιώσεις ενίοτε είναι υψηλότερου βαθμού κακοήθειας και μπορεί να εξελιχθούν.

#### Χαμηλόβαθμο θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα

Αποτελεί θηλώδες ουροθηλιακό νεόπλασμα με συνολική ομαλή εμφάνιση αλλά με εύκολα αναγνωρίσιμη ποικιλία αρχιτεκτονικών ή / και κυτταρολογικών χαρακτηριστικών, κυρίως ως προς την πολικότητα και το πυρηνικό μέγεθος, το σχήμα και την υφή της χρωματίνης. Οι μιτώσεις είναι σπάνιες και συνήθως παρατηρούνται στο κατώτερο ήμισυ, αλλά μπορούν και να παρατηρηθούν σε οποιοδήποτε επίπεδο του ουροθηλίου. Δεν είναι ασυνήθης η συγχώνευση των παρακείμενων θηλών. Κατά την προσπάθεια εκτίμησης της διαταραχής της πολικότητας, εφαπτόμενες τομές κοντά στη βάση του ουροθηλίου μπορεί να παραπλανήσουν και να έχουν ως αποτέλεσμα την εμφάνιση ταπητίων ανώριμου ουροθηλίου με συχνή μιτωτική δραστηριότητα. Για το λόγο αυτό, είναι προτιμότερο να αξιολογούνται μόνο οι κάθετα διατετημένοι αγγειοσυνδετικοί άξονες.

Τα χαμηλόβαθμα θηλώδη καρκινώματα είναι μη-διηθητικά ή διηθούν το χόριο. Στην τελευταία περίπτωση έχουν χαμηλή πιθανότητα (<5%) περαιτέρω εξέλιξης, και συχνά υποτροπιάζουν (Διαμαντοπούλου, 2014).

#### Υψηλόβαθμο θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα

Είναι ένα θηλώδες ουροθηλιακό νεόπλασμα με εμφανώς διαταραγμένο πρότυπο ανάπτυξης και μέτρια ως εκσεσημασμένη αρχιτεκτονική και κυτταρολογική ατυπία. Τα κύτταρα συναθροίζονται ακανόνιστα και το επιθήλιο αποδιοργανώνεται. Η χρωματίνη τείνει να συσσωρεύεται με εμφανή πυρήνια. Οι μιτώσεις, ακόμη και άτυπες, παρατηρούνται συχνά σε όλα τα επίπεδα του ουροθηλίου. Σε όγκους με ποικίλου βαθμού κακοήθειας, ο όγκος αξιολογείται με βάση τον υψηλότερο βαθμό κακοήθειας. Τα υψηλόβαθμα θηλώδη ουροθηλιακά καρκινώματα παρουσιάζουν πολύ υψηλότερο κίνδυνο εξέλιξης σε σχέση με χαμηλόβαθμες αλλοιώσεις. Αυτοί οι όγκοι έχουν επίσης έναν υψηλό κίνδυνο συσχέτισης με διηθητική νόσο τη στιγμή της εμφάνισης. Ο παρακείμενος επίπεδος ουροθηλιακός βλεννογόνο μπορεί επίσης να παρουσιάζει καρκίνωμα *in situ* (Διαμαντοπούλου, 2014).

Διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα εντός του υποεπιθηλιακού συνδετικού ιστού (χορίου)

Η διήθηση του υποεπιθηλιακού συνδετικού ιστού (χορίου) χαρακτηρίζεται από την παρουσία των ουροθηλιακών φωλεών και αθροίσεων ή / και μεμονωμένων κυττάρων. Τα καρκινικά κύτταρα μπορεί να παρουσιάζουν ηωσινόφιλο κυτταρόπλασμα και συνυπάρχει σχετιζόμενη δεσμοπλαστική ή φλεγμονώδης αντίδραση στρώματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι σε χαμηλόβαθμα θηλώδη καρκινώματα, οι μεγάλες στρόγγυλες φωλέες του ουροθηλίου με περιφερική πασσαλωτή διάταξη εντός του χορίου, που ακόμη περιβάλλονται από φυσιολογικά εμφανιζόμενο στρώμα, αντιπροσωπεύουν ένα ανεστραμμένο πρότυπο ανάπτυξης μη διηθητικού καρκινώματος.

Σε περίπου μισές από τις διουρηθρικές εκτομές (TURs – Transurethral Resections), μπορεί κανείς να διακρίνει ότι το μέσο επίπεδο του χορίου χαρακτηρίζεται από την παρουσία της βλεννογονίου μυϊκής στοιβάδας, όπως επίσης και από παρουσία παχυτοιχωματικών αγγείων. Σε περιπτώσεις με διήθηση του χορίου, συνιστάται η ακριβής, ξεκάθαρη διατύπωση, ώστε να μην συγχέεται από τον ουρολόγο η διήθηση της βλεννογονίου μυϊκής στοιβάδας με τη διήθηση του μυϊκού χιτώνα (detrusor muscle). Συνιστάται να αναφέρεται πάντοτε αν ο μυϊκός χιτώνας συμπεριλαμβάνεται στη βιοψία, ακόμα και επί παρουσίας CIS, PUNLMP και μη διηθητικού θηλώδους ουροθηλιακού καρκινώματος. Ο διηθητικός όγκος βαθμοποιείται ως χαμηλόβαθμος ή υψηλόβαθμος ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο σύστημα βαθμοποίησης των μη διηθητικών αλλοιώσεων.

Διηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα εντός του μυϊκού χιτώνα (Εξωστήρα Μυός)

Η διήθηση του μυϊκού χιτώνα διαγιγνώσκεται όταν ο όγκος διηθεί δεσμίδες λείου μυός. Η διάκριση της διήθησης της βλεννογονίου μυϊκής στοιβάδας από τον μυϊκό χιτώνα σε υλικό διουρηθρικών εκτομών μπορεί, περιστασιακά, να είναι δύσκολη. Συνήθως πρόκειται για εκτεταμένο διηθητικό όγκο, όπου διάσπαρτα ελάχιστα τμήματα λείου μυός μπορούν να αντιπροσωπεύουν είτε τη βλεννογόνο μυϊκή στοιβάδα, είτε διακεκομμένο ή παραμορφωμένο μυϊκό χιτώνα. Όταν υπάρχει

αβεβαιότητα ως προς την παρουσία διήθησης της βλεννογονίου μυϊκής στοιβάδας, συνιστάται ο ουρολόγος να εκτελεί TUR επανασταδιοποίησης. Η παρουσία πολυάριθμων αγγείων στο μέσο επίπεδο του χορίου, όπου η βλεννογονίος μυϊκή είναι ασταθώς παρούσα, μπορεί να βοηθήσει στην ταξινόμηση μυϊκών δεσμίδων ως βλεννογονίου μυϊκής στοιβάδας παρά ως μυϊκό χιτώνα. Σε αντιπροσωπευτικό δείγμα TUR δεν είναι απαραίτητη η υποσταδιοποίηση της εν τω βάθει διήθησης του μυϊκού χιτώνα, ενώ η παρουσία όγκου εντός λίπους δεν σημαίνει απαραίτητα εξωκυστική επέκταση, καθώς ο λιπώδης ιστός μπορεί να παρατηρηθεί και στο χόριο (Διαμαντοπούλου, 2014).

### 3.2 ΚΛΙΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

#### Σημεία και συμπτώματα

Ο τύπος και η σοβαρότητα των κλινικών σημείων και συμπτωμάτων του διηθητικού ουροθηλιακού καρκινώματος εξαρτάται από την έκταση και την εντόπιση του όγκου. Οι περισσότεροι ασθενείς με ουροθηλιακούς όγκους εμφανίζονται τουλάχιστον με μικροσκοπική αιματουρία. Το πιο σύνηθες σύμπτωμα εμφάνισης του καρκίνου της ουροδόχου κύστης είναι η ανώδυνη μακροσκοπική αιματουρία, που απαντάται στο 85% των ασθενών. Μπορεί να επακολουθήσουν θρόμβωση και επώδυνη ούρηση. Στην περίπτωση μεγάλων όγκων η ικανότητα της ουροδόχου κύστης μπορεί να μειωθεί, έχοντας ως αποτέλεσμα τη συχνουρία. Όγκοι, που εντοπίζονται στον αυχένα ή που καλύπτουν μεγάλη περιοχή της ουροδόχου κύστης μπορεί να οδηγήσουν σε συμπτώματα ερεθισμού π.χ. δυσουρία, έπειξη για ούρηση και συχνουρία. Παρόμοια συμπτώματα μπορεί να παρουσιαστούν στην περίπτωση εκτεταμένου καρκινώματος in situ. Όγκοι, που διηθούν το ουρητηρικό στόμιο μπορεί να οδηγήσουν σε υδρονέφρωση, που θεωρείται πτωχό προγνωστικό στοιχείο. Σπάνια, ασθενείς με εκτεταμένη νόσο εμφανίζονται με ψηλαφητή πυελική μάζα ή οίδημα του κατώτερου άκρου. Σε περίπτωση προχωρημένης νόσου μπορεί να παρουσιαστούν απώλεια βάρους ή κοιλιακός ή οστικός πόνος λόγω μεταστάσεων.

Αν και η διάγνωση ενός νεοπλάσματος ουροδόχου κύστης μπορεί να πιθανολογηθεί μερικές φορές στο υπερηχογράφημα ή στην αξονική τομογραφία, αυτή επιβεβαιώνεται κυστεοσκοπικά. Η ιστολογική διάγνωση εξασφαλίζεται με εκτομή του όγκου βαθιά εντός της μυϊκής στοιβάδας του τοιχώματος της ουροδόχου κύστης. Ένα ποσοστό ασθενών με νόσο σταδίου T1 μπορούν να θεραπευτούν με επαναληπτική διουρηθρική εκτομή (TUR) μόνο. Παρόλα αυτά, σε περίπτωση εκτεταμένης νόσου, οι περισσότεροι ασθενείς είναι δυνητικά υποψήφιοι θεραπευτικής αγωγής.

Οι όγκοι του ανώτερου ουροποιητικού συστήματος απαντώνται σε λιγότερο από το 10% των ασθενών. Η μικροσκοπική αιματουρία μπορεί να είναι το πρώτο κλινικό σημείο διηθητικών όγκων της νεφρικής πυέλου και του ουρητήρα και σχεδόν οι μισοί ασθενείς παρουσιάζονται με μακροσκοπική αιματουρία. Σε περίπτωση θρόμβωσης, η απόφραξη μπορεί να είναι οξεία και να οδηγήσει σε επώδυνο ουρητηρικό λαγόνιο κολικό και μπορεί να εκληφθεί λανθασμένα ως ουρητηρολιθίαση. Μπορεί να προκύψει υδρονέφρωση αλλά να διαλάθει κλινικά, αν η απόφραξη αναπτυχθεί βραδέως. Ανουρία και νεφρική ανεπάρκεια προκύπτουν στην περίπτωση μονήρους νεφρού ή αμφοτερόπλευρης απόφραξης (Διαμαντοπούλου, 2014).

### 3.3 ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΚΑΙ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Ο ουροθηλιακός καρκίνος (Ο.Κ.) συνήθως παρουσιάζει αρχικά αιματουρία και στη συνέχεια διαγιγνώσκεται με κυστεοσκόπηση, τηλεσκοπική ενδοσκόπηση της ουροδόχου κύστης, υπερηχογράφημα ή / και ουρογραφία τομογραφίας (CT). Επτά από τις 10 περιπτώσεις καρκίνου της ουροδόχου κύστης εντοπίζονται σε πρώιμα στάδια, επιτρέποντας έτσι εκτομή και μεγαλύτερη επιβίωση. Οι μη μυοδιηθητικοί όγκοι (Non Muscle Invasive Bladder Cancer - NMIBC) αφαιρούνται τυπικά με διουρηθρική εκτομή (Transurethral Resection - TUR). Εναλλακτικά, μια διαδικασία κυστεοσκόπησης και βιοψίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ορισμένες εκτομές.

Επίσης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ενδοκυστική θεραπεία (BCG –Bacillus Calmette-Guérin) για περιπτώσεις υψηλού κινδύνου.

Για το 30% των ασθενών με μυοδιηθητικό καρκίνο ουροδόχου κύστης (Muscle Invasive Bladder Cancer - MIBC), η νεοεπικουρική και επικουρική χημειοθεραπεία θεωρούνται πρότυπο για τη μείωση του κινδύνου υποτροπής ενώ η ριζική κυστεκτομή είναι η βασική χειρουργική θεραπεία. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ακτινοθεραπεία.

Για τη θεραπεία της μεταστατικής νόσου (η οποία επί του παρόντος έχει μόνο 5% ποσοστό πενταετούς επιβίωσης), η χημειοθεραπεία πλατίνας παραμένει το πρότυπο, αν και οι νέες ανοσοθεραπείες, δηλαδή οι αναστολείς των σημείων ανοσιακού ελέγχου, επιλέγονται όλο και περισσότερο για θεραπεία πρώτης γραμμής και πέραν αυτής.

Ενώ τα ποσοστά επιβίωσης έχουν βελτιωθεί με την έγκαιρη διάγνωση, τις ρομποτικές χειρουργικές τεχνικές και την εισαγωγή της ανοσοθεραπείας, ο καρκίνος της ουροδόχου κύστης παραμένει ένας σημαντικός και αυξανόμενος επιβαρυντικός παράγοντας κακοήθειας παγκοσμίως, ειδικά στις ανεπτυγμένες χώρες. Είναι ζωτικής σημασίας η καλύτερη κατανόηση της επιδημιολογίας και οι παράγοντες κινδύνου που διέπουν τον καρκίνο της ουροδόχου κύστης για την πρόληψή του (Διαμαντοπούλου, 2014), (Saginala *et al.*, 2020).

### 3.4 ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑ TNM

Η σταδιοποίηση γίνεται με βάση το σύστημα TNM (Tumor, Nodes, Metastasis). Η παθολογοανατομική σταδιοποίηση γίνεται ως εξής (**Εικόνα 6**):

#### **T- πρωτοπαθής όγκος (T)**

Στάδιο pTx: ο πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί,

pT0: χωρίς απόδειξη πρωτοπαθούς όγκου,

pTa: ο όγκος είναι επιφανειακός, θηλώδης, μη-διηθητικός,

pTis: ενδοεπιθηλιακό (in situ) καρκίνωμα: «επίπεδος όγκος»,

pT1: το νεόπλασμα διηθεί τον υποεπιθηλιακό συνδετικό ιστό,

pT2: το νεόπλασμα διηθεί το μυϊκό χιτώνα, υποδιαιρούμενο σε pT2a: όταν το νεόπλασμα διηθεί το επιπολής (έσω ½) του μυϊκού χιτώνα και pT2b: όταν το νεόπλασμα διηθεί το εν τω βάθει (έξω ½) του μυϊκού χιτώνα,

pT3: ο όγκος διηθεί τον περικυστικό λιπώδη ιστό, υποδιαιρούμενο σε pT3a: σε περίπτωση μικροσκοπικής διήθησης και pT3b: σε περίπτωση μακροσκοπικής διήθησης (εξωκυστική μάζα),

pT4: ο όγκος διηθεί κατά συνέχεια ιστού παρακείμενα όργανα, υποδιαιρούμενο σε

pT4a: όταν ο όγκος διηθεί προστάτη, μήτρα ή κόλπο, πυελικό/κοιλιακό τοίχωμα και

pT4b: ο όγκος διηθεί πυελικό ή κοιλιακό τοίχωμα.

### **N επιχώριοι λεμφαδένες (N)**

*Οι κοινοί λαγόνιοι λεμφαδένες ορίζονται ως περιοχή δευτερογενούς αποχέτευσης επιχώριων λεμφαδένων και όχι ως μεταστατική νόσος.*

pNX οι επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν,

pN0 χωρίς μετάσταση σε επιχώριους λεμφαδένες,

pN1 ένας θετικός επιχώριος λεμφαδένας,

pN2 πολλαπλοί θετικοί επιχώριοι λεμφαδένες,

pN3 εμπλοκή κοινού λαγόνιου λεμφαδένα.

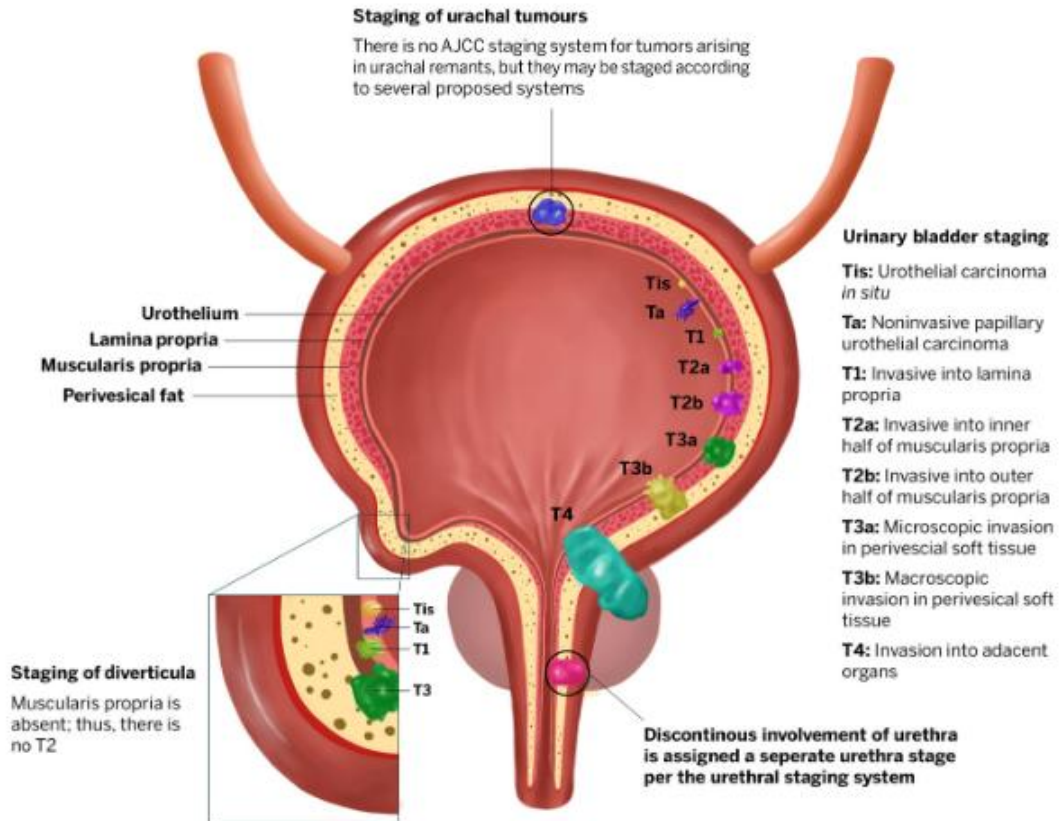
### **M απομακρυσμένη μετάσταση (M)**

pMX απομακρυσμένη μετάσταση δεν μπορεί να εκτιμηθεί,

pM0 χωρίς απομακρυσμένη μετάσταση,

pM1 απομακρυσμένη μετάσταση.





Εικόνα 7: Επισκόπηση της σταδιοποίησης των όγκων που προέρχονται από την ουροδόχο κύστη, το εκκολωματικό σύστημα και τα υπολείμματα της ουραχού (Magers *et al.*, 2019).

## II. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

## Εισαγωγή

Το φυσιολογικό ανθρώπινο ουροθήλιο αποτελείται από ένα στρώμα βασικών κυττάρων που είναι σε επαφή με τη βασική μεμβράνη, πολλά στρώματα ενδιάμεσων κυττάρων και ένα μονό στρώμα μεγάλων, επιφανειακών κύτταρων-«ομπρέλα» με μια εξειδικευμένη κορυφαία μεμβράνη που εξυπηρετεί την επέκταση και τη συστολή της ουροδόχου κύστης.

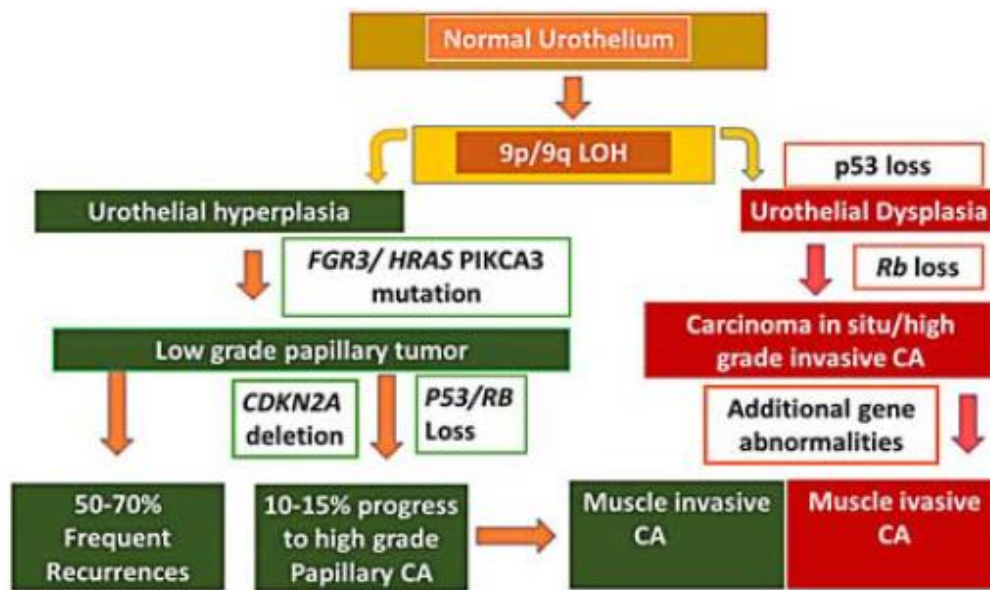
Το καρκίνωμα του ουροθηλίου εμφανίζεται κατά 4 φορές συχνότερα στους άντρες από τις γυναίκες και είναι ο 6<sup>ος</sup> πιο κοινός όγκος, αλλά η δεύτερη πιο κοινή ουρολογική κακοήθεια στους άντρες. Το καρκίνωμα του ουροθηλίου αποτελεί περισσότερο από το 90% των όγκων της ουροδόχου κύστης όγκοι ενώ το καρκίνωμα των πλακωδών κυττάρων και τα αδενοκαρκινώματα αποτελούν το 5% και 2% αντίστοιχα. Περισσότερο από το 90% των καρκίνων ουροδόχου κύστης εμφανίζεται στην Αμερική και κατά 84% του καρκίνου ουροδόχου κύστης εμφανίζεται στους άνδρες παγκοσμίως (Saginala *et al.*, 2020).

Η έντονη και συνεχής έρευνα σχετικά με τις διάφορες μοριακές πτυχές του καρκίνου της ουροδόχου κύστης έχει αναδείξει μια πληθώρα πληροφοριών για το μοριακό προφίλ και τις μοριακές οδούς του καρκίνου της ουροδόχου κύστης. Η μελέτη του γενωμικού και μεταγραφωμικού προφίλ (μοριακές υπογραφές) οδήγησε σε αρκετά συστήματα μοριακής ταξινόμησης του ουροθηλιακού καρκινώματος. Τα ευρήματα αυτά παρέχουν νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις κυρίως στα πλαίσια της εξατομικευμένης στοχευμένης ιατρικής.

### Η μοριακή παθογένεση του ουροθηλιακού καρκινώματος

Ιστοπαθολογικές και μοριακές μελέτες υποδεικνύουν ότι το ουροθηλιακό καρκίνωμα (Urothelial Carcinoma – UC) μπορεί να εξελιχθεί μέσω δύο διαφορετικών οδών με διακριτή βιολογική συμπεριφορά και κλινική πρόγνωση, γεγονός που αντανακλά ότι πρόκειται για ετερογενή ομάδα όγκων.

Το ουροθηλιακό καρκίνωμα περιλαμβάνει δύο συνηθέστερους υπότυπους με γνώμονα τη γονιδιακή αστάθεια. Ο πιο συνηθισμένος είναι ο *γενετικά σταθερός* θηλώδης, χαμηλού βαθμού κακοήθειας, μη διηθητικός υπότυπος (70%), που πιστεύεται ότι προέρχεται από περιοχές ουροθηλιακών θηλωμάτων ή υπερπλασίας και συχνά πολυεστιακός με υψηλό ποσοστό υποτροπής. Αυτοί οι όγκοι (10% –15%) σπάνια προχωρούν σε μυϊκή διήθηση. Όγκοι σταδίου pT1 που διηθούν το χόριο του βλεννογόνου, χωρίς μυϊκή διήθηση αντιπροσωπεύουν το 10% έως 20% των περιπτώσεων. Αξίζει να σημειωθεί η ύπαρξη ενός υποσύνολου των pT1 όγκων που είναι επιθετικοί και υποτροπιάζουν με μυοδιηθητική συμπεριφορά. Το υποσύνολο αυτό έχει μικτά μοριακά χαρακτηριστικά που σχετίζονται τόσο με pT1 όγκους όσο και με τον διηθητικό υπότυπο. Ο δεύτερος υπότυπος είναι *γενετικά ασταθής* με επιθετική μυοδιηθητική συμπεριφορά (Στάδια pT2 – pT4). Αντιπροσωπεύει περίπου το 20% των ουροθηλιακών καρκίνων που θα εξαπλωθούν και θα αναπτύξουν μεταστάσεις στις μισές περίπου περιπτώσεις με λιγότερο από 50% πιθανότητα 5ετούς επιβίωσης. Η αλληλουχία της καρκινογένεσης ξεκινά από το φυσιολογικό ουροθήλιο, και μέσω διαφόρων γεγονότων μπορεί να εξελιχθεί σε δυσπλασία, καρκίνωμα in situ (Carcinoma in situ – CIS δηλαδή επίπεδη αλλοίωση όπου τα επιφανειακά επιθηλιακά κύτταρα εμφανίζουν κυτταρολογικούς χαρακτήρες κακοήθειας) και καταλήγει σε διηθητικό όγκο (**Εικόνα 8**) (Magers *et al.*, 2019), (Mitra, 2016).



Εικόνα 8: Η διαδικασία της νεοπλασίας της ουροδόχου κύστης ξεκινά με πλήρη απώλεια χρωμοσώματος 9 ή μόνο απώλεια του ενός αλληλομόρφου στον φαινοτυπικά φυσιολογικό βλεννογόνο της ουροδόχου κύστης με αποτέλεσμα την αύξηση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που μπορεί να προκαλέσει επίπεδη ή θηλώδη υπερπλασία, μέσω διαφορετικών οδών που περιλαμβάνουν είτε το *FGFR3* / *RAS* μονοπάτι (πράσινο) ή το μονοπάτι *TP53* / *RB1* (κόκκινο). Η ουροθηλιακή υπερπλασία μπορεί να εξελιχθεί σε χαμηλόβαθμο θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα με την απόκτηση μεταλλάξεων στο μονοπάτι *FGFR3* / *RAS*. Τα περισσότερα χαμηλόβαθμα θηλώδη ουροθηλιακά καρκινώματα χαρακτηρίζονται από συχνές υποτροπές χωρίς περαιτέρω εξέλιξη. Μια μειονότητα μπορεί να προχωρήσει σε υψηλού βαθμού κακοήθειας θηλώδες καρκίνωμα που μπορεί τελικά να προχωρήσει σε MIBC. Αυτό οφείλεται συνήθως στην έλλειψη του *CDKN2A* ή στην απώλεια του *TP53* / *RB1*.

Αντίθετα, η υπερπλασία με ταυτόχρονη απώλεια του *TP53* μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη δυσπλασίας του ουροθηλίου. Περαιτέρω απώλεια του γονιδίου *RB1* καταλήγει στο CIS (Carcinoma In situ). Το CIS με την απόκτηση πρόσθετης γενετικής αλλοίωσης μπορεί τελικά να μετατραπεί σε MIBC. Συνεπώς, το MIBC μπορεί να ανήκει σε 2 διακριτές κατηγορίες που προέρχονται από τον θηλώδη τύπο ουροθηλιακού καρκινώματος ή από το CIS. *FGFR3*: υποδοχέας αυξητικού παράγοντα ινοβλαστών 3 (Fibroblast Growth Factor Receptor 3), *MIBC*: μυοδιηθητικός καρκίνος της ουροδόχου κύστης (Akhtar et al., 2019A).

Η πρόσφατη ταυτοποίηση των καρκινικών βλαστικών κυττάρων (Cancer Stem Cells - CSCs) στο ουροθηλιακό καρκίνωμα έριξε περισσότερο φως στο μοντέλο καρκινογένεσης των 2 οδών του ουροθηλιακού καρκινώματος. Το ουροθήλιο είναι ένας ιεραρχικά οργανωμένος ιστός που περιέχει ουροθηλιακά αρχέγονα κύτταρα που μπορούν να δώσουν αύξηση της βιολογικής ετερογένειας εντός του όγκου με διαφοροποίηση σε πλήρως διαφοροποιημένα καρκινικά κύτταρα. Οι πρωτεΐνες CK14, p63 και ALDH1A1 είναι μερικές από τους δείκτες των CSCs που ενδέχεται να διαδραματίζουν ρόλο στην ανάπτυξη επιθετικών τύπων ουροθηλιακών καρκινωμάτων. Συγκεκριμένα, τα CD44 θετικά CSCs έχουν υψηλότερο ογκογόνο δυναμικό από αντίστοιχα CD44 αρνητικά κύτταρα. Ακόμη, βρέθηκε ότι η έκφραση 477 γονιδίων ενισχύεται σε CD44 θετικά CSCs. Η υπογραφή αυτή βρέθηκε να έχει προγνωστική σημασία (Fang and Kitamura, 2018). Επιπλέον, τα γονίδια που σχετίζονται με αρχέγονα κύτταρα υποδεικνύουν υποομάδες ασθενών με μη διηθητικά καρκινώματα ουροδόχου κύστης, οι οποίοι όμως κινδυνεύουν να αναπτύξουν επιθετική νόσο με μικρότερη επιβίωση. Έχει επίσης αναφερθεί ότι **το ουροθηλιακό καρκίνωμα που είναι ελάχιστα διαφοροποιημένο χαρακτηρίζεται από υπερέκφραση γονιδίων εμβρυικών αρχέγονων κυττάρων (Embryonic Stem - Cell Genes) (Kandimalla et al., 2012).**

#### Η μοριακή βάση των πολλαπλών εστιών στο ουροθηλιακό καρκίνωμα

Το καρκίνωμα του ουροθηλίου χαρακτηρίζεται από την υψηλή συχνότητα σύγχρονων και μεταχρονικών πολυεστιακών πρωτοπαθών όγκων. Οι σύγχρονοι όγκοι ορίζονται ως πολλαπλοί πρωτοπαθείς όγκοι στους οποίους η καρκινογένεση συμβαίνει ταυτόχρονα. Μεταχρονικοί είναι οι όγκοι όπου οι καρκινικές εστίες αναπτύσσονται μερικές φορές πολλά χρόνια μετά την εκτομή της πρώτης. Επιπλέον, παρατηρούνται δυσπλαστικές αλλαγές στο γύρω ουροθήλιο (Mitra, 2016).

Υπάρχουν δύο πιθανές εξηγήσεις για τις πολλαπλές εστίες. Αρχικά, το φαινόμενο «καρκινοποίησης του πεδίου» (“Field cancerization effect”) σύμφωνα με το οποίο η παρατεταμένη έκθεση σε καρκινογόνους παράγοντες οδηγεί στον ταυτόχρονο σχηματισμό γενετικών αλλοιώσεων σε διαφορετικές περιοχές του

ουροθηλίου, με αποτέλεσμα πολλαπλούς όγκους οι οποίοι δεν έχουν μεταξύ τους την ίδια γενετική βάση. Δεύτερον, η θεωρία μονοκλωνικότητας υποδηλώνει ότι ένα μοναδικό μετασηματισμένο προγονικό κύτταρο πολλαπλασιάζεται και τα θυγατρικά εξαπλώνονται σε όλο το ουροθήλιο είτε με ενδοεπιθηλιακή μετανάστευση είτε με ενδοαυλική εμφύτευση με αποτέλεσμα τις πολλαπλές εστίες. Οι πολλαπλοί όγκοι δύνανται να χαρακτηρίζονται από πρώιμη γενετική αστάθεια και απώλεια της ικανότητας κυτταρικής προσκόλλησης, γεγονότα που οδηγούν στη μετανάστευση των νεοπλασματικών κυττάρων στο ουροθήλιο. Επομένως, μετά τις αρχικές δυσπλαστικές αλλαγές, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να συσσωρεύουν επιπρόσθετες γενετικές παρεκκλίσεις, που οδηγούν είτε σε ενδοκαρκινική ετερογένεια είτε σε διακριτούς κλώνους με διαφορετικές γενετικές τροποποιήσεις (Akhtar et al., 2019A).

Η ανακάλυψη των CSCs «άνοιξε» μια νέα διάσταση για τους πολυεστιακούς όγκους και την επανεμφάνιση του ουροθηλιακού καρκίνου, καθώς τα CSCs που απομένουν μετά την αφαίρεση του όγκου τελικά προκαλούν την υποτροπή του.

#### Φαινότυποι του ουροθηλιακού καρκινώματος και οι συμπεριφορές τους

Μορφολογικά, το ουροθηλιακό καρκίνωμα περιλαμβάνει μια μεγάλη ποικιλία διαφοροποιήσεων, από πλακώδη διαφοροποίηση έως αδενική. Ακόμη, η σαρκωματοειδής διαφοροποίηση εμφανίζεται ως και στο 10% των υψηλόβαθμων διηθητικών όγκων ουροδόχου κύστης. Η μοριακή βάση αυτών των φαινοτύπων μελετάται και έχουν σχηματιστεί οι εξής υποθέσεις: πρώτον, οι διάφορες μορφολογίες αντιπροσωπεύουν ανεξάρτητους καρκινικούς κλώνους που προέρχονται από διαφορετικά CSCs. Δεύτερον, έχει προταθεί ότι ο όγκος ξεκινά από μονοκλωνικό πολλαπλασιασμό προερχόμενο από ένα πολυδύναμο CSC, το οποίο διαφοροποιείται στα παραπάνω πρότυπα. Αυτή η θεωρία απόκλισης υποστηρίζεται από τον προσδιορισμό μιας μεταβατικής ζώνης μεταξύ των ιστολογικά ανόμοιων περιοχών, ώστε να επισημανθεί η απόκλιση μονοκλωνικής προέλευσης.

Οι μοριακές αλλαγές στους όγκους σταδίου T1 είναι σύνθετες και αποτελούν πρόκληση. Το 10-20% των περιπτώσεων όγκων σταδίου T1 (διήθηση του χορίου) υποτροπιάζουν σε μυοδιηθητικούς για τους οποίους απαιτείται ριζική θεραπευτική αντιμετώπιση. Αυτοί οι όγκοι θεωρείται ότι αναπτύσσονται *de novo*, ή εξελίσσονται από υψηλόβαθμα CIS.

Η επιθετική συμπεριφορά του ουροθηλιακού καρκίνου σχετίζεται με μοριακές – μορφολογικές αλλαγές. Με άλλα λόγια, οι όγκοι περιλαμβάνουν διάφορα ιστοπαθολογικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένων πλακώδους, σαρκωματοειδούς, μικροκυτταρικής/νευροενδοκρινούς, μικροθηλώδους και πλασματοκυτταροειδούς διαφοροποίησης. Αυτοί που διαθέτουν αυτά τα χαρακτηριστικά τείνουν να σχετίζονται περισσότερο με «επιθετικούς» φαινοτύπους. Σε μοριακό επίπεδο παρουσιάζουν επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή (Epithelial to Mesenchymal Transition - EMT), και χαρακτηρίζονται από ανευλοειδία και σύνθετες χρωμοσωμικές ανωμαλίες (McConkey and Choi, 2018).

#### Μηνυματοδοτικοί οδοί του ουροθηλιακού καρκινώματος

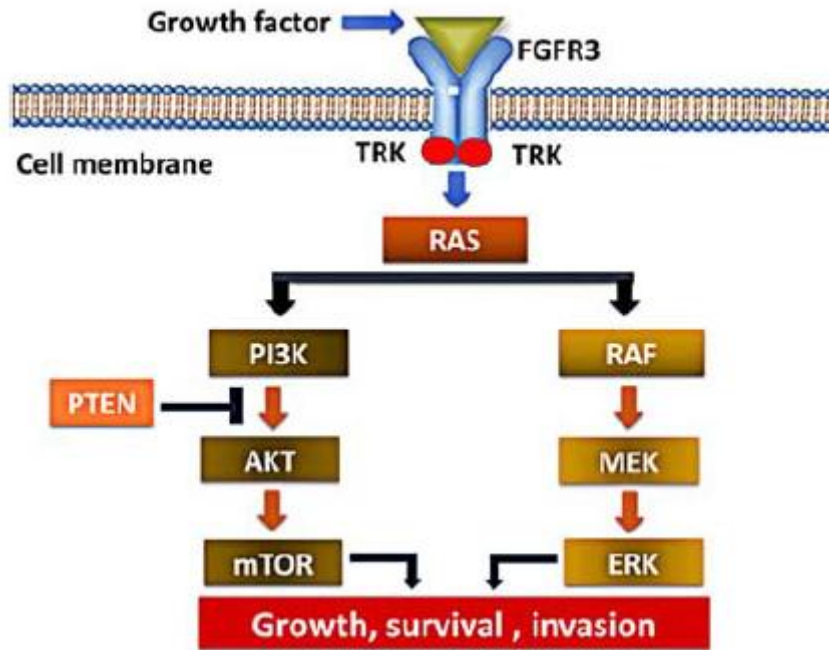
Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες έρευνες, υποδεικνύονται **2 διαφορετικά μοριακά μονοπάτια που οδηγούν στους επιφανειακούς μη μυοδιηθητικούς χαμηλόβαθμης κακοήθειας όγκους (70%) και στους μυοδιηθητικούς (10-15%)**. Έχει συσχετισθεί μεγάλος αριθμός μορίων/μονοπατιών με την εμφάνιση μη μυοδιηθητικών όγκων συμπεριλαμβανομένων των FGFR3, PI3K/AKT και RAS. Ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του FGFR3 ανιχνεύονται έως και στο 80% των χαμηλόβαθμων ουροθηλιακών καρκίνων. Ακόμη, έχει αναφερθεί ότι το 42% των όγκων στους οποίους δεν έχει ανιχνευθεί μετάλλαξη, έδειξαν υπερέκφραση του FGFR3, και στο ποσοστό αυτό συμπεριλαμβάνονται και μυοδιηθητικοί όγκοι.

Ο ενεργοποιημένος υποδοχέας FGFR3 ενεργοποιεί με τη σειρά του το μονοπάτι PI3K (**Εικόνα 9**). Οι μεταλλάξεις του PIK3CA συνήθως εμφανίζονται μαζί με αυτές του FGFR3 και συμπερασματικά δεν αποτελούν εναλλακτικό μονοπάτι



καρκινογένεσης του ουροθηλίου. Επιπρόσθετα, μεταλλάξεις του PIK3CA βρέθηκαν σε περίπου 20% σε επιφανειακούς όγκους σε αντίθεση με τους διηθητικούς όπου ήταν πολύ χαμηλή η συχνότητά τους του ίδιου γονιδίου. Η μικρότερη επικράτηση των μεταλλάξεων αυτών στους διηθητικούς καρκίνους ενισχύει την αντίληψη ότι οι θηλώδεις μη διηθητικοί και οι διηθητικοί αποτελούν 2 διαφορετικές μοριακές οντότητες. Μεμονωμένες μεταλλάξεις των FGFR3 και PIK3CA και οι διαφορετικοί συνδυασμοί μεταλλάξεων FGFR3 – PIK3CA/AKT1 και PIK3CA – RAS μπορούν να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι AKT, αλλά όχι το MAPK μονοπάτι (Akhtar et al., 2019A).

Από την άλλη πλευρά, τα μονοπάτια που εμπλέκονται στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου στο διηθητικό καρκίνωμα περιλαμβάνουν κυρίως μεταλλάξεις ογκοκατασταλτικών γονιδίων, όπως το TP53, p16 και RB. Οι μεταλλάξεις του p53 δίνουν το ερέθισμα για έναν «καταρράκτη» καθοδικών γεγονότων, όπως τη μειωμένη έκφραση ή απώλεια του p21 (διακοπή του κυτταρικού κύκλου). Η συγκεκριμένη μείωση παρατηρείται στην πλειονότητα των ουροθηλιακών καρκίνων με μεταλλαγμένο το TP53. Επίσης, στα υψηλόβαθμης κακοήθειας καρκινώματα καθώς και στα CIS βρέθηκε συσσώρευση της p53 εντός του πυρήνα καθώς και μεταλλάξεις του γονιδίου της. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι **η πρωτεΐνη p53 αποτελεί δείκτη υποτροπής, πρόγνωσης και επιβίωσης των ασθενών με επιφανειακό θηλώδες υψηλής κακοήθειας υποτροπιάζον ουροθηλιακό καρκίνωμα.**



**Εικόνα 9: Η οδός του FGFR3.** Η σύνδεση του παράγοντα FGF στον μονομερή υποδοχέα του (FGFR3) ενεργοποιεί τον διμερισμό του και την επακόλουθη τρανσφωσφορυλίωση των καταλοίπων τυροσινικής κινάσης. Αυτό ξεκινά έναν «καταρράκτη» φωσφορυλίωσης που περιλαμβάνει έναν αριθμό συνδεδεμένων πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα τη σηματοδότηση καθοδικών μονοπατιών, συμπεριλαμβανομένων των RAS-MAPK και PI3K. Αυτά τα μονοπάτια ρυθμίζουν μια ποικιλία κυτταρικών λειτουργιών, συμπεριλαμβανομένων του πολλαπλασιασμού, μετανάστευσης και διαφοροποίησης. Οι μεταλλάξεις του FGFR3 που ευνοούν τον διμερισμό χωρίς την απαραίτητη σύνδεση του προσδέτη FGF, την ενεργοποίηση, και σηματοδότηση, μπορούν να οδηγήσουν σε ανώμαλο πολλαπλασιασμό των κυττάρων και νεοπλασία. Η ενεργοποίηση των γονιδίων RAS μπορεί να ενεργοποιήσει τα μονοπάτια MAPK και PI3K/mTOR (στόχος ραπαμυκίνης στα θηλαστικά (mTOR mammalian Target of Rapamycin)). Οι μεταλλάξεις PIK3CA συμβαίνουν γενικά ταυτόχρονα με τις μεταλλάξεις FGFR3 προτείνοντας μια πρόσθετη ογκογόνο δράση του PIK3CA στις FGFR3 μεταλλάξεις. Το PTEN έχει ογκοκατασταλτική ιδιότητα καθώς παρεμποδίζει το μονοπάτι PI3K-AKT-mTOR MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase, PTEN: Phosphatase and Tensin homolog (Akhtar et al., 2019A).

### Μοριακή ταξινόμηση του ουροθηλιακού καρκινώματος

Πολύ πρόσφατες μελέτες, συμπεριλαμβανομένων αυτών που εξήγαγε το The Cancer Genome Atlas (TCGA), υπέδειξαν ότι οι μοριακοί υπότυποι μπορούν να ταυτοποιηθούν στους περισσότερους ανθρώπινους καρκίνους. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μοριακές υποομάδες συσχετίζονται με διαφορετική επιβίωση από τη νόσο και διαφορετικές αποκρίσεις σε χημειο- και βιολογικές θεραπείες, επιβεβαιώνοντας έτσι την κλινική τους σημασία.

Το ουροθηλιακό καρκίνωμα ξεκινά από το ουροθήλιο της ουροδόχου κύστης, το οποίο όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αποτελείται από ένα τριπλό κυτταρικό στρώμα, τα βασικά κύτταρα, τα ενδιάμεσα και τα διαφοροποιημένα κύτταρα δίκην ομπρέλας (umbrella cells). Τα βασικά κύτταρα εκφράζουν CK5 και CDH3 (P-cadherin), ενώ τα κύτταρα «ομπρέλες» εκφράζουν CK20 και ουροπλακίνη. Σε περίπτωση τραυματισμού, σήματα προερχόμενα από το στρώμα επάγουν τον πολλαπλασιασμό των βασικών κυττάρων τα οποία τελικά σχηματίζουν τις πιο διαφοροποιημένες στιβάδες. Τις τελευταίες δεκαετίες έχει δοθεί περισσή σημασία στην έρευνα αυτών των παραγόντων ανάπτυξης και διαφοροποίησης του ουροθηλίου (Eriksson *et al.*, 2015).

Στις μελέτες χρησιμοποιήθηκε μεγάλης κλίμακας προφίλ της έκφρασης mRNA (large-scale mRNA expression profiling), οι οποίες κατέληξαν στο ότι στο μεγαλύτερο ποσοστό οι μη μυοδιηθητικοί όγκοι (Non Muscle Invasive Bladder Cancers – NMIBCs) σχηματίζουν μια κατηγορία και οι μυοδιηθητικοί μια δεύτερη κατηγορία (Muscle Invasive Bladder Cancers – MIBCs). Η ανάλυση της γονιδιακής έκφρασης που διέκρινε τις 2 κατηγορίες αποκάλυψε ότι οι MIBCs χαρακτηρίζονταν από μεγαλύτερη έκφραση γονιδίων σχετικών με την πρόοδο του κυτταρικού κύκλου, τη μίτωση, το εξωκυττάριο στρώμα και τα ανοσοκύτταρα, ενώ οι NMIBCs συσχετίστηκαν με υπερέκφραση ριβοσωμικών γονιδίων. Επιπλέον, μια υποομάδα των MIBCs συσχετίστηκε με πλακώδη μετάπλαση (McConkey and Choi, 2018).

Ακόμη, έχουν γίνει προσπάθειες την τελευταία δεκαετία μοριακής ταξινόμησης του ουροθηλιακού καρκίνου (**Εικόνα 10**). Μετά από μελέτη της μοριακής ετερογένειας, έγινε ο ορισμός των 2 ανώτερων κατηγοριών σε “MS1” για τους NMIBCs και “MS2” για τους MIBCs. Έτσι, οι όγκοι MS2 χαρακτηρίζονται από ιδιαίτερη γενετική αστάθεια και υψηλότερα ποσοστά μετάλλαξης του TP53, ωστόσο η αστάθεια δεν εξαρτάται από την απενεργοποίηση του p53. Επιπλέον, σε αυτή την ομάδα όγκων παρατηρήθηκαν μεταλλάξεις και αλλαγές των αριθμών αντιγράφων του ογκογονιδίου E2F3 και του ογκοκατασταλτικού RB1 (Akhtar et al., 2019A).

Αντιθέτως, όπως και στους θηλώδεις NMIBCs, στους MS1 όγκους παρατηρούνται ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του PIK3CA που επάγουν την καθοδική ενεργοποίηση του μονοπατιού του AKT. Παρά το γεγονός ότι αυτές οι αναλύσεις παρείχαν μια καλύτερη κατανόηση των υποκείμενων μηχανισμών της μοριακής ετερογένειας του ουροθηλιακού καρκίνου, δεν έδωσαν και πολλές πληροφορίες για την ετερογένεια μεταξύ των NMIBCs και MIBCs (McConkey and Choi, 2018).

Οι έρευνες επέδειξαν τους πυρηνικούς υποδοχείς PPAR $\gamma$  και RXRA, τους μεταγραφικούς ρυθμιστές FOXA1, TP63 καθώς και πρωτεΐνες της οικογένειας GATA ως τα μόρια που καθορίζουν τη διαδικασία της διαφοροποίησης. Σύμφωνα με μελέτη της ίδιας ομάδας που όρισε τις κατηγορίες MS1 και MS2 (Lauss and Kristina, 2012), περιγράφηκαν 3 κύριοι υπότυποι του ουροθηλιακού καρκίνου : **Urobasal** (A και B), οι **γενετικά ασταθείς όγκοι** (Genomically Unstable – GU) και οι **προσομοιάζοντες σε πλακώδη καρκινώματα όγκοι** (Squamous Cell Carcinomas - like – SCC).

- Οι όγκοι Urobasal A (UroA) εμφανίζουν θηλώδη ανάπτυξη, καλή πρόγνωση και συχνά μεταλλάξεις και υπερέκφραση των FGFR3 και PIK3CA.
- Οι όγκοι Urobasal B (UroB) είναι περισσότερο προχωρημένοι αλλά μοριακά όμοιοι με τους UroA. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η υψηλή έκφραση του FGFR3 και οι συχνές μεταλλάξεις του και στους 2 αυτούς τύπους, γεγονός που

οδηγεί στην υπόθεση ότι εξαρτώνται από αυτό το γονίδιο για την ανάπτυξή τους.

- Οι γενετικά ασταθείς (GU) χαρακτηρίζονται από πτωχή διαφοροποίηση, έντονη διήθηση στρωματικών κυττάρων, συχνές ενισχύσεις των E2F3/SOX4, ελλείψεις του RB1, μεταλλάξεις του TP53 και έκφραση του ERBB2.
- Τέλος, οι όγκοι SCC-like χαρακτηρίζονται από ενισχυμένη έκφραση των βασικοκυτταρικών δεικτών CK5, EGFR και CDH3, δηλαδή πρωτεΐνες κερατινοποίησης και πλακώδους διαφοροποίησης.

Οι ομάδες UroB και SCC-like διακρίνονται από κακή πρόγνωση σε σχέση με τους UroA. (Choi *et al.*, 2017), (Eriksson *et al.*, 2015), (Mitra, 2016).

Σύμφωνα με πολυάριθμες μελέτες, συμπεριλαμβανομένης της μελέτης από το **The Cancer Genome Atlas Research Network** (TCGA), η ταξινόμηση του ουροθηλιακού καρκινώματος βασίζεται με ακρίβεια στις μοριακές αλλαγές που το χαρακτηρίζουν και οδηγεί σε δύο κατηγορίες, ανεξαρτήτως της μορφολογίας.

- Οι χαμηλόβαθμης κακοήθειας pTa όγκοι δυνητικώς αναπτύσσονται σε έδαφος απλής υπερπλασίας ή ατυπίας ακαθόριστης σημασίας, έχουν κάποιο δυναμικό υποτροπής αλλά είναι γενετικά σταθεροί. Μοριακώς χαρακτηρίζονται από απώλεια ετεροζυγωτίας (Loss of Heterozygosity – LOH) του χρωμοσώματος 9 (9q και 9p), ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του FGFR3 (Fibroblast Growth Factor Receptor 3), λιγότερο συχνές μεταλλάξεις του p53, του PIK3CA (που κωδικοποιεί το p110α του PI3K) και του STAG2. Στη θηλώδη οδό ρόλο οδηγού κατέχει ο άξονας FGFR3/ras ( ανοδική ενεργοποίηση του ras μονοπατιού).
- Οι μυοδιηθητικοί όγκοι αναπτύσσονται σε έδαφος δυσπλασίας ή CIS με συχνή τη μετάλλαξη στο p53, επιπλέον των ελλείψεων του χρωμοσώματος 9, με σπάνιες όμως μεταλλάξεις του FGFR3. Πρόκειται για γενετικά ασταθείς όγκους με άφθονες συσσωρευμένες γενετικές μεταβολές. Επιπλέον, εμφανίζεται συχνά η απώλεια ετεροζυγωτίας στην περιοχή του

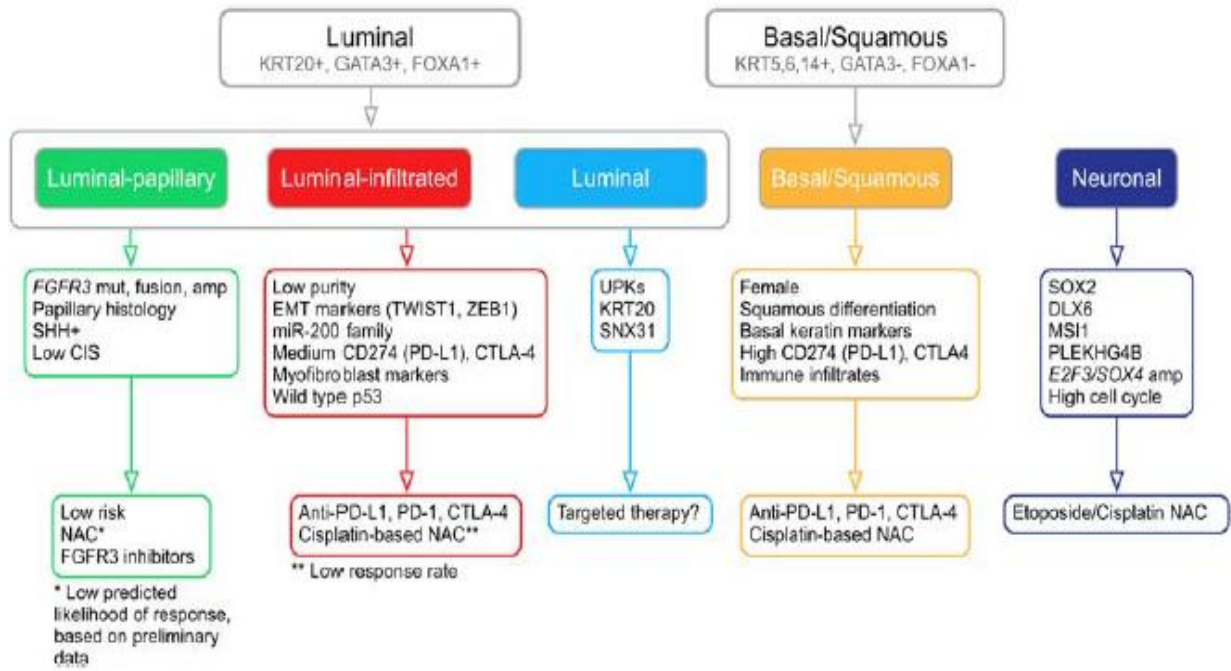
PTEN στο χρωμόσωμα 10. Στον επιθετικό διηθητικό φαινότυπο κυρίαρχος ο ρόλος της απώλειας της ογκοκατασταλτικής λειτουργίας των p53 και RB1 ( μέσω μεταλλάξεων / ενίσχυσης και υπερέκφρασης του MDM2 / ελλείψεων CDKN2A ) και της ενεργοποίησης του μονοπατιού PTEN/κινάση PI3/AKT/mTOR.

- Η μελέτη γονιδιακής έκφρασης (*Gene Expression Profiling*) οδήγησε στη μοριακή ταξινόμηση του ουροθηλιακού καρκίνου σε κλινικά σχετικές υποκατηγορίες. Οι υψηλόβαθμοι όγκοι σταδίου T1 ταξινομήθηκαν σε 3 ξεχωριστές υποομάδες, με την καθεμία να χαρακτηρίζεται από μοναδικό αριθμό μεταλλάξεων στο FGFR3 και το p53. Η ομάδα I παρουσιάζει συχνές μεταλλάξεις του FGFR3 και θηλώδη μορφολογία, γεγονός που υποδεικνύει ότι οι εν λόγω ασθενείς ίσως ανταποκριθούν σε αναστολείς των FGFRs ή καθοδικών στόχων τους. Αυτοί οι όγκοι εμφάνισαν ακόμη μειωμένη έκφραση των miR-99a και miR-100. Επιπλέον, η ομάδα I και II εμφάνισαν υψηλή έκφραση των δεικτών καρκίνου του μαστού (του αντίστοιχου μοριακού υποτύπου καρκίνου του μαστού luminal A), συμπεριλαμβανομένων των GATA3 και FOXA1 καθώς και ουροπλακίνης, E – καντχερίνης, μελών της οικογένειας miR – 200, ERBB2 και του υποδοχέα οιστρογόνου β ESR2. Η ομάδα III εμφανίζει πολλές μεταλλάξεις του p53, απουσία μεταλλάξεων του FGFR3 και εντυπωσιακά χαμηλή συχνότητα απώλειας ετεροζυγωτίας του χρωμοσώματος 9 καθώς και επιθηλιακούς δείκτες όπως οι CK14, CK5, CK6A και EGFR. Τέλος, η ομάδα II εμφανίζει λιγότερες χρωμοσωμικές ανωμαλίες από την ομάδα III (McConkey and Choi, 2018), (Akhtar et al. , 2019A).
- Επιπρόσθετα, με χρήση *προφίλ έκφρασης ολικού mRNA* (whole genome mRNA expression profiling) προτάθηκε ότι το μυοδιηθητικό ουροθηλιακό καρκίνωμα δύναται να διακριθεί σε 3 μοριακούς υπότυπους:

το βασικό τύπο (basal), τον αυλικό τύπο (luminal), οι οποίοι έχουν διακριτή κλινική συμπεριφορά και απόκριση στη χημειοθεραπεία (Dadhania *et al.*, 2016), και τους σχετιζόμενους με p53 μυοδιηθητικούς όγκους (p53 – like). Ο βασικός τύπος χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση κερατινών υψηλού μοριακού βάρους (CK14, CK5), δεικτών που εμφανίζονται και στον καρκίνο του μαστού καθώς και από ενεργοποίηση του p63. Οι όγκοι του αυλικού τύπου χαρακτηρίζονται από ενεργοποίηση των πρωτεϊνών PPARγ (Peroxisome Proliferator – Activated Receptor), της μεταγραφής του ER (υποδοχέα οιστρογόνου), από ενεργοποιητικές μεταλλάξεις του FGFR3, εν δυνάμει ευαισθησία στον αναστολέα των FGFRs, και ενίσχυση της κερατίνης CK20. Οι σχετιζόμενοι με p53 όγκοι εμφανίζονται ανθεκτικοί στην νεοεπικουρική χημειοθεραπεία με μεθοτρεξάτη, βινμπλαστίνη, δοξορουβικίνη και σισπλατίνη, ενώ όλοι οι χημειοανθεκτικοί παρατηρήθηκε ότι αποκτούσαν φαινότυπο p53 – like (Mitra, 2016).

Φαίνεται ότι οι MIBCs μπορούν να διαχωριστούν σε τουλάχιστον 5 μοριακούς υποτύπους: **αυλικούς θηλώδεις/ UroA, αυλικούς διηθητικούς/p53-like, αυλικούς/GU, βασικούς πλακώδεις και νευροενδοκρινείς**. Οι μοριακοί υπότυποι παρουσιάζουν διαφορετική προγνωστική σημασία και μάλιστα, φαίνεται να σχετίζονται με διαφοροποιημένα οφέλη από τις συστηματικές θεραπείες (McConkey and Choi, 2018).

Πιστεύεται ότι μελλοντικά η μοριακή ταξινόμηση του ουροθηλιακού καρκινώματος θα εξελιχθεί έτσι ώστε να αντικατοπτρίζει αποτελεσματικά τη βιολογική βάση της νόσου, μέσω μοριακών αλλά και μορφολογικών και κλινικών παραμέτρων. Το γεγονός αυτό με τη σειρά του θα αποδειχθεί επαναστατικά αποτελεσματικό στην αντιμετώπιση της ασθένειας.



Εικόνα 10: Οι διαφορετικοί μοριακοί υπότυποι και τα πρότυπα έκφρασής τους (Al-Ahmadie and Netto, 2020).



## 4. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΜΕ ΤΟ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

### 4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χρωματίνη αποτελεί το μακρομοριακό σύμπλεγμα DNA και πρωτεϊνών (ιστόνες), που κρατά «πακεταρισμένο» το ανθρώπινο γονιδίωμα, το οποίο περιέχει την κληρονομήσιμη πληροφορία. Η βασική λειτουργική μονάδα της χρωματίνης είναι το νουκλεόσωμα. Περιλαμβάνει 147 ζεύγη βάσεων DNA το οποίο είναι «τυλιγμένο» γύρω από το οκταμερές των ιστονών το οποίο με τη σειρά του αποτελείται από διμερή πρωτεϊνών H2A, H2B, H3 και H4. Σε γενικές γραμμές, η χρωματίνη διακρίνεται σε 2 κατηγορίες: την ετεροχρωματίνη, η οποία είναι συμπυκνωμένη σε μεγάλο βαθμό, καθυστερεί η αντιγραφή της και περιέχει κυρίως ανενεργά γονίδια, και δεύτερον την ευχρωματίνη, η οποία έχει χαλαρότερη διάταξη και περιέχει τα περισσότερα ενεργά γονίδια. Οι προσπάθειες για τη μελέτη της συντονισμένης ρύθμισης του νουκλεοσώματος έχουν δείξει ότι όλα τα συστατικά του υπόκεινται σε ομοιοπολική τροποποίηση, η οποία ουσιαστικά μεταβάλλει την οργάνωση και τη λειτουργία της χρωματίνης. Ο όρος «επιγενετική» επινοήθηκε αρχικά από τον Conrad Waddington για να περιγράψει κληρονομικές αλλαγές σε έναν κυτταρικό φαινότυπο που ήταν ανεξάρτητες από αλλοιώσεις στην αλληλουχία DNA. Παρά τις δεκαετίες συζήτησης και έρευνας, ο ορισμός της επιγενετικής παραμένει αμφιλεγόμενος και διφορούμενος. Η επιγενετική χρησιμοποιείται πιο συχνά για να περιγράψει γεγονότα που συμβαίνουν με βάση την χρωματίνη και που με τη σειρά τους ρυθμίζουν τη γονιδιακή έκφραση. Στην παρούσα μελέτη θα αναφερθούμε στις βασικότερες επιγενετικές τροποποιήσεις.

Οι τροποποιήσεις στο DNA και τις ιστόνες καθορίζονται δυναμικά και απομακρύνονται με ένζυμα τροποποίησης της χρωματίνης με πολύ ρυθμιζόμενο τρόπο (**Πίνακας 1**). Ως σήμερα, υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερις διαφορετικές τροποποιήσεις DNA και 16 τάξεις τροποποιήσεων ιστονών. Αυτές οι τροποποιήσεις μπορούν να αλλάξουν τη δομή της χρωματίνης μεταβάλλοντας τις μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις εντός και μεταξύ των νουκλεοσωμάτων. Χρησιμεύουν επίσης ως

περιοχές σύνδεσης για εξειδικευμένες πρωτεΐνες με μοναδικές επικράτειες, που αναγνωρίζουν συγκεκριμένα αυτές τις τροποποιήσεις. Αυτοί οι αναγνώστες χρωματίνης επιστρατεύουν επιπλέον τροποποιητές χρωματίνης και ένζυμα αναδιαμόρφωσης, τα οποία χρησιμεύουν ως τελεστές της τροποποίησης. Οι πληροφορίες που μεταφέρονται από επιγενετικές τροποποιήσεις διαδραματίζουν κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση όλων των διαδικασιών που βασίζονται στο DNA, όπως αντιγραφή, επιδιόρθωση DNA και μεταγραφή. Κατά συνέπεια, τα μη φυσιολογικά πρότυπα έκφρασης ή οι γονιδιωματικές μεταβολές στους ρυθμιστές της χρωματίνης μπορούν να έχουν διακριτά αποτελέσματα και μπορούν να οδηγήσουν στην πρόκληση ογκογένεσης και διατήρησή της (Dawson and Kouzarides, 2012).

**Πίνακας 1: Απεικονίζονται οι 4 διαφορετικές τροποποιήσεις του DNA και οι 16 διαφορετικές τροποποιήσεις των ιστονών και οι λειτουργίες τους (Dawson and Kouzarides, 2012).**

<b>Table 1. Chromatin Modifications, Readers, and Their Function</b>			
Chromatin Modification	Nomenclature	Chromatin-Reader Motif	Attributed Function
<b>DNA Modifications</b>			
5-methylcytosine	5mC	MBD domain	transcription
5-hydroxymethylcytosine	5hmC	unknown	transcription
5-formylcytosine	5fC	unknown	unknown
5-carboxylcytosine	5caC	unknown	unknown
<b>Histone Modifications</b>			
Acetylation	K-ac	BromodomainTandem, PHD fingers	transcription, repair, replication, and condensation
Methylation (lysine)	K-me1, K-me2, K-me3	Chromodomain, Tudor domain, MBT domain, PWWP domain, PHD fingers, WD40/β propeller	transcription and repair
Methylation (arginine)	R-me1, R-me2s, R-me2a	Tudor domain	transcription
Phosphorylation (serine and threonine)	S-ph, T-ph	14-3-3, BRCT	transcription, repair, and condensation
Phosphorylation (tyrosine)	Y-ph	SH2 <sup>a</sup>	transcription and repair
Ubiquitylation	K-ub	UIM, IUIM	transcription and repair
Sumoylation	K-su	SIM <sup>a</sup>	transcription and repair
ADP ribosylation	E-ar	Macro domain, PBZ domain	transcription and repair
Deimination	R → Cit	unknown	transcription and decondensation
Proline isomerisation	P-cis ↔ P-trans	unknown	transcription
Crotonylation	K-cr	unknown	transcription
Propionylation	K-pr	unknown	unknown
Butyrylation	K-bu	unknown	unknown
Formylation	K-fo	unknown	unknown
Hydroxylation	Y-oh	unknown	unknown
O-GlcNAcylation (serine and threonine)	S-GlcNAc; T-GlcNAc	unknown	transcription

Modifications: me1, monomethylation; me2, dimethylation; me3, trimethylation; me2s, symmetrical dimethylation; me2a, asymmetrical dimethylation; and Cit, citrulline. Reader domains: MBD, methyl-CpG-binding domain; PHD, plant homeodomain; MBT, malignant brain tumor domain; PWWP, proline-tryptophan-tryptophan-proline domain; BRCT, BRCA1 C terminus domain; UIM, ubiquitin interaction motif; IUIM, inverted ubiquitin interaction motif; SIM, sumo interaction motif; and PBZ, poly ADP-ribose binding zinc finger.

<sup>a</sup>These are established binding modules for the posttranslational modification; however, binding to modified histones has not been firmly established.

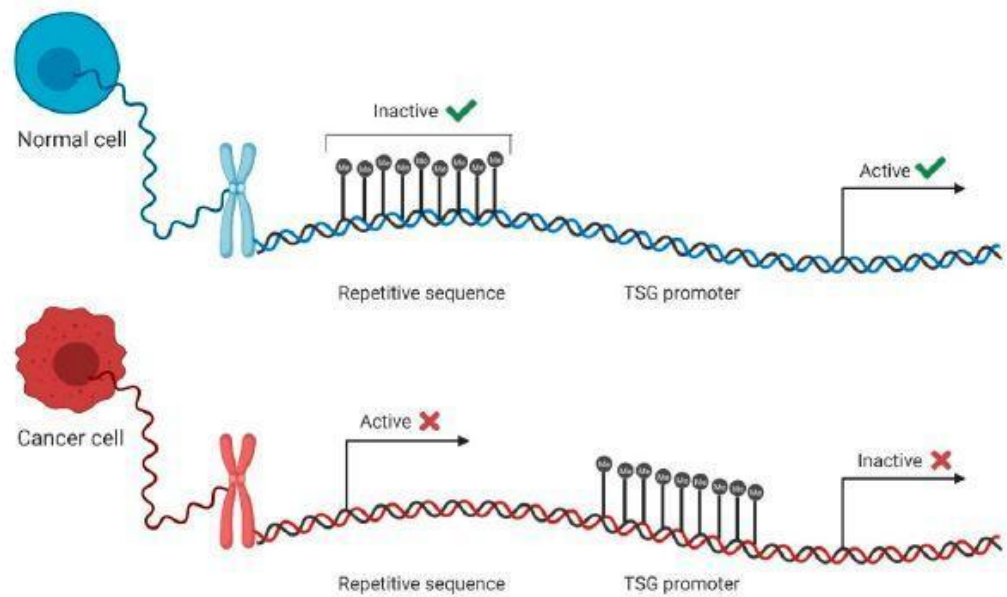
## 4.2 Η DNA ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ ΣΤΟ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

Η μεθυλίωση του DNA είναι διαδικασία όπου μια ομάδα μεθυλίου προστίθεται με έναν ομοιοπολικό δεσμό στη θέση άνθρακα 5 ενός καταλοίπου κυτοσίνης του DNA (5mC) από τις DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs). Συνήθως εμφανίζεται σε μια κυτοσίνη ακολουθούμενη από μια γουανίνη (νησίδες CpG ή δινουκλεοτίδια αλληλουχίας κυτοσίνη – γουανίνη) και είναι η πρώτη ομοιοπολική επιγενετική τροποποίηση του DNA και ίσως η πιο εκτενώς χαρακτηρισμένη τροποποίηση της χρωματίνης. Οι νησίδες CpG βρίσκονται σε τοποθεσίες που συνήθως αλληλεπικαλύπτονται με περιοχές ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (Martinez *et al.*, 2019), (Sandra P. Nunes, *et al.*, 2020). Η μεθυλίωση σημειώνεται κυρίως εντός των κεντρομερών, των τελομερών, των ανενεργών X χρωμοσωμάτων και των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών.

Παρά το ότι η υπομεθυλίωση παρατηρείται συνήθως στα κακοήθη κύτταρα, οι καλύτερα μελετημένες επιγενετικές αλλαγές στον καρκίνο είναι οι μεθυλίώσεις που συμβαίνουν εντός των νησίδων CpG, που είναι παρούσες στο 70% των υποκινητών γονιδίων στα θηλαστικά. Η μεθυλίωση των CpG στους υποκινητές διαδραματίζει ένα πολύ σημαντικό ρόλο στη μεταγραφική ρύθμιση και συνήθως μεταβάλλεται κατά την κακοήθη εξαλλαγή.

Οι πλατφόρμες NGS (Next Generation Sequencing) παρέχουν πλέον χάρτες μεθυλίωσης CpG σε πλήρη γονιδιωματική βάση, οι οποίοι επιβεβαιώνουν το ότι μεταξύ 5-10% των φυσιολογικά μη μεθυλιωμένων νησίδων CpG υποκινητών, μεθυλιώνονται σε διάφορα καρκινικά γονιδιώματα (**Εικόνα 11**). Επιπλέον, έχει δειχθεί ότι η μεθυλίωση των υποκινητών δεν επηρεάζει αποκλειστικά την έκφραση κωδικοποιητικών γονιδίων αλλά και την παραγωγή μη κωδικών RNAs (non-coding RNAs), μερικά από τα οποία εμπλέκονται στην κακοήθη εξαλλαγή. Ακόμη, είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι βρέθηκαν ενδιαφέρουσες αλλαγές στη μεθυλίωση του DNA στις νησίδες CpG, αλληλουχίες που αποτελούν συντηρημένες περιοχές εντός των γονιδίων. Η λειτουργική συνάφεια αυτών των αλλαγών στη μεθυλίωση δεν έχει

αποκρυπτογραφηθεί πλήρως, αλλά αξίζει να σημειωθεί ότι μέσω αυτών, αμφισβητήθηκε το γενικό δόγμα σύμφωνα με το οποίο η μεθυλίωση DNA ισοδυναμεί με μεταγραφική σίγαση. Στην πραγματικότητα, οι μελέτες αυτές απέδειξαν ότι πολλά ενεργά μεταγραφόμενα γονίδια έχουν υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης DNA εντός τους, υποδηλώνοντας ότι το πλαίσιο και η χωροταξική κατανομή της μεθυλίωσης είναι ζωτικής σημασίας για τη μεταγραφική ρύθμιση.



**Εικόνα 11: Η DNA μεθυλίωση σε φυσιολογικά και νεοπλασματικά κύτταρα.** Σε φυσιολογικά κύτταρα, οι περισσότερες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Repetitive Sequence) είναι μεθυλιωμένες, ενώ οι υποκινητές των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (TSGs – Tumor Suppressor Genes) παραμένουν μη μεθυλιωμένοι και ενεργοί με αποτέλεσμα τη γονιδιακή έκφραση. Αντιθέτως, στα νεοπλασματικά κύτταρα οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες απομεθυλιώνονται και έτσι μεταγράφονται, συμβάλλοντας στη γενωμική αστάθεια, ενώ οι υποκινητές των ογκοκατασταλτικών γονιδίων μεθυλιώνονται, απενεργοποιώντας τα και προωθώντας τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και επιβίωση (Sandra P. Nunes et al., 2020).

Η μεθυλίωση επιτυγχάνεται με τη συμμετοχή πέντε ενζύμων, των μεθυλοτρανσφερασών (DNMTs): οι DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b, και DNMT3L. Συγκεκριμένα, οι DNMT3a και DNMT3b πραγματοποιούν τις de novo μεθυλίώσεις, ενώ η DNMT1 διατηρεί τα ήδη υπάρχοντα μοτίβα μεθυλίωσης αντιγράφοντας αυτά τα μοτίβα κατά την αντιγραφή του γονιδιώματος στην εμβρυική ανάπτυξη. Η DNMT1 είναι μια μεθυλοτρανσφεράση συντήρησης που αναγνωρίζει ημιμεθυλιωμένο DNA, το οποίο προκύπτει από την αντιγραφή, και στη συνέχεια μεθυλιώνει νεοσυντιθέμενα δινουκλεοτίδια CpG, των οποίων τα συμπληρωματικά στη μητρική αλυσίδα είναι ήδη μεθυλιωμένα. Οι DNMT2 και DNMT3L δεν παρουσιάζουν την ίδια ενεργότητα, αλλά εξυπηρετούν στη μεταμεταγραφική ρύθμιση ως συμπαραγοντες άλλων DNMTs αντίστοιχα (Sandra P. Nunes et al., 2020) . Ακόμη, η μεθυλίωση του DNA παρέχει τις απαραίτητες πλατφόρμες σύνδεσης για διάφορες πρωτεΐνες MBDs (Methyl – Binding proteins), συμπεριλαμβανομένων των MBD1, MBD2, MBD3, και MeCP2. Αυτές με τη σειρά τους επιστρατεύουν τροποποιητικά ένζυμα ιστονών για το συντονισμό των διεργασιών με βάση τη χρωματίνη. Αν και οι μεταλλάξεις των DNMTs και των MBDs είναι ήδη γνωστό ότι συμβάλλουν στην ανάπτυξη ανωμαλιών, μόλις πρόσφατα έγινε γνωστός ο ρόλος τους «κλειδί» στις ανθρώπινες κακοήθειες.

Η κατανόηση των κυτταρικών συνεπειών της φυσιολογικής και παρεκκλίνουσας μεθυλίωσης του DNA παραμένει βασικός τομέας ενδιαφέροντος, ειδικά λόγω του ότι χρησιμοποιούνται υπομεθυλιωτικοί παράγοντες ως επιγενετικές θεραπείες, μετά από έγκριση από τον FDA (U.S Food and Drug Administration) για κλινική χρήση ρουτίνας. Για παράδειγμα παράγοντες όπως η αζακυτιδίνη και δεσιταμπίνη έδειξαν μικτά αποτελέσματα σε ποικιλία συμπαγών όγκων. Προκύπτει επίσης, ότι η συνδυαστική χρήση αναστολέων DNA μεθυλοτρανσφερασών και αποακετυλασών ιστονών HDACs (Histone Deacetylases) μπορεί να προσφέρει ανώτερα θεραπευτικά αποτελέσματα.

Υπάρχουν νησίδες CpG σε περιοχές υποκινητών/5' στο 50% όλων των γνωστών γονιδίων οι οποίες φυσιολογικά δεν είναι μεθυλιωμένες, γεγονός το οποίο

σχετίζεται με εν δυνάμει ενεργή μεταγραφή. Η μεθυλίωση του DNA είναι διαδικασία «κλειδί» στην ανάπτυξη των θηλαστικών. Μεταβολές στη φυσιολογική μεθυλίωση εντοπίζονται στο 50-90% των ουροθηλιακών καρκίνων, συμπεριλαμβανομένων των υπερμεθυλίωσεων υποκινητών των γονιδίων *A3BP1*, *NPTX2*, *ZIC4*, *PAX5A*, *MGMT*, *IGSF4*, *GDF15*, *SOX11*, *HOXA9*, *MEIS1*, *VIM*, *STK11*, *MSH6*, *BRCA1*, *TBX2*, *TBX3*, *TERT*, *GATA2*, *DAPK1*, *CDH4*, *CCND2*, *GSTP1*, *CDKN2A*, *CDKN2B*, *WIF1*, *RASSF1A* μεταξύ άλλων. Αυτά τα γονίδια διαθέτουν κατά κύριο λόγο ογκοκατασταλτικό ρόλο σε βιολογικές οδούς όπως της επιδιόρθωσης του DNA, ελέγχου του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής διήθησης και απόπτωσης. Η μεθυλίωση των υποκινητών συνήθως παρεμποδίζει τη γονιδιακή έκφραση, οδηγώντας στην ανάπτυξη και πρόοδο του ουροθηλιακού καρκίνου και δύναται να έχει προβλεπτική αξία (Xylinas *et al.*, 2016).

Οι πρώτες μελέτες μεθυλίωσης DNA στον ουροθηλιακό καρκίνο επικεντρώθηκαν στα εν δυνάμει γονίδια των οποίων η κατάσταση μεθυλίωσής τους μπορεί να συσχετίζεται με το στάδιο, το βαθμό κακοήθειας και την πιθανότητα υποτροπής. Πρόσφατα, η ανάπτυξη των σύγχρονων προσδιορισμών μεθυλίωσης ολόκληρου του γονιδιώματος (modern whole-genome DNA methylation assays) επέτρεψε την εις βάθος ανάλυση του μεθυλιώματος του ουροθηλιακού καρκίνου. Η Wolff και οι συνεργάτες της καθιέρωσαν ότι οι περισσότερες μεταβολές μεθυλίωσης DNA συμβαίνουν στα πρώιμα στάδια του καρκινώματος και διατηρούνται στο καρκίνωμα *in situ*, στους μη διηθητικούς όγκους αλλά και στους διηθητικούς και εδράζονται στις νησίδες CpG. Επιπρόσθετα, ο βαθμός και η έκταση της υπερμεθυλίωσης σχετίζεται με το βαθμό κακοήθειας και το στάδιο δεδομένου ότι οι χαμηλόβαθμοι όγκοι έχουν λιγότερους τόπους τροποποιημένης μεθυλίωσης συγκριτικά με υψηλόβαθμους και διεισδυτικούς όγκους (Wolff *et al.*, 2010). Σχετικά με το γονίδιο *FGFR3* (Fibroblast Growth Factor Receptor 3), η μεθυλίωση του υποκινητή του είναι διαφορετική από αυτή της μεταλλαγμένης μορφής του. Με άλλα λόγια έχει παρατηρηθεί ότι οι μη μυοδιηθητικοί όγκοι (NMIBCs) με φυσιολογικό το *FGFR3* (wild-type), οι οποίοι έχουν φτωχότερη πρόγνωση σε σχέση με τους NMIBCs με μεταλλαγμένο το *FGFR3*, ήταν περισσότερο μεθυλιωμένοι σε

σχέση με αυτούς με μεταλλαγμένο FGFR3. Εκτός από αυτό το γεγονός, στους χαμηλόβαθμους μη διηθητικούς όγκους, η υπομεθυλίωση του DNA ήταν συχνότερη από την αντίστοιχη των διηθητικών όγκων.

Παρατηρήθηκε επίσης, υπερμεθυλίωση των γονιδίων *ZO2*, *MYOD* και *CDH13* σε φαινοτυπικά φυσιολογικό ουροθήλιο από καρκινική ουροδόχο κύστη σε σχέση με ουροθήλιο από φυσιολογική κύστη υποδηλώνοντας ένα επιγενετικό «ελαττωματικό πεδίο» που πιθανώς συμβάλλει στην απώλεια επιθηλιακής ακεραιότητας, και δημιουργίας ενός κατάλληλου περιβάλλοντος για υποτροπή (Martinez *et al.*, 2019).

Δεδομένου ότι ταυτοποιήθηκαν μερικά γονίδια ως συχνά υπερμεθυλιωμένα στο πρώιμο ουροθηλιακό καρκίνο, η διάγνωση θα μπορούσε να πραγματοποιείται με βάση την κατάσταση μεθυλίωσης μιας ομάδας γονιδίων. Παραδείγματος χάριν, η μεθυλίωση των *IPF1*, *GALR1*, *TAL1*, *PENK* και *TJP2* βρέθηκε υψηλότερη σε μυοδιηθητικούς όγκους (MIBCs) σε σχέση με τους NMIBCs. Ο Sacristan και οι συνεργάτες της υπέδειξαν ότι η μεθυλίωση των *RARB*, *CD44*, *GSTP1*, *IGSF4*, *CHFR*, *PYCARD*, *TP53*, *STK11* και *GATA5* διέκρινε τους χαμηλόβαθμους έναντι των υψηλόβαθμων όγκων (Sacristan *et al.*, 2014), ενώ η Olkhov-Mitsel και οι συνεργάτες της απέδειξαν ότι η συμπερίληψη των *GP5* and *ZSCAN12* σε πάνελ μεθυλίωσης θα μπορούσε εύλογα να διακρίνει τους υψηλόβαθμους από τους χαμηλόβαθμους όγκους (Olkhov-Mitsel *et al.*, 2017). Επιπλέον, εφόσον το 20% των ασθενών με BC υποτροπιάζουν, η εύρεση επιγενετικών δεικτών θα ήταν εξαιρετικά χρήσιμη για την πρόβλεψη υποτροπής. Μια μετα-ανάλυση εξέτασε 87 άρθρα που ανέφεραν τη σχέση των επιγενετικών δεικτών με προγνωστικά αποτελέσματα (Casadevall *et al.*, 2017). Ωστόσο, η προγνωστική επίδραση των επιγενετικών μεταβολών στο ουροθηλιακό καρκίνωμα παραμένει ασαφής (Martinez *et al.*, 2019). Παρακάτω αναφέρονται αποτελέσματα μελετών:

- Η μεθυλίωση των *CACNA1G* και *TBX3* συσχετίστηκαν με πρόοδο νόσου και το *SFRP5* με υποτροπή.

- Το γονίδιο CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) μεθυλιώνεται στο 64% των ουροθηλιακών καρκίνων, ωστόσο βρέθηκαν αντικρουόμενα αποτελέσματα στην πρόγνωση (Casadevall, Kilian and Bellmunt, 2017).
- Με βάση δεδομένα από TCGA (The Cancer Genome Atlas program), η μεθυλίωση και τα επίπεδα έκφρασης του SOWAHC βρέθηκαν να σχετίζονται με την πρόγνωση των ασθενών (Yang *et al.*, 2019).
- Τα γονίδια HOX εμφανίζονται υπερμεθυλιωμένα σχεδόν σε όλους τους επιθετικούς καρκίνους και η μεθυλίωση του υποκινητή HOXA9 συσχετίστηκε με υψηλότερη πιθανότητα υποτροπής και προόδου νόσου. Επιπλέον, συσχετίστηκε με χημειοανθεκτικότητα στη σισπλατίνη σε κυτταρικές σειρές ουροθηλιακού καρκίνου (Xylinas *et al.*, 2016).

Οι υψηλού κινδύνου NMIBCs εκδηλώνουν υψηλότερα ποσοστά εξέλιξης σε διηθητικούς όγκους σε σχέση με τους χαμηλού και μέτριου κινδύνου ουροθηλιακούς καρκίνους, οι οποίοι σε πολλές περιπτώσεις δεν υποτροπιάζουν ή δεν παρουσιάζουν πρόοδο. Πρόσφατα, προτάθηκαν πολλαπλές νησίδες διαφορετικά μεθυλιωμένες μεταξύ των υψηλού κινδύνου και των χαμηλότερου κινδύνου και μικρότερης επιθετικότητας όγκων (Kitchen *et al.*, 2018).

Ένα πάνελ μεθυλίωσης τριών γονιδίων, που διαφοροποιείται μεταξύ των ασθενών με διηθημένους λεμφαδένες και ασθενών με ελεύθερους λεμφαδένες, μπορεί επίσης να προβλέψει την ανάπτυξη μετάστασης και να επιτρέψει την επιλογή ασθενών που θα επωφελούνταν από την εξαίρεση λεμφαδένων και τη νεοεπικουρική χημειοθεραπεία (Stubendorff *et al.*, 2019). Σε ασθενείς που υποβάλλονται σε ενδοκυστική ανοσοθεραπεία BCG (Bacillus Calmette-Guerin) , η κατάσταση μεθυλίωσης των MSH6 και THBS1 μπορεί να βοηθήσει στη διάκριση αυτών που θα ανταποκριθούν στη θεραπεία και η μεθυλίωση του GATA5 που σχετίζεται με την επιβίωση ίσως επιτρέψει την πιθανή αναγνώριση ασθενών που



χρειάζονται πιο επιθετική θεραπεία. Το γονίδιο MDR1 βρέθηκε να υπερεκφράζεται στον ουροθηλιακό καρκίνο μετά τη χημειοθεραπεία σε σύγκριση με όγκους που δεν έχουν υποστεί αγωγή, και με όγκους από ασθενείς που τελικά υποτροπίασαν. Αυτή η υπερέκφραση συσχετίστηκε αρνητικά με μεθυλίωση νησίδων CpG στην περιοχή του υποκινητή του γονιδίου MDR1. Μια ενδιαφέρουσα μελέτη εξέτασε τη γονιδιακή μεθυλίωση σε δευτερογενείς υποτροπές στην ουροδόχο κύστη πρωτοπαθών ουροθηλιακών καρκινωμάτων ανώτερης οδού και κατέληξε στο ότι ο ρυθμός μεθυλίωσης σε ορισμένα γονίδια τείνει να αυξάνεται με τον αριθμό των υποτροπών. Αυτό μας οδηγεί στη σκέψη, ότι το φαινόμενο αυτό δύναται να αποτελέσει προγνωστικό δείκτη για την πιθανότητα υποτροπής μετά τη χειρουργική επέμβαση. Ωστόσο, η ύπαρξη αντικρουόμενων αποτελεσμάτων και η έλλειψη μελετών επικύρωσης παρεμποδίζει την παρούσα σημασία αυτών των ευρημάτων (Casadevall et al., 2017, Porten et al., 2018).

Για την κατάσταση **υπομεθυλίωσης** στο ουροθηλιακό καρκίνωμα, υπάρχουν λιγότερα δεδομένα. Το 1983, μια πρωτοποριακή μελέτη ανέφερε ότι η υπομεθυλίωση θα μπορούσε να διακρίνει τα γονίδια των νεοπλασματικών κυττάρων σε σύγκριση με τα φυσιολογικά τους αντίστοιχα (Andrew P. and Bert, 1983). Στα φυσιολογικά κύτταρα, ορισμένες δορυφορικές επαναλήψεις πλούσιες σε CpG μεθυλιώνονται έντονα, όπως η LINE-1 (Long Interspersed Nuclear Elements 1). Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι αυτές οι περιοχές είναι έντονα υπομεθυλιωμένες σε όλους τους τύπους ουροθηλιακού καρκίνου (Kreimer *et al.*, 2013) και θα μπορούσε να μεταφραστεί σε γονιδιωματική αστάθεια (Wolff *et al.*, 2010). Εκτός των παραπάνω, ως αποτύπωμα ιστού, το μοτίβο υπομεθυλίωσης του LINE-1 φαίνεται να είναι ειδικό για κάθε ιστό και τύπο όγκου (Sharma *et al.*, 2019). Επιπλέον, μια διαφορετική μελέτη ανέλυσε σε παγκόσμιο επίπεδο τη μεθυλίωση του DNA κυττάρων αίματος και διαπίστωσε ότι **στα λευκοκύτταρα η υπομεθυλίωση του DNA αποτελεί παράγοντα κινδύνου για εμφάνιση ουροθηλιακού καρκίνου** (Moore et al., 2008).

**Μεταλλάξεις στα ρυθμιστικά γονίδια της χρωματίνης υπάρχουν περίπου στο 76% των ουροθηλιακών καρκίνων (Ding *et al.*, 2018) και μάλιστα συχνότερα βρίσκονται στον ουροθηλιακό παρά σε οποιονδήποτε άλλο συμπαγή όγκο.** Ωστόσο, οι αλλαγές σχετικά με τις DNMTs, σχετίζονται κυρίως με αύξηση της έκφρασής τους. Αρκετά μεθυλιωμένα γονίδια στο ουροθηλιακό καρκίνωμα καταστέλλονται από σύμπλοκα Polycomb<sup>1</sup> (Polycomb Group proteins – PcG) (Kandimalla *et al.*, 2012). Τα PcG σύμπλοκα που αποτελούνται από τη μεθυλοτρανσφεράσης ιστόνης EZH2 (Enhancer of zeste homolog 2) στρατολογούν τις DNMTs που απαιτούνται για μεθυλίωση του DNA, κάτι το οποίο υποδηλώνει ανοδική ρύθμιση της μεθυλίωσης του ουροθηλιακού καρκίνου (Martinez *et al.*, 2019).

#### 4.3 ΙΣΤΟΝΙΚΕΣ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΔΙΑΜΟΡΦΩΣΗ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΙΝΗΣ ΣΤΟ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

##### 4.3.1. Τροποποιήσεις Ιστονών

Το 1964, ο Vincent Allfrey προέβλεψε ότι οι τροποποιήσεις των ιστονών ίσως επηρεάζουν τη μεταγραφική ρύθμιση (Allfrey *et al.*, 1964). Σχεδόν μισό αιώνα αργότερα, ακόμη γίνεται προσπάθεια αποκρυπτογράφησης των μηχανισμών που διέπουν αυτή τη δήλωση. Ως σήμερα, γνωρίζουμε ότι αυτές οι τροποποιήσεις έχουν μέγιστη επιρροή, όχι μόνο στη μεταγραφή αλλά σε όλες τις διεργασίες που έχουν ως βάση το DNA. Η μεγάλη ποικιλία των τροποποιήσεων ιστονών εισάγει μια αξιοσημείωτη πολυπλοκότητα που σταδιακά αρχίζει να διευκρινίζεται. Χρησιμοποιώντας τη μεταγραφή ως παράδειγμα, έγινε γνωστό ότι κάποιες τροποποιήσεις ιστονών σχετίζονται με ενεργοποίηση, ενώ άλλες με καταστολή.

---

<sup>1</sup> Οι πρωτεΐνες της ομάδας Polycomb είναι μια οικογένεια συμπλεγμάτων πρωτεϊνών που μπορούν να αναδιαμορφώσουν την χρωματίνη έτσι ώστε να πραγματοποιείται επιγενετική σίγαση των γονιδίων. Έγιναν γνωστές από την ικανότητά τους να αποσιωπούν την έκφραση των γονιδίων *Hox* μέσω αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης κατά την εμβρυική ανάπτυξη στη *Drosophila melanogaster*.

Ωστόσο, αυτά τα μοτίβα τροποποίησης δεν αποτελούν στατικές οντότητες αλλά ένα δυναμικά μεταβαλλόμενο τοπίο που εξελίσσεται σύμφωνα με το περιβάλλον. Επιπρόσθετα, οι ενεργοποιητικές και κατασταλτικές τροποποιήσεις δεν είναι πάντοτε αμοιβαία αποκλειόμενες. Η συνδυαστική δράση/επιρροή που έχουν μια ή περισσότερες τροποποιήσεις ιστονών στην δημιουργία, ερμηνεία, και διαγραφή μιας άλλης τροποποίησης ιστόνης, έχει οριστεί ως αλληλεπίδραση ιστονών ή “**histone crosstalk**”. Το φαινόμενο αυτό είναι ευρέως διαδεδομένο και μεγάλης βιολογικής σημασίας (Dawson and Kouzarides, 2012).

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι τα κυτταρικά ένζυμα που τροποποιούν ιστόνες δύνανται να έχουν και μη ιστονικούς στόχους, και γι’ αυτό το λόγο υπάρχει δυσκολία στο διαχωρισμό των κυτταρικών συνεπειών από μεμονωμένες ιστονικές τροποποιήσεις από ευρύτερους στόχους πολλών από αυτά τα ένζυμα. Εκτός της καταλυτικής τους λειτουργίας, πολλοί τροποποιητές της χρωματίνης διαθέτουν επικράτεια «ανάγνωσης», η οποία τους επιτρέπει να συνδέονται σε ειδικές περιοχές του γονιδιώματος και να αποκρίνονται σε πληροφορίες που μεταδίδονται από «καταρράκτες» σηματοδότησης.

Κατ’ αυτόν τον τρόπο μας παρέχονται δύο τρόποι για τη θεραπευτική στόχευση αυτών των επιγενετικών ρυθμιστών. Τα κατάλοιπα που ευθυγραμμίζουν τη θηλιά δέσμευσης των περιοχών ανάγνωσης μπορούν να υπαγορεύουν ειδικότητα για συγκεκριμένες καταστάσεις τροποποίησης, ενώ τα κατάλοιπα έξω από τη θηλιά δέσμευσης συμβάλλουν στον προσδιορισμό της ειδικότητας της ιστόνης. Αυτός ο συνδυασμός επιτρέπει σε παρόμοιες περιοχές ανάγνωσης να αγκυροβολούν σε διαφορετικά τροποποιημένα κατάλοιπα ή στο ίδιο αμινοξύ που εμφανίζει διαφορετικές καταστάσεις τροποποίησης. Παραδείγματος χάριν, μερικά ένζυμα που αναγνωρίζουν μεθυλιωμένες λυσίνες συνδέονται περισσότερο με δι- ή τρι- μεθυλιωμένες λυσίνες (Kme<sup>2/3</sup>), ενώ άλλα προτιμούν μόνο- ή μη μεθυλιωμένες λυσίνες. Εναλλακτικά, όταν οι ίδιες λυσίνες είναι ακετυλιωμένες, τα ένζυμα προσδέονται σε πρωτεΐνες με βρωμοεπικράτειες (Taverna *et al.*, 2007). Πολλές πρωτεΐνες που τροποποιούν ή συνδέονται με ιστονικές τροποποιήσεις είναι

λανθασμένα ρυθμισμένες στον καρκίνο. Θα αναφερθούν οι πιο εκτεταμένα μελετημένες όσον αφορά την ογκογένεση, την εξέλιξη και την αντιμετώπιση του ουροθηλιακού καρκίνου.

### *Ακετυλίωση Ιστονών*

Η ακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης είναι η σημαντικότερη τροποποίηση που εμπλέκεται στη μεταγραφή, στη δομή της χρωματίνης και στην επιδιόρθωση του DNA. Η ακετυλίωση εξουδετερώνει το θετικό φορτίο της λυσίνης και δύναται συνεπώς να αποδυναμώσει την ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ των ιστονών και του αρνητικά φορτισμένου DNA. Για το λόγο αυτό η ακετυλίωση ταυτίζεται με μια «χαλαρότερη», πιο ανοιχτή δομή της χρωματίνης. Η αλληλούχιση μετά από ανοσοκατακρήμνιση χρωματίνης (ChIPSeq analysis) επιβεβαίωσε την κατανομή της ιστονικής ακετυλίωσης σε υποκινητές και ενισχυτές και σε κάποιες περιπτώσεις, σε όλη τη μεταγραφείσα περιοχή ενεργών γονιδίων. Η ακετυλίωση αποτελεί μια εξαιρετικά δυναμική τροποποίηση και ρυθμίζεται από την ανταγωνιστική δράση δύο ενζυμικών οικογενειών, τις ακετυλοτρανσφεράσες λυσινών ιστονών (KATs ή HATs), και οι αποακετυλάσες (HDACs).

### *Μεθυλίωση Ιστονών*

Οι ιστόνες μεθυλιώνονται στις πλευρικές αλυσίδες της αργινίνης, λυσίνης και ιστιδίνης. Η μεθυλίωση σε αντίθεση με την ακετυλίωση και τη φωσφορυλίωση, δεν μεταβάλλει το συνολικό φορτίο του μορίου. Οι λυσίνες μπορεί να είναι μονο-, δι-, ή τρι- μεθυλιωμένες, και τα κατάλοιπα αργινίνης δύναται να είναι συμμετρικά ή ασύμμετρα μεθυλιωμένα. Τα μεθυλιωμένα κατάλοιπα λυσίνης των ιστονών είναι τα καλύτερα χαρακτηρισμένα, και τα πιο μελετημένα είναι τα εξής H3K4 (ιστόνη H3, λυσίνη 4), H3K9, H3K27, H3K36, H3K79, και H4K20. Μερικές από αυτές (π.χ. H3K9, H3K36) ταυτίζονται με ευχρωματινικές περιοχές, ενώ άλλες (H3K9, H3K27) με ετεροχρωματινικές περιοχές του γονιδιώματος. Διαφορετικές μεθυλιωτικές καταστάσεις στο ίδιο κατάλοιπο μπορούν επίσης να εντοπιστούν διαφορετικά. Παραδείγματος χάριν, η H3K4me2/3 συνήθως καλύπτει την περιοχή έναρξης της μεταγραφής (Transcriptional Start Site – TSS) ενεργών γονιδίων, ενώ η H3K4me1

σχετίζεται με ενεργούς ενισχυτές. Ομοίως, ενώ η μονομεθυλίωση της H3K9 παρατηρείται σε ενεργά γονίδια, η τριμεθυλίωση της ίδιας περιοχής σχετίζεται με γονιδιακή καταστολή (Dawson and Kouzarides, 2012).

### *Φωσφορυλίωση Ιστονών*

Η φωσφορυλίωση της σερίνης, της θρεονίνης, και των καταλοίπων τυροσίνης έχουν τεκμηριωθεί σε όλες τις βασικές ιστόνες και τις περισσότερες παραλλαγές ιστονών. Η φωσφορυλίωση μεταβάλλει το φορτίο της πρωτεΐνης, επηρεάζοντας τις ιοντικές ιδιότητές της, τη συνολική δομή και λειτουργία του τοπικού περιβάλλοντος της χρωματίνης. Η φωσφορυλίωση των ιστονών είναι αναπόσπαστη τροποποίηση στις βασικές κυτταρικές διεργασίες όπως τη μίτωση, αντιγραφή, επιδιόρθωση DNA, μεταγραφή και απόπτωση. Σε γενικές γραμμές, οι θέσεις φωσφορυλίωσης ιστόνης μπορούν να διακριθούν σε δύο ευρείες κατηγορίες:

1. εκείνες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγραφής, και
2. εκείνες που εμπλέκονται στη συμπύκνωση της χρωματίνης.

Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι πολλές από αυτές τις τροποποιήσεις ιστόνης, όπως η H3S10, σχετίζονται **και** με τις δύο κατηγορίες (Dawson and Kouzarides, 2012).

Οι κινάσες είναι οι κύριοι ενορχηστρωτές των μονοπατιών μεταγωγής σήματος που μεταφέρουν εξωκυτταρικά μηνύματα εντός του κυττάρου. Η τροποποιημένη γονιδιακή έκφραση, οι κωδικοποιητικές μεταλλάξεις και οι διαμεταθέσεις που περιλαμβάνουν κινάσες σηματοδότησης είναι μερικά από τα πιο συχνά ογκογόνα φαινόμενα που περιγράφονται στον καρκίνο. Πολλές από αυτές τις κινάσες έχουν ρόλο μετατροπέα σήματος στο κυτταρόπλασμα. Ωστόσο, πρόσφατα βρέθηκε ότι ορισμένες κινάσες μπορούν να έχουν πυρηνικές λειτουργίες, που περιλαμβάνουν τη φωσφορυλίωση των ιστονών (Baek, 2011). Ενα τέτοιο

ένζυμο είναι η τυροσινική κινάση μη υποδοχέα JAK2, η οποία συχνά ενισχύεται ή μεταλλάσσεται στις αιματολογικές κακοήθειες (Dawson and Kouzarides, 2012).

Η φωσφορυλίωση ιστονών είναι μια πολύ δυναμική επιγενετική τροποποίηση, η οποία ελέγχεται αμοιβαία από τις ανταγωνιστικές δραστηριότητες των πρωτεϊνικών κινασών και των πρωτεϊνικών φωσφατασών. Οι φωσφατάσες (ένζυμα που αφαιρούν μια ομάδα φωσφόρου από μια πρωτεΐνη), όπως οι πρωτεϊνικές κινάσες, παρουσιάζουν ειδικότητα είτε για τα κατάλοιπα σερίνης / θρεονίνης είτε για κατάλοιπα τυροσίνης ή μπορεί να έχουν διπλή ειδικότητα. Αν και δεν υπάρχει αμφιβολία ότι και οι φωσφατάσες ιστονών είναι αναπόσπαστες στη ρύθμιση της χρωματίνης, εκτός της επιδιόρθωσης και ρύθμισης του DNA κατά τη μίτωση, λίγα είναι σήμερα γνωστά για τη λειτουργία αυτών των ενζύμων στην ανάπτυξη καρκίνου (Dawson and Kouzarides, 2012).

#### 4.3.2. Αναδιαμόρφωση της χρωματίνης

##### Σύμπλοκα Αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης

Οι ομοιοπολικές τροποποιήσεις του νουκλεοσώματος συχνά παρέχουν το κρίωμα και το πλαίσιο για δυναμική αναδιαμόρφωση της χρωματίνης, εξαρτώμενη από ATP. Με βάση τη βιοχημική δραστηριότητα και τη σύσταση της υπομονάδας, τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης διακρίνονται σε 4 οικογένειες: την SWI/SNF (Switching defective/sucrose Nonfermenting), τη SWI (ISWI), τη Nucleosome Remodeling NuRD/Mi-2/chromodomain helicase DNA binding (CHD) και τη INO80 (inositol requiring 80). Αυτά τα ένζυμα διατηρούνται εξελικτικά και χρησιμοποιούν το ATP ως πηγή ενέργειας για κινητοποίηση και ανταλλαγή ιστονών. Κάθε μια από τις παραπάνω οικογένειες έχει διακριτές δομές επικράτειας, και οι πρωτεΐνες που περιλαμβάνονται περιέχουν ποικίλα μοτίβα ανάγνωσης (SANT επικράτειες, βρωμο- και χρωμο- επικράτειες) που προσδίδουν ειδικότητα στη δράση τους.

Αρκετές πρωτεΐνες από αυτές τις οικογένειες αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης, όπως οι SNF5 και MTA1 είναι γνωστές για τις μεταλλάξεις τους στον καρκίνο. Οι πρόσφατες μελέτες αλληλούχισης των καρκινικών γονιδιωμάτων υπέδειξαν μεταλλάξεις διαφόρων μελών της οικογένειας SWI/SNF σε υψηλή συχνότητα σε αιματολογικές κακοήθειες αλλά και σε συμπαγείς όγκους (**Εικόνα 12**). Η επικράτηση αυτών των μεταλλάξεων υποδηλώνει ότι πολλές από τις πρωτεΐνες αυτών των συμπλόκων εμπλέκονται στην ανάπτυξη και διατήρηση του όγκου. Ωστόσο, μόλις τώρα αρχίζουν να εμφανίζονται οι γνώσεις για τους μηχανισμούς της ογκογένεσης, σχετικά με τη λειτουργία των αναδιαμορφωτών της χρωματίνης. Είναι σαφές το γεγονός ότι τα σύμπλοκα SWI/SNF αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς παράγοντες ειδικούς για τον ιστό, προκειμένου να ρυθμίσουν τη διαφοροποίηση και έχουν μια αμοιβαία και ανταγωνιστική σχέση με τα σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Πιθανότατα, οι μεταλλάξεις των SWI/SNF ενισχύουν την κακοήθεια παρακάμπτοντας την ισορροπία μεταξύ αυτο-ανανέωσης και διαφοροποίησης, η πιθανότητα όμως αυτή πρέπει να αποδειχθεί. Τα πρόσφατα δεδομένα προτείνουν επίσης ότι τα σύμπλοκα SWI/SNF παίζουν ρόλο στη ρύθμιση της προόδου του κυτταρικού κύκλου, της κυτταρικής κινητικότητας και της σηματοδότησης των πυρηνικών ορμονών (Dawson and Kouzarides, 2012).

SWI/SNF		
Gene	Mutation	Tumor
BRG1*	N, M, F, D	Lung, Rhabdoid, Medulloblastoma, Breast, Prostate, Pancreas, HNSCC
BRM*	N, M, F	HNSCC
ARID1A	N, F, M, T	OCC, Endometroid, Renal, Gastric, Breast, Medulloblastoma, TCC
ARID1B	F, M, D	Breast
ARID2	N, F, S	Hepatocellular carcinoma
SNF5	D, N, F, S, T	Rhabdoid, Familial Schwannomatosis, Chondrosarcoma, Epithelioid sarcoma, Meningioma, Chordoma, Undifferentiated sarcoma
PBRM1*	N, F, M, S, D	Renal, Breast
BCL7A	T, M	B-NHL, Multiple myeloma
BAF60A	M	Breast

\* = Bromodomain

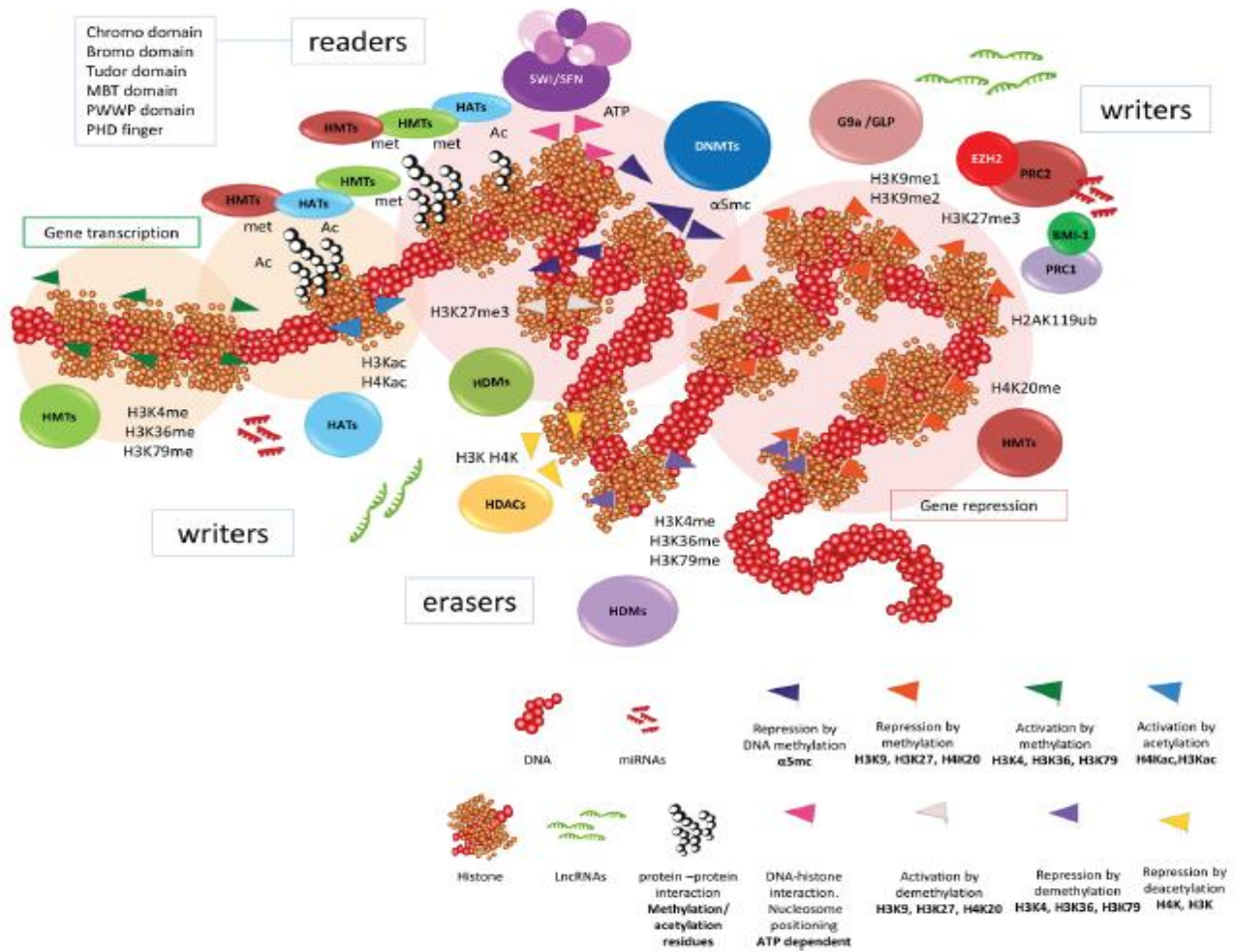
**Εικόνα 12:** Μεταλλάξεις που επηρεάζουν μέλη της οικογένειας συμπλόκων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης SWI/SNF. Το SWI/SNF είναι ένα σύμπλοκο πολλαπλών υπομονάδων που δεσμεύει τη χρωματίνη και διακόπτει την επαφή ιστόνης και DNA. Δρα μέσω της αλλαγής της τοποθεσίας και δομής του νουκλεοσώματος σύροντας και εκδιώκοντας τα νουκλεοσώματα, καθιστώντας το DNA πιο προσβάσιμο σε μεταγραφικούς παράγοντες και άλλους χρωματινικούς ρυθμιστές. Επαναλαμβανόμενες μεταλλάξεις σε μέλη της SWI/SNF, συσχετίστηκαν με μεγάλο αριθμό όγκων. Συντομογραφίες όγκων: B-NHL B-cell non-Hodgkin's Lymphoma – μη Χότζκιν Λέμφωμα Β κυττάρων, HNSCC head and neck squamous cell carcinoma – πλακώδες καρκίνωμα κεφαλής και τραχήλου, TCC transitional cell carcinoma of the urinary bladder – μεταβατικό καρκίνωμα ουροδόχου κύστης. Τύποι μεταλλάξεων: M missense – λανθασμένου νοήματος, F frameshift – αλλαγής αναγνωστικού πλαισίου, N nonsense – χωρίς νόημα, S splice site mutation – μετάλλαξη θέσης εναλλακτικού ματίσματος, T translocation – διαμετάθεση και D deletion – έλλειψη (Dawson and Kouzarides, 2012).

Οι μεταλλάξεις στα γονίδια αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης είναι πολύ συχνές στο ουροθηλιακό καρκίνωμα (Ding *et al.*, 2018), επηρεάζοντας το 89% των



αναδιαμορφωτών ιστόνης και 64% των γονιδίων τοποθέτησης νουκλεοσωμάτων στο MIBC. Οι μετα-μεταφραστικές/επιγενετικές τροποποιήσεις ιστονών, όπως η ακετυλίωση, μεθυλίωση, φωσφορυλίωση ή ουμπικουιλίνωση σε συγκεκριμένα κατάλοιπα λυσίνης, αργινίνης και σερίνης διαμορφώνουν τις δυναμικές και αναστρέψιμες αλλαγές στη δομή της χρωματίνης. Αυτός ο «κωδικός ιστόνης» μπορεί να γραφεί, να διαγραφεί και να αναγνωσθεί από διαφορετικά μόρια που ρυθμίζουν τη μεταγραφή. Επομένως, οι αναδιαμορφωτές της χρωματίνης μπορούν να ταξινομηθούν ως **συγγραφείς** (μεθυλοτρανσφεράσες (HMTs) ή ακετυλάσες (HATs)), **διαγραφείς** (απομεθυλάσες (HDMs) και αποακετυλάσες (HDACs)) και **αναγνώστες**, οι οποίοι διακρίνονται περαιτέρω σε πρωτεΐνες ή σύμπλοκα - «τελεστές» που αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες επικράτειες (Gillette and Hill, 2015), και πολύ - πρωτεϊνικά σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης νουκλεοσωμάτων που είναι ικανά να μεταβάλλουν την επαφή DNA – ιστόνης (**Εικόνα 13**).

- Τα σήματα που υποδεικνύουν τη **μεταγραφή** γονιδίων είναι η ακετυλίωση των ιστονών 3 και 4 (**H3Kac, H4Kac**) και μεθυλίωση της ιστόνης 3 στη λυσίνη 4, 36 και 79 (**H3K4me, H3K36me, H3K79me**), ενώ
- οι μεθυλίώσεις της ιστόνης 3 στη λυσίνη 9 και 27, και της ιστόνης 4 στη λυσίνη 20 (**H3K9me, H3K27me, H4K20me**) αντιπροσωπεύουν σήματα για **καταστολή** γονιδίων (Martinez *et al.*, 2019).



**Εικόνα 13: Επιγενετική ρύθμιση σε νεοπλασματικά κύτταρα.** Σχήμα της δυναμικής αλληλεπίδρασης μεταξύ της μεθυλίωσης του DNA, των τροποποιήσεων ιστονών και της τοποθέτησης νουκλεοσωμάτων, μεταξύ άλλων παραγόντων, που συμμετέχουν στους μηχανισμούς του επιγενώματος για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης. Με αυτό τον τρόπο το νεοπλασματικό κύτταρο αποκτά μια συγκεκριμένη ταυτότητα. Η DNA μεθυλίωση παρατηρείται σε όλο το γονιδίωμα, ωστόσο μπορούμε να βρούμε παρεκκλίνουσες μεθυλιώσεις DNA ή αλλαγές στα ένζυμα DNMTs (μεθυλοτρανσφεράσες του DNA) στον όγκο. Το σήμα μεθυλίωσης H3K27 είναι το κυριότερο που ελέγχει την καταστολή γονιδίων στην ευχρωματίνη. Τα ένζυμα αναδιαμόρφωσης, που ονομάζονται *συγγραφείς* (writers) (HMT: μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης, HAT: ακετυλοτρανσφεράση ιστόνης), *διαγραφείς* (erasers) (HDM: απομεθυλάση ιστόνης, HDAC: αποακετυλάση ιστόνης) και *αναγνώστες* (readers) (εξειδικευμένο μοτίβο αλληλεπίδρασης συμπεριλαμβανομένων πρωτεϊνών που αναγνωρίζουν μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, κυρίως ακετυλιώσεις και μεθυλιώσεις), των κύριων τροποποιήσεων ιστονών λειτουργούν με συντονισμένο τρόπο για τη ρύθμιση της μεταγραφής γονιδίων.

Ανάλογα με τα γονίδια που ρυθμίζουν, στρατολογούνται στην ίδια περιοχή για να λειτουργούν μαζί. Επομένως, όλα αυτά τα μόρια αποτελούν αντικείμενο μελέτης ως πιθανοί θεραπευτικοί στόχοι (Martinez *et al.*, 2019).

### Συγγραφείς

Η μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης **EZH2** καταλύει τις H3K27me<sub>2</sub> και H3K27me<sub>3</sub> για τη ρύθμιση της καταστολής της γονιδιακής έκφρασης (Deb *et al.*, 2014) και “συμπιέζει” τη χρωματίνη με άλλα μόρια όπως το BMI-1. Η εμπλοκή της στην ανάπτυξη και εξέλιξη του όγκου είναι ένα κοινό χαρακτηριστικό αρκετών ανθρώπινων όγκων, συμπεριλαμβανομένου του ουροθηλιακού καρκίνου. Έχει αποδειχθεί ότι η ενεργοποίηση του ογκογόνου άξονα Rb-E2F-EZH2 προβλέπει υποτροπή και εξέλιξη στο NMIBC (Santos *et al.*, 2014) και προωθεί αλλαγές στην έκφραση των γονιδίων, συμπεριλαμβανομένης της παρεκκλίνουσας έκφρασης των lncRNAs, και η σίγαση πολλών microRNAs, όπως η οικογένεια των miR-200. Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι η EZH2 αλληλεπιδρά επίσης με άλλους τροποποιητές όπως τις DNMTs, HDACs ή HMTs, γεγονός που θα μπορούσε να εξηγήσει τη συμμετοχή της στον καρκίνο. Η σημασία αυτών των «ανώμαλων» λειτουργιών της EZH2 για το ουροθηλιακό καρκίνωμα δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητή, αν και θα μπορούσε να εξηγήσει την ενδοεοπλασματική ετερογένεια (Martinez *et al.*, 2019) (Deb *et al.*, 2014).

Η μεθυλοτρανσφεράση ιστόνης **G9a** (*EHMT2*) θεωρείται επιγενετικός παράγοντας, ο οποίος πιθανώς να εμπλέκεται σε ουροθηλιακούς όγκους. Αυτό το ένζυμο δεσμεύει την GLP (*EHMT1*) και καταλύει την H3K9me<sub>2</sub> που οδηγεί σε σίγαση γονιδίων μέσω φυσικής αλληλεπίδρασης με συμπαραγόντες και / ή μη κωδικά RNAs. Επιπλέον, το G9a μπορεί να αλληλεπιδράσει με την EZH2 επιτρέποντας την αποσιώπηση συγκεκριμένης περιοχής με συνεργατικό τρόπο, γεγονός που την καθιστά δυνητικό στόχο για προχωρημένο μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα (Segovia *et al.*, 2019).

Η μεθυλοτρανσφεράση **KMT2D** (*MLL2*), η οποία καταλύει τις H3K4me1 και H3K4me2, εμφανίζει το υψηλότερο ποσοστό μετάλλαξης μεταξύ όλων των HMTs στο ουροθηλιακό καρκίνωμα, και σχετίζεται ισχυρά με την ανάπτυξη όγκου, την υποτροπή και την αντίσταση στη θεραπεία. Η *KMT2C* (*MLL3*) συνήθως μεταλλάσσεται σε υψηλόβαθμους NMIBC, σε αυλικούς θηλώδεις και βασικούς πλακώδεις υποτύπους του MIBC (Bailey *et al.*, 2018), ενώ η αποσιώπησή της επηρεάζει τα γονίδια επιδιόρθωσης βλάβης του DNA (Rampias *et al.*, 2019). Ακόμη, σωματικές μεταλλάξεις 13 γονιδίων HMT, συμπεριλαμβανομένων των NSD1 και NSD3, είναι παρούσες σε υψηλό ποσοστό όγκων ουροθηλίου (Ding *et al.*, 2019). Τέλος, τα γονίδια που κωδικοποιούν τις ακετυλοτρανσφεράσες *EP300* και *CREBBP* περιλαμβάνονται στα γονίδια τα συχνότερα απενεργοποιημένα μέσω μετάλλαξης στον ανθρώπινο ουροθηλιακό καρκίνο (Martinez *et al.*, 2019).

#### Διαγραφείς

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την απομεθυλάση ιστόνης KDM6A (*UTX*) και εδράζεται στο X χρωμόσωμα, είναι ένα από τα συχνότερα μεταλλαγμένα στο ουροθηλιακό καρκίνωμα. Αυτή η απομεθυλάση μπορεί να διαγράψει συγκεκριμένα τις τροποποιήσεις της EZH2. Οι μεταλλάξεις στο KDM6A είναι πιο συχνές στο NMIBC και στις γυναίκες και τείνουν να είναι αμοιβαία αποκλειόμενες με τις μεταλλάξεις της μεθυλοτρανσφεράσης *MLL2*, γεγονός που προτείνει μια κυρίαρχα αποσιωπημένη χρωματίνη στην πορεία καρκινογένεσης στην ουροδόχο κύστη. Σε ορισμένες περιπτώσεις, αυτό έχει συσχετιστεί με μετάλλαξη του *RB1* σε υψηλού βαθμού κακοήθειας ουροθηλιακούς όγκους.

Η ακετυλίωση των καταλοίπων λυσίνης στις ιστονικές ουρές οδηγεί σε περισσότερο ανοικτή χρωματίνη. Έχει παρατηρηθεί ότι τα επίπεδα ακετυλίωσης μειώνονται κατά την εξέλιξη του όγκου σε MIBC (Ellinger *et al.*, 2016). Επιπρόσθετα, η απορρυθμισμένη έκφραση διαφόρων αποακετυλασών όπως των HDAC1, 2, 3 και 6 περιγράφηκε σε ουροθηλιακούς όγκους σε στενή συσχέτιση με κακοήθεια (Martinez *et al.*, 2019).

### Αναγνώστες

Τα αποτελέσματα των επιγενετικών τροποποιήσεων διαμεσολαβούνται από σύμπλοκα – «τελεστές» που «διαβάζουν» αυτές τις «σηματοδοτήσεις» και διευκολύνουν τις αλληλεπιδράσεις DNA-ιστόνης και πρωτεΐνης-πρωτεΐνης. Αυτό δημιουργεί πλατφόρμες «επιστράτευσης» και άλλων επιγενετικών ρυθμιστών σε συγκεκριμένες περιοχές του DNA (Dawson and Kouzarides, 2012) (Εικόνα 13). Οι συγγραφείς μεθυλίωσης και ακετυλίωσης έχουν συνήθως επικράτειες αναγνωστών που επιτρέπουν την αναγνώριση της κατάστασης μεθυλίωσης / ακετυλίωσης της ιστόνης.

Οι μεθυλιωμένες θέσεις CpG αναγνωρίζονται από πρωτεΐνες που περιέχουν συντηρημένες επικράτειες δέσμευσης όπως περιοχή σύνδεσης μεθυλίου σε CpG (MBD – Methyl Binding Domain), περιοχή SRA (SET and Ring Associated) και ψευδαργύρου (ZnF – Zinc Finger). Αυτές οι πρωτεΐνες λειτουργούν μαζί με άλλους παράγοντες για την αλλαγή της μεταγραφικής κατάστασης του DNA (Biswas and Rao, 2018).

Στο ουροθηλιακό καρκίνωμα ο αναγνώστης ακετυλίωσης ιστόνης BRD4 υπερεκφράζεται και μπορεί να «υπερεκφράσει» με τη σειρά του το *c-myc*, το οποίο ελέγχει την έκφραση των γονιδίων προόδου του κυτταρικού κύκλου. Επίσης, ενισχύει τη δέσμευση αυτού του παράγοντα στον υποκινητή της EZH2 και τελικά προκαλεί την υπερέκφραση της EZH2, η οποία έχει σημαντική συμβολή στην ανάπτυξη του όγκου. Κατά συνέπεια, η EZH2 προωθεί την ανάπτυξη του ουροθηλιακού καρκίνου μέσω τροποποίησης της χρωματίνης. Άλλοι αναδιαμορφωτές όπως η ARID1A (συστατικό νουκλεοσωμικού συμπλέγματος SWI / SNF), συχνά δείχνουν απενεργοποιητικές μεταλλάξεις ή εκτεταμένες ελλείψεις και στο MIBC και στο NMIBC.

Μια επιπλέον πολυπλοκότητα στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης βρίσκεται στο γεγονός ότι πολλοί ρυθμιστές της χρωματίνης έχουν περισσότερους από έναν τύπους επικράτειας «αναγνώστη», και η δέσμευσή τους στη χρωματίνη μπορεί να επηρεάζεται περαιτέρω από τις τροποποιήσεις ιστονών. Η κατανόηση

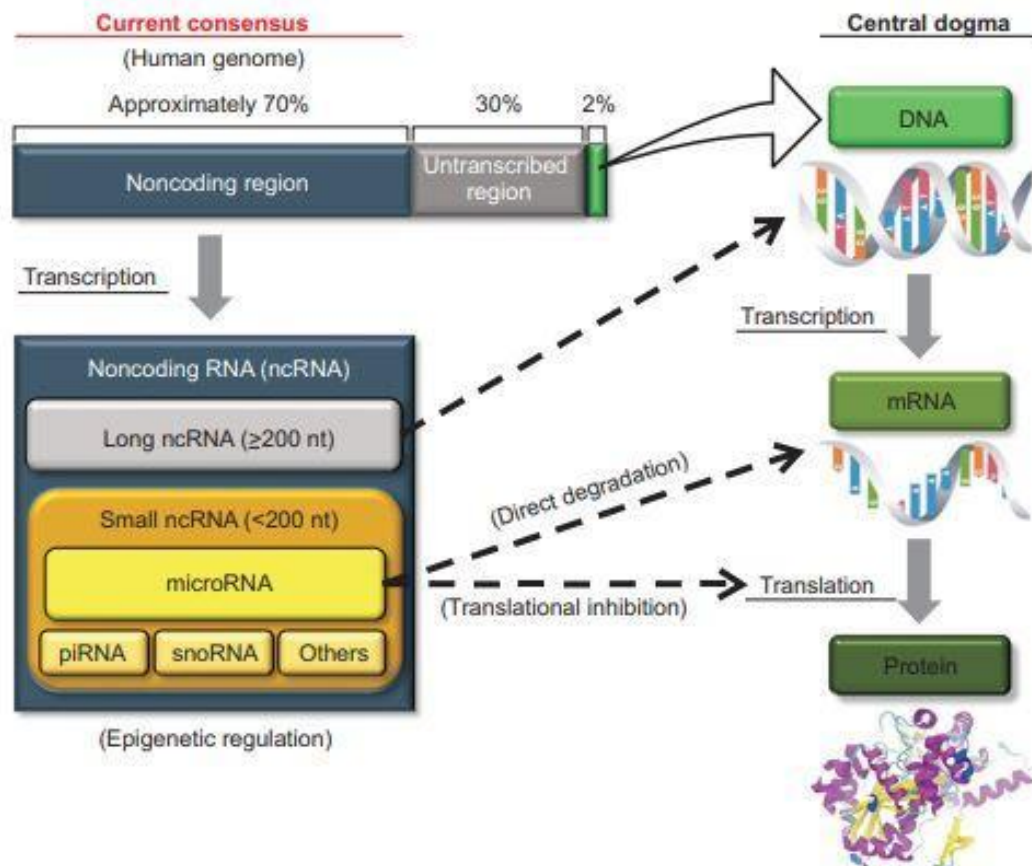
της δυναμικής πλαστικότητας του DNA και των ιστονικών τροποποιήσεων θα μας επιτρέψουν να ανοίξουμε νέους «δρόμους» προς τη διαχείριση και θεραπεία του BC (Martinez *et al.*, 2019).

#### 4.4 ΤΑ ΜΗ ΚΩΔΙΚΑ RNAS (NON-CODING RNAS) ΣΤΟ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΤΗΣ ΟΥΡΟΔΟΧΟΥ ΚΥΣΤΗΣ

##### 4.4.1 Εισαγωγή

Οι υψηλής απόδοσης γονιδιωματικές πλατφόρμες και η ολοκλήρωση του Human Genome Project (2003) ταυτοποίησαν 20-25.000 γονίδια και απέδειξαν ότι σχεδόν ολόκληρο το γονιδίωμα μεταγράφεται, αλλά μόνο το 2% μεταφράζεται τελικά. Τα εναπομείναντα «μη κωδικά» RNAs (Non – coding RNAs, ncRNAs) αποτελούν το 70% της γενωμικής περιοχής που μέχρι πρότινος θεωρούνταν «άχρηστο DNA» (“junk DNA”) και κατηγοριοποιούνται αδρώς σε μεγάλα (l long ncRNAs), μεγέθους  $\geq 200$  νουκλεοτίδια και μικρά (small ncRNAs, μεγέθους  $\leq 200$  νουκλεοτίδια) (**Εικόνα 14**).

Τα non-coding RNAs (ncRNAs) αναγνωρίζονται όλο και περισσότερο ότι είναι ζωτικής σημασίας για τη φυσιολογική ανάπτυξη και εμπλέκονται σε νόσους όπως ο καρκίνος. Έχουν σημαντικό ρόλο στις επιγενετικές αλλαγές που οδηγούν στην ανάπτυξη και εξέλιξη του ουροθηλιακού καρκίνου. Πέρα από τα tRNAs και rRNAs, που αποτελούν τα πιο άφθονα ncRNAs ( $3-10 \times 10^7$  και  $3-10 \times 10^6$  μόρια ανά κύτταρο, αντίστοιχα), τα ncRNAs μπορούν να διακριθούν στα εξής: μακρά μη κωδικά RNAs (long non-coding RNAs, lncRNAs), μεταγραφείσα υπερ-συντηρημένη περιοχή (Transcribed Ultraconserved Region - T-UCR), κυκλικά RNAs (circular RNA - circRNA), μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (small interfering RNA - siRNA), Y RNA (YRNA), microRNA (miRNA, miR), RNA που αλληλεπιδρά με PIWI πρωτεΐνες (PIWI interacting RNA - piRNA), μικρά RNAs πυρηνίσκου (small nucleolar RNAs - snoRNAs) και μικρά πυρηνικά RNAs (small nuclear RNAs – snRNAs) (Martinez *et al.*, 2019), (Li *et al.*, 2019), (Kristensen *et al.*, 2018), (Tolkach *et al.*, 2017).



**Εικόνα 14: Επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης με μη κωδικά RNAs.** Τα microRNAs αποτελούν μια κατηγορία από τα μικρά μη κωδικά RNAs και λειτουργούν επιγενετικά ως αρνητικοί ρυθμιστές της μετάφρασης πρωτεϊνών μέσω συμπληρωματικής σύνδεσης με το messengerRNA - στόχο (mRNA). ncRNA = non coding RNA, μη κωδικό RNA (Enokida *et al.*, 2016).

Πολλές από αυτές τις οικογένειες συντηρούν την αλληλουχία τους σε υψηλό βαθμό μεταξύ των ειδών και διαδραματίζουν ρόλο στη μεταγραφική και μεταμεταγραφική γονιδιακή αποσιώπηση μέσω ειδικής συμπληρωματικής σύνδεσης των βάσεων. Αντιθέτως, τα lncRNAs επιδεικνύουν φτωχή συντήρηση της αλληλουχίας τους μεταξύ των ειδών, και ο ρόλος τους ποικίλλει στη μεταγραφική ρύθμιση. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα lncRNAs εμπλέκονται σημαντικά στη χρωματινική ρύθμιση, όπου φυσιολογικά λειτουργούν είτε ως

μοριακοί συνοδοί, είτε ως ικρίώματα για διάφορους χρωματινικούς ρυθμιστές. Επίσης, εμπλέκονται σε ένα μεγάλο εύρος αναπτυξιακών διεργασιών και ασθενειών όπως ο καρκίνος και δύνανται να αναστείλουν ή να προάγουν τη γονιδιακή έκφραση μέσω διαφόρων μηχανισμών. Τέλος, σε αντίθεση με τα miRNAs, δεν έχουν μελετηθεί και χαρακτηριστεί ακόμη ενδελεχώς (Li *et al.*, 2019), (Enokida *et al.*, 2016).

Τα μη κωδικά RNAs είναι ειδικά RNAs που δεν μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, και διαδραματίζουν βασικούς ρυθμιστικούς ρόλους σε σχεδόν κάθε πτυχή της κυτταρικής λειτουργίας. Συμμετέχουν στη διατήρηση της γονιδιωματικής σταθερότητας, κυρίως μέσω προσαρμογής της έκφρασης του DNA και σύνθετης αλληλεπίδρασης με άλλα ncRNAs αλλά και με πρωτεΐνες. Συνεπώς, η περιγραφή της λειτουργίας των ncRNAs μεμονωμένα είναι πολύ περίπλοκη. Αρκετά ncRNAs (όπως τα miRNAs) είναι ικανά να στοχεύουν τα mRNAs πολλαπλών άλλων γονιδίων και να συνδέονται με αυτά με πλήρη ή μερική συμπληρωματικότητα, ενώ το mRNA ενός γονιδίου μπορεί επίσης να στοχεύεται από πολυάριθμα miRNAs. Επιπρόσθετα, τα miRNAs μπορούν να αλληλεπιδράσουν με άλλα μόρια ncRNA, όπως lncRNAs και circRNAs, προκειμένου να ελέγξουν τη σταθερότητά τους, ενώ τα lncRNAs και τα circRNA είναι ικανά να ρυθμίζουν την αφθονία των miRNAs. Εκτός αυτού, τα ncRNAs μπορούν να αλληλεπιδρούν με μεμονωμένες πρωτεΐνες και πρωτεϊνικά σύμπλοκα τα οποία πιθανώς διευκολύνουν την ειδική στόχευση πρωτεϊνών ή τη συναρμολόγηση πρωτεϊνικών συμπλόκων παρέχοντας ικρίωμα (Anastasiadou, Jacob and Slack, 2017).

Τα **lncRNAs** και τα **miRNAs** αντιπροσωπεύουν τις δύο κύριες κατηγορίες των ncRNAs που εμπλέκονται στην επιγενετική αιτιολογία του ουροθηλιακού καρκίνου καθώς και στην εξέλιξή του, και θα αναλυθούν λεπτομερώς παρακάτω.



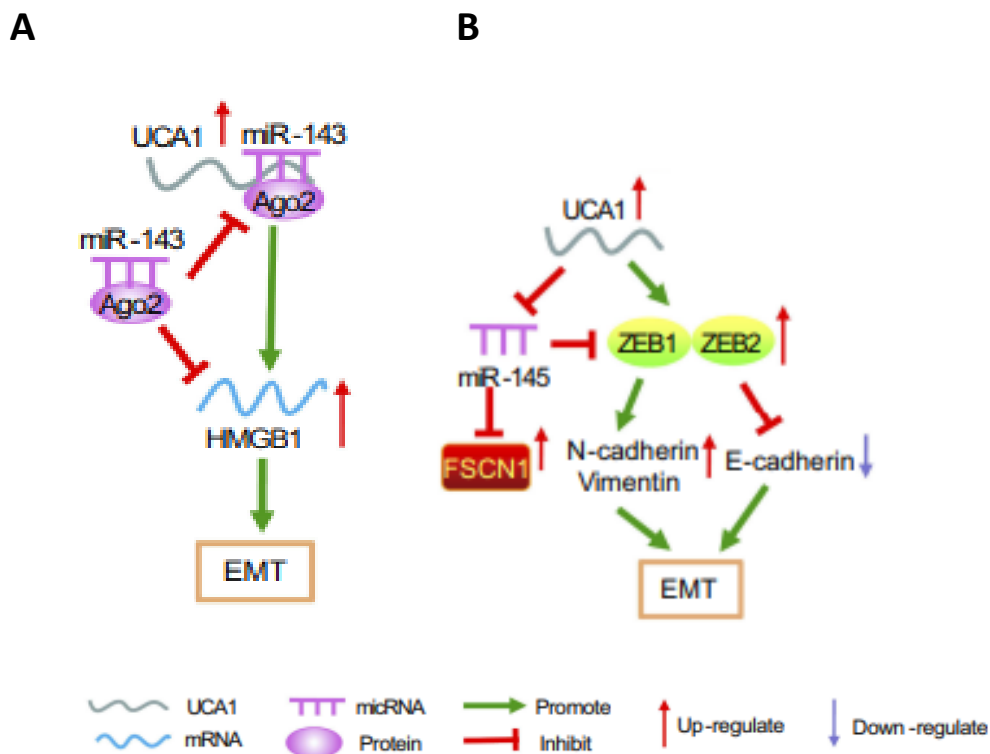
#### 4.4.2 Μακρά μη κωδικά RNAs - Long non-coding RNAs (lncRNAs)

Τα lncRNAs αποτελούνται από περισσότερα από 200 νουκλεοτίδια και εμπλέκονται σε αρκετές βασικές βιοχημικές διεργασίες. Οι Clark και οι συνεργάτες του εξέτασαν περίπου 7.200 lncRNA μόρια και περιέγραψαν μια μεγάλη διακύμανση στη σταθερότητα, με διάκριση ως ασταθή μόρια, εκείνα με χρόνο ημιζωής <30 λεπτά και ως εξαιρετικά σταθερά τα lncRNAs με χρόνο ημιζωής >48 ωρών (με μέσο χρόνο ημιζωής 3,5 ώρες) (Clark *et al.*, 2012), (Tani *et al.*, 2015). Επιπλέον, τα lncRNAs έχει βρεθεί ότι είναι σημαντικά λιγότερο άφθονα από ό, τι το ολικό mRNA ενός κυττάρου ( $3-50 \times 10^3$  έναντι  $3-10 \times 10^5$  μορίων ανά κύτταρο, αντίστοιχα). Ακόμη, έχει δειχθεί ότι πολλά lncRNAs εκφράζονται διαφορετικά σε ένα ευρύ φάσμα νεοπλασματικών ιστών σε σύγκριση με τους αντίστοιχους υγιείς ιστούς, γεγονός που υποδηλώνει το σημαντικό τους ρόλο στην καρκινογένεση. Η απορρύθμισή τους στο ουροθηλιακό καρκίνωμα βρέθηκε ότι συμβάλλει με διάφορους τρόπους, συμπεριλαμβανομένης της παρατεταμένης σηματοδότησης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και επαγωγής της διήθησης και της μετάστασης (Bhan *et al.*, 2017).

Με βάση τα πρότυπα έκφρασής τους και τις λειτουργίες τους στο νεοπλασματικό ουροθήλιο σε σύγκριση με την έκφραση και λειτουργία τους στον υγιή ιστό «μάρτυρα», τα lncRNAs μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο ομάδες: αυτά που εμφανίζουν αυξημένη έκφραση (*ογκογονικά lncRNAs*) και αυτά που εμφανίζουν μειωμένη έκφραση (*ογκοκατασταλτικά lncRNAs*) σε νεοπλασματικό ιστό.

Για παράδειγμα, το ογκογόνο lncRNA-*UCA1* έχει αναφερθεί ότι προκαλεί **επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή** (EMT – Epithelial Mesenchymal Transition) και προώθηση της κυτταρικής μετανάστευσης και διήθησης μέσω του μονοπατιού miR-145 – ZEB1 / 2 – FSCN1, καθώς και με στόχευση του miR-582-5p ή διαμόρφωση του σηματοδοτικού μονοπατιού miR-143 / HMGBG1 (**Εικόνα 15**). Η υπερέκφραση του *UCA1* έχει συσχετιστεί με υψηλό κίνδυνο κακής έκβασης του ουροθηλιακού καρκίνου. Κατά συνέπεια, η χρήση του *UCA1* ως δυνητικού βιοδείκτη αποτελεί αντικείμενο συνεχούς έρευνας. Το lncRNA-*H19* βρέθηκε να εκφράζεται άφθονα στο ουροθηλιακό καρκίνωμα οδηγώντας σε αύξηση έκφρασης του miR-675,

αναστέλλοντας έτσι την ενεργοποίηση του TP53. Επίσης, προωθεί τη μετάσταση και την EMT μέσω αναστολής της E-καντχερίνης καθώς και με τη στόχευση του miR-29b-3p. Άλλα καλά περιγραφόμενα ογκογόνα lncRNAs που εμπλέκονται στο ουροθηλιακό καρκίνωμα είναι τα *MALAT1*, *HOTAIR*, *TUG1*, *ANRIL* και *PVT1*, ενώ τα γνωστά lncRNAs-*MEG3* και *GAS5* αποτελούν ογκοκατασταλτικά μόρια. Αν και πρόσφατα έχουν γνωστοποιηθεί ακόμη πολλά ογκογόνα και ογκοκατασταλτικά lncRNAs στον ουροθηλιακό καρκίνο, κρίνεται απαραίτητη περαιτέρω έρευνα προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος τους στη νόσο. Τέλος, η χρήση συγκεκριμένων lncRNAs ως βιοδείκτες ή θεραπευτικοί στόχοι υπόκειται σε τρέχουσα έρευνα και θα συζητηθεί παρακάτω αναλυτικότερα (βλ. Ενότητα Βιοδείκτες) (Martinez *et al.*, 2019).



**Εικόνα 15: Ρυθμιστικοί μηχανισμοί του lncRNA-UCA1 στο ουροθηλιακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης.** Στην εικόνα **A** απεικονίζεται με διάγραμμα η στόχευση του σηματοδοτικού μονοπατιού miR-143 / HMGBG1. Η έκφραση του UCA1 αυξάνεται και έτσι χρησιμεύει ως ενδογενές «σφουγγάρι» του miR-143, γεγονός που προκαλεί την αύξηση του HMGB1 που με τη σειρά του οδηγεί σε επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή, ενώ στην εικόνα

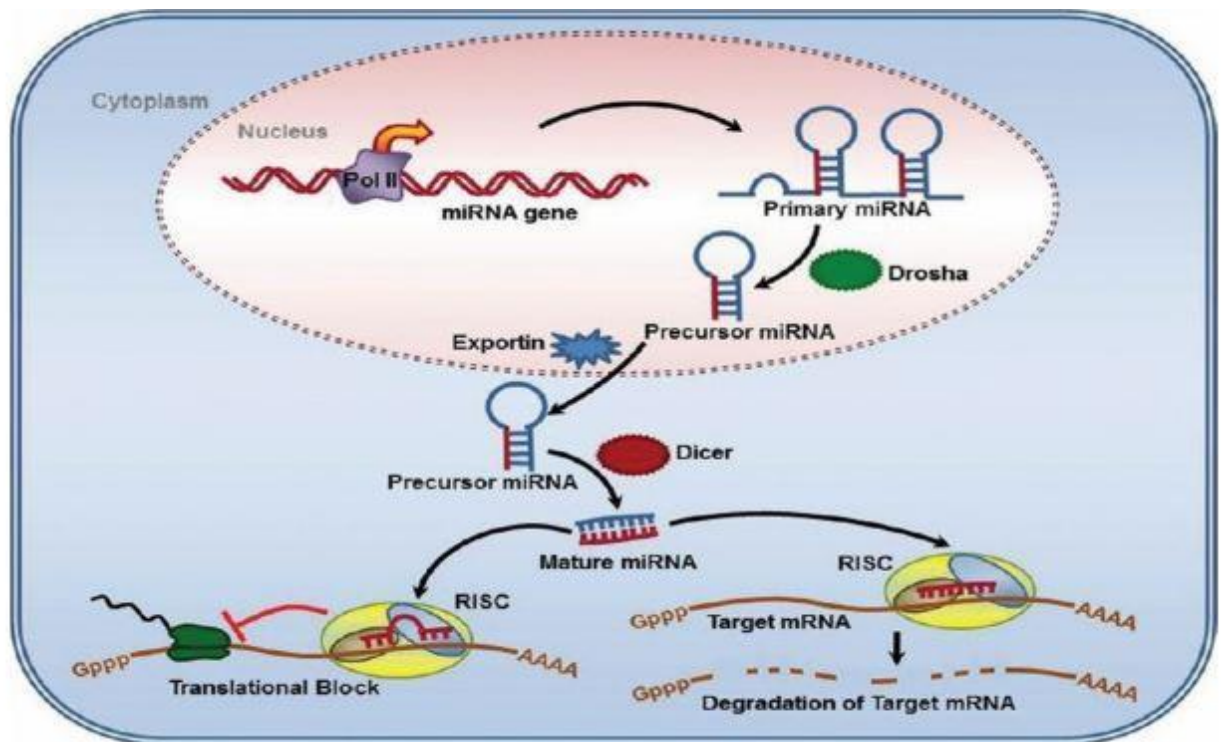
Β η αύξησή του οδηγεί σε υπερέκφραση της N-καντχερίνης και βιμεντίνης και μειωμένη έκφραση του επιθηλιακού δείκτη E-καντχερίνη (Yao et al., 2019).

#### 4.4.3 Μικρά μη κωδικά RNAs - micro RNAs (miRNAs)

Τα microRNAs (miRNAs) αποτελούν μη κωδικά μόρια RNA (ncRNAs) που έχουν μήκος 20-24 νουκλεοτίδια, και τα αντίστοιχα γονίδια τους είτε βρίσκονται μεμονωμένα, είτε οργανωμένα σε συστάδες, δηλαδή σε απόσταση μεταξύ τους περίπου 10.000 ζεύγη βάσεων, στην ίδια γενωμική περιοχή. Τα γονίδια των miRNAs εδράζονται εντός γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (40% αυτών βρίσκονται σε ιντρονικές ή εξωνικές περιοχές) ή σε διαγονιδιακές περιοχές. Αυτά που βρίσκονται εντός ιντρονίων ή εξωνίων μοιράζονται τους υποκινητές των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και συνεπώς συνεκφράζονται με τα γονίδια «ξενιστές» τους. Περισσότερα από το 50% των miRNAs εδράζονται μέσα σε εύθραυστες χρωμοσωμικές περιοχές, οι οποίες συχνά διαγράφονται ή αναδιατάσσονται σε γονιδιωματικές περιοχές που σχετίζονται με την κακοήθεια. Τα ώριμα miRNAs εμφανίζουν υψηλή σταθερότητα όσον αφορά το χρόνο ημιζωής τους ο οποίος φθάνει τις 8 ώρες εντός του κυττάρου, κάτι το οποίο αντικατοπτρίζεται στην αφθονία του συνόλου των μορίων miRNAs ( $1-3 \times 10^5$  μόρια ανά κύτταρο) (Li et al., 2019), (Martinez et al., 2019).

Η βιογένεση των miRNAs (**Εικόνα 16**) επιτελείται στον πυρήνα και το κυτταρόπλασμα. Αρχικά, η μεταγραφή του γονιδίου του miRNA στον πυρήνα, και οδηγεί στο πρωτογενές miRNA (primary: pri-miRNA) το οποίο έχει μήκος από μερικές εκατοντάδες ως και μερικές χιλιάδες νουκλεοτίδια και περιλαμβάνει την 5' καλύπτρα (5' cap structure) και την 3' πολυαδενική ουρά (3' poly-A tail). Στη συνέχεια, το μόριο αυτό κατεργάζεται από την ενδονουκλεάση Drosha (RNase III) και τον συμπαράγοντα DGCR8 και έτσι παράγεται ένα μικρότερο πρόδρομο miRNA, το οποίο ονομάζεται πρόδρομο miRNA (precursor: pre-miRNA). Ακολούθως, αυτό εξάγεται στο κυτταρόπλασμα με τη βοήθεια της exportin-5 όπου επεξεργάζεται περαιτέρω. Η περιοχή της θηλιάς (loop) του pre-miRNA αποκόπτεται με τη βοήθεια

της RNase III που λέγεται Dicer. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία του δίκλωνου ώριμου miRNA. Εν συνεχεία, με τη συμμετοχή των ενζύμων ελικάσες διασπάται στους 2 κλώνους. Ο ένας κλώνος miRNA ενσωματώνεται στο επαγόμενο από miRNA αποσιωπητικό σύμπλοκο (miRNA – induced silencing complex - RISC), ο οποίος λειτουργεί αναγνωρίζοντας συμπληρωματικές αλληλουχίες εντός messenger RNAs – στόχων (mRNAs) και ο συνοδός κλώνος οδηγείται σε αποικοδόμηση (Li *et al.*, 2019).



**Εικόνα 16: Η βιογένεση των miRNAs.** Η επεξεργασία τους γίνεται σε πολλαπλά βήματα που ξεκινούν από τον πυρήνα και καταλήγουν στο κυτταρόπλασμα (Homami and Ghazi, 2016).

Ένα miRNA δύναται να καταστείλει τη μετάφραση ενός μετάγραφου-στόχου είτε διαταράσσοντας τη μεταφραστική αποτελεσματικότητα είτε προκαλώντας τη διάσπαση του mRNA (messenger RNA), μέσω μερικής ή πλήρους συμπληρωματικής σύνδεσής του με το mRNA στόχο. Συνεπώς, τα miRNAs παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση πολλών φυσιολογικών κυτταρικών λειτουργιών, όπως στον πολλαπλασιασμό, την επιβίωση, την απόπτωση και διαφοροποίηση. Ως και σήμερα

έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 30 χιλιάδες miRNA, σύμφωνα με ηλεκτρονική βάση δεδομένων (<http://www.mirbase.org/>) ενώ το 2015 είχαν βρεθεί μόνο 2.000. Αναλύσεις Βιοπληροφορικής υπέδειξαν ότι τα miRNAs δύνανται να ρυθμίζουν 30-60% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Επιπρόσθετα, κάθε miRNA ρυθμίζει δυνητικά περισσότερα από 200 γονίδια, ενώ ταυτόχρονα πολλαπλά miRNAs στοχεύουν ένα μόνο γονίδιο μέσω ενός σύνθετου ρυθμιστικού συμπλόκου (Li *et al.*, 2019).

Τα miRNAs είναι σε μεγάλο βαθμό συσχετισμένα με όλα τα χαρακτηριστικά ενός όγκου, όπως η ογκογένεση, η ανάπτυξη, η μετάσταση, η αγγειογένεση και το ασταμάτητο αντιγραφικό δυναμικό. Η άφθονη έκφραση ορισμένων miRNAs βρέθηκε ότι δύναται να επηρεάσει τα 2 κύρια γενετικά μονοπάτια που προδιαθέτουν για το ουροθηλιακό καρκίνωμα. Μερικά, λοιπόν, miRNAs στοχεύουν στο μονοπάτι FGFR3 (π.χ. τα miR-99a, miR-100, miR-101, και miR-145) ενώ άλλα το μονοπάτι TP53 (όπως τα miR-21 και miR-373) (Homami and Ghazi, 2016). Όπως και τα lncRNAs, έτσι και τα miRNAs σε πολλά καρκινώματα μπορούν να λειτουργούν ογκογόνα ή ογκοκατασταλτικά, αναλόγως του γονιδίου – στόχου τους (Li *et al.*, 2019).

Η έκφραση των miRNAs εμφανίζει ειδικότητα ιστού, γεγονός που ενισχύει την υπόθεση δημιουργίας «υπογραφών» miRNA για ποικιλία συμπαγών όγκων. Μελέτες έδειξαν ότι το profiling των miRNAs είναι πιο έγκυρο και ακριβές στην ταξινόμηση των χαμηλά διαφοροποιημένων όγκων, υποδηλώνοντας ότι μπορούν να αποτελέσουν χρήσιμα μόρια για την έγκαιρη διάγνωση του καρκίνου. Μεγάλος αριθμός μελετών επιβεβαιώνει τις ογκογόνες μεταλλάξεις των miRNAs στο ουροθηλιακό καρκίνωμα της ουροδόχου κύστης. Η έκφραση των miRNAs αποτελεί ένα λειτουργικό ρυθμιστικό δίκτυο που παίζει σημαντικό ρόλο στην πρόοδο του καρκινώματος της ουροδόχου κύστης.

Η αποκρυπτογράφηση της έκφρασης των miRNAs θα παρέχει μεγάλης σημασίας στοιχεία για τη διαλεύκανση των μοριακών μηχανισμών που προκαλούν

την έναρξη, την πρόοδο, και μετάσταση της κακοήθειας καθώς και για τη διαλογή βιοδεικτών (διάγνωσης, ταξινόμησης, πρόγνωσης και πρόβλεψης).

Σε ανασκοπική μελέτη των Li και συνεργατών του, το 2019, προτάθηκε αρχικά ένα πάνελ τεσσάρων miRNAs: miR-101, miR-125a-5p, miR-148b, and miR-151-5p και ένα τριών: miR-148b, miR-181b, and miR-874, ως miRNAs αναφοράς για κανονικοποίηση. Τα miR-16-5p και miR-193a-5p έδειξαν σταθερή έκφραση στον ορό αίματος και χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια αναφοράς για τη μελέτη έκφρασης miRNAs στον ορό για ασθενείς καρκίνου ουροδόχου κύστης (Li *et al.*, 2019).

### Συμπεράσματα ανασκόπησης

**Πάνω από 200 μεμονωμένα ή οικογένειες miRNAs εκφράζονται σε αφθονία στον καρκίνο ουροδόχου κύστης, 53 από τα οποία αναφέρονται σε περισσότερες από μια δημοσιεύσεις.**

**Τα miRNAs μειωμένης έκφρασης δύνανται να λειτουργούν ογκοκατασταλτικά. Το miR-145 φαίνεται να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο καθώς έχει τις περισσότερες αναφορές στα μειωμένης έκφρασης miRNAs στον καρκίνο ουροδόχου κύστης.**

**Το υπερεκφρασμένα miRNAs μπορούν να προωθούν την ογκογένεση στην ουροδόχο κύστη. Το miR-21 έχει δειχθεί να είναι ταυτόχρονα υπερεκφρασμένο στους ιστούς, στο πλάσμα του αίματος και στα εξωσώματα ούρων ασθενών ουροθηλιακού καρκίνου. Χρειάζεται η περαιτέρω μελέτη του.**

**Τα κυκλοφορούντα miRNAs στα σωματικά υγρά, ιδιαίτερα στα ούρα, αναγνωρίζονται ως σημαντική υπογραφή του ουροθηλιακού καρκινώματος και θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες διάγνωσης, πρόγνωσης, ταξινόμησης και υποτροπής.**

**Το miR-146a-5p συχνά υπερεκφράζεται στα ούρα των ασθενών ουροθηλιακού καρκίνου, κάτι το οποίο υποδεικνύει το δυναμικό του ως κατάλληλος βιοδείκτης για έγκαιρη και ταχεία διάγνωση.**

Εικόνα 17: Συμπεράσματα του ρόλου των miRNAs στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης, σύμφωνα με τα έως τώρα δεδομένα (Li *et al.*, 2019).

### *MiRNAs με αρνητική ρύθμιση στο ουροθηλιακό καρκίνωμα (Downregulated)*

Στους όγκους, τα miRNAs με αρνητική ρύθμιση θεωρούνται δυνητικοί ογκοκαταστολείς και συνεπώς έχουν μελετηθεί ιδιαίτερα. Ένα σημαντικό miRNA στον ουροθηλιακό καρκίνο είναι το miR-145. Συγκεκριμένα, 8 μελέτες επισήμαναν τη μειωμένη έκφραση του **miR-145** σε ιστικά δείγματα, και σε ούρα ασθενών ουροθηλιακού καρκίνου. Επιπλέον, έχει βρεθεί αυξημένο σε καρκίνωμα με μετάσταση σε λεμφαδένες. Επομένως, το miR-145 ίσως εμπλέκεται και στη μετάσταση κακοήθων κυττάρων (Li *et al.*, 2019).

Σχεδόν τα μισά miRNAs που έχουν μειωμένη έκφραση στο ουροθηλιακό καρκίνωμα έχουν μελετηθεί εκτεταμένα και η λειτουργία τους έχει δειχθεί *in vitro* και *in vivo*. Ακόμη, σχεδόν όλα αυτά τα μελετημένα miRNAs φυσιολογικά παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση των νεοπλασματικών κυττάρων και αγγειογένεση και προκαλούν τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Σε αυτούς τους εν δυνάμει ογκοκαταστολείς περιλαμβάνονται τα miR-100, miR-99a, miR-124, miR-125b, miR-1826, miR-195, miR-202, miR-23b, miR-26a, miR-30a-5p, miR-31, miR-430, miR-451, miR-5195-3p, miR-582-5p, miR-590-3p, και miR-613. Μερικά miRNAs, συμπεριλαμβανομένων των miR-1, miR-101, miR-1180, miR-1236, miR-133a, miR-143, miR-144, miR-144-5p, miR-145, miR-195-5p, miR-199a-5p, miR-30a-3p και miR-370, φάνηκε να παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό και να επάγουν την απόπτωση των κακοήθων κυττάρων. Ακόμη, για παράδειγμα, η μειωμένη έκφραση του miR-34a στο ουροθηλιακό καρκίνωμα παρουσιάζει αντι-μεταστατική λειτουργία μέσω του σηματοδοτικού μονοπατιού CD44/EMT και μέσω της στόχευσης των NOTCH1 και HNF4G ρυθμίζει αρνητικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη διήθηση. Αντίστοιχα, η χαμηλή του έκφραση συσχετίστηκε με φτωχή πρόγνωση. Ωστόσο, ο ρόλος πολλών από τα παραπάνω miRNAs δεν είναι ίδιος σε όλες τις συναφείς έρευνες, γεγονός που σημαίνει ότι απαιτείται η περαιτέρω μελέτη τους προκειμένου να διευκρινιστεί ο ρόλος τους υπό τις διάφορες ειδικές συνθήκες.

Πολλά miRNAs συμβάλλουν στην αύξηση της ευαισθησίας των νεοπλασματικών κυττάρων στα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Για παράδειγμα, το miR-19a δρα συνεργιστικά με το τριοξείδιο του αρσενικού (Arsenic Trioxide) και παρεμποδίζεται ο πολλαπλασιασμός ενώ ταυτόχρονα επάγεται η απόπτωση των νεοπλασματικών κυττάρων του ουροθηλίου (Cao *et al.*, 2011).

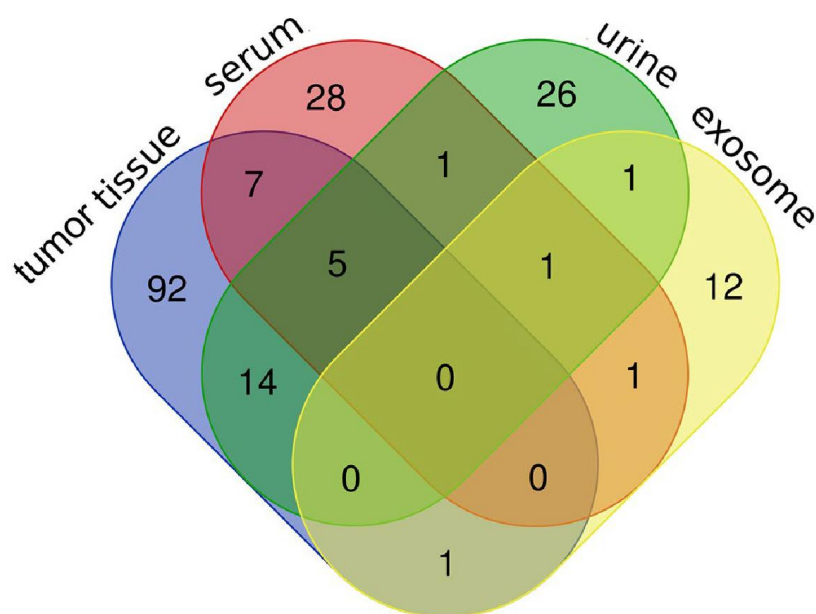
#### *MiRNAs με θετική ρύθμιση στο ουροθηλιακό καρκίνωμα (Upregulated)*

Η αυξημένη έκφραση των miRNAs ίσως σχετίζεται με την προώθηση της ογκογένεσης. Στο πλαίσιο αυτό τα miRNAs: miR-205, miR-96, miR-141, miR-146a-5p, miR-200b, miR-21, miR-106b, και miR-182 συχνά εμφανίζουν αυξημένη έκφραση στους ιστούς ή στα ούρα ασθενών ουροθηλιακού καρκίνου. Τα miR-205, miR-96, miR-141, και miR-182 εκφράζονται κυρίως σε ιστικά δείγματα, ενώ το miR-146a-5p εμφανίζει υψηλότερη έκφραση στα ούρα των ασθενών (Li *et al.*, 2019). Αυτή η υψηλή περιεκτικότητα του miR-146a-5p θα μπορούσε να υποδεικνύει την προοπτική του για χρήση ως βιοδείκτη για ταχεία και πρώιμη διάγνωση του καρκινώματος. Εντωμεταξύ, το **miR-21** βρέθηκε ταυτόχρονα υπερεκφρασμένο σε ιστούς, πλάσμα αίματος και εξωσώματα ούρων των ασθενών, εύρημα το οποίο υποδηλώνει ίσως ότι προάγει τον όγκο. Μένει να εξακριβωθεί ο ρόλος αυτού του miRNA στο ουροθηλιακό καρκίνωμα.

Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι τα μοτίβα έκφρασης των ίδιων miRNAs προερχόμενα από διαφορετικά κλινικά δείγματα (όπως το νεοπλασματικό ιστό, πλάσμα/ορός αίματος ή ούρα) είναι διαφορετικά μεταξύ τους (**Εικόνα 18**). Παραδείγματος χάριν, η έκφραση του miR-92a μειώθηκε στο πλάσμα αίματος αλλά αυξήθηκε σημαντικά σε νεοπλασματικό ιστό και εξωσώματα ούρων των ασθενών. Αντιθέτως αυτή του miR-30b μειώθηκε σε υπερκείμενο υγρό ούρων ασθενών ουροθηλιακού καρκίνου και αυξήθηκε σε νεοπλασματικούς ιστούς. Επιπλέον, τα miR-203, miR-30a-5p, η οικογένεια miR-200, και miR-200a εμφανίζουν διαφορετική έκφραση μεταξύ δειγμάτων ιστού και σωματικών υγρών. Ακόμη, προκαλούν ενδιαφέρον τα διαφορετικά αποτελέσματα έκφρασης των ίδιων miRNAs, με τους



πειραματικούς παράγοντες σταθερούς, στις διαφορετικές μελέτες. Υπάρχει ακόμη περίπτωση κάποια miRNAs να απελευθερώνονται ευκολότερα εξωκυτταρικά, ή πιο συμπυκνωμένα στα ούρα από τους νεφρούς, συγκριτικά με άλλα, κάτι το οποίο οδηγεί στα διάφορα μοτίβα έκφρασης μεταξύ των δειγμάτων ιστού και σωματικών υγρών (π.χ. miR-125b, miR-100, miR-205, miR-96, miR-10a, miR-200a, miR-204, miR-214, miR-99a, miR-19a, miR-222, και miR-15a). Η απόκλιση στην έκφραση των miRNAs στις διάφορες μελέτες μπορεί να οφείλεται σε: διαφορετική έκφραση στα διαφορετικά στάδια του ουροθηλιακού καρκίνου, στη βιοπληροφορική ανάλυση και τα γονίδια αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν και τέλος, σε τεχνικά λάθη (Li *et al.*, 2019).



**Εικόνα 18:** Διάγραμμα Venn που δείχνει την προέλευση διαφορετικά εκφρασμένων miRNAs. Tumor tissue = νεοπλασματικός ιστός, Serum = ορός αίματος, Urine = ούρα, Exosome = εξώσωμα (Li *et al.*, 2019).

Μερικά υπερεκφρασμένα miRNAs, όπως το miR-130b-3p, miR-556-3p και miR-940, λειτουργούν ως ογκογονίδια και προάγουν τη νεοπλασματική ανάπτυξη, μετανάστευση και διήθηση. Επίσης, τα miR-182-5p και miR-940 έδειξαν αντιαποπτωτική δράση στα καρκινικά κύτταρα και το miR-221 άσκησε

αντιαποπτωτική δράση μέσω στόχευσης του μονοπατιού TRAIL και αναστολής της κασπάσης-3. Άλλα miRNAs συμβάλλουν στην ανάπτυξη του όγκου μέσω αύξησης της χημειοανθεκτικότητας, όπως το miR-138 που παρεμποδίζει τη δράση της σισπλατίνης σε νεοπλασματικά κύτταρα.

Η οικογένεια **miR-200** περιλαμβάνει 5 διαφορετικά μόρια, τα miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-429 και miR-141, μερικά από τα οποία έχουν ήδη αναφερθεί παραπάνω. Αποτελεί μια **ιδιαίτερη ομάδα miRNAs**, τα οποία καταστέλλουν την επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή, και παρεμποδίζουν τη νεοπλασματική διήθηση και μετάσταση μέσω θετικής ρύθμισης της έκφρασης της E-καντχερίνης στοχεύοντας άμεσα τους μεταγραφικούς παράγοντες ZEB1 και ZEB2 (Korpal *et al.*, 2008).

Μερικά από τα γονίδια – στόχους αυτών των miRNAs είναι τα *MUC4*, το γονίδιο της φωσφατάσης, *PTEN*, *FOXO1*, *SMAD4*, *RECK*, *ZEB1*, *ZEB2*, *ERBB3*, *ERBB4*, *DAB2IP*, *INPP4A*, *GSK3β*, *IRS1*, και *MAP4K1*. Με βάση τις λειτουργίες τους, αυτά τα γονίδια διακρίνονται σε ογκοκατασταλτικά (π.χ. *PTEN*), σε ογκογονίδια (π.χ. *GSK3β*), σε ρυθμιστές σηματοδοτικών μονοπατιών (π.χ. *ERBB3*, *ERBB4*) και γονίδια που σχετίζονται με τη χημειοανθεκτικότητα (π.χ. *MUC4*).

#### 4.4.4 Έκφραση των miRNAs σε NMIBC και MIBC

Κλινικά, όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, ο ουροθηλιακός καρκίνος διακρίνεται στα στάδια T<sub>a</sub> και T<sub>1</sub>-T<sub>4</sub>, όπου T<sub>a</sub> και T<sub>1</sub> αποτελούν NMIBC (μη μυοδιηθητικοί όγκοι) και T<sub>2</sub>-T<sub>4</sub> είναι οι MIBCs (μυοδιηθητικοί όγκοι). Μελετήθηκαν οι διαφορετικές υπογραφές των miRNAs ανάμεσα στους NMIBC και MIBC και βρέθηκε με q-PCR, υπερέκφραση των miR-146b και miR-9 στους MIBC, και παράλληλα τα miR-9, miR-182, και miR-200b συσχετίστηκαν ειδικότερα με επιθετικότητα του όγκου και πρόγνωση των MIBC σε σχέση με τους NMIBC.

Σε άλλη έρευνα, η έκφραση του miR-185-5p ήταν σε σημαντικά υψηλότερα επίπεδα στο ίζημα ούρων των MIBC ασθενών, σε σχέση με αυτή των NMIBC

ασθενών. Ακόμη, βρέθηκε ότι ασθενείς με υψηλόβαθμους όγκους έδειξαν αξιοσημείωτα υψηλότερα επίπεδα έκφρασης του miR-146a-5p στα ούρα, συγκριτικά με την αντίστοιχη σε ασθενείς με χαμηλόβαθμους όγκους. Τα ίδια φαινόμενα παρατηρήθηκαν αντίστοιχα σε ασθενείς με διηθητικούς και μη διηθητικούς όγκους.

Αξίζει να σημειωθεί ότι πιθανότατα οι επιγενετικές τροποποιήσεις αποτελούν το λόγο για τον οποίο παρατηρείται δυσλειτουργία στην έκφραση των miRNAs στα διάφορα στάδια του ουροθηλιακού καρκίνου. Συγκεκριμένα, βρέθηκε ότι η υπερμεθυλίωση των νησίδων CpG επάγει την αποσιώπηση των miR-200 και miR-205 σε όγκους MIBC σταδίων T2-T4, γεγονός που υποδεικνύει ότι η δυσλειτουργία του miR-200 αποτελεί γεγονός – «κλειδί» σε πολλαπλά σημεία της ογκογένεσης. Μέχρι στιγμής, περίπου 90 miRNAs έδειξαν δυσλειτουργική έκφραση στους MIBCs και NMIBCs, μεταξύ των οποίων τα miR-125b, miR-205 και miR-141 υπερεκφράζονται τόσο στους ιστούς όσο και στα σωματικά υγρά των ασθενών MIBC. Συνεπώς, ίσως αυτά τα miRNAs εμπλέκονται στην μυοδιηθητική οδό των όγκων και δύνανται να χρησιμοποιηθούν ως βιοδείκτες των MIBCs (Li *et al.*, 2019).

#### 4.4.5 Άλλα μη κωδικά RNAs

Εκτός από τα miRNAs, και άλλοι τύποι RNAs χρησιμοποιήθηκαν ως γονίδια αναφοράς σε μελέτες. Σε μελέτη βασιζόμενη σε κλινικά δείγματα, χρησιμοποιήθηκε το snoRNA (small nucleolar RNA) RNU48 ως γονίδιο αναφοράς για ανάλυση της έκφρασης miRNAs ούρων σε ασθενείς με ουροθηλιακό καρκίνο (Miah *et al.*, 2012). Σε άλλη μελέτη, βρέθηκε με χρήση της ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (quantitative PCR ή Real – Time PCR) ότι το SNORD43 αποτελεί κατάλληλο γονίδιο αναφοράς για την ανάλυση των κυκλοφορούντων miRNAs σε ασθενείς με ουρολογικές κακοήθειες και ο συνδυασμός των εξής 2 γονιδίων SNORD43 και RNU1-4 αυξάνει τη σταθερότητα. Επιπρόσθετα, το snoRNA U6 είναι το

πιο συχνά χρησιμοποιημένο RNA γονίδιο αναφοράς σε πολλές έρευνες και ακολουθούν η RNase P, TBP, 5sRNA,  $\mu$ -actin και RPL16 (Sanders *et al.*, 2012).

Τα **circRNAs** αποτελούν ncRNAs που είναι ομοιοπολικά κλειστά σε βρόχο στα 3' και 5' άκρα. Η έλλειψη ελεύθερων 3' ή 5' άκρων παρέχει αυξημένη ανθεκτικότητα στην αποικοδόμηση RNA από εξωριβονουκλεάση, η οποία έχει ως αποτέλεσμα παρατεταμένο χρόνο ημιζωής, άνω των 48 ωρών. Ακόμη και αν οι κυτταρικές τους λειτουργίες είναι ακόμη σε μεγάλο βαθμό άγνωστες, ορισμένα circRNAs παρουσιάζουν σημαντικό ρόλο σε πολλαπλούς τύπους καρκίνου (Zhang *et al.*, 2017), (Kristensen *et al.*, 2018). Επιπλέον, αν και η έρευνα του ρόλου των circRNA στον ουροθηλιακό καρκίνο είναι ακόμη περιορισμένη, έχει αποδειχθεί ότι υπάρχουν αρκετά circRNAs που υπερεκφράζονται. **Αυτά τα ενδογενή circRNAs στοχεύουν ανταγωνιστικά ειδικά miRNAs, καταστέλλοντας έτσι τη δραστηριότητά τους.** Για παράδειγμα, το circTCF25 έχει αποδειχθεί ότι προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και τη μετάσταση δρώντας ως «σφουγγάρι» RNA των miR-103a-3p και miR-107, με αποτέλεσμα αυξημένα επίπεδα CDK6 (Zhong *et al.*, 2016). Επιπλέον, το circRNA-MYLK και circRNA-CTDP1 δεσμεύουν ανταγωνιστικά το miR-29a-3p οδηγώντας σε αυξημένη έκφραση των γονιδίων - στόχων: DNMT3B, VEGFA, HAS3 και ITGB1, με αποτέλεσμα αγγειογένεση, EMT και μετάσταση. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκαν μόρια circRNA που έχουν ογκογόνο ρόλο στην ογκογένεση και εξέλιξη του ουροθηλιακού καρκίνου, συμπεριλαμβανομένων των circCEP128, circRNA-VANGL1, circPRMT5 και circRNA-cTFRC.

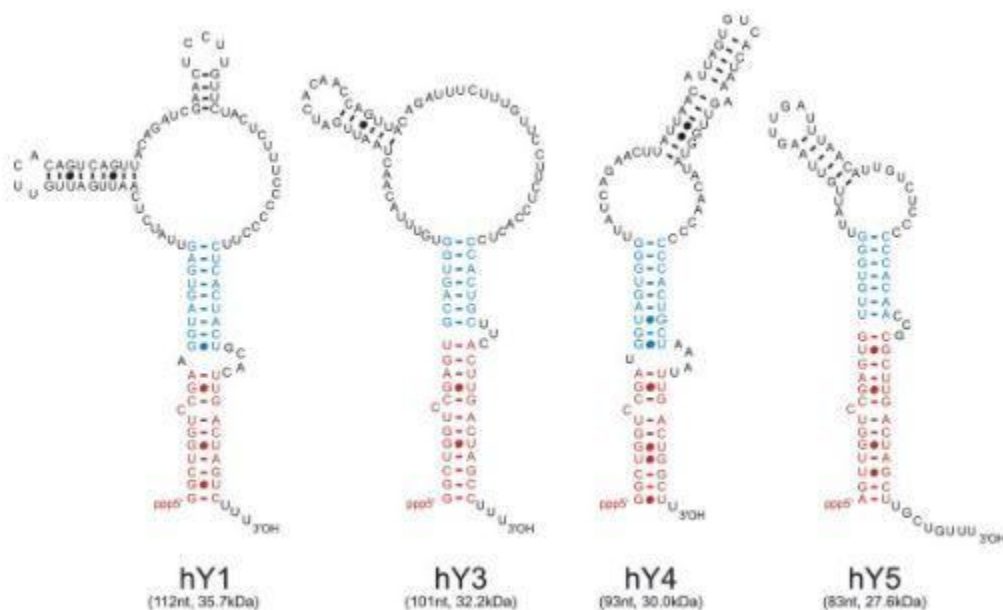
Σε αντίθεση με αυτόν τον ρόλο πολλών circRNAs, μερικά circRNAs δρουν ογκοκατασταλτικά και έχει αποδειχθεί ότι εκφράζονται χαμηλότερα στο ουροθηλιακό καρκίνωμα. Για παράδειγμα, το circRNA-ITCH καταστέλλει την επιθετική βιολογική συμπεριφορά του ουροθηλιακού καρκίνου μέσω της αυξημένης έκφρασης του p21 και του PTEN, με τη δέσμευση των miR-17 και miR-224, ενώ το circRNA-BCRC-3 δρα ως αναστολέας των miR-182-5p με αποτέλεσμα αυξημένη έκφραση του p27. Άλλα ογκοκατασταλτικά circRNAs που βρέθηκαν πρόσφατα είναι τα εξής: circRNA-BCRC4, circRNA-Cdr1as και circMTO1.

Συμπερασματικά, η εκτεταμένη αφθονία, η σταθερότητα και η ιστοειδικότητά τους στην έκφραση καθιστά τα circRNAs ελκυστικά για κλινική έρευνα (Kristensen *et al.*, 2018), (Zhang *et al.*, 2017), (Zhong *et al.*, 2016).

Τα μόρια **Y RNA** είναι μικρά ncRNAs (μήκους 21-24 νουκλεοτίδια) απαραίτητα για την αντιγραφή του DNA μέσω αλληλεπιδράσεων με τη χρωματίνη και πρωτεΐνες έναρξης. Τέσσερα Y RNA έχουν ταυτοποιηθεί και είναι εξαιρετικά συντηρημένα εξελικτικά, τα Y1, Y3, Y4 και Y5 (**Εικόνα 19**). Αυτά τα ncRNAs προστατεύονται από την αποικοδόμηση μέσω της αλληλεπίδρασής τους με την Ro<sup>2</sup> (Ro60 60000 Mr), ένα μόριο ριβονουκλεοπρωτεΐνης που τους παρέχει σταθερότητα και τους επιτρέπει την αφθονία (περίπου  $1 \times 10^5$  μόρια ανά κύτταρο). Παρόλο που έχει αναφερθεί ο πιθανός ρόλος των Y RNAs στο ουροθηλιακό καρκίνωμα, από διάφορες μελέτες, έχουν δημοσιευθεί αντιφατικές παρατηρήσεις. Οι Christon και οι συνεργάτες του το 2008 περιέγραψαν σημαντική υπερέκφραση δύο YRNAs, των Y1 και Y3, ενώ οι Tolkach και οι συνεργάτες πρόσφατα δημοσίευσαν σημαντική μείωση της έκφρασης και των τεσσάρων Y RNA σε ιστό ουροθηλιακού καρκινώματος σε σύγκριση με φυσιολογικό ιστό «μάρτυρα» (Christon *et al.*, 2008), (Tolkach *et al.*, 2017). Κατά συνέπεια, τονίζεται η ανάγκη για περαιτέρω μελέτες για να αποσαφηνιστεί ο πιθανός ρόλος τους στην αιτιολογία και εξέλιξη του ουροθηλιακού καρκινώματος.

---

<sup>2</sup> Πρωτεΐνη δέσμησης RNA (RNA – binding protein) που προσδένεται σε ncRNAs, pre-5S rRNA και στα Y RNAs. Δύναται να σταθεροποιήσει μερικά από αυτά τα RNAs και να τα προστατεύσει από την αποικοδόμηση. <https://www.uniprot.org/uniprot/P10155>.



**Εικόνα 19: Τα ανθρώπινα Y RNAs.** Απεικονίζονται η δομή τους, το μήκος τους (nt = nucleotides / νουκλεοτίδια), και το μοριακό τους βάρος (kDa) (Kowalski and Krude, 2015).

Τα **piRNAs** είναι βραχεία μονόκλινα ncRNAs (μήκους 26-31 νουκλεοτίδια), χωρίς συγκεκριμένη δομή, που μεσολαβούν επιγενετικά και μετα-μεταγραφικά στην αποσιώπηση γονιδίων μέσω αλληλεπιδράσεων με PIWI πρωτεΐνες. Το μικρό τους μέγεθος υποδηλώνει ιδιαίτερη αντίσταση στην αποικοδόμηση, η οποία μπορεί να οδηγήσει στην παρουσία σχετικά πολλών μορίων piRNA. Έχει βρεθεί απορύθμιση ορισμένων piRNAs σε διάφορους τύπους καρκίνου. Στο ουροθηλιακό καρκίνωμα, οι Martinez et al. περιέγραψαν τη συσχέτιση υψηλών επιπέδων piRNA FR004819 με φτωχότερη επιβίωση, ενώ οι Taubert et al. όρισαν μια σημαντική σχέση μεταξύ μειωμένης έκφρασης PIWIL2 και κακής πρόγνωσης (Martinez *et al.*, 2019). Επιπλέον, το piRABC εμφανίζει χαμηλή έκφραση στο νεοπλασματικό ιστό του ουροθηλίου, γεγονός που προάγει την ανάπτυξη και εξέλιξη αυτής της παθολογίας. Εκτός αυτού, έχει προταθεί ότι το piRABC μπορεί να προάγει την απόπτωση των κυττάρων στο ουροθηλιακό καρκίνωμα με την αύξηση έκφρασης της πρωτεΐνης TNFSF4.

## 5. ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΗ ΡΥΘΜΙΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

### 5.1 Ανοσοκυτταρικό περιβάλλον

Η έναρξη και η εξέλιξη του καρκίνου συχνά σχετίζονται με την παρεμπόδιση της αντινεοπλασματικής ανοσοαπόκρισης και δυσλειτουργία της φλεγμονώδους δραστηριότητας. Οι συμπαγείς όγκοι χαρακτηρίζονται από την παρουσία ανοσοκυττάρων στο μικροπεριβάλλον τους, όπως τα λεμφοκύτταρα T και B, τα φυσικά φονικά κύτταρα (Natural Killer - NK), μακροφάγα (Macrophages) και αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (Antigen – Presenting Cells – APCs). Αυτά τα ανοσοκύτταρα εμφανίζουν διαφορετικές συμπεριφορές και μορφολογίες ως αποτέλεσμα διαφοροποίησης, που μερικές φορές οδηγείται από επιγενετικώς ρυθμιζόμενες γενεαλογικές αλλαγές που επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων ζωτικής σημασίας για την ταυτότητα των ανοσοκυττάρων και προώθηση κυτταρικών αποκρίσεων σε ερεθίσματα (**Εικόνα 20**)

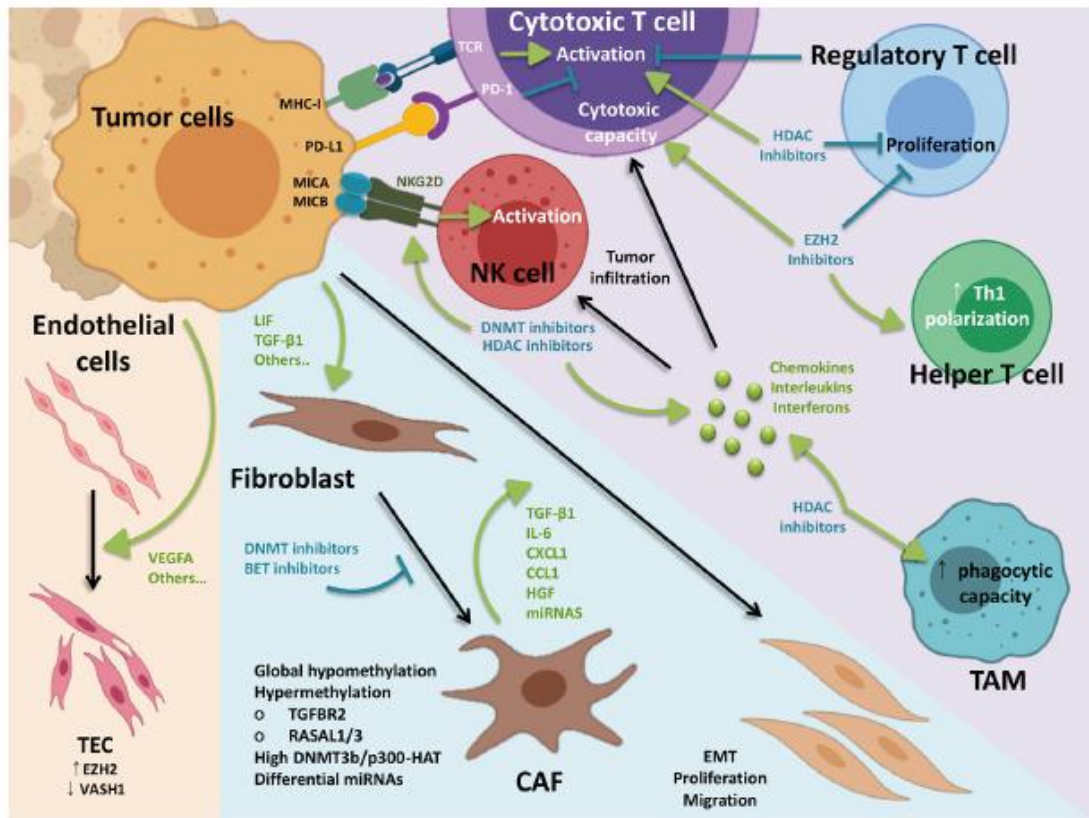
Πρόσφατα, έχει δειχθεί ότι η μετα-μετάφραστική τροποποίηση των ιστονών μπορεί να ρυθμίσει τη συμπεριφορά των κυττάρων που εμπλέκονται στην ανοσοαπόκριση, συμπεριλαμβανομένων των μακροφάγων που σχετίζονται με τον όγκο (Tumor Associated Macrophages - TAMs), των ρυθμιστικών T κυττάρων (T – regulatory - Tregs), των δενδριτικών κυττάρων (DCs), των κυττάρων NK, των κατασταλτικών κυττάρων που προέρχονται από μυελό (Myeloid-Derived Suppressor Cells - MDSCs), των T κυττάρων - τελεστών (effector T Cells - T effs) και άλλων. Με βάση δεδομένα προσδιορισμού αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος από το BLUEPRINT Epigenome Project (<http://www.blueprint-epigenome.eu>) οι Schuyler et al. προσδιόρισαν τα μοτίβα αναστροφής μεθυλίωσης στις μυελοειδείς και λεμφοειδείς γενεές σε νεοπλασματικούς ιστούς, όπου τα νεοπλάσματα που προέρχονται από λεμφοειδή χάνουν τα μοτίβα CpG μεθυλίωσης, ενώ οι κακοήθειες των μυελοειδών αυξάνουν σημαντικά τα επίπεδα μεθυλίωσης DNA (Schuyler *et al.*, 2016), (Martinez *et al.*, 2019). Αυτές οι παρατηρήσεις έχουν επιβεβαιωθεί από

άλλους συγγραφείς που αναφέρουν ότι διαφορετικά πρότυπα μεθυλίωσης συμβάλλουν στην ενεργοποίηση μυελοειδών και λεμφοειδών καρκινικών κυττάρων.

Το κύριο κυτταρικό συστατικό του ανοσοποιητικού συστήματος που διηθεί συμπαγείς όγκους είναι τα **TAMs**, τα οποία συχνά σχετίζονται με χειρότερη πρόγνωση. Τα TAMs διακρίνονται σε 2 κατηγορίες: M1 και M2. Είναι γνωστό γενικά ότι τα M1 μακροφάγα έχουν αντι-ογκογόνα δράση, ενώ τα M2 μπορούν να προωθήσουν την ανάπτυξη του όγκου. Τα γονίδια των M2 μακροφάγων ρυθμίζονται επιγενετικά από αμοιβαίες τροποποιήσεις μεταξύ των H3K4 και H3K27. Μετά από διέγερση της IL-4, συμβαίνει μείωση της διμεθυλίωσης H3K27 και τριμεθυλίωσης (H3K27me2 / 3) καθώς και μεταγραφική ενεργοποίηση συγκεκριμένων M2 γονιδίων. Εκτός από τη μεθυλίωση, κατά τη διάρκεια διαφοροποίησης μονοκυττάρων προς μακροφάγα, υπάρχει μια τεράστια αναδιάρθρωση μοτίβων ακετυλίωσης λυσίνης σε ρυθμιστικά γονιδιακά στοιχεία με θετική συσχέτιση μεταξύ της επιδεικτικής σε μεταγραφή ακετυλιωμένης ιστόνης H3 και της δραστηριότητας των ρυθμιστικών στοιχείων.

Το στρώμα του όγκου χαρακτηρίζεται από καλοήθη κύτταρα και εξωκυτταρικά συστατικά που περιβάλλουν τον όγκο, που έχουν βασικό, καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη και εξέλιξή του. Οι ινοβλάστες στο μικροπεριβάλλον του όγκου διαφοροποιούνται σε ινοβλάστες που σχετίζονται με τον όγκο - **CAFs (Cancer Associated Fibroblasts)**, και πλέον αποτελούν τα κύρια συστατικά στο νεοπλασματικό στρώμα. Οι περισσότερες σχετικές μελέτες υποδεικνύουν προ-νεοπλασματικές λειτουργίες που περιλαμβάνουν αναδιαμόρφωση του εξωκυτταρικού στρώματος, αγγειογένεση, ανοσοκαταστολή και χημειοανθεκτικότητα (Martinez *et al.*, 2019).





**Εικόνα 20: Επιγενετικό τοπίο του μικροπεριβάλλοντος του όγκου.** Τα νεοπλασματικά κύτταρα μπορούν να επηρεάσουν το στρώμα μέσω διαφορετικών παραγόντων, με τους διαλυτούς παράγοντες να είναι πιο χαρακτηριστικοί. Το VEGFA που παράγεται από νεοπλασματικά κύτταρα επάγει την EZH2 από τα TEC (Tumor Endothelial Cells), το οποίο οδηγεί στην υπερμεθυλίωση του αντι-αγγειογόνου Vash1. Επίσης προκαλούμενη από νεοπλασματικά κύτταρα, η διαφοροποίηση των CAFs σχετίζεται με διάφορα επιγενετικά χαρακτηριστικά και μπορεί να παρεμποδιστεί από έναν αριθμό αναστολέων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Με τη σειρά τους, οι CAFs προάγουν τη νεοπλασματική ανάπτυξη και μετάσταση μέσω έκκρισης διαλυτών παραγόντων και αναδιαμόρφωσης του στρώματος. Από την πλευρά του ανοσοποιητικού, τα κυτταροτοξικά T κύτταρα και τα NKs είναι οι κύριοι παράγοντες της αντινεοπλασματικής ανοσοαπόκρισης. Η ισορροπία μεταξύ ενεργοποίησης και αναστολής σημάτων που προέρχονται από κύτταρα στόχευσης όγκου καθορίζει την κυτταροτοξική δράση αυτών των κυττάρων. Άλλα ανοσοκύτταρα όπως τα ρυθμιστικά T κύτταρα και τα μακροφάγα είναι κρίσιμα στην αντινεοπλασματική ανοσοαπόκριση. Αξίζει να σημειωθεί ότι υπάρχουν μυελοειδείς και λεμφοειδείς σειρές που παρουσιάζουν αντίστροφα πρότυπα μεθυλίωσης σε νεοπλασματικούς ιστούς, συμβάλλοντας στην παρεκκλίνουσα λειτουργικότητα. Η αναστολή των επιγενετικών

συγγραφέων μπορεί να αποκλείσει τη διαφοροποίηση και λειτουργία των Tregs, ενώ προάγει την αντινεοπλασματική δραστηριότητα στα Tregs. Η επαναφορά επιγενετικών τροποποιήσεων, που οφείλονται στον όγκο και αποτυπώνονται στο TME, μπορεί να προκαλέσει την αποτελεσματική εξάλειψη κακοήθων κυττάρων σε συνδυασμό με υπάρχουσες θεραπείες, όπως η ανοσοθεραπεία. **TEC**: Tumor Endothelial Cells, ενδοθηλιακά κύτταρα όγκου, **CAFs**: Cancer Associated Fibroblasts, ινοβλάστες που σχετίζονται με τον καρκίνο, **EMT**: Epithelial Mesenchymal Transition, επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή; **TAM**: Tumor Associated Macrophages, μακροφάγα που σχετίζονται με τον όγκο (Martinez *et al.*, 2019).

Η υπάρχουσα γνώση για τη βιολογία των CAFs είναι περιορισμένη και προέρχεται κατά βάση από πειράματα *in vitro*. Ωστόσο, έχει δειχθεί θετική συσχέτιση μεταξύ των ενεργών CAFs και της έκφρασης των δεικτών της EMT και χειρότερη πρόγνωση του ουροθηλιακού καρκίνου. Τα νεοπλασματικά κύτταρα δύνανται να επάγουν τη διαφοροποίηση των ινοβλαστών σε CAFs μέσω εξωσωμάτων και άλλων παραγόντων όχι πλήρως αναγνωρισμένων. Ως αποτέλεσμα, οι διαφοροποιημένες CAFs επάγουν την κινητικότητα και τη μετανάστευση των νεοπλασματικών κυττάρων μέσω επαγωγής της EMT, λόγω έκκρισης διαλυτών παραγόντων, όπως TGF- $\beta$ 1, IL-6, HGF (Hepatocyte Growth Factor), είτε μέσω άμεσης προσέλευσης χημειοκινών (π.χ. CXCL1, CCL1) (Martinez *et al.*, 2019).

Μελέτες ανάλυσης των μοτίβων μεθυλίωσης έδειξαν ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις διαδραματίζουν σημαντικότατο ρόλο στην ενεργοποίηση ινοβλαστών και διαφοροποίηση των CAFs. **Πράγματι, οι ανθρώπινες CAFs διακρίνονται από γενικότερη υπομεθυλίωση.** Παρ' όλ' αυτά, ορισμένα γονίδια – κλειδιά εμφανίζονται υπερμεθυλιωμένα στα CAFs, όπως τα *TGFBR2*, *RASAL1* κ.α.

Ακόμη, πολλές μελέτες υποδεικνύουν ότι στη διαφοροποίηση και λειτουργία των CAFs εμπλέκονται και τα miRNAs. Αυτά μπορούν είτε να εκφράζονται από τις CAFs, είτε να ενσωματώνονται μέσω εξωσωμάτων. Είναι δυνατό να συμβαίνει και το αντίστροφο, όπου οι CAFs τροποποιούν τη συμπεριφορά των νεοπλασματικών κυττάρων μέσω μεταφοράς των miRNAs. Στο ουροθηλιακό καρκίνωμα, μια μελέτη

συνέκρινε την έκφραση των miRNAs μεταξύ ινοβλαστών από υγιείς και νεοπλασματικούς ιστούς και τα ευρήματα έδειξαν υψηλότερη έκφραση των miR-16 και miR-320. Ωστόσο, παραμένει το ερώτημα ποιές λειτουργίες ρυθμίζουν τις CAFs και αν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την κατάσταση του καρκινικού στρώματος.

Στους συμπαγείς όγκους, η de novo δημιουργία αιμοφόρων αγγείων, γνωστή ως αγγειογένεση, παρέχει την κατάλληλη τροφοδότηση στον αναπτυσσόμενο όγκο. Επομένως, η στόχευση της αγγειογένεσης μέσω παρεμπόδισης σηματοδότησης του αγγειακού επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor) εξετάζεται για την αντιμετώπιση του ουροθηλιακού καρκίνου σε συνδυασμό με τις υπάρχουσες θεραπευτικές προσεγγίσεις.

Στο ουροθηλιακό καρκίνωμα, ο υπερβολικός πολλαπλασιασμός των ενδοθηλιακών κυττάρων του όγκου (**TECs – Tumor Endothelial Cells**) έχει συνδεθεί με τη σταδιοποίηση και φτωχότερη επιβίωση των ασθενών. Οι διηθητικές κυτταρικές σειρές του ουροθηλίου εμφανίζουν αυξημένη πρόσφυση στα ενδοθηλιακά κύτταρα μέσω των MUC1 και CD43 που προσδένουν στον ICAM-1, κάτι το οποίο θα μπορούσε να συνδεθεί με μεταστατικό δυναμικό. Επιπλέον, μια *in vitro* μελέτη έδειξε ότι τα TECs ίσως προωθούν την ανάπτυξη των ουροθηλιακών καρκινικών κυττάρων με παρακρινή τρόπο, που περιλαμβάνει την έκκριση του επιθηλιακού αυξητικού παράγοντα EGF (Epithelial Growth Factor) από τα TECs ως απόκριση στον προερχόμενο από τον όγκο VEGF. Τέλος, τα TECs βρέθηκαν στο MIBC να υπερεκφράζουν τον αγγειογενετικό παράγοντα θρομβοσπονδίνη-2 (TSP2), ο οποίος συμβάλλει στην ανεξέλεγκτη αγγειογένεση (Roudnicky *et al.*, 2018).

Είναι ευρέως γνωστό ότι οι επιγενετικές τροποποιήσεις διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων. Πράγματι, μια πρόσφατη μελέτη των Wang και συναδέλφων του υποδεικνύει ότι η απόκριση στον παράγοντα VEGFA βασίζεται σε μεγάλο βαθμό στους επιγενετικούς μηχανισμούς (Zhou *et al.*, 2013).

- Οι αναστολείς αναδιαμόρφωσης χρωματίνης μειώνουν την ανάπτυξη του όγκου και την αγγειογένεση δρώντας στα καρκινικά και ενδοθηλιακά κύτταρα. Συγκεκριμένα, η υψηλή έκφραση της EZH2 στα TECs σχετίζεται με υψηλόβαθμης κακοήθειας και υψηλού σταδίου καρκίνωμα και φτωχότερη επιβίωση.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι οι βιολογίες των CAFs και TECs συναντώνται στην ενδοθηλιομεσεγχυματική μετατροπή (EndMT – Endothelial to Mesenchymal Transition) που παρατηρείται στον καρκίνο. Χρησιμοποιώντας τη διαδικασία ανοσοκατακρήμνισης χρωματίνης (ChIP-Seq), οι Nagai N. και συνεργάτες έδειξαν ότι ο μεταγραφικός παράγοντας ERG/FLI1 σχετίζεται με την ακετυλίωση H3K27ac στις περιοχές του ενισχυτή και υποκινητή, στα διάφορα γονίδια των ECs, προάγοντας την έκφραση του miR-126, που με τη σειρά του καταστέλλει τα γονίδια EndMT. Τέλος, χρησιμοποιώντας διαθέσιμα δεδομένα, η ίδια ομάδα έδειξε ότι η χαμηλότερη έκφραση του ERG συσχετίζεται σημαντικά με φτωχή πρόγνωση (Nagai *et al.*, 2018).

Κατά την ανάλυση της κατάστασης ενεργοποίησης των διηθητικών στον όγκο λεμφοκυττάρων (Tumor – Infiltrating Lymphocytes - TILs), TAMs και DCs, αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι **η κατάσταση μεθυλίωσης των ανοσογονιδίων επηρεάζει την ανοσοαπόκριση του όγκου**, και συσχετίζεται με την πυκνότητα των TILs και την εξέλιξη του όγκου. Για παράδειγμα, σε παρθένα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα, ο υποκινητής του γονιδίου της ιντερφερόνης-γ (IFN-γ) και ο ανοδικός ενισχυτής είναι μεθυλιωμένοι. Ωστόσο, στα λεμφοκύτταρα Th1, όπου προκαλείται η έκφραση IFN-γ, ο υποκινητής και ενισχυτής της απομεθυλιώνονται, υποδηλώνοντας έναν σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση των Th1/Th2 (Martinez *et al.*, 2019).

## 6. ΤΡΕΧΟΝΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΟΙ ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΒΙΟΔΕΙΚΤΕΣ ΤΟΥ ΟΥΡΟΘΗΛΙΑΚΟΥ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΣΤΟΙΧΕΣ ΘΕΡΑΠΕΙΕΣ

Οι πρώτες ενδείξεις συσχέτισης της επιγενετικής με την καρκινογένεση προήλθαν από τις μελέτες γονιδιακής έκφρασης και μεθυλίωσης του DNA. Αυτές οι πρώτες παρατηρήσεις ενισχύθηκαν από πρόσφατα αποτελέσματα από τη Διεθνή Κοινότητα Καρκινικού Γονιδιώματος (International Cancer Genome Consortium - ICGC). Η αλληλούχιση ολόκληρου του γονιδιώματος (Whole Genome Sequencing) σε μια ποικιλία όγκων παρείχε έναν κατάλογο από επαναλαμβανόμενες σωματικές μεταλλάξεις σε πολλούς επιγενετικούς ρυθμιστές. Ένα κεντρικό και βασικό σημείο στην ανάλυση των καρκινικών γονιδιωμάτων είναι η ταυτοποίηση των «οδηγών» μεταλλάξεων (driver mutations), οι οποίες εμπλέκονται με σχέση αιτίου αιτιατού στη διαδικασία της ογκογένεσης. Μια χαρακτηριστική ιδιότητα των οδηγών μεταλλάξεων είναι ότι εντοπίζονται σε ποικιλία καρκίνων, ή/και συχνά είναι παρούσες σε υψηλό επίπεδο επιπολασμού σε συγκεκριμένους τύπους όγκων.

Η καρκινογένεση στην ουροδόχο κύστη περιλαμβάνει αλλαγές σε πολλαπλά μονοπάτια. Το αποτέλεσμα αυτών των μεταλλάξεων είναι αυτό που θα καθορίσει την πορεία της νόσου. Συνεπώς, τα μόρια που υφίστανται τις ποικίλες αλλαγές, όχι μόνο χρησιμεύουν ως προγνωστικοί δείκτες, αλλά και ως θεραπευτικοί στόχοι (Mitra, 2016).

Η δυνατότητα αναστροφής των επιγενετικών αλλαγών (DNA μεθυλίωση και χρωματινικές τροποποιήσεις) αντιπροσωπεύει έναν ελκυστικό στόχο για θεραπεία του ουροθηλιακού καρκινώματος. Έναν επιπρόσθετο στόχο της επιγενετικής θεραπείας αποτελεί η διαχείριση των miRNAs, μόρια πολλά υποσχόμενα (Faleiro *et al.*, 2017), (Sandra P. Nunes *et al.*, 2020)

## 6.1 Η μεθυλίωση του DNA ως επιγενετικός βιοδείκτης στην υγρή βιοψία

Έναν αναδυόμενο βιοδείκτη σε δείγμα ούρων ή αίματος αποτελεί η **DNA μεθυλίωση**. Εφόσον οι αλλαγές στη μεθυλίωση είναι χημικά σταθερές, δύνανται να εντοπιστούν στην υγρή βιοψία, στα κυκλοφορούντα DNAs που βρίσκονται εκτός κυττάρου, και στα κύτταρα εντός του ιστού. Επί του παρόντος, υπάρχουν πολλαπλές μέθοδοι για την ανίχνευση αλλαγών στη μεθυλίωση, συμπεριλαμβανομένων της ανάλυσης του ολικού μεθυλιώματος και ειδικών γονιδίων ενδιαφέροντος. Η πλειοψηφία των μεθόδων αξιολόγησης συγκεκριμένων γονιδίων βασίζονται σε μετατροπή διθειώδους άλατος και κατόπιν PCR και αλληλούχιση, πυροαλληλούχιση ή ειδική για μεθυλίωση PCR (Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης - Polymerase Chain Reaction - PCR), μεταξύ άλλων, που γενικά εμφανίζει υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα.

Έγινε ανάλυση ενός πάνελ δεικτών (DAPK, RARβ, E-cadherin και p16) με χρήση PCR ευαίσθητη στη μεθυλίωση και ως αποτέλεσμα αποδείχθη 91% ευαισθησία και 76% ειδικότητα, ενώ σε πάνελ άλλων δεικτών (DAPK, BCL2 και TERT) βρέθηκε 78% ευαισθησία και 100% ειδικότητα. Συνεπώς, οι δείκτες DNA μεθυλίωσης παρουσιάζουν πολυάριθμα πλεονεκτήματα όπως σταθερότητα, ευαίσθητη ανίχνευση με χρήση της Real-Time PCR (PCR σε πραγματικό χρόνο).

Επιπλέον αξιοσημείωτη είναι η εξής παρατήρηση. Το πάνελ των μεθυλίωσεων των *HOXA9*, *PCDH17*, *POU4F2*, και *ONECUT2* εντόπισε το ουροθηλιακό καρκίνωμα με 90,5% ευαισθησία και 73,2% ειδικότητα σε δείγματα ούρων σε Κινέζους ασθενείς που παρουσίασαν αιματοουρία, οδηγώντας τους συγγραφείς της έρευνας στην εκτίμηση ότι περίπου το 60% των κυστεοσκοπήσεων θα μπορούσαν να έχουν αποφευχθεί. Ακόμη, ένα πάνελ μεθυλίωσης των *GDF15*, *TMEFF2*, και *VIM* διέκρινε τους ασθενείς ουροθηλιακού καρκίνου από τους υγιείς μάρτυρες και τους ασθενείς καρκινώματος προστάτη και νεφρών με ευαισθησία 94% και ειδικότητα 90% σε δείγματα ιζημάτων ούρων. Επιπρόσθετα, οι DNMTs

αυξάνονται στο ουροθηλιακό καρκίνωμα, γεγονός που τις καθιστά ελκυστικό θεραπευτικό στόχο (Martinez *et al.*, 2019).

Επιπρόσθετα, οι Friedrich και οι συνεργάτες ανέφεραν υπερμεθυλίωση των γονιδίων **DAPK**, **BCL2** και **TERT** σε δείγματα ούρων από ασθενείς ουροθηλιακού καρκίνου (Friedrich *et al.*, 2004). Ακόμη, η μεθυλίωση ορισμένων γονιδιακών υποκινητών μπορούν να είναι ενδεικτικοί της πρόγνωσης. Για παράδειγμα, η μεθυλίωση του υποκινητή του γονιδίου RUNX3 σχετίζεται με υψηλότερο κίνδυνο εξέλιξης του καρκίνου και χαμηλότερη επιβίωση (Kim *et al.*, 2008).

Πάρα πολύ πρόσφατα, δημιουργήθηκε ένα **επιγενετικό «τεστ» παρακολούθησης υποτροπής σε NMIBCs** Bladder EpiCheck™ (Nucleix, Rehovot, Israel) που βασίζεται στη μεθυλίωση γονιδίων και εφαρμόζεται αυτή τη στιγμή στην κλινική πράξη, με χρήση υλικού υγρής βιοψίας (Mancini *et al.*, 2020). Η εξέταση αυτή στηρίζεται στο γεγονός ότι οι NMIBCs αποτελούν μοριακά ετερογενείς όγκους και μπορούν να διακριθούν σε επιμέρους μοριακές ομάδες, προκειμένου να επιτευχθεί η πρόγνωση της νόσου και η πρόβλεψη για τη θεραπεία. Συγκεκριμένα, γίνεται η ανάλυση σε δείγμα ούρων του ασθενούς 15 γονιδιωματικών τόπων που σχετίζονται με υψηλό επιπολασμό μεθυλίωσης του DNA σε νεοπλασματικά κύτταρα της ουροδόχου κύστης.

## 6.2 Η μεθυλίωση των ιστονών ως επιγενετικός βιοδείκτης

Παρατηρήθηκε συνολική αύξηση της μεθυλίωσης ιστονών σε δείγματα ουροθηλιακού καρκίνου, και συγκεκριμένα σε υποομάδα ασθενών με NMIBC. Στους ασθενείς αυτούς συσχετίστηκε η αυξημένη μεθυλίωση στις **H3K9** και **H3K27** με υψηλόβαθμης κακοήθειας καρκινώματα. Ωστόσο, οι ερευνητές δεν εντόπισαν συσχέτιση μεταξύ ιστονικής μεθυλίωσης και πιθανότητας υποτροπής και επιβίωσης από τον καρκίνο (Ellinger *et al.*, 2014). Ενδιαφέρων παρουσίασε μια άλλη μελέτη της ίδιας ερευνητικής ομάδας η οποία έδειξε ότι η μείωση σε άλλα μοτίβα μεθυλίωσης

ιστονών (H3K4 και H4K20), θα μπορούσε να αποτελεί προγνωστικό βιοδείκτη για την επιβίωση ασθενών από MIBC που υπέστησαν ριζική κυστεκτομή (Schneider *et al.*, 2011), (Faleiro *et al.*, 2017). Η ύπαρξη διαφορετικών μοτίβων μεθυλίωσης ιστονών στους μυοδιηθητικούς και μη μυοδιηθητικούς όγκους υποδεικνύει ότι οι ασθενείς θα ανταποκρίνονται με διαφορετικό τρόπο στις επιγενετικές θεραπείες που θα επηρεάζουν την ιστονική μεθυλίωση. Τα δεδομένα αυτά ενδυναμώνουν την ανάγκη ανακάλυψης βιοδεικτών που θα προβλέπουν την απόκριση στην επιγενετική θεραπεία.

### 6.3 Κυκλοφορούντα miRNAs ως αναδυόμενοι επιγενετικοί βιοδείκτες στην υγρή βιοψία

Μεταξύ των διαφορετικών ncRNAs που περιγράφηκαν παραπάνω, τα miRNAs είναι αυτά που έχουν μελετηθεί περισσότερο σε υγρές βιοψίες ως σήμερα. Έχουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που τα καθιστούν υποψήφιους βιοδείκτες σε υγρή βιοψία:

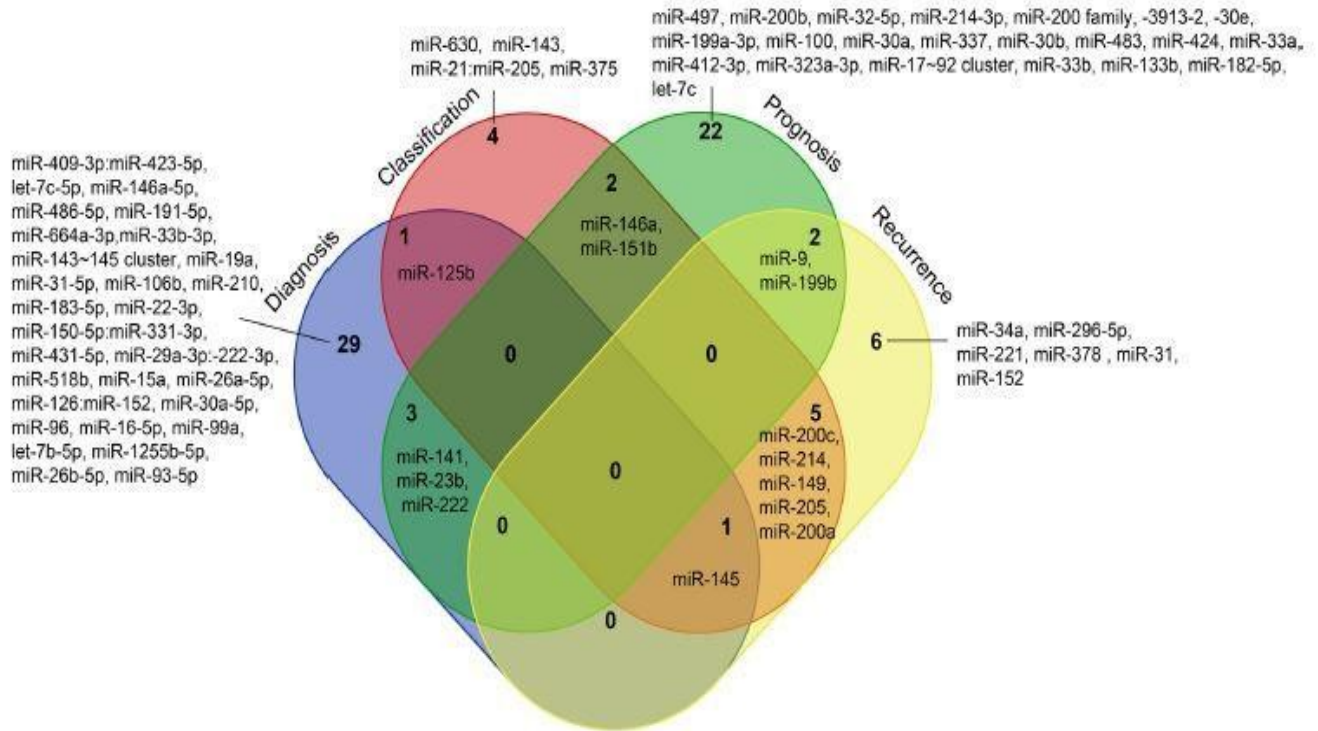
- Εμφανίζουν ιδιαίτερα ομοιόμορφα επίπεδα έκφρασης μεταξύ των ασθενών αλλά ειδικά προφίλ έκφρασης στους διαφορετικούς ιστούς (Liang *et al.*, 2007).
- Συνήθως εντάσσονται σε πρωτεϊνικά σύμπλοκα και κυρίως σε εξωσώματα, τα οποία τους προσφέρουν προστασία από αποικοδόμηση και σταθερότητα.
- Υπάρχουν διάφορα συστήματα σχεδιασμένα για τον προσδιορισμό της έκφρασης των ncRNAs, με χρήση της RT-qPCR η οποία επιτρέπει την αξιολόγηση ενός μεγάλου αριθμού miRNAs από πολύ μικρή ποσότητα ολικού RNA και με χαμηλό κόστος (Martinez *et al.*, 2019).

Τα κυκλοφορούντα miRNAs σε σύγκριση με τα mRNAs, είναι σταθερότερα και ανθεκτικότερα στη φυσική αποδόμηση, που συμβαίνει κατά τη διάρκεια αποθήκευσης και των κύκλων κατάψυξης και απόψυξης. Επομένως, τα miRNAs

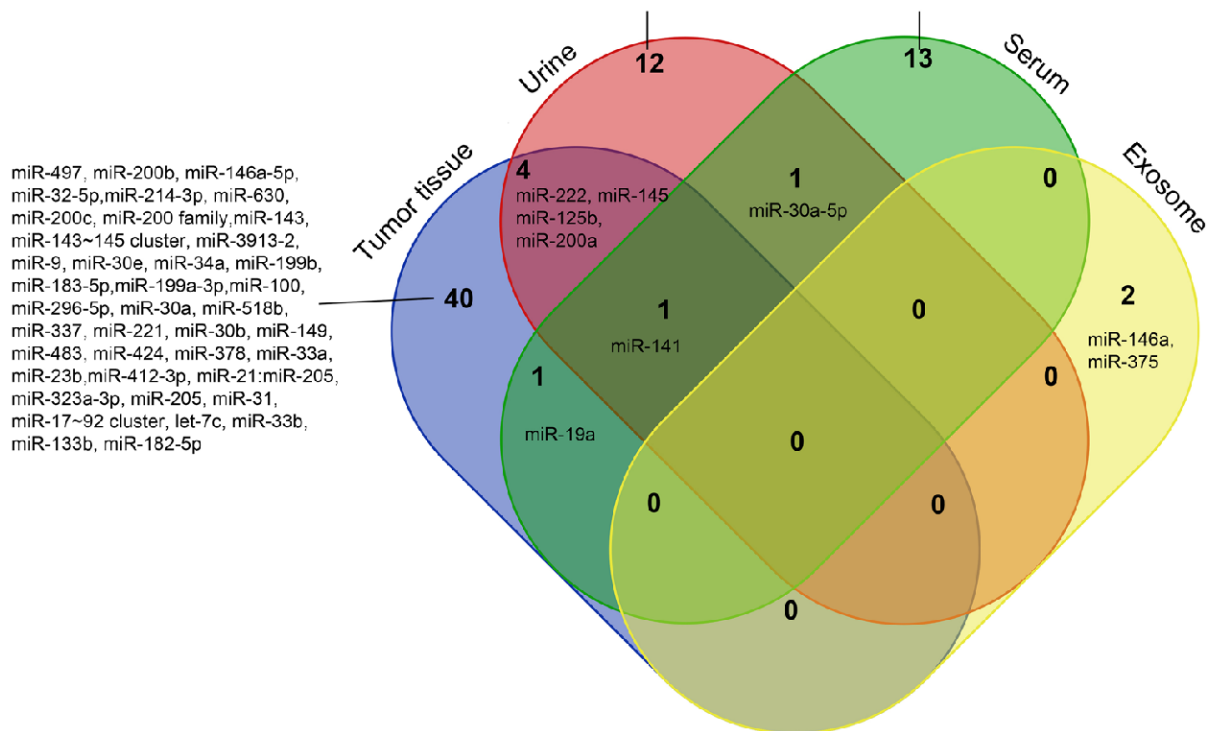


αποτελούν ιδανικά υποψήφια μόρια για βιοδείκτες σε κλινικές εφαρμογές. Η αύξηση των αποδεικτικών στοιχείων καταδεικνύει τη δυνατότητα της χρήσης μεμονωμένων ή σε πάνελ miRNAs ως βιοδείκτες διάγνωσης, πρόγνωσης, ταξινόμησης και υποτροπής του ουροθηλιακού καρκίνου. Ως σήμερα, έχουν δημοσιευθεί αρκετά miRNAs υποψήφια για βιοδείκτες (**Εικόνες 23, 24**). Τα miRNAs των ούρων αποτελούν ενδεχομένως τους ιδανικότερους βιοδείκτες διάγνωσης του ουροθηλιακού καρκίνου.

Επιπλέον, τα miRNAs κρίνονται σημαντικά λόγω της διαφορικής έκφρασής τους και έτσι έχουν δυναμικό κλινικής χρησιμότητας ως διαγνωστικοί βιοδείκτες, στους οποίους θα αναφερθούμε αναλυτικά παρακάτω. Για παράδειγμα, ο λόγος miR-126:miR-152 βρέθηκε ότι βοηθά την ανίχνευση του ουροθηλιακού καρκίνου σε δείγματα ούρων (Hanke *et al.*, 2010). Σε συνδυασμό με τη διαγνωστική τους αξία, πρόσφατα δεδομένα αποδεικνύουν το δυναμικό τους ως προγνωστικοί δείκτες (Yousef and Gabril, 2018).



**Εικόνα 21: Διάγραμμα Venn που υποδεικνύει τους εν δυνάμει miRNA βιοδείκτες του καρκίνου της ουροδόχου κύστης, και το πλαίσιο στο οποίο δύνανται να χρησιμοποιηθούν. Diagnosis = διάγνωση, Classification = ταξινόμηση, Prognosis = πρόγνωση, Recurrence = υποτροπή, miR: miRNA (Li *et al.*, 2019).**



**Εικόνα 22:** Διάγραμμα Venn όπου παρουσιάζεται η προέλευση των εν δυνάμει miRNA βιοδεικτών. Tumor tissue = νεοπλασματικός ιστός, Urine = ούρα, Serum = ορός αίματος, Exosome = εξώσωμα, miR: miRNA (Li *et al.*, 2019).

Για παράδειγμα,

- το miR-205 διακρίνει το χαμηλόβαθμο θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνωμα από το αντίστοιχο υψηλόβαθμο, με ευαισθησία 95,8% και ειδικότητα 96,7%, ενώ το miR-145 διακρίνει το υψηλόβαθμο θηλώδες ουροθηλιακό καρκίνο από το διηθητικό καρκίνωμα με ευαισθησία και ειδικότητα 100% και 91,7% αντίστοιχα.
- Επιπλέον, τα miR-200 και miR-205 εμφανίζουν **υπερέκφραση στους MIBCs σε αντίθεση με τα NMIBCs**. Ωστόσο, αυτά τα miRNAs συχνά αποσιωπούνται και εμφανίζουν υπερμεθυλίωση του DNA στους μυοδιηθητικούς όγκους. Αυτή η υπερμεθυλίωσή τους θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως προγνωστικός δείκτης του ουροθηλιακού καρκίνου. Επίσης, εμπλέκονται στη διαδικασία της EMT (Enokida *et al.*, 2016).

- Τα εξής 7 miRNAs miR-129, miR-133b, miR-140-5p, miR-29c, miR-3658, miR-518c, και miR-92a-3p συσχετίστηκαν έντονα με την **πρόοδο του ουροθηλιακού καρκίνου**.
- Τα επίπεδα έκφρασης των miR-143 και miR-497 συσχετίστηκαν με **το στάδιο TNM του ουροθηλιακού καρκίνου**, την παθολογοανατομική σταδιοποίηση και τη μετάσταση.

Άλλες μελέτες αναφέρουν τα εξής:

- Η μειωμένη έκφραση της οικογένειας miR-200 σε ασθενείς ουροθηλιακού καρκίνου, συσχετίστηκε με φτωχή πρόγνωση.
- Τα let-7c, miR-141, miR-199a-3p, miR-200b, miR-214-3p, και τα miR-17-92 αποτελούν εν δυνάμει προγνωστικούς παράγοντες για τους MIBCs.
- Τα επίπεδα έκφρασης των miR-125b-5p, miR-145, miR-152, miR-187-5p, miR-199b, miR-200a, miR-214, miR-221, miR-296-5p, miR-29c-3p, miR-30a, miR-31, miR-34a, miR-378, και miR-9 συσχετίζονται με υποτροπή του ουροθηλιακού καρκίνου.
- Το miR-145 αποτελεί πιθανό δείκτη για διάγνωση, ταξινόμηση και υποτροπή (Li *et al.*, 2019).

Συνοψίζοντας, η διαφορική έκφραση miRNA είναι άλλο ένα επιγενετικό χαρακτηριστικό του ουροθηλιακού καρκίνου της ουροδόχου κύστης και μπορεί να διακρίνει τους ασθενείς από τα υγιή άτομα. Τα miRNAs σχετίζονται με γονίδια-στόχους του ουροθηλιακού καρκίνου και εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου, στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, στην κυτταρική διαφοροποίηση και τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος. Τόσο η θετική όσο και η αρνητική ρύθμιση της έκφρασης των miRNAs μπορεί να ενισχύσει την ανάπτυξη του καρκίνου. Στον ουροθηλιακό καρκίνο, η απώλεια του miR-200 σχετίζεται με την επιθηλιομεσεγχυματική μετατροπή ενώ η αύξηση της έκφρασης των miR-21 και

miR-129 σχετίζεται με όγκους υψηλόβαθμης κακοήθειας και φτωχούς πρόγνωση, αντίστοιχα (Catto *et al.*, 2011), (Faleiro *et al.*, 2017), ενώ το miR-21 σχετίζεται με το στάδιο και μπορεί να προβλέψει την πορεία της νόσου (Jalanko *et al.*, 2020).

Μέχρι σήμερα, έχουν δημοσιευθεί πολλές μελέτες σχετικά με το ρόλο των miRNAs ως αναδυόμενοι βιοδείκτες. Ωστόσο, εξαιτίας των αντικρουόμενων αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφορετικών δημοσιεύσεων και της έλλειψης δοκιμών σε ανεξάρτητες ομάδες, τα υπάρχοντα ως τώρα δεδομένα δε μπορούν να ληφθούν υπόψη στη λήψη κλινικών αποφάσεων.

#### 6.4 Εξωσωματικά miRNAs ως αναδυόμενοι επιγενετικοί βιοδείκτες

Τα εξωσώματα είναι κυστίδια που εκκρίνονται από σχεδόν όλους τους τύπους κυττάρων. Μεταφέρουν διάφορα κυτταρικά προϊόντα π.χ. νουκλεϊκά οξέα, πρωτεΐνες κ.τ.λ. Μπορούν να διακριθούν σε υποομάδες (π.χ. εξωσώματα, κυστίδια αποβολής, στρωματικά κυστίδια, αποπτωτικά σωματίδια). Το εξώσωμα είναι το μικρότερο κυστίδιο με διάμετρο 30-100nm. Αφού εκκρίνονται από τα «μητρικά» / αρχικά κύτταρα, απελευθερώνονται στο εξωκυτταρικό μικροπεριβάλλον και εντοπίζονται στα διάφορα σωματικά υγρά. Δεδομένου ότι τα εξωσώματα φέρουν πολλά σημαντικά χαρακτηριστικά μόρια των μητρικών κυττάρων, το δυναμικό τους ως βιοδείκτες σε ορισμένες παθολογικές καταστάσεις έχει λάβει ουσιαστική προσοχή. Τα νεοπλασματικά κύτταρα εκκρίνουν περισσότερα εξωσώματα από άλλους τύπους κυττάρων και επίσης, οι καρκινοπαθείς έχουν αυξημένη έκφραση εξωσωμάτων στο αίμα, κάτι που υποδεικνύει ότι τα εξωσώματα στα σωματικά υγρά είναι ιδανικοί υποψήφιοι για την πρώιμη διάγνωση καρκίνου. Στον ουροθηλιακό καρκίνο, τα εξωσωματικά miRNAs από τον ορό αίματος ασθενών και τα ούρα, και από τα υπερκείμενα υγρά των νεοπλασματικών κυττάρων έχουν μελετηθεί από πολλές ομάδες ερευνητών.

Κατά κανόνα, τα miRNAs που περιέχονται στα εξωσώματα έχουν ανάλογη υπογραφή με αυτή των μητρικών κυττάρων τους, εκτός από το miR-30a-3p, το οποίο είναι δυσλειτουργικό μόνο σε εξωσώματα διηθητικών νεοπλασματικών κυττάρων σε σύγκριση με τα εξωσώματα μη διηθητικών κυττάρων, αλλά αυτό δε συμβαίνει και στα μητρικά κύτταρά του. Ακόμη:

- Ερευνητές διευκρίνισαν τα miRNA προφίλ των εξωσωμάτων ούρων από ασθενείς ουροθηλιακού καρκίνου, αποκαλύπτοντας ότι τα miR-141-3p, miR-200a-3p και miR-205-5p είχαν σημαντικά μειωμένη έκφραση, ενώ το miR-99a-5p ήταν υπερεκφρασμένο στα εξωσώματα ούρων ασθενών MIBC, συγκριτικά με αυτά των ούρων NMIBC ασθενών.
- Σε άλλη μελέτη, βρέθηκαν 26 απορρυθμισμένα miRNAs σε εξωσώματα ούρων ασθενών υψηλόβαθμου ουροθηλιακού καρκίνου, όπου ξεχώρισαν το miR-375 ως βιοδείκτης για το υψηλόβαθμης κακοήθειας και το miR-146a για το χαμηλόβαθμης κακοήθειας καρκίνωμα.

Εκτός του διαγνωστικού δυναμικού των εξωσωματικών miRNAs, έχουν μελετηθεί και άλλοι πιθανοί ρόλοι τους. Συγκεκριμένα, σε κυτταρική σειρά ουροθηλιακού καρκίνου, το miR-23b, το οποίο σχετίζεται με μεταγραφικές αλλαγές, απελευθερώνεται σε εξωσώματα και εμπλέκεται στη μετάσταση.

Επιπλέον, έχει αποδειχθεί η διαφορετική κατανομή των miRNAs στους νεοπλασματικούς ιστούς, στα σωματικά υγρά και στα εξωσώματα του ίδιου ασθενούς. Παράλληλα, ένας αξιοσημείωτος αριθμός υπερεκφρασμένων miRNAs βρέθηκαν σε εξωσώματα ούρων ασθενών ουροθηλιακού καρκίνου, αλλά όχι και στο πλάσμα αίματός τους, γεγονός που οδηγεί στην υπόθεση ότι τα εξωσώματα αποτελούν ιδανικούς υποψήφιους βιοδείκτες διάγνωσης του ουροθηλιακού καρκίνου (Li *et al.*, 2019).

### 6.5 Επιγενετικές τροποποιήσεις ως θεραπευτικοί στόχοι

Το επιγένωμα χαρακτηρίζεται από αλλαγές που δεν περιλαμβάνουν τροποποιήσεις στην αλληλουχία νουκλεοτιδίων του DNA. Αυτές οι αλλαγές διακρίνονται αδρά, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, σε μεθυλίωση του DNA και τροποποιήσεις ιστονών που επιτρέπουν το «άνοιγμα» και το «κλείσιμο» της χρωματίνης. Ωστόσο, οι μηχανισμοί επιγενετικής ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης δεν περιορίζονται στους τροποποιητές χρωματίνης και στις αλλαγές μέσω μεθυλίωσης αλλά ρόλο παίζουν και τα μη-κωδικά RNAs. Οι λειτουργίες του επιγενώματος είναι θεμελιώδεις για τη σωστή γονιδιακή έκφραση και οι μεταβολές του επηρεάζουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες. Το μεγάλο επιγενετικό τοπίο αποτελεί χαρακτηριστικό του καρκίνου του ανθρώπου, και συγκεκριμένα χαρακτηρίζει τον ουροθηλιακό καρκίνο ως επιγενετική νόσο.

Είναι σαφές ότι οι βιοδείκτες είναι απαραίτητοι στα διάφορα στάδια του ουροθηλιακού καρκίνου, για την έγκαιρη διάγνωση, τον καθορισμό της πρόγνωσης, θεραπείας και της μεταθεραπείας. Παρά την αδιαμφισβήτητη χρησιμότητά τους, είναι γεγονός ότι μερικοί μόνο από αυτούς χρησιμοποιούνται αυτή τη στιγμή για το ουροθηλιακό καρκίνωμα, κάτι που οφείλεται στις αποκλίσεις μεταξύ των μελετών ως τώρα.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η μεθυλίωση του DNA είναι μια αναστρέψιμη μεταβολή που συμβάλλει στην ανάπτυξη και εξέλιξη του ουροθηλιακού καρκινώματος, και οι DNMTs υπερεκφράζονται σε αυτή τη νεοπλασία. Έτσι, οι DNMTs αποτελούν ελκυστικούς στόχους για τη θεραπεία αυτού του καρκίνου και πολλά «επι-φάρμακα» έχουν ήδη εγκριθεί για τη θεραπεία συγκεκριμένων παθήσεων (Erdmann *et al.*, 2015). Συγκεκριμένα, προ-κλινικές μελέτες έδειξαν ότι αναστολείς των HDACs (όπως το Vorinostat) μπορούν να αναστείλουν την κυτταρική ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό και να δράσουν συνεργιστικά με χημειοθεραπεία βασισμένη στη σισπλατίνη, σε κυτταρικές σειρές και σε μοντέλο ποντικού (Faleiro *et al.*, 2017), (Porten *et al.*, 2018).

Υπάρχουν δύο στρατηγικές επιγενετικής θεραπείας που αυτή τη στιγμή αναπτύσσονται: μικρά μόρια που αναστέλλουν τα τροποποιητικά ένζυμα του επιγενώματος και διαχείριση της έκφρασης των miRNAs. Η αναστολή των αποακετυλασών των ιστονών (HDACs) και των DNA μεθυλοτρανσφερασών (DNMTs) δύναται να αναστρέψει τη γονιδιακή αποσιώπηση και να επαναφέρει την έκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων (Porten et al., 2018).

Οι **αναστολείς των HDACs** (**HDACi** – HDAC inhibitors) κατηγοριοποιούνται σε 4 διαφορετικές ομάδες με βάση τη χημική τους δομή: υδροξαμάτες (hydroxamates π.χ. SB393, Vorinostat, Panobinostat), κυκλικά πεπτίδια (Romidepsin), βενζαμίδες (Entinostat, Mocetinostat) και αλειφατικά λιπαρά οξέα (Valproic Acid) (Faleiro et al., 2017). Στην πλειονότητά τους αναστέλλουν τις εξαρτώμενες από ψευδάργυρο (Zn) HDACs, αλληλεπιδρώντας με ιόντα του. Στα νεοπλασματικά κύτταρα, η αναστολή της αποακετυλίωσης των ιστονών επαναφέρει την έκφραση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, των οποίων η έκφραση μέχρι πρότινος ήταν αποσιωπημένη από τους επιγενετικούς μηχανισμούς.

Οι **αναστολείς των DNMTs** (**DNMTi** – DNMT inhibitors) (Εικόνες 23,24) μπορούν να ταξινομηθούν, ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους, ως νουκλεοσιδικά και μη νουκλεοσιδικά ανάλογα.

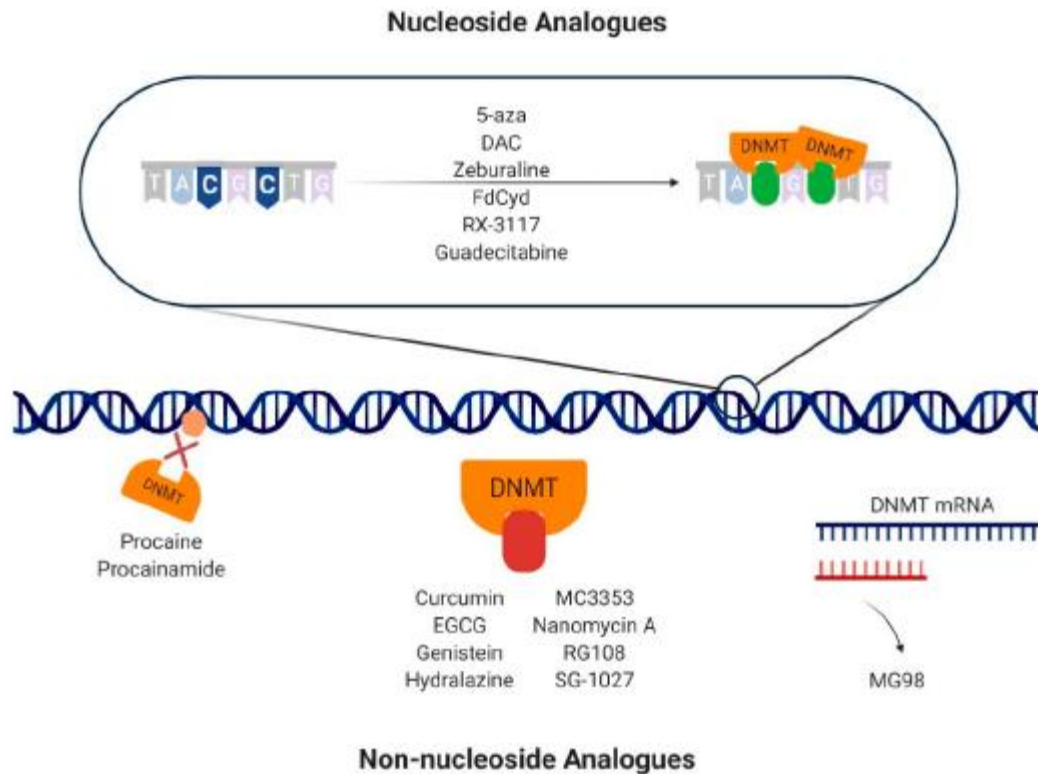
- Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα (ή ανάλογα κυτιδίνης) αποτελούν μια ομάδα ενώσεων που εντός του κυττάρου, μεταβολίζονται και ενσωματώνονται στο DNA αντί για την κυτοσίνη, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ομοιοπολικού δεσμού με DNMT στον άνθρακα-5 του αναλόγου κυτιδίνης κατά τη φάση S του κυτταρικού κύκλου (π.χ. Azacytidine, Decitabine, FdCyd) (Sandra P. Nunes et al., 2020). Οι DNA μεθυλοτρανσφεράσες μπορούν να συνδεθούν με αυτά τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια, αλλά **η αλλαγή στον άνθρακα-5 αποτρέπει τη μεθυλίωσή τους**. Ακόμη, παρεμποδίζουν την απομάκρυνση του ενζύμου, μειώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο τη



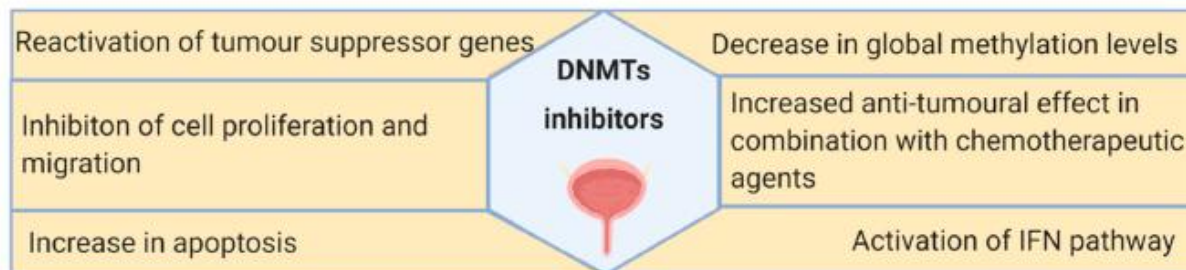
δράση της DNMT σε άλλα σημεία. Τέλος, το σύμπλοκο που σχηματίζεται μεταξύ του DNA και της DNMT υπό αυτές τις συνθήκες προκαλεί δίκλωνες θραύσεις, οδηγώντας σε απώλεια των «σημαδιών» μεθυλίωσης (Sandra P. Nunes, et al., 2020).

- Τα μη νουκλεοσιδικά ανάλογα όπως Hydralazine, Procainamide και MG98, αναστέλλουν τη μεθυλίωση μέσω της σύνδεσής τους με την καταλυτική επικράτεια της DNMT (Faleiro *et al.*, 2017).

Η 5-Aza-2-deoxycytidine (ή decitabine (DAC, Dacogen®)) έχει παρουσιάσει αποτελεσματικότητα στην παρεμπόδιση της κυτταρικής διαίρεσης και επαγωγή της απόπτωσης στα νεοπλασματικά κύτταρα κυτταρικής σειράς ουροθηλιακού καρκίνου (Shang *et al.*, 2008). Μόνο λίγες επιγενετικές θεραπείες προχώρησαν στη φάση των κλινικών δοκιμών, και μόλις μία από αυτές τις τρεις μελέτες έδειξαν θετικό αποτέλεσμα στην αναστολή των HDACs (Belinostat) σε συνδυασμό, ωστόσο, με χημειοθεραπεία. Παρ' όλα αυτά, τρεις άλλες κλινικές δοκιμές φάσης 2 επιγενετικής θεραπείας (είτε μεμονωμένες είτε σε συνδυασμό με χημειοθεραπεία) είναι σε εξέλιξη, ή πρόκειται να ολοκληρωθούν σύντομα. Αυτές περιλαμβάνουν το Mocetinostat (HDACi) σε ασθενείς με προχωρημένο ουροθηλιακό καρκίνωμα (Faleiro *et al.*, 2017), (Porten *et al.*, 2018).



**Εικόνα 23: Μηχανισμοί δράσης των αναστολέων των DNMTs.** Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα όπως η 5-azacytidine (5-aza), decitabine (DAC), zebularine, 5'-fluoro-2'-deoxycytidine (FdCyd), RX-3117 (fluorocyclopentenylcytosine) και guadecitabine ενσωματώνονται στο DNA αντί για την κυτοσίνη (C). Έτσι, όταν οι DNMTs προσδεθούν, σχηματίζεται ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ του ενζύμου και του νουκλεοσιδικού αναλόγου. Τα μη νουκλεοσιδικά ανάλογα λειτουργούν διαφορετικά. Συγκεκριμένα, η προκαΐνη και η προκαΐναμίδη συνδέονται απευθείας στο DNA αντί για τις DNMTs παρεμποδίζοντας την πρόσδεση των τελευταίων. Οι κουρκουμίνη, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), genistein, hydralazine, MC3353, nanomycin A (αντιβιοτικό), RG108, και SG-1027 προσδένονται απευθείας στις καταλυτικές επικράτειες των DNMTs, αναστέλλοντας τη δράση τους. Το MG98 είναι ένα ολιγοδεοξυνουκλεοτίδιο που συνδέεται στο mRNA της DNMT1 μέσω συμπληρωματικότητας των βάσεων, παρεμποδίζοντας τη μετάφρασή του (Sandra P. Nunes et al., 2020).



**Εικόνα 24:** Σύνοψη των κυριότερων δράσεων των αναστολέων των DNMTs, που παρατηρούνται στο ουροθηλιακό καρκίνωμα σε μοντέλα *in vitro* και *in vivo*, καθώς και σε κλινικές δοκιμές (Sandra P. Nunes et al., 2020)

**Αναστολείς μεθυλοτρανσφερασών:** Πρόσφατα η CM272 χαρακτηρίστηκε ως νέα διπλή αναστολέας της μεθυλοτρανσφεράσης ιστόνης G9a και της DNA μεθυλοτρανσφεράσης ιστόνης DNMT1 (**G9a/DNMT1 dual inhibitor**) με σημαντική αντι-ογκογόνα δράση (προκαλώντας ανοσοαπόκριση) στο ουροθηλιακό καρκίνωμα σε έρευνες *in vitro* and *in vivo*, δηλαδή σε προκλινικό επίπεδο (Segovia et al., 2019). Στην ίδια γραμμή, οι καταλυτικές επικράτειες των **PRC2**, **EZH1** και **EZH2**, που καταλύουν τη H3K27 μεθυλίωση, έχουν αποτελέσει ερευνητικό στόχο για τη θεραπεία του ουροθηλιακού καρκινώματος. Έτσι, έχουν αναπτυχθεί και μελετηθεί μερικοί αναστολείς τους, οι οποίοι διακρίνονται σε 3 κατηγορίες: (i) ικρίώματα τύπου pyridone-indazole όπως οι UNC1999 ή GSK343, τα οποία αναστέλλουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετάσταση σε καρκινικές σειρές ουροθηλίου (Chen et al., 2019), (ii) ικρίώματα τύπου pyridone-indole όπως οι GSK126 (NCT02082977) και (iii) ικρίώματα τύπου pyridone-phenyl όπως το EPZ6438, γνωστό ως Tazemetostat, το οποίο προχώρησε στη φάση κλινικών δοκιμών I/ II (NCT03854474) για τη θεραπεία ασθενών με τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό ουροθηλιακό καρκίνωμα σε συνδυασμό με ανοσοθεραπεία (Pembrolizumab – Anti-PD-L1). Η δυνητική χρήση της μεθυλοτρανσφεράσης ιστόνης EZH2 προς μελέτη για την αντιμετώπιση του ουροθηλιακού καρκινώματος συζητείται έντονα πλέον (Martinez et al., 2019).

Είναι γεγονός ότι λίγες μόνο μελέτες επιγενετικής θεραπείας έχουν πραγματοποιηθεί με σκοπό την αντιμετώπιση του ουροθηλιακού καρκινώματος. Μόνο μία στις τρεις κλινικές μελέτες των HDACi έδειξε μια θετική απόκριση (Faleiro *et al.*, 2017). Περαιτέρω μελέτες είναι αναγκαίο να πραγματοποιηθούν με τους HDACi σε συνδυασμό με άλλους παράγοντες για να επιβεβαιωθεί το θεραπευτικό τους δυναμικό στον καρκίνο της ουροδόχου κύστης.

## 7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΚΕΨΕΙΣ ΓΙΑ ΤΟ ΜΕΛΛΟΝ

Η θεραπεία του ουροθηλιακού καρκίνου της ουροδόχου κύστης αποτελεί μια πρόκληση. Αν και οι ανοσοθεραπείες έχουν προσφέρει πιθανό όφελος σε ένα ποσοστό ασθενών, παραμένει ως επί το πλείστον μια ανίατη ασθένεια στην προχωρημένη της κατάσταση. Παρά την προφανή σημασία της επιγενετικής στην ανάπτυξη και πορεία του ουροθηλιακού καρκίνου, λίγες επιγενετικές θεραπείες έφθασαν σε πολύ προχωρημένη κλινική δοκιμή. Όπως κατέδειξαν τα ως τώρα προκλινικά δεδομένα, δεν έγινε δυνατή η «μετάφρασή» τους στις αναμενόμενες κλινικές απαντήσεις. Μάλιστα, αυτό έρχεται πιθανώς δευτερεύον μετά τις μη ειδικές δράσεις των επιγενετικών φαρμάκων και στις επακόλουθες τοξικότητες που σχετίζονται με τη χορήγηση τους. Επιπλέον, ορισμένα από αυτά έχουν επιπρόσθετα μη επιγενετικά αποτελέσματα που περιορίζουν την αποτελεσματικότητά τους. Τα ένζυμα HDAC, για παράδειγμα, στοχεύουν και μη ιστονικές πρωτεΐνες, οι οποίες εμπλέκονται σε ογκολογικές οδούς που δεν σχετίζονται με επιγενετική ρύθμιση (Rius and Lyko, 2012). Ομοίως, οι παράγοντες απομεθυλίωσης δεν είναι ειδικοί σε γονίδια που εμπλέκονται στην καρκινογένεση, αλλά καταλήγουν σε συνολική απομεθυλίωση του γονιδιώματος, με συνέπεια τη γενωμική αστάθεια που μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές παρενέργειες.

Η χρήση των **αντινοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων (Antisense Oligonucleotides – ASOs, oncomiRs και mimics)** ίσως αποφεύγει ορισμένα από τα ζητήματα που περιγράφονται παραπάνω, καθώς έχουν σχεδιαστεί να είναι πιο στοχευμένα. Ωστόσο, οι ASOs έχουν επίσης τους περιορισμούς της τοξικότητας (Faleiro *et al.*, 2017).

Επί του παρόντος, η θεραπεία του καρκίνου καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό σύμφωνα με το στάδιό του, παρόλο που οι ασθενείς με παρόμοιου σταδίου όγκο μπορεί να ανταποκρίνονται διαφορετικά στον ίδιο τύπο θεραπείας. Η υπόσχεση της «εξατομικευμένης ιατρικής» στηρίζεται στην ιδέα ότι η προσαρμογή της θεραπείας σε έναν ασθενή θα βελτιστοποιήσει την αποτελεσματικότητα ελαχιστοποιώντας ταυτόχρονα την τοξικότητα. Η εξατομίκευση πρέπει να αποτελεί συνεχή στόχο για την αντιμετώπιση όλων των νεοπλασιών, συμπεριλαμβανομένων των επιγενετικών θεραπειών. Η ανάπτυξη βιοδεικτών θα πρέπει επομένως να είναι κεντρικός στόχος της ανάπτυξης επιγενετικών θεραπειών, αφενός ώστε ο ασθενής να λαμβάνει τη σωστή θεραπεία και αφετέρου για να διασφαλιστεί ότι οι θεραπείες που έχουν αξία σε ένα υποσύνολο ασθενών δεν εφαρμόζονται, λόγω έλλειψης αποτελεσματικότητας, σε άλλους ασθενείς (Faleiro *et al.*, 2017).

Το ουροθηλιακό καρκίνωμα πλέον αναγνωρίζεται ως μια νόσος η οποία δε μπορεί να αντιμετωπιστεί αποκλειστικά έχοντας ως βάση την παθολογοανατομική σταδιοποίηση. Επιβάλλεται η προσπάθεια θεραπείας του να εστιαστεί στις υποκείμενες μοριακές αλλαγές. Η διαθεσιμότητα των προηγμένων γενωμικών, πρωτεομικών, πληροφορικών και στατιστικών τεχνολογιών αποτελεί πλεονέκτημα για την επιστημονική κοινότητα ώστε να γίνει η διαλεύκανση των μοριακών συμβάντων που οδηγούν την ουροθηλιακή ογκογένεση και πρόοδο. Για το σκοπό αυτό απαιτείται η δημιουργία πάνελ δεικτών που θα προσφέρουν έγκυρες πληροφορίες για πρόγνωση και πρόβλεψη σε κάθε ασθενή.

Οι προσπάθειες αντιμετώπισης του ουροθηλιακού καρκίνου ενδέχεται να μην αρκούν με τη χρήση ενός μόνο παράγοντα. Πράγματι, οι πρόσφατες προσπάθειες για τον χαρακτηρισμό του γονιδιώματος του καρκίνου της ουροδόχου κύστης έχουν θέσει τον χάρτη πορείας για τον προσδιορισμό πιθανών θεραπευτικών ρόλων **αρκετών** μορίων στόχων. Συνεπώς, η ανάπτυξη παραγόντων ειδικών στόχων και ο προσεκτικός συνδυασμός επιγενετικών θεραπειών με παραδοσιακούς τρόπους, ίσως μας δώσει τη δυνατότητα για κλινική επιτυχία στο εγγύς μέλλον.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Διαμαντοπούλου, Κ. (2014) *Ανοσοϊστοχημική Μελέτη των δεικτών COX-2 ΚΑΙ PPAR-γ σε ουροθηλιακά καρκινώματα της ουροδόχου κύστεως. Συσχέτιση με κλινικοπαθολογοανατομικές παραμέτρους*. National Kapodistrian University of Athens.

Adeyeye, S. A. O. (2018) 'Heterocyclic Amines and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Cooked Meat Products: A Review', *Polycyclic Aromatic Compounds*, 40(5), pp. 1557–1567. doi: 10.1080/10406638.2018.1559208.

Al-Ahmadie, H. and Netto, G. J. (2020) 'Updates on the Genomics of Bladder Cancer and Novel Molecular Taxonomy', *Advances in Anatomic Pathology*, 27(1), pp. 36–43. doi: 10.1097/PAP.0000000000000252.

Akhtar, M. *et al.* (2019B) 'Urothelial carcinoma in situ (CIS): New insights', *Advances in Anatomic Pathology*, 26(5), pp. 313–319. doi: 10.1097/PAP.0000000000000239.

Akhtar, M., Al-Bozom, I. A., Ben Gashir, M., & Taha, N. M. (2019A). Intrinsic molecular subclassification of urothelial carcinoma of the bladder: Are we finally there? *Advances in Anatomic Pathology*, 26(4), 251–256. <https://doi.org/10.1097/PAP.0000000000000235>

Allfrey, V. G., Faulkner, R. and Mirsky, A. E. (1964) 'Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of*, 51(1938), pp. 786–794. doi: 10.1073/pnas.51.5.786.

Anastasiadou, E., Jacob, L. S., & Slack, F. J. (2017). Non-coding RNA networks in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 18(1), 5–18. <https://doi.org/10.1038/nrc.2017.99>

Andrew P, F. and Bert, V. (1983) 'Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts', *Nature*, 301(9), pp. 89–92.

Baek, S. H. (2011) 'When Signaling Kinases Meet Histones and Histone Modifiers in the Nucleus', *Molecular Cell*, 42(3), pp. 274–284. doi: 10.1016/j.molcel.2011.03.022.

Bailey, M. H., Tokheim, C., Porta-Pardo, E., Sengupta, S., Bertrand, D., Weerasinghe, A., Colaprico, A., Wendl, M. C., Kim, J., Reardon, B., Kwok-Shing Ng, P., Jeong, K. J., Cao, S., Wang, Z., Gao, J., Gao, Q., Wang, F., Liu, E. M., Mularoni, L., ... Karchin, R. (2018). Erratum: Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations (ARTICLE (2018) 173(2) (371–385), (S009286741830237X), (10.1016/j.cell.2018.02.060)). *Cell*, 174(4), 1034–1035. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.034>

Bertz, S. *et al.* (2017) 'Urothelial Bladder Cancer: An Update on Molecular Pathology with Clinical Implications', *European Urology, Supplements*. European Association of Urology, 16(12), pp. 272–294. doi: 10.1016/j.eursup.2017.10.003.

Bhan, A., Soleimani, M., & Mandal, S. S. (2017). Long noncoding RNA and cancer: A new paradigm. *Cancer Research*, 77(15), 3965–3981. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2634>

Biswas, S., & Rao, C. M. (2018). Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *European Journal of Pharmacology*, 837, 8–24. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2018.08.021>

Cao, Y. *et al.* (2011) 'MicroRNA-dependent regulation of PTEN after arsenic trioxide treatment in bladder cancer cell line T24', *Tumor Biology*, 32(1), pp. 179–188. doi: 10.1007/s13277-010-0111-z.



Casadevall, D., Kilian, A. Y. and Bellmunt, J. (2017) 'The prognostic role of epigenetic dysregulation in bladder cancer: A systematic review', *Cancer Treatment Reviews*, 61, pp. 82–93. doi: 10.1016/j.ctrv.2017.10.004.

Catto, J. W. F. *et al.* (2011) 'MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: A systematic review', *European Urology*, 59(5), pp. 671–681. doi: 10.1016/j.eururo.2011.01.044.

Chen, Z. *et al.* (2019) 'EZH2 inhibition suppresses bladder cancer cell growth and metastasis via the JAK2/STAT3 signaling pathway', *Oncology Letters*, 18(1), pp. 907–915. doi: 10.3892/ol.2019.10359.

Christov, C. P., Trivier, E., & Krude, T. (2008). Noncoding human Y RNAs are overexpressed in tumours and required for cell proliferation. *British Journal of Cancer*, 98(5), 981–988. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604254>

Clark, M. B. *et al.* (2012) 'Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability', *Genome Research*, 22(5), pp. 885–898. doi: 10.1101/gr.131037.111.

Dadhania, V. *et al.* (2016) 'Meta-Analysis of the Luminal and Basal Subtypes of Bladder Cancer and the Identification of Signature Immunohistochemical Markers for Clinical Use', *EBioMedicine*. The Authors, 12, pp. 105–117. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.08.036.

Dawson, M. A. and Kouzarides, T. (2012) 'Review Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy', *Cell*. Elsevier Inc., 150(1), pp. 12–27. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.013.

Deb, G., Singh, A. K., & Gupta, S. (2014). EZH2: Not EZHY (easy) to deal. *Molecular Cancer Research*, 12(5), 639–653. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0546>

Ding, B., Yan, L., Zhang, Y., Wang, Z., Zhang, Y., Xia, D., Ye, Z., & Xu, H. (2019). Analysis of the role of mutations in the KMT2D histone lysine methyltransferase in bladder cancer. *FEBS Open Bio*, 9(4), 693–706. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12600>

Ding, L., Bailey, M. H., Porta-Pardo, E., Thorsson, V., Colaprico, A., Bertrand, D., Gibbs, D. L., Weerasinghe, A., Huang, K. Lin, Tokheim, C., Cortés-Ciriano, I., Jayasinghe, R., Chen, F., Yu, L., Sun, S., Olsen, C., Kim, J., Taylor, A. M., Cherniack, A. D., ... Mariamidze, A. (2018). Perspective on Oncogenic Processes at the End of the Beginning of Cancer Genomics. *Cell*, 173(2), 305-320.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.033>

Dudziec, E., Goepel, J. R. and Catto, J. W. F. (2011) 'Global epigenetic profiling in bladder cancer', *Epigenomics*, 3(1), pp. 35–45. doi: 10.2217/epi.10.71.

Ellinger, J. *et al.* (2014) 'Alterations of global histone H3K9 and H3K27 methylation levels in bladder cancer', *Urologia Internationalis*, 93(1), pp. 113–118. doi: 10.1159/000355467.

Ellinger, J., Schneider, A. C., Bachmann, A., Kristiansen, G., Müller, S. C., & Rogenhofer, S. (2016). Evaluation of global histone acetylation levels in bladder cancer patients. *Anticancer Research*, 36(8), 3961–3964.

Enokida, H. *et al.* (2016) 'The role of microRNAs in bladder cancer', pp. 60–76.

Erdmann, A. *et al.* (2015) 'Targeting DNA methylation with small molecules: What's next?', *Journal of Medicinal Chemistry*, 58(6), pp. 2569–2583. doi: 10.1021/jm500843d.

Eriksson, P. *et al.* (2015) 'Molecular subtypes of urothelial carcinoma are defined by specific gene regulatory systems', *BMC Medical Genomics*, 8(1), pp. 1–15. doi: 10.1186/s12920-015-0101-5.

Faleiro, I. *et al.* (2017) 'Epigenetic therapy in urologic cancers: An update on clinical trials', *Oncotarget*, 8(7), pp. 12484–12500. doi: 10.18632/oncotarget.14226.

Fang, D. and Kitamura, H. (2018) 'Cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition in urothelial carcinoma: Possible pathways and potential therapeutic approaches', *International Journal of Urology*, 25(1), pp. 7–17. doi: 10.1111/iju.13404.

Friedrich, M. G. *et al.* (2004) 'Detection of methylated apoptosis-associated genes in urine sediments of bladder cancer patients', *Clinical Cancer Research*, 10(22), pp. 7457–7465. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0930.

Gillette, T. G., & Hill, J. A. (2015). Readers, writers, and erasers: Chromatin as the whiteboard of heart disease. *Circulation Research*, 116(7), 1245–1253.

<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.303630>

Hanke, M. *et al.* (2010) 'A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker : microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer', *URO*. Elsevier Inc., 28(6), pp. 655–661. doi: 10.1016/j.urolonc.2009.01.027.

Homami, A. and Ghazi, F. (2016) 'MicroRNAs as biomarkers associated with bladder cancer', pp. 1–8.

Humphrey, P. A., Moch, H., Cubilla, A. L., Ulbright, T. M., & Reuter, V. E. (2016). The 2016 WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs—Part B: Prostate and Bladder Tumours. *European Urology*, 70(1), 106–119.

<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.028>

Jalanko, T. *et al.* (2020) 'Genomic Subtyping in Bladder Cancer', *Current Urology Reports*, 21(2). doi: 10.1007/s11934-020-0960-y.

Kandimalla, R., Van Tilborg, A. A. G., Kompier, L. C., Stumpel, D. J. P. M., Stam, R. W., Bangma, C. H., & Zwarthoff, E. C. (2012). Genome-wide analysis of CpG Island methylation in bladder cancer identified TBX2, TBX3, GATA2, and ZIC4 as pTa-specific prognostic markers. *European Urology*, *61*(6), 1245–1256. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.01.011>

Kim, E. J. *et al.* (2008) 'Methylation of the RUNX3 Promoter as a Potential Prognostic Marker for Bladder Tumor', *Journal of Urology*, *180*(3), pp. 1141–1145. doi: 10.1016/j.juro.2008.05.002.

Kitchen, M. O. *et al.* (2018) 'HumanMethylation450K Array–Identified Biomarkers Predict Tumour Recurrence/Progression at Initial Diagnosis of High-risk Non-muscle Invasive Bladder Cancer', *Biomarkers in Cancer*, *10*, p. 1179299X1775192. doi: 10.1177/1179299x17751920.

Korpala, M., Lee, E. S., Hu, G., & Kang, Y. (2008). The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(22), 14910–14914. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800074200>

Kowalski, M. P., & Krude, T. (2015). Functional roles of non-coding Y RNAs. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *66*, 20–29. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.07.003>

Kreimer, U., Schulz, W. A., Koch, A., Niegisch, G., & Goering, W. (2013). HERV-K and LINE-1 DNA methylation and reexpression in urothelial carcinoma. *Frontiers in Oncology*, *3 SEP*(September), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00255>

Kristensen, L. S., Hansen, T. B., Venø, M. T., & Kjems, J. (2018). Circular RNAs in cancer: Opportunities and challenges in the field. *Oncogene*, *37*(5), 555–565. <https://doi.org/10.1038/onc.2017.361>

Kurttio, P. *et al.* (1999) 'Arsenic concentrations in well water and risk of bladder and kidney cancer in Finland', *Environmental Health Perspectives*, 107(9), pp. 705–710. doi: 10.1289/ehp.99107705.

Lauss, M. and Kristina, L. (2012) 'A Molecular Taxonomy for Urothelial Carcinoma', pp. 3377–3387. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0077-T.

Li, F. *et al.* (2014) 'Red and processed meat intake and risk of bladder cancer: A meta-analysis', *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 7(8), pp. 2100–2110. doi: 10.1093/annonc/mdu353.14.

Li, Q. *et al.* (2019) 'MicroRNAs: Key Players in Bladder Cancer', (0123456789). doi: 10.1007/s40291-019-00410-4.

Lippi, G., Mattiuzzi, C. and Cervellin, G. (2016) 'Meat consumption and cancer risk: A critical review of published meta-analyses', *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 97, pp. 1–14. doi: 10.1016/j.critrevonc.2015.11.008.

Magers, M. J. *et al.* (2019) 'Staging of bladder cancer', *Histopathology*, 74(1), pp. 112–134. doi: 10.1111/his.13734.

Malats, N. *et al.* (2005) 'P53 as a prognostic marker for bladder cancer: A meta-analysis and review', *Lancet Oncology*, 6(9), pp. 678–686. doi: 10.1016/S1470-2045(05)70315-6.

Mancini, M. *et al.* (2020) 'The bladder epicheck test as a non-invasive tool based on the identification of DNA methylation in bladder cancer cells in the urine: A review of published evidence', *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), pp. 1–9. doi: 10.3390/ijms21186542.

Marshall, G. *et al.* (2007) 'Fifty-Year study of lung and bladder cancer mortality in Chile related to arsenic in drinking water', *Journal of the National Cancer Institute*, 99(12), pp. 920–928. doi: 10.1093/jnci/djm004.

Maurice P. A. Zeegers, Alex Volovics, Elisabeth Dorant, R. Alexandra Goldbohm, and P. A. van den B. (2001) 'Alcohol Consumption and Bladder Cancer Risk: Results from the Netherlands Cohort Study', *American Journal of Epidemiology*, 153(1), pp. 38–41.

McConkey, D. J. and Choi, W. (2018) 'Molecular Subtypes of Bladder Cancer', *Current Oncology Reports*. *Current Oncology Reports*, 20(10), pp. 1–7. doi: 10.1007/s11912-018-0727-5.

Miah, S. *et al.* (2012) 'An evaluation of urinary microRNA reveals a high sensitivity for bladder cancer', *British Journal of Cancer*, 107(1), pp. 123–128. doi: 10.1038/bjc.2012.221.

Mitra, A. P. (2016) 'Molecular substratification of bladder cancer: Moving towards individualized patient management', *Therapeutic Advances in Urology*, 8(3), pp. 215–233. doi: 10.1177/1756287216638981.

Nagai, N., Ohguchi, H., Nakaki, R., Matsumura, Y., Kanki, Y., Sakai, J., *et al.* (2018). Downregulation of ERG and FLI1 expression in endothelial cells triggers endothelial-to-mesenchymal transition. *PloS Genet.* 14, e1007826. doi: 10.1371/journal.pgen.1007826

Olkhov-Mitsel, E. *et al.* (2017) 'Epigenome-Wide DNA Methylation Profiling Identifies Differential Methylation Biomarkers in High-Grade Bladder Cancer', *Translational Oncology*, 10(2), pp. 168–177. doi: 10.1016/j.tranon.2017.01.001.

Rampias, T., Karagiannis, D., Avgeris, M., Polyzos, A., Kokkalis, A., Kanaki, Z., Kousidou, E., Tzetzis, M., Kanavakis, E., Stravodimos, K., Manola, K. N., Pantelias, G. E., Scorilas, A., & Klinakis, A. (2019). The lysine-specific methyltransferase KMT 2C/ MLL 3 regulates DNA repair components in cancer . *EMBO Reports*, 20(3), 1–20. <https://doi.org/10.15252/embr.201846821>

Rius, M. and Lyko, F. (2012) 'Epigenetic cancer therapy: Rationales, targets and drugs', *Oncogene*, 31(39), pp. 4257–4265. doi: 10.1038/onc.2011.601.

Roudnicky, F. *et al.* (2018) 'Alternative transcription of a shorter, non-anti-angiogenic thrombospondin-2 variant in cancer-associated blood vessels', *Oncogene*, 37(19), pp. 2573–2585. doi: 10.1038/s41388-018-0129-z.

Sacristan, R. *et al.* (2014) 'Molecular classification of non-muscle-invasive bladder cancer (pTa Low-Grade, pT1 Low-Grade, and pT1 High-Grade Subgroups) using methylation of tumor-suppressor genes', *Journal of Molecular Diagnostics*, 16(5), pp. 564–572. doi: 10.1016/j.jmoldx.2014.04.007.

Saginala, K., Barsouk, A., Aluru, J. S., Rawla, P., Padala, S. A., & Barsouk, A. (2020). *medical sciences Epidemiology of Bladder Cancer*. 1–12.

Sanders, I. *et al.* (2012) 'Evaluation of reference genes for the analysis of serum miRNA in patients with prostate cancer, bladder cancer and renal cell carcinoma', *International Journal of Urology*, 19(11), pp. 1017–1025. doi: 10.1111/j.1442-2042.2012.03082.x.

Santos, M., Martínez-Fernández, M., Dueñas, M., García-Escudero, R., Alfaya, B., Villacampa, F., Saiz-Ladera, C., Costa, C., Oteo, M., Duarte, J., Martínez, V., Gómez-Rodríguez, M. J., Martín, M. L., Fernández, M., Viatour, P., Morcillo, M. A., Sage, J., Castellano, D., Rodríguez-Peralto, J. L., ... Paramio, J. M. (2014). In vivo disruption of an Rb-E2F-Ezh2 signaling loop causes bladder cancer. *Cancer Research*, 74(22), 6565–6577. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-1218>

Schneider, A. C. *et al.* (2011) 'Global histone H4K20 trimethylation predicts cancer-specific survival in patients with muscle-invasive bladder cancer', *BJU International*, 108(8 B), pp. 290–296. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10203.x.

Segovia, C., San José-Enériz, E., Munera-Maravilla, E., Martínez-Fernández, M., Garate, L., Miranda, E., Vilas-Zornoza, A., Lodewijk, I., Rubio, C., Segrelles, C., Valcárcel, L. V., Rabal, O., Casares, N., Bernardini, A., Suarez-Cabrera, C., López-

Calderón, F. F., Fortes, P., Casado, J. A., Dueñas, M., ... Paramio, J. M. (2019). Inhibition of a G9a/DNMT network triggers immune-mediated bladder cancer regression. *Nature Medicine*, 25(7), 1073–1081. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0499-y>

Shang, D. *et al.* (2008) 'Demethylating Agent 5-Aza-2'-Deoxycytidine Enhances Susceptibility of Bladder Transitional Cell Carcinoma to Cisplatin', *Urology*, 71(6), pp. 1220–1225. doi: 10.1016/j.urology.2007.11.029.

Sharma, A., Jamil, M. A., Nuesgen, N., Dauksa, A., Gulbinas, A., Schulz, W. A., Oldenburg, J., & El-Maarri, O. (2019). Detailed methylation map of LINE-1 5'-promoter region reveals hypomethylated CpG hotspots associated with tumor tissue specificity. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*, 7(5), 3–7. <https://doi.org/10.1002/mgg3.601>

Stubendorff, B. *et al.* (2019) 'A three-gene methylation marker panel for the nodal metastatic risk assessment of muscle-invasive bladder cancer', *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 145(4), pp. 811–820. doi: 10.1007/s00432-018-02829-4.

Sun, J. W. *et al.* (2015) 'Obesity and risk of bladder cancer: A dose-response meta-analysis of 15 cohort studies', *PLoS ONE*, 10(3), pp. 1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0119313.

Tani, H., Imamachi, N., Mizutani, R., Imamura, K., Kwon, Y., Miyazaki, S., Maekawa, S., Suzuki, Y., & Akimitsu, N. (2015). Genome-wide analysis of long noncoding RNA turnover. *Methods in Molecular Biology*, 1262, 305–320. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2253-6\\_19](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2253-6_19)

Taverna, S. D. *et al.* (2007) 'How chromatin-binding modules interpret histone modifications: Lessons from professional pocket pickers', *Nature Structural and Molecular Biology*, 14(11), pp. 1025–1040. doi: 10.1038/nsmb1338.



Tolkach, Y., Stahl, A. F., Niehoff, E. M., Zhao, C., Kristiansen, G., Müller, S. C., & Ellinger, J. (2017). YRNA expression predicts survival in bladder cancer patients. *BMC Cancer*, 17(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3746-y>

Wang, C. and Jiang, H. (2012) 'Meat intake and risk of bladder cancer: A meta-analysis', *Medical Oncology*, 29(2), pp. 848–855. doi: 10.1007/s12032-011-9985-x.

Wang, X. *et al.* (2016) '5-Azacytidine inhibits the proliferation of bladder cancer cells via reversal of the aberrant hypermethylation of the hepaCAM gene', *Oncology Reports*, 35(3), pp. 1375–1384. doi: 10.3892/or.2015.4492.

Wolff, E. M. *et al.* (2010) 'Unique DNA methylation patterns distinguish noninvasive and invasive urothelial cancers and establish an epigenetic field defect in premalignant tissue', *Cancer Research*, 70(20), pp. 8169–8178. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1335.

Wolff, E. M., Byun, H. M., Han, H. F., Sharma, S., Nichols, P. W., Siegmund, K. D., Yang, A. S., Jones, P. A., & Liang, G. (2010). Hypomethylation of a LINE-1 promoter activates an alternate transcript of the MET oncogene in bladders with cancer. *PLoS Genetics*, 6(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000917>

Xylinas, E. *et al.* (2016) 'An epigenomic approach to improving response to neoadjuvant cisplatin chemotherapy in bladder cancer', *Biomolecules*, 6(3). doi: 10.3390/biom6030037.

Yan, H. *et al.* (2018) 'Cancer Management and Research Dovepress Secondhand smoking increases bladder cancer risk in nonsmoking population: a meta-analysis', *Cancer Management and Research*, pp. 10–3781. Available at: <http://dx.doi.org/10.2147/CMAR.S175062>.

Yang, Z. *et al.* (2019) 'Prognostic value of differentially methylated gene profiles in bladder cancer', *Journal of Cellular Physiology*, 234(10), pp. 18763–18772. doi: 10.1002/jcp.28515.

Yao, F., Wang, Q., & Wu, Q. (2019). The prognostic value and mechanisms of LNCRNA UCA1 in human cancer. *Cancer Management and Research*, 11, 7685–7696. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S200436>

Zhang, Y., Liang, W., Zhang, P., Chen, J., Qian, H., Zhang, X., & Xu, W. (2017). Circular RNAs: Emerging cancer biomarkers and targets. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 36(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13046-017-0624-z>

Zhong, Z., Lv, M., & Chen, J. (2016). Screening differential circular RNA expression profiles reveals the regulatory role of circTCF25-miR-103a-3p/miR-107-CDK6 pathway in bladder carcinoma. *Scientific Reports*, 6(July), 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep30919>

Zhou, B. *et al.* (2013) 'MicroRNA-503 targets FGF2 and VEGFA and inhibits tumor angiogenesis and growth', *Cancer Letters*, 333(2), pp. 159–169. doi: 10.1016/j.canlet.2013.01.028.

## Δικτυογραφία

<https://www.whatisepigenetics.com/fundamentals/>