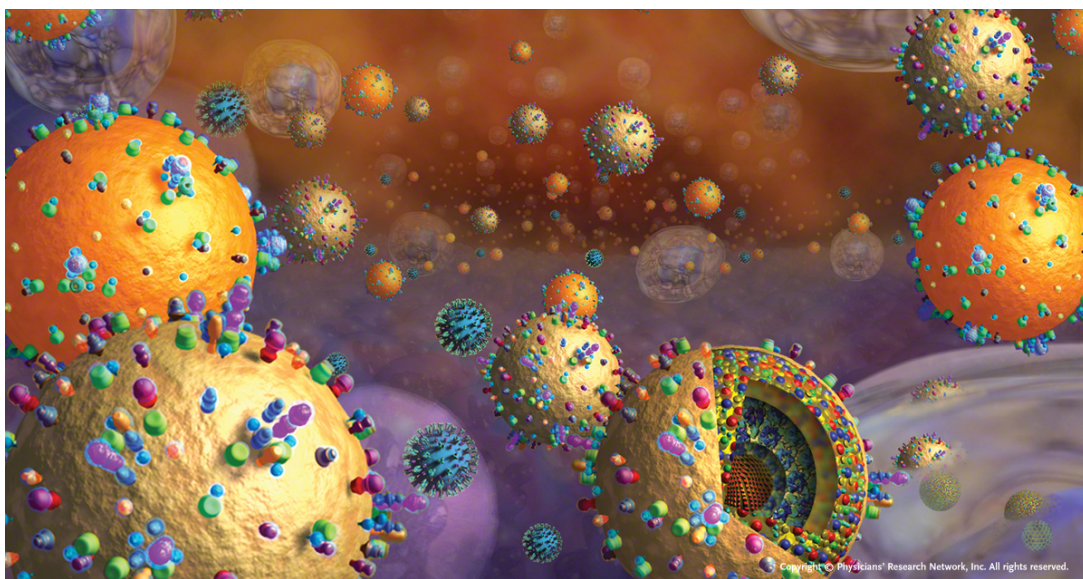


*ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ*  
*ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ*  
*ΚΛΙΝΙΚΗ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ*  
*(Διευθυντής: Καθηγητής ΟΔΥΣΣΕΑΣ ΖΩΡΑΣ)*

**ΔΗΜΗΤΡΗΣ Π. ΣΤΑΜΑΤΙΟΥ**

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΙΟΥΣ ΕΡΣΤΕΙΝ-BARR (EBV),  
BK (BKV) ΚΑΙ ΤΟΥ ΙΟΥ ΤΟΥ ΘΗΛΩΜΑΤΟΣ (HPV) ΣΤΟΝ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ  
ΑΔΕΝΑ ΚΑΙ Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ  
ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ**



**ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

*Σα βγεις στον πηγαιμό για την Ιθάκη, να εύχεται νάναι μακρύς ο δρόμος...*

Κ.Π Καβάφης 1911

.....στους γονείς μου,  
τους καθηγητές μου και το σταύρο

**ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική διατριβή μου θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όσους με βοήθησαν στην πραγματοποίησή της και κυρίως τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Οδυσσέα Ζώρα για την καθοδήγηση και την ηθική υποστήριξη, που αποτέλεσαν βασικούς παράγοντες για την ολοκλήρωσή της.

Ευχαριστώ τα μέλη της επταμελούς επιτροπής που με τίμησαν με την παρουσία τους.

Ευχαριστώ θερμά τον Καθηγητή κ. Δημήτριο Α. Σπαντίδο για την παροχή του εργαστηριακού εξοπλισμού και την ευκαιρία που μου έδωσε να δουλέψω στο εργαστήριό του.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος τον Αναπληρωτή καθηγητή κ. Γεώργιο Σουρβίνο για την οργάνωση της διατριβής και στη συμβολή του στην πραγματοποίηση του DNA sequencing.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω τον Επίκουρο Καθηγητή Χειρουργικής του Παν/μίου Αθηνών κ. Γεώργιο Σακοράφα για τη βοήθειά του στη συλλογή του υλικού της διατριβής.

Ευχαριστώ ακόμα τον Εμμανουήλ Συμβουλάκη για τη βοήθεια του στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων, τα σχόλια και τις κριτικές του.

Ευχαριστώ επίσης όλα τα μέλη του εργαστηρίου Κλινικής Ιολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης για τη συνεργασία τους.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στην οικογένεια μου, τον πατέρα μου, τη μητέρα μου, τον αδελφό μου και το φίλο και συνεργάτη μου Σταύρο Π. Δέρδα, τον οποίο αισθάνομαι ως μέλος της οικογένειάς μου, για την ηθική, ψυχική και πρακτική υποστήριξή τους για να κάνω το όνειρό μου για γνώση πραγματικότητα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παρά το γεγονός ότι οι ιοί έχουν πρόσφατα εμπλακεί στη ρύθμιση της επιθηλιο-μεσεγχυματικής μετάβασης και στην πρόοδο της καρκινογένεσης, πολύ λίγα είναι γνωστά σχετικά με τη συμμετοχή των ιογενών λοιμώξεων στις κακοήθειες του θυρεοειδούς αδένου. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανίχνευση αλληλουχιών τριών δυνητικά καρκινογόνων ιών, του BKV, του EBV και του HPV σε μια σειρά δειγμάτων θυρεοειδεκτομής.

Ο ιός Epstein-Barr (EBV) ανήκει στην ομάδα των ερπητοϊών και προκαλεί την λοιμώδη μονοπυρήνωση. Έχει επίσης αναγνωριστεί ως παράγοντας στην ανάπτυξη διαφόρων νεοπλασιών, όπως το λέμφωμα Burkitt, το ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα, και άλλες λεμφοβλαστικές διαταραχές σε ανοσοκατασταλμένα άτομα, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο EBV πιθανότατα παίζει σημαντικό ρόλο στη διαδικασία της καρκινογένεσης. Όσον αφορά στον θυρεοειδή αδένου, υπάρχουν αρκετές ενδείξεις στη βιβλιογραφικές ενδείξεις ότι ο EBV σχετίζεται με την ανάπτυξη κακοήθους λεμφώματος του θυρεοειδούς αλλά και με την εξαλλαγή του διαφοροποιημένου θυρεοειδικού καρκινώματος, στην πιο κακοήθη αδιαφοροποίητη μορφή.

Ο ιός BK (BKV) ανήκει στο γένος των polyoma ιών και προκαλεί αιμορραγική κυστίτιδα σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, ενώ έχει ανιχνευθεί σ'ένα σημαντικό αριθμό κακοηθειών. Ο ιός Simian Virus 40 (SV40), ένα άλλο μέλος της οικογένειας των polyoma ιών, ξενιστής του οποίου είναι ο ασιατικός ρέζους πίθηκος, έχει εμπλακεί στην καρκινογένεση σε τρωκτικά, ενώ έχει ανιχνευθεί σε δείγματα τόσο θυρεοειδικού καρκίνου, όσο και σε καλοήγη θυρεοειδικά οζίδια.

Ο ιός του θηλώματος (Human Papilloma Virus-HPV) ανήκει στο γένος των Papilloma ιών. Υπάρχουν πολλοί τύποι HPV οι οποίοι, εκτός από το ότι προκαλούν διαφόρων ειδών θηλώματα σε διαφορετικά σημεία του σώματος, ανάλογα με τον τύπο, έχουν βρεθεί ότι σχετίζονται ιδιαίτερα με την ανάπτυξη καρκίνων. Οι τύποι HPV-16 και HPV-18 χαρακτηρίζονται ως «υψηλού κινδύνου» (high-risk) όσον αφορά την καρκινογένεση, κυρίως του τραχήλου της μήτρας. Μια πρόσφατη έρευνα έδειξε ότι ο HPV-18 έχει τη δυνατότητα να αλληλεπιδρά με πυρηνικούς υποδοχείς, όπως οι υποδοχείς της θυρεοειδικής ορμόνης, των οιστρογόνων και των ανδρογόνων και να τους ενεργοποιεί ανεξαρτήτως της ύπαρξης της αντίστοιχης ορμόνης.

Η μελέτη περιελάμβανε παρασκευάσματα θυρεοειδεκτομής από τριάντα ασθενείς με οζίδια θυρεοειδούς αδένου μέσα σε μια περίοδο 3 ετών. Η δειγματοληψία περιελάμβανε τόσο οζιδιακό, όσο και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό από το παρασκευάσμα κάθε ασθενούς. Αλληλουχίες των ιικών γονιδίων του BKV (γονίδιο VP1), του EBV (γονίδια

LMP1, EBNA2 και EBER1) και του HPV, ενισχύθηκαν με PCR. Τα αποτελέσματα της PCR επιβαιώθηκαν με ανάλυση direct sequencing.

Αλληλουχίες του γονιδίου VP1 ανιχνεύθηκαν στο 60% (18/30) των δειγμάτων θυρεοειδικού καρκίνου/πολυοζώδους υπερπλασίας, σε σύγκριση με 43.3% (13/30) σε αντίστοιχο παρακαείμενο φυσιολογικό ιστό. Σε δεκαπέντε από τα τριάντα (50%) δείγματα θυρεοειδικού καρκίνου/πολυοζώδους υπερπλασίας, ανεδείχθησαν αλληλουχίες του γονιδίου LMP1 σε σύγκριση με 46.7% (14/30) σε παρακαείμενο φυσιολογικό ιστό. Αλληλουχίες του γονιδίου EBNA2 ανιχνεύθηκαν στο 90% (27/30) των δειγμάτων θυρεοειδικού καρκίνου/πολυοζώδους υπερπλασίας, ενώ στο ίδιο ακριβώς ποσοστό (90%-27/30), ανιχνεύθηκαν στους αντίστοιχους παρακαείμενους φυσιολογικούς ιστούς. Όλα τα δείγματα ήταν αρνητικά για αλληλουχίες του EBER1, καθώς και για DNA του ιού HPV.

Η παρούσα μελέτη συνιστά τη “λοίμωξη” από BKV και EBV σαν ένα πρώιμο γεγονός, που προφανώς συμβαίνει σε φυσιολογικό ιστό. Οι αλληλουχίες του LMP1, παρατηρήθηκε ότι αυτές ανιχνεύθηκαν συχνότερα στα κακοήθη δείγματα συγκριτικά με τα δείγματα φυσιολογικού ιστού. Αν και τα ευρήματά μας δέν επιτρέπουν την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το δυνητικά ογκογόνο ρόλο των εξετασθέντων ιών ως προς το θυρεοειδή αδέννα, συνιστούν ένα μοτίβο συνύπαρξης, ή “ενδημικότητας”. Καθώς ο αριθμός των εξετασθέντων δειγμάτων ήταν μικρός και όλα τα δείγματα προέρχονταν από το ίδιο νοσοκομείο, απαιτούνται περαιτέρω μελέτες ώστε να εκτιμηθούν αυτές οι παρατηρήσεις σε σχέση με τοπικοπεριοχικά χαρακτηριστικά.

## ABSTRACT

Although recent evidence has implicated viruses in epithelial-to-mesenchymal transition regulation and tumor progression, however, little information is known regarding viral infections in thyroid malignancies. The aim of this study was to detect sequences of three potentially oncogenic viruses, BKV, EBV and HPV in a series of postoperative thyroid gland specimens.

Epstein-Barr virus (EBV) belongs to the herpes virus family and is the etiologic factor of infectious mononucleosis. Apart from that, it has been implicated in the development of several other neoplasias, such as Burkitt lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, as well as other lymphoblastic diseases in immunocompromised patients. All of the above, support the potential role of EBV in carcinogenesis. Considering the thyroid gland, EBV has been detected in thyroid lymphoma samples and has been implicated in thyroid carcinoma dedifferentiation.

BK virus (BKV) belongs to the polyomaviridae family and is the etiologic factor of hemorrhagic cystitis in immunocompromised patients, while it has been detected in samples of several malignancies. Another member of the polyomaviridae family, Simian Virus 40 (SV40), the host of which is the asian rhesus monkey, causes cancer in rodents and has been detected in both benign and malignant thyroid specimens.

Human papilloma virus (HPV) belongs to the papillomaviridae family. Several members of the family have been detected, some of which have been implicated in carcinogenesis, apart from the development of benign papillomas in several parts of the body. HPV types 16 and 18 have been characterized as “high risk” types, considering cervical cancer development. Recent research has shown that HPV-18 may interact with nuclear receptors, such as thyroid hormone, androgen and estrogen receptors, and activate them, irrespective of the presence of the corresponding hormone.

Thirty patients with thyroid nodules that underwent surgery for thyroid disease within a 3-year period, were enrolled. Both nodular and adjacent normal thyroid tissue were surgically excised from each patient. Viral gene sequences of BKV (VP1), EBV (LMP1, EBNA2 and EBER1) and HPV were amplified by PCR. The PCR results were confirmed by direct sequencing analysis.

VP1 gene sequences were detected in 60 % (18/30) of thyroid cancer or multinodular hyperplasia lesions compared to 43.3% (13/30) of adjacent normal thyroid tissue

specimens. Fifteen out of thirty (50%) of thyroid cancer or multinodular hyperplasia samples revealed LMP1 sequences compared to 46.7% (14/30) of the corresponding normal thyroid tissues. EBNA2 gene sequences were detected in 90% (27/30) of thyroid cancer or multinodular hyperplasia, compared to 90% (27/30) of adjacent normal thyroid tissue specimens. All samples were negative for EBER1 sequences, while HPV DNA was not detected in either nodular or normal thyroid tissue.

This study suggests BKV and EBV 'infection' as an early event, occurring apparently within normal tissue. Regarding LMP1, we noted that malignant specimens more commonly harbour the mentioned sequences in comparison to normal ones. Although our findings do not allow assumptions about the potential oncogenic role of the above viruses, considering the thyroid gland, to be made, they suggest a coexistence or an 'endemicity' pattern. Since the number of specimens was small and all specimens came from the same hospital, further studies are needed to assess these observations in relation to locality features.



## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	I
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	II
SUMMARY	IV
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	VI
<b>A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</b>	
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ I. Ο ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ</b>	1
1.1 Ανατομία και εμβρυολογία του θυρεοειδούς αδένος	1
1.2 Θυρεοειδικά νεοπλάσματα	2
1.2.1 Καλοήγη νεοπλάσματα	
1.2.2 Κακοήγη νεοπλάσματα	
1.3 Ταξινόμηση και Σταδιοποίηση	9
1.4 Διαταραχές του θυρεοειδικού μεταβολισμού	12
1.4.1 Καλοήγη θυρεοειδικές παθήσεις	
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ II. ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΗ</b>	15
2.1 Γενικά	15
2.2 Παράγοντες καρκινογένεσης	18
2.3 Ογκογονίδια	19
2.4 Αυξητικοί και αγγειογενετικοί παράγοντες	20
2.5 Διαμεμβρανικοί υποδοχείς και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες	21
2.6 Μεταγραφικοί παράγοντες	21
2.7 Πολυλειτουργικά ογκογονίδια	22
2.8 Ογκοκατασταλτικά γονίδια	22
2.9 Γονδιακή θεραπεία	23
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ III. ΙΟΙ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ</b>	25
3.1 Ιστορική αναδρομή	25
3.2 Εισαγωγή	26
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV. Ο ΙΟΣ ΒΚV</b>	29
4.1 Γενικά	29
4.2 Παθογένεια	30
4.3 Ογκογεννητικότητα του ΒΚV	31
4.4 ΒΚV και κακοήθειες στον άνθρωπο	32
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ V. Ο ΙΟΣ ΕΒV</b>	33
5.1 Γενικά	33
5.2 Παθογένεια	34
5.3 ΕΒV και ανθρώπινη νόσος	38
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI. ΟΙ ΙΟΙ ΗΡV</b>	41
6.1 Γενικά	41
6.2 Παθογένεια	41
6.3 ΗΡVs και ανθρώπινη νόσος	44

## **B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

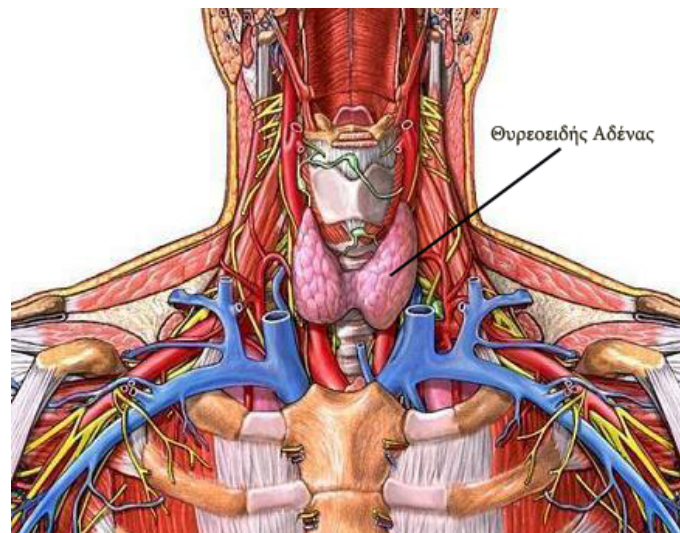
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>47</b>
<b>7.1 ΜΕΘΟΔΟΙ</b>	<b>47</b>
7.1.1 Συλλογή Δειγμάτων	47
7.1.2 Εκχύλιση DNA από ιστούς	47
7.1.3 Έλεγχος της ποιότητας του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	47
7.1.4 Φωτομέτρηση DNA	48
7.1.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	48
7.1.6 Συνθήκες αντιδράσεων PCR και εκκινητές	50
7.1.7 Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης	51
7.1.8 Χρώση νουκλεϊκών οξέων με βρωμιούχο αιθίδιο	52
7.1.9 DNA sequencing	52
7.1.10 Στατιστική ανάλυση	52
<b>7.2 ΥΛΙΚΑ</b>	<b>52</b>
7.2.1 Διαλύματα	52
7.2.1.1 Διαλύματα απομόνωσης DNA, RNA και πρωτεϊνών	
7.2.1.2 Ηλεκτροφορητικά διαλύματα	
7.2.2 Ένζυμα	
7.2.3 Υλικά και εταιρείες προέλευσης	
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ VIII. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b>	<b>55</b>
8.1 Δείγματα και ασθενείς που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης	55
8.2 Ανίχνευση αλληλουχιών του ιού BKV (γονίδιο <i>VP1</i> )	55
8.3 Ανίχνευση αλληλουχιών του ιού EBV (γονίδια <i>LMP1</i> , <i>EBNA2</i> , <i>EBER1</i> )	57
8.3.1 Ανίχνευση αλληλουχιών του γονιδίου <i>LMP1</i>	58
8.3.2 Ανίχνευση αλληλουχιών του γονιδίου <i>EBNA2</i>	60
8.3.3 Σύγκριση των αποτελεσμάτων <i>LMP1-EBNA2</i>	62
8.3.4 Ανίχνευση αλληλουχιών του γονιδίου <i>EBER1</i>	64
8.4 Ανίχνευση αλληλουχιών του ιού HPV (γονίδιο <i>L1</i> )	64
8.5 DNA sequencing	64
8.6 Συγκεντρωτικά στοιχεία	65
<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ IX. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b>	<b>67</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b>	<b>73</b>
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ</b>	<b>91</b>

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

## ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ

## 1.1. Ανατομία και Εμβρυολογία του Θυρεοειδούς αδένος

Ο θυρεοειδής αδένος προέρχεται από το εμβρυϊκό ενδόδερμα και μεταναστεύει κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης στη θέση που έχει στους ενήλικες στη βάση του τραχήλου. Ενίοτε, συμπληρωματικός θυρεοειδικός ιστός μπορεί να βρεθεί κατά μήκος αυτής της οδού της καθόδου, είτε στη βάση της γλώσσας ή κατά μήκος του θυρεογλωσσικού πόρου. Κατά την 12<sup>η</sup> εβδομάδα της κύησης ο θυρεοειδής αδένος είναι μορφολογικά και λειτουργικά ακέραιος και τα θυρεοειδικά επιθηλιακά κύτταρα έχουν σχηματίσει μικρά, ακέραια θυλάκια που περιέχουν κολλοειδές. Ο θυρεοειδής επίσης περιέχει κύτταρα C, προερχόμενα από τη νευρική ακρολοφία, γνωστά για την έκκριση καλσιτονίνης [1,2].



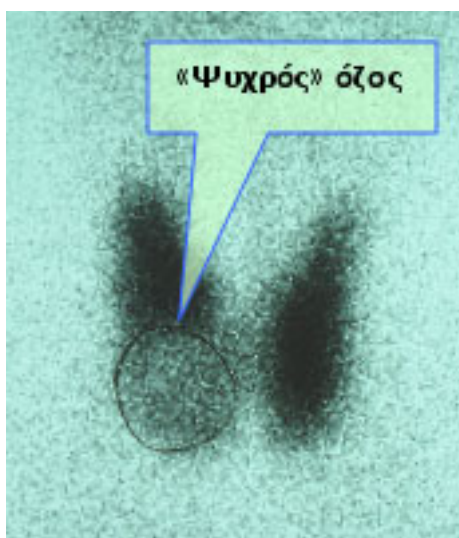
Εικόνα 1.1. Ο φυσιολογικός θυρεοειδής αδένος.

Ο φυσιολογικός θυρεοειδής αδένος έχει βάρος περίπου 25 gr και αποτελείται από δύο πλευρικούς λοβούς και τον ισθμό. Ο ισθμός κείται ακριβώς κάτω από τον κρικοειδή χόνδρο προσθίως της τραχείας και οι πλευρικοί λοβοί επεκτείνονται προς τα άνω μέσα στη σφαγιτιδική αύλακα περίπου 4-5 εκατοστά (Εικόνα 1.1). Η κλινική εξέταση και ψηλάφηση του θυρεοειδή, επιτρέπουν αναγνώριση συμμετρικής ή ασύμμετρης διόγκωσης των πλευρικών λοβών (βρογχοκήλη), ευδιάκριτων οζιδίων, σκληρότητας του θυρεοειδή ή μεταβολές στη σύσταση του φυσιολογικού αδένος. Πολλές μέθοδοι έχουν προταθεί για τη σωστή ψηλάφηση του θυρεοειδούς, όμως καμιά τεχνική δεν είναι ανώτερη κάποιος άλλης και ο κάθε εξεταστής θα πρέπει να εφαρμόζει την προσπέλαση που τον διευκολύνει καλύτερα σε κάθε περίπτωση [1,2].

## 1.2. ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΑ ΝΕΟΠΛΑΣΜΑΤΑ

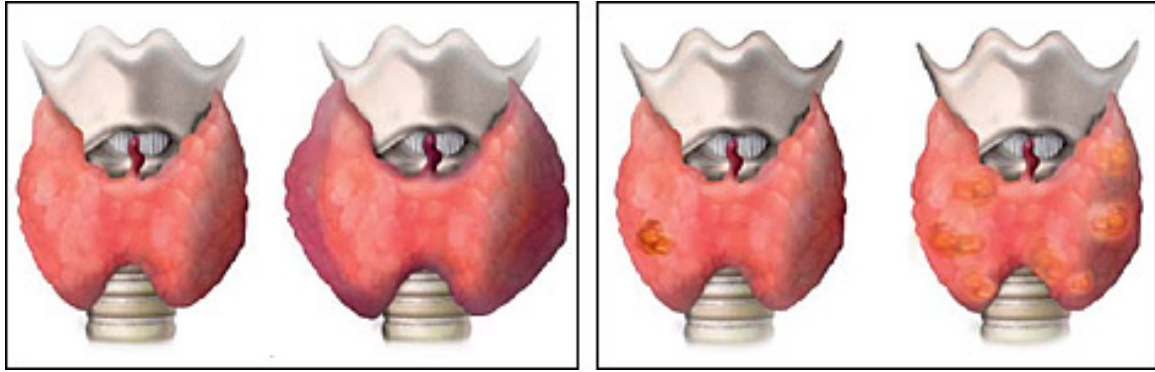
### 1.2.1. Καλοήγη νεοπλάσματα

Τα καλοήγη νεοπλάσματα του θυρεοειδούς ταξινομούνται ως αδενώματα. Τα περισσότερα αδενώματα φαίνονται σαν μη λειτουργικά (ψυχρός όζος) στο σπινθηρογράφημα του θυρεοειδούς (Εικόνα 1.2), αν και ενίοτε μπορεί να παρουσιάζουν φυσιολογική λειτουργία (αδιαφοροποίητος όζος) ή υπερλειτουργία (θερμός όζος) και επομένως να καταστέλλουν τον εναπομείναντα θυρεοειδικό ιστό προκαλώντας θυρεοτοξίκωση.



**Εικόνα 1.2.** Το σπινθηρογράφημα γίνεται με την χορήγηση ραδιενεργού ιωδίου, που προσλαμβάνεται από τον αδένα. Ανάλογα με τον βαθμό πρόσληψης, οι όζοι χωρίζονται σε **ψυχρούς** και **θερμούς**. Δεν μπορεί να μας διαχωρίσει εάν ένας όζος είναι καλοήγη ή κακοήγη αλλά μπορεί να μας δώσει την πληροφορία εάν ο όζος έχει αυξημένες πιθανότητες να έχει κακοήθεια. Είναι γνωστό ότι το 21% περίπου των ψυχρών είναι κακοήθεις και αυτοί που δεν είναι ακόμα, έχουν μεγάλη πιθανότητα να γίνουν.

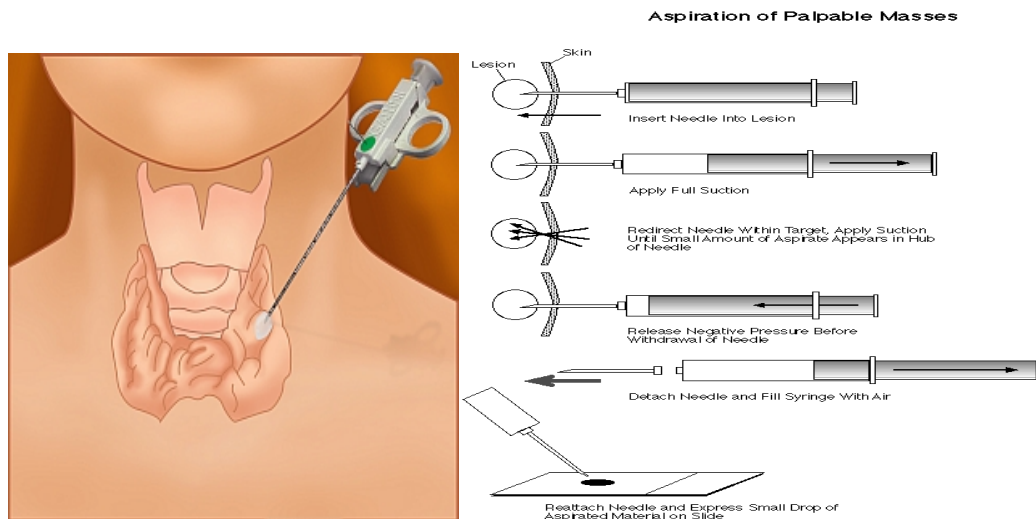
Σημαντική διαγνωστική πρόκληση για τον θεράποντα ιατρό αποτελεί η διαφοροδιάγνωση των θυρεοειδικών αδενωμάτων από τον θυλακίωδη καρκίνο του θυρεοειδούς. Το ιστορικό και η φυσική εξέταση παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες, αλλά όχι απόλυτες, για να βγεί το συμπέρασμα εάν ή όχι ένας όζος είναι κακοήγη.



**Εικόνα 1.3.** Οι μορφολογικές παθήσεις: αφορούν στην αλλαγή της μορφής του θυρεοειδούς αδένος τόσο σε σχήμα όσο και σε μέγεθος, χωρίς να επηρεαστεί συνήθως η λειτουργία του. Η μορφή του αδένος μπορεί να αλλάξει είτε από διόγκωση του ίδιου του αδένος (διάχυτη βρογχοκήλη) είτε από την ανάπτυξη ενός όζου (μονήρης όζος) ή πολλαπλών όζων (πολυοζώδης βρογχοκήλη).

Η Εικόνα 1.3 παρουσιάζει ένα προτεινόμενο σχήμα για τη διαφοροποίηση των καλοήθων από τους κακοήθεις όζους. Ορισμένοι παράγοντες ενισχύουν την κλινική υποψία για κακοήθεια. Ιστορικό ακτινοβολίας της κεφαλής, αυχένα ή του ημιθωρακίου κατά την παιδική ηλικία είναι ίσως το σημαντικότερο εύρημα του ιστορικού. Οι όζοι που αναπτύσσονται σε νέους (<20 ετών) ή γηραιότερους ασθενείς (>60 ετών) ή σε άνδρες (οποιασδήποτε ηλικίας), είναι πιο πιθανό να είναι κακοήθεις. Η ταχεία ανάπτυξη του όζου, η σύμφυση με υποκείμενους ιστούς του αυχένα, η παρουσία σκληρίας και η λεμφαδενοπάθεια, υπαινίσσονται θυρεοειδικό καρκίνο. Επίσης, ασθενείς με διαγνωσμένο καρκίνο, μπορεί να έχουν τραχηλική λεμφαδενοπάθεια, με απουσία ψηλαφητού θυρεοειδικού όζου. Το οικογενειακό ιστορικό δεν βοηθά, εκτός περιπτώσεων μυελοειδούς θυρεοειδικού καρκίνου παρουσιαζόμενου σαν μέρος του συνδρόμου της πολλαπλής ενδοκρινικής νεοπλασίας των τύπων 2A και 2B (MEN, multiple endocrine neoplasia).

Οι παραδοσιακές εργαστηριακές εξετάσεις που γίνονται για το θυρεοειδικό όζο δεν μπορούν να ξεχωρίσουν τις καλοήθεις από τις κακοήθεις βλάβες. Ένας κακοήθης θυρεοειδικός όζος, είναι σχεδόν πάντα ψυχρός στο σπινθηρογράφημα και τα περισσότερα αδενώματα είναι ψυχροί όζοι. Εντούτοις, ένας όζος που είναι σαφώς λειτουργικός (θερμός), σπάνια αποδεικνύεται κακοήθης. Για το λόγο αυτό, το σπινθηρογράφημα έχει ένα επιλεκτικό ρόλο στις διαγνωστικές εξετάσεις. Το υπερηχογράφημα προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για το μέγεθος και τα κυστικά στοιχεία αλλά δεν μπορεί να διαγνώσει μια κακοήθεια και δεν θα έπρεπε να χρησιμοποιείται σαν εξέταση ρουτίνας.



**Εικόνα 1.4.** Η βιοψία θυρεοειδή με λεπτή βελόνη.

Η βιοψία θυρεοειδή με λεπτή βελόνη (FNA, fine needle aspiration), (Εικόνα 1.4), είναι η πιο αξιόπιστη και χρήσιμη διαγνωστική τεχνική για το συμπέρασμα εάν ένας όζος είναι καλοήθης ή κακοήθης. Η FNA είναι ευαίσθητη και ειδική εξέταση, επομένως μειώνει σημαντικά την αδιάκριτη αφαίρεση όλων των θυρεοειδικών όζων. Υπάρχει πολύ μικρή πιθανότητα ψευδώς καλοήθων όζων μετά από FNA βιοψία (<1-5%). Η FNA επίσης βοηθά στη διάκριση συμπαγών από κυστικούς όζους. Όταν η FNA αποκαλύψει μία κύστη, το υγρό της θα πρέπει να εξεταστεί κυτταρολογικά, γιατί ένα μικρό ποσοστό κύστεων συνδέονται με θυρεοειδικό καρκίνο. Δυστυχώς, η τεχνική δεν ξεχωρίζει θυλακιώδη αδενώματα από θυλακιώδη καρκινώματα γιατί η διάγνωση του θυλακιώδους καρκινώματος βασίζεται κυρίως σε διήθηση της κάψας ή των αγγείων, που δεν μπορούν να διακριθούν με την κυτταρολογική εξέταση. Ευρήματα κακοήθειας, επιβάλλουν τη χειρουργική αντιμετώπιση. Αποτελέσματα βιοψίας όπως «υποψία καρκινώματος», άτυπα κύτταρα ή αδιευκρίνιστα, παρουσιάζουν ένα περαιτέρω πρόβλημα. Ο όζος μπορεί να αξιολογηθεί με σπινθηρογράφημα ραδιενεργού ιωδίου και οι λειτουργικοί όζοι να παρακολουθούνται συν τω χρόνω ή, αν είναι ψυχροί, να αφαιρούνται [1,2].

### 1.2.2. Κακοήθη νεοπλάσματα

Ο θυρεοειδικός καρκίνος είναι ο πιο συχνός ενδοκρινικός καρκίνος. Εντούτοις, μέσα σ' όλους τους τύπους καρκίνου στο γενικό πληθυσμό είναι ευδιάκριτα ασυνήθης. Υπάρχουν περί τις 10.000-12.000 νέες περιπτώσεις και 1.100 θάνατοι ετησίως στις Η.Π.Α. Σε λανθάνουσα μορφή ο θυρεοειδικός καρκίνος είναι πολύ πιο συχνός διότι μελέτες αυτοψίας ρουτίνας δείχνουν ότι ποσοστό 5-20% φυσιολογικών θυρεοειδικών αδένων μπορεί να έχουν εστίες καρκινικού θυρεοειδικού ιστού, με αμφιλεγόμενη κλινική σημασία. Ο γενικός όρος «θυρεοειδικός καρκίνος» περιλαμβάνει διάφορους τύπους καρκίνου από καλά διαφοροποιημένους, βραδέως αναπτυσσόμενους όγκους πολύ καλής πρόγνωσης, μέχρι επιθετικούς καρκίνους χαμηλής διαφοροποίησης, με κακή πρόγνωση. Το δεδομένο ότι ο θυρεοειδικός καρκίνος αντιπροσωπεύει ποσοστό <1% των θανάτων από καρκίνο, ενώ <10% των ασθενών με θυρεοειδικό καρκίνο

πεθαίνουν απο την ασθένεια, έχουν προωθήσει τη φήμη πως ο θυρεοειδικός καρκίνος είναι αντιστοίχως «καλοήθης» νεοπλασία.

Οι διάφοροι τύποι των πρωτοπαθών θυρεοειδικών καρκίνων αναφέρονται στον πίνακα 1. Τρεις τύποι προέρχονται απο θυλακιώδες επιθήλιο : θηλώδεις, θυλακιώδης και αναπλαστικός. Οι άλλοι πρωτοπαθεις καρκίνοι του θυρεοειδούς είναι το θυρεοειδικό λέμφωμα και το μυελώδες καρκίνωμα. Το τελευταίο προέρχεται απο τα παραθυλακιώδη ή C κύτταρα και έχει χαρακτηριστικές βιοχημικές εκδηλώσεις [1,2].

**πίνακας 1: Τύποι πρωτοπαθούς θυρεοειδικού καρκινώματος**

Θηλώδεις
Θυλακιώδεις
Αναπλαστικό
Μυελοειδες
Λέμφωμα

#### 1.2.2.1. Θηλώδεις καρκίνωμα

Το θηλώδες καρκίνωμα είναι το πιο συχνό από τους πρωτοπαθεις θυρεοειδικούς καρκίνους και αντιπροσωπεύει το 60-70% όλων των θυρεοειδικών καρκίνων των ενηλίκων. Είναι συχνότερο στις γυναίκες απ' ότι στους άνδρες (2:1 έως 3:1) κι έχει μια αύξηση στην 3η και 4η δεκαετία της ζωής. Οι περισσότεροι ασθενείς έχουν μια ασυμπτωματική μάζα στον τράχηλο, ενίοτε υπάρχουν διάφοροι ψηλαφητοί όζοι, ενώ στο 1/3 περίπου των ασθενών υπάρχουν διογκωμένοι τραχηλικοί λεμφαδένες. Οι ασθενείς με θηλώδες καρκίνωμα μπορεί να έχουν ιστορικό ακτινοβολίας της κεφαλής, του τραχήλου ή του άνω ημιθωρακίου κατα την παιδική ηλικία.

Το θηλώδες καρκίνωμα είναι ο πιο βραδέως εξελισσόμενος θυρεοειδικός καρκίνος. Ο όγκος δεν περιβάλλεται απο κάψα και μπορεί να διηθεί τους παρακείμενους ιστούς, επεκτεινόμενος στους τραχηλικούς λεμφαδένες. Στο 5% των ασθενών μια τραχηλική μετάσταση (επίσημα γνωστή ως ετερόπλευρος ψευδοθυρεοειδής) μπορεί να είναι το κύριο εύρημα και ο θυρεοειδής αδένας μπορεί να είναι μόνο μια μικροσκοπική εστία μυελώδους καρκίνου. Αγγειακή διήθηση είναι σπάνια. Απομακρυσμένες μεταστάσεις υπάρχουν στο 10% των ενηλίκων και είναι συχνότερες στους πνεύμονες στα οστά και στον εγκέφαλο.

Ο όγκος παρουσιάζει μια χαρακτηριστική ιστοπαθολογική εικόνα συνιστάμενη από κυλινδρικό επιθήλιο, θηλώδεις προεκτάσεις (θάλλους) και διάσπαρτες συγκεντρικά τοποθετημένες εναποθέσεις ασβεστίου, που ονομάζονται ψαμμώδη σωματίδια. Οι περισσότεροι όγκοι είναι μείγμα θηλωδών και θυλακιωδών καρκινικών στοιχείων. Αυτό το χαρακτηριστικό έχει σοβαρές θεραπευτικές συνέπειες, διότι ο θυλακιώδης ιστός του όγκου συγκεντρώνει ραδιενεργό ιώδιο, ενώ ο θηλώδης όχι.

Διάφοροι παράγοντες συνεργούν στην κακή πρόγνωση των ασθενών με θηλώδες καρκίνωμα, συμπεριλαμβανομένων της ηλικίας >50 ετών, του φύλου (ανδρικό), της τοπικής καρκινικής εξάπλωσης κατά την διάρκεια της επέμβασης και της παρουσίας απομακρυσμένων

μεταστάσεων. Αντίθετα απ' ότι συμβαίνει σε πρωτοπαθείς καρκίνους άλλων οργάνων, η παρουσία τοπικής λεμφαδενικής μετάστασης δεν επηρεάζει δυσμενώς την πρόγνωση. Το γενικό ποσοστό θνησιμότητας στα θηλώδη καρκινώματα είναι αρκετά χαμηλό: ποσοστό επιβίωσης  $\geq 90\%$  σε ηλικίες 20 ή 30 ετών είναι ο κανόνας που επηρεάζεται από τους παράγοντες επικινδυνότητας που αναφέρθηκαν. Η αιτία θανάτου που προέρχεται από αυτόν τον όγκο είναι συνήθως τοπική εξάπλωση του όγκου στην τραχεία και/ή τον οισοφάγο. Σε μερικούς ασθενείς, ο όγκος υφίσταται αναπλαστική μετατροπή και γίνεται πιο επιθετικός με διάσπαρτες μεταστάσεις [1,2]. Πάνω από το 70% των περιπτώσεων θηλώδους καρκινώματος, είναι γνωστό ότι περιέχουν σημειακές μεταλλάξεις των γονιδίων *BRAF* και *RAS*, καθώς και αναδιατάξεις των γονιδίων και *RET/PTC TRK* [3,4]. Όλες οι προαναφερθείσες μεταλλάξεις, μπορούν να ενεργοποιήσουν το μονοπάτι της mitogen-activated πρωτεϊνικής κινάσης (MAPK) [3].

#### **1.2.2.2. Θυλακιώδες καρκίνωμα**

Το θυλακιώδες καρκίνωμα είναι ένας πρωτοπαθής θυρεοειδικός καρκίνος και αντιπροσωπεύει το 15% περίπου όλων των θυρεοειδικών καρκίνων. Είναι συνηθέστερος στις γυναίκες απ' ότι στους άνδρες (2:1 έως 3:1) και πιο συχνός σε ασθενείς >40 ετών. Πολλοί από τους ασθενείς έχουν ιστορικό ακτινοβολίας στην κεφαλή, τον αυχένα ή το άνω ημιθώρακιο. Υπάρχουν αρκετές σημαντικές διαφορές μεταξύ καλά διαφοροποιημένων θυλακιδίων και θηλωδών καρκινωμάτων. Τα θυλακιδώδη καρκινώματα περιβάλλονται από κάψα και συνήθως μεθίστανται με αιματογενή διασπορά και σπάνια στους λεμφαδένες της περιοχής. Οι ασθενείς με θυλακιδώδη καρκίνο έχουν την τάση να έχουν μικρότερους θυρεοειδικούς όγκους και μπορεί να έχουν απομακρυσμένη μετάσταση. Μετάσταση στα οστά μπορεί να εμφανιστεί νωρίς, είναι πολύ καταστροφική και απαντά ελάχιστα στη θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο. Άλλα συχνά σημεία απομακρυσμένης μετάστασης είναι το ήπαρ και οι πνεύμονες. Ο ιστός του θυλακιδώδους όγκου έχει την ικανότητα να συγκεντρώνει ραδιενεργό ιώδιο, αν και λιγότερο αποτελεσματικά απ' ότι ο φυσιολογικός θυρεοειδικός ιστός και να συνθέτει θυρεοειδική ορμόνη σε μικρότερα ποσά. Γι' αυτό διάσπαρτο μεταστατικό θυλακιδώδες καρκίνωμα σημαντικής μάζας μπορεί ενίοτε να παράγει αρκετή θυρεοειδική ορμόνη η οποία να προάγει θυρεοτοξίκωση και μάλιστα πιο συχνά T3 τοξίκωση. Το θυλακιδώδες καρκίνωμα, όπως και το θηλώδες, είναι ένας βραδέως αναπτυσσόμενος καρκίνος. Εντούτοις, το θυλακιδώδες καρκίνωμα έχει λιγότερο ευνοϊκή πρόγνωση. Την πρόγνωση επηρεάζουν η ηλικία του ασθενούς και ο βαθμός διήθησης της κάψας και των αγγείων. Στην περίπτωση μικρού βαθμού εξάπλωσης η 10ετής επιβίωση κυμαίνεται από 85-90%. Με μεγαλύτερη εξάπλωση, η 10ετής επιβίωση είναι περίπου 50%.

Μια σπάνια ποικιλία του θυλακιδώδους καρκινώματος είναι το καρκίνωμα από κύτταρα Hurthle. Αυτός ο όγκος χαρακτηρίζεται από αυξημένα ποσά οξύφιλου κυτταροπλάσματος, το οποίο σε ηλεκτρονική μικροσκοπία φαίνεται να περιέχει αφθονία μιτοχονδρίων. Και αυτοί οι όγκοι μπορεί να παρουσιάζουν απομακρυσμένες μεταστάσεις. Εντούτοις, σε αντίθεση με το θυλακιδώδες καρκίνωμα, σπάνια προσλαμβάνουν ραδιενεργό ιώδιο [1,2]. Στο 70-75% των θυλακιδίων



καρκινωμάτων, ανευρίσκονται είτε σημειακές μεταλλάξεις του γονιδίου *RAS*, είτε ανακατατάξεις των γονιδίων *PAX8/PPARγ* [5].

### 1.2.2.3. Αναπλαστικό καρκίνωμα

Το 5% των θυρεοειδικών καρκίνων αποτελεί το αναπλαστικό καρκίνωμα. Είναι λίγο συχνότεροι στις γυναίκες και μπορεί να προέρχεται από προϋπάρχον θηλώδες καρκίνωμα ή πολυζώδη βρογχοκήλη. Παρουσιάζει μια αύξηση της επίπτωσής του στην 6<sup>η</sup> και 7<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής, αν και έχει εμφανιστεί και σε άτομα <40 ετών. Η κλινική εικόνα είναι συνήθως αυτή της ταχέως αναπτυσσόμενης θυρεοειδικής μάζας που μπορεί να συνδέεται με δυσφαγία, βράγχος φωνής, αιμόπτυση και αναπνευστικά προβλήματα. Η μάζα αυτή είναι σκληρή στην ψηλάφηση και καθηλωμένη στους περιβάλλοντες ιστούς. Αυτή η επιθετική κλινική εικόνα πρέπει να διαχωριστεί από αυτή του θυρεοειδικού λεμφώματος (συζητείται παρακάτω), που είναι θεραπεύσιμο και γενικά έχει ευνοϊκότερη πρόγνωση. Οι περισσότεροι ασθενείς με αναπλαστικό καρκίνωμα πεθαίνουν εντός μηνών αφ' ότου έχει διαγνωστεί και λίγοι επιζούν για περισσότερο από ένα χρόνο.

Κατά την κυτταρολογική εξέταση μετά από FNA εμφανίζονται ατρακτοειδή και πολυπύρνα γιγαντιαία κύτταρα με πολλές μιτώσεις. Είναι έντονες σε περιοχές νέκρωσης και φλεγμονής. Νησίδια θηλώδους και/ή θυλακιώδους καρκινώματος μπορεί να υπάρχουν υποστηρίζοντας την ιδέα ενός προϋπάρχοντος ρόλου αυτών των καρκίνων σε μερικές περιπτώσεις. Η θεραπεία είναι ανακουφιστική. Η εγχείρηση χρειάζεται για ν' ανακουφιστεί η τραχεία και ο οισοφάγος. Η χημειοθεραπεία και η θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο είναι συνήθως μη δραστικές. Η ακτινοθεραπεία μπορεί σε μερικές περιπτώσεις να επιβραδύνει την εξέλιξη της νόσου [1,2]. Τα αναπλαστικά καρκινώματα, συνήθως περιέχουν μεταλλάξεις του μονοπατιού της κινάσης της 3'-φωσφατιδυλοϊνοσιτόλης (*PI3K*), καθώς και μεταλλάξεις των γονιδίων *TP53* και *CTNNB1*, οι οποίες σπανίως απαντώνται στα καλά διαφοροποιημένα θηλώδη και θυλακιώδη καρκινώματα [6].

### 1.2.2.4. Λέμφωμα

Το θυρεοειδικό λέμφωμα αποτελεί μόνο ένα μικρό ποσοστό των περιπτώσεων θυρεοειδικού καρκίνου. Είναι συχνότερο στις γυναίκες απ' ότι στους άνδρες (3:1), με συχνότερη την εμφάνιση κατά την 7<sup>η</sup> ή 8<sup>η</sup> δεκαετία της ζωής, μπορεί όμως να συναντηθεί και νωρίτερα, κατά την 3<sup>η</sup> δεκαετία. Είναι συνήθως μια ταχέως αναπτυσσόμενη μάζα στο θυρεοειδή, συνδεδεμένη με πόνο και ευαισθησία διαφόρων βαθμών.

Το ιστοπαθολογικά ευρήματα συχνότατα συμφωνούν με το διάχυτο ιστιοκυτταρικό λέμφωμα. Σχεδόν πάντα υπάρχουν ιστολογικές ενδείξεις για θυρεοειδίτιδα Hashimoto και πολλοί ασθενείς είναι υποθυρεοειδικοί. Οι περισσότεροι ασθενείς με λέμφωμα έχουν χαρακτηριστικά αυξημένα επίπεδα θυρεοειδικών αντιμικροσωματικών και αντιθυρεοσφαιρινικών αντισωμάτων. Η σχέση της θυρεοειδίτιδας Hashimoto με το θυρεοειδικό λέμφωμα, φαίνεται να είναι κάτι περισσότερο από συμπτωματική. Αν και ο πραγματικός αριθμός περιπτώσεων θυρεοειδικών λεμφωμάτων

που αναπτύσσονται σε ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto είναι μικρός, ο κίνδυνος για ανάπτυξη θυρεοειδικού λεμφώματος είναι υψηλότερος σε ασθενείς με θυρεοειδίτιδα Hashimoto, όπως είναι ο κίνδυνος ανάπτυξης άλλων λεμφοβλαστικών ή μυελοβλαστικών συνδρόμων.

Η πρόγνωση είναι καλύτερη όταν η διάγνωση γίνει νωρίς. Όταν το λέμφωμα περιορίζεται στο θυρεοειδή, η πενταετής επιβίωση κυμαίνεται από 75-85%. Σε επέκταση στον τράχηλο η πενταετής επιβίωση κυμαίνεται στο 35-40% και σε ευρέως διασπαρμένο λέμφωμα η πενταετής επιβίωση βρίσκεται στο 5% περίπου. Ασθενείς <65 ετών και σε άνδρες έχουν σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης.

Η θεραπεία του θυρεοειδικού λεμφώματος συνήθως συνίσταται σε ακτινοθεραπεία και χημειοθεραπεία μόνες τους ή σε συνδυασμό. Η εγχείρηση γίνεται μόνο αν χρειάζεται ανακούφιση η τραχεία ή ενίοτε για πιο εκτεταμένη νόσο [1,2].

#### **1.2.2.5. Μυελοειδές καρκίνωμα**

Σχεδόν το 5-10% όλων των νέων περιπτώσεων θυρεοειδικού καρκίνου είναι μυελοειδή καρκινώματα. Ο όγκος προέρχεται από τα C κύτταρα που παράγουν την πολυπεπτιδική ορμόνη καλσιτονίνη. Είναι ελαφρώς πιο συχνό στις γυναίκες απ' ό,τι στους άνδρες με μια έξαρση κατά την 5η και 6η δεκαετία της ζωής. Υπάρχουν τρεις μορφές μυελοειδών καρκινωμάτων: η σποραδική, εκείνη που συνδέεται με πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία (Multiple endocrine neoplasia, MEN), τύπος 2A (σύνδρομο του Sipple) και αυτή που συνδέεται με MEN τύπος 2B. Οι ασθενείς συνήθως έχουν μια μάζα θυρεοειδούς, που είναι ψυχρή στο σπινθηρογράφημα. Όταν συνδέεται με MEN τύπου 2A μπορεί να υπάρχει ιστορικό φαιοχρωμοκυττώματος ή υπερπαραθυρεοειδισμού. Όταν συνδέεται με τύπο 2B μπορεί να υπάρχει ιστορικό φαιοχρωμοκυττώματος και κλινική εικόνα με μαρφανοειδή χαρακτηριστικά και διάχυτου γαγγλιονευρώματος πιο εμφανούς στη γλώσσα.

Η σποραδική μορφή είναι συχνότερη (4:1), εμφανίζεται σε μεγαλύτερες ηλικίες (>40) και είναι συνήθως ετερόπλευρη. Ο οικογενής τύπος είναι κληρονομούμενος με το αυτοσωμικό επικρατούντα χαρακτήρα, είναι συνήθως αμφοτερόπλευρη και παρουσιάζεται σε νεότερες ηλικίες. Την καλύτερη πρόγνωση έχει το μυελοειδές καρκίνωμα που συνδέεται με MEN2A και τη χειρότερη αυτό που συνδέεται με MEN 2B. Η πρόγνωση για τη σποραδική μορφή είναι ενδιάμεση. Η πρόγνωση της νόσου συνδέεται ευθέως με το ποσό της καλσιτονίνης του όγκου μετρημένης με ανοσοϊστοχημική μέθοδο. Το μυελοειδές καρκίνωμα μεθίσταται μέσω λεμφαγγείων στους λεμφαδένες στον τράχηλο και στο μεσοθωράκιο. Συχνά επίσης παρουσιάζει μεταστάσεις απομακρυσμένες ως επί το πλείστον στους πνεύμονες, στα οστά και στο ήπαρ.

Το μυελοειδικό καρκίνωμα έχει προσδιορισίμους βιοχημικούς δείκτες και μπορεί να συνδέεται με διάφορα παρανεοπλασματικά σύνδρομα. Ο βιολογικός δείκτης αυτού του όγκου είναι η καλσιτονίνη και αυτή είναι αυξημένη είτε σαν βασική τιμή, είτε μετά από διέγερση με πενταγαστρίνη ή έγχυση ασβεστίου στις περισσότερες περιπτώσεις. Το επίπεδο της καλσιτονίνης είναι ο μοναδικός δείκτης για την ανίχνευση αρχικών σταδίων μυελοειδούς καρκίνου σε ασθενείς που έχουν τις οικογενείς μορφές διότι η βασική και/ή η διεγερθείσα τιμή της καλσιτονίνης είναι αυξημένη όταν υπάρχει υπερπλασία των C κυττάρων, η οποία προηγείται

του μυελοειδικούς καρκινώματος. Το επίπεδο καλσιτονίνης στον ορό, χρησιμεύει για την ανίχνευση ύπαρξης υπολειπόμενου καρκινικού ιστού μετά την εγχείρηση. Το μυελοειδές θυρεοειδικό καρκίνωμα συνδέεται επίσης με το κλασικό σύνδρομο Cushing ή με καρκινοειδές σύνδρομο οφειλόμενο στην έκτοπη παραγωγή ACTH ή σεροτονίνης από τον όγκο. Η έκτοπη παραγωγή προσταγλανδινών, κινινών και αγγεοδραστικών εντερικών πεπτιδίων προκαλεί υδαρή διάρροια σε μερικούς ασθενείς. Ο όγκος παράγει επίσης ισταμινάση, που είναι χρήσιμος δείκτης για μεταστατική νόσο και το καρκινοεμβρυονικό αντιγόνο, ένα ακόμη καρκινικό δείκτη.

Η διάγνωση του μυελοειδούς καρκινώματος γίνεται συνήθως με τον προσδιορισμό της βασικής τιμής ή/και της μετά από διέγερση καλσιτονίνης. Στους οικογενείς τύπους είναι απαραίτητη μια διαγνωστική διερεύνηση για φαιοχρωμοκύττωμα πριν την επέμβαση. Στους ασθενείς με MEN τύπου 2Α θα πρέπει να γίνονται προσδιορισμοί του ασβεστίου του ορού και των επιπέδων της παραθορμόνης. Η ιστολογική διάγνωση γίνεται με παρακέντηση με βελόνα μεγάλης διαμέτρου, ή με ανοιχτή βιοψία διεγχειρητικά. Ο όγκος αποτελείται από μεγάλες αθροίσεις κυττάρων C, επιθηλιακών κυττάρων, ινώδη ιστό και αποθέσεις αμυλοειδούς. Οι εναποθέσεις αλάτων ασβεστίου είναι υπεύθυνες για την ανεύρεση πυκνών ομοιογενών αποτιτανώσεων. Η θεραπεία του μυελοειδούς καρκινώματος του θυρεοειδούς συνίσταται σε θυρεοειδεκτομή με λεμφαδενικό καθαρισμό των κεντρικών τραχηλικών λεμφαδένων. Γίνεται δειγματοληψία από τους πλάγιους τραχηλικούς λεμφαδένες και αν το αποτέλεσμα είναι θετικό, εκτελείται λεμφαδενεκτομή. Η ακτινοθεραπεία, η θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο και η χημειοθεραπεία, είναι αναποτελεσματικές. Στους οικογενείς τύπους ο προσδιορισμός της βασικής καλσιτονίνης και της μετά από διέγερση καλσιτονίνης είναι στοιχειώδης για την ανίχνευση της προϋπαρχούσης του μυελοειδούς καρκινώματος, υπερπλασίας των C κυττάρων, διότι η θυρεοειδεκτομή σ' αυτό το στάδιο είναι θεραπευτική. Στους παράγοντες κινδύνου συνδεδόμενους με κακή πρόγνωση, συμπεριλαμβάνονται το ανδρικό φύλο, η λεμφαδενική διήθηση, η επέκταση εκτός θυρεοειδούς και η σύνδεση με MEN τύπο 2Β. Πέντε έως δέκα χρόνια επιβίωσης έχουν ποσοστό 67-80%, το οποίο δεν είναι ασύνηθες στις διάφορες ανακοινούμενες σειρές σποραδικών όγκων και όγκων συνδεδόμενων με MEN τύπου 2Α [1,2]. Παρά το γεγονός ότι τα περισσότερα μυελοειδή καρκινώματα είναι σποραδικά, το 20% αυτών είναι οικογενή, και προκύπτουν από μετάλλαξη του πρωτο-ογκογονιδίου RET [7].

### 1.3. Ταξινόμηση και Σταδιοποίηση

Μετά την ιστολογική διάγνωση, η οποία γίνεται με την λήψη βιοπτικού υλικού, ακολουθεί η σταδιοποίηση της νόσου με στόχο την εκτίμηση της έκτασής της. Η σταδιοποίηση πραγματοποιείται με βάση το το σύστημα TNM των επιτροπών της UICC (**Διεθνής Ένωση κατά του Καρκίνου**) και είναι ιδιαίτερα σημαντική τόσο στην πρόγνωση όσο και στον καθορισμό της θεραπευτικής αγωγής [2].

<b>ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ TNM ΓΙΑ ΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ</b>	
<b>Πρωτοπαθής εστία (T)</b>	
<b>Tx</b>	Η πρωτοπαθής εστία δεν μπορεί να εκτιμηθεί
<b>To</b>	Δεν ανευρίσκεται πρωτοπαθής εστία
<b>T1</b>	≤ 2 cm που περιορίζεται στον θυρεοειδή αδένα
	<b>T1a</b> ≤ 1 cm
	<b>T1b</b> > 1 cm αλλά ≤ 2 cm
<b>T2</b>	> 2 cm αλλά ≤ 4cm, που περιορίζεται στον θυρεοειδή αδένα
<b>T3</b>	> 4 cm που περιορίζεται στον θυρεοειδή αδένα ή οποιοσδήποτε όγκος με μικρή εξωθυρεοειδική εκτόπιση (επέκταση στον στερνοθυρεοειδή μυ ή στον περιθυρεοειδικό λιπώδη ιστό)
<b>T4</b>	
	<b>T4a</b> Προχωρημένη νόσος, όγκος ανεξαρτήτως μεγέθους που επεκτείνεται στο υποδόριο λίπος ή διηθεί τραχεία, λάρυγγα, οισοφάγο ή το παλινδρομο λαρυγγικό νεύρο
	<b>T4b</b> Πολύ προχωρημένη νόσος, όγκος που διηθεί την προσπονδυλική περιτονία ή περικλείει την καρωτίδα ή αγγεία του μεσοθωρακίου
* Όλα τα αναπλαστικά καρκινώματα ταξινομούνται ως T4.	
<b>T4a</b>	Όλα τα αναπλαστικά καρκινώματα που περιορίζονται στον θυρεοειδή αδένα
<b>T4b</b>	Όλα τα αναπλαστικά καρκινώματα με εξωθυρεοειδική επέκταση
<b>Περιοχικοί λεμφαδένες (N)</b>	
<b>Nx</b>	Η ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων δεν μπορεί να εκτιμηθεί
<b>No</b>	Δεν υπάρχουν λεμφαδενικές μεταστάσεις
<b>N1</b>	Ύπαρξη λεμφαδενικών μεταστάσεων
	<b>N1a</b> Μεταστάσεις σε λεμφαδένες του κεντρικού τραχηλικού διαμερίσματος
	<b>N1b</b> Μεταστάσεις σε λεμφαδένες του ομότιμου ή αντίπλευρου πλάγιου τραχηλικού διαμερίσματος ή σε λεμφαδένες του μεσοθωρακίου
<b>Απομακρυσμένες μεταστάσεις (M)</b>	
<b>Mo</b>	Μη ανεύρεση απομακρυσμένων μεταστάσεων
<b>M1</b>	Ύπαρξη απομακρυσμένων μεταστάσεων

Πίνακας 1.1. Ταξινόμηση TNM για τον καρκίνο του θυρεοειδούς.

<b>ΣΤΑΔΙΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ</b>			
<b>ΘΗΛΩΔΕΣ ή ΘΥΛΑΚΙΩΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ</b>			
Ηλικίες < 45 ετών			
Στάδιο	T	N	M
<b>I</b>	κάθε T	κάθε N	M <sub>0</sub>
<b>II</b>	κάθε T	κάθε N	M <sub>1</sub>
Ηλικίες ≥ 45 ετών			
Στάδιο	T	N	M
<b>I</b>	T <sub>1</sub>	No	M <sub>0</sub>
<b>II</b>	T <sub>2</sub>	No	M <sub>0</sub>
<b>III</b>	T <sub>3</sub>	No	M <sub>0</sub>
<b>IVA</b>	T <sub>1-3</sub>	N <sub>1a</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>4a</sub>	N <sub>1b</sub>	
<b>IVB</b>	T <sub>4a</sub>	κάθε N	M <sub>0</sub>
<b>IVC</b>	κάθε T	κάθε N	M <sub>1</sub>
<b>ΜΥΕΛΟΕΙΔΕΣ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ</b>			
Όλες οι ηλικίες			
Στάδιο	T	N	M
<b>I</b>	T <sub>1</sub>	No	M <sub>0</sub>
<b>II</b>	T <sub>2,3</sub>	No	M <sub>0</sub>
<b>III</b>	T <sub>1-3</sub>	N <sub>1a</sub>	M <sub>0</sub>
<b>IVA</b>	T <sub>4a</sub>	No	M <sub>0</sub>
	T <sub>4a</sub>	N <sub>1a</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>1</sub>	N <sub>1b</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>2</sub>	N <sub>1b</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>3</sub>	N <sub>1b</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>4a</sub>	N <sub>1b</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>4a</sub>	No, N <sub>1b</sub>	M <sub>0</sub>
	T <sub>1-T4a</sub>	N <sub>1b</sub>	M <sub>0</sub>
<b>IVB</b>	T <sub>4b</sub>	κάθε N	M <sub>0</sub>
<b>IVC</b>	κάθε T	κάθε N	M <sub>1</sub>
<b>ΑΝΑΠΛΑΣΤΙΚΟ ΚΑΡΚΙΝΩΜΑ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ</b>			
Όλες οι ηλικίες			
Στάδιο	T	N	M
<b>IVA</b>	T <sub>4a</sub>	κάθε N	M <sub>0</sub>
<b>IVB</b>	T <sub>4b</sub>	κάθε N	M <sub>0</sub>
<b>IVC</b>	κάθε T	κάθε N	M <sub>1</sub>

Πίνακας 1.2. Σταδιοποίηση του θυρεοειδικού καρκίνου με βάση το σύστημα TNM των επιτροπών της UICC.

Η σταδιοποίηση του θυρεοειδικού καρκίνου, γίνεται με βάση την εκτίμηση των αποτελεσμάτων της βιοψίας καθώς και των ευρημάτων μιας σειράς κλινικών και απεικονιστικών εξετάσεων, με τις οποίες εκτιμάται η έκταση της νόσου και η παρουσία μεταστάσεων.

## **1.4. ΔΙΑΤΑΡΑΧΕΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΙΚΟΥ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΥ**

### **1.4.1. Καλοήθειες θυρεοειδικές παθήσεις**

#### **1.4.1.1. Υποθυρεοειδισμός**

Μια ευαίσθητη ισορροπία μεταξύ της κεντρικής παραγωγής και της περιφερικής δράσης της  $T_3$  και  $T_4$  απαιτείται για τη δημιουργία της ευθυρεοειδικής κατάστασης στην περιφέρεια. Ο κλινικός υποθυρεοειδισμός είναι συνήθως σχετιζόμενος με μειωμένη παραγωγή στον θυρεοειδή αδένα, αν και μπορούμε να επισημάνουμε και περιπτώσεις περιορισμένης δραστηριότητας των ορμονών στην περιφέρεια. Σε πολλές υπανάπτυκτες χώρες η έλλειψη του απαραίτητου ιωδίου εξηγεί το μεγάλο ποσοστό των υποθυρεοειδικών καταστάσεων. Σε αντιδιαστολή στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες, οι περισσότερες περιπτώσεις υποθυρεοειδισμού, οφείλονται σε θυρεοειδίτιδα Hashimoto, επιθετική θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο ή χειρουργική εξαίρεση του αδένα. Επίσης θα πρέπει να αναφερθούν γενετικές παρεκκλίσεις στην οργανογένεση του θυρεοειδούς στα παιδιά όπως η αγενεσία και η υποπλασία. Διαμαρτίες του κεντρικού νευρικού συστήματος, είναι δυνατό να οδηγήσουν είτε σε παθήσεις του πρόσθιου λοβού της υπόφυσης, είτε σε υποθαλαμικές διαταραχές οι οποίες μπορούν να χαρακτηριστούν ως υπεύθυνες για έναν κεντρικής αιτίας υποθυρεοειδισμό σαν αποτέλεσμα της μειωμένης έκκρισης TSH ή TRH. Τέλος, έχει περιγραφεί περιφερική ιστική αντίσταση στη δράση των θυρεοειδικών ορμονών, πιθανώς λόγω μεταβολής του μηχανισμού των υποδοχέων [1,2].

#### **1.4.1.2. Ενδημική βρογχοκήλη**

Η έλλειψη ιωδίου μπορεί να προκαλέσει μια αναστρέψιμη νόσο γνωστή ως ενδημική βρογχοκήλη, σοβαρότερο εκ των αποτελεσμάτων της είναι ο ενδημικός κρετινισμός. Η έλλειψη ιωδίου μικρής ή συμπτωματικής μορφής, αφορά το ένα τρίτο του παγκόσμιου πληθυσμού ειδικά σε υποανάπτυκτες χώρες, και περίπου 12 εκατομμύρια άνθρωποι παγκοσμίως υποφέρουν από ενδημικό κρετινισμό. Οι χώρες της νοτιανατολικής Ασίας, όπως η Ινδία, η Ινδονησία και η Κίνα, συμπεριλαμβάνονται στις υψηλότερες θέσεις όσον αφορά τον κίνδυνο από έλλειψη ιωδίου, ενώ αρκετές ευρωπαϊκές χώρες όπως η Ιταλία, η Ισπανία, η Ουγγαρία, η Πολωνία και η Σερβία δεν απέχουν πολύ από τη μέση της κατάταξης όσον αφορά την έλλειψη ιωδίου και τον κίνδυνο εμφάνισης ενδημικής βρογχοκήλης. Σε περιοχές που παρατηρείται σοβαρή έλλειψη ιωδίου, τα κλινικά σημεία και συμπτώματα της βρογχοκήλης εμφανίζονται σε μικρότερες ηλικίες. Η επικράτηση της νόσου αυξάνεται δραματικά στην όψιμη παιδική ηλικία δημιουργώντας την κορυφή της καμπύλης (peak) στην εφηβεία. Η εμφάνιση της βρογχοκήλης μειώνεται κατά τη διάρκεια της ενήλικης ζωής, με μια ελαφρά υπεροχή στις γυναίκες [1,2].

#### **1.4.1.3. Θυρεοειδίτιδα Hashimoto**

Μια από τις πιο σημαντικές αιτίες του υποθυρεοειδισμού στον ενήλικο πληθυσμό είναι η θυρεοειδίτιδα Hashimoto, η οποία αποτελεί ένα σύνθετο ανοσολογικό φαινόμενο που εμπλέκει τη δραστηριότητα ανοσοσυμπλεγμάτων και του συμπληρώματος στη βασική μεμβράνη των θυλακιδίων κυττάρων. Η δέσμευση του συμπληρώματος έχει σαν αποτέλεσμα την μεταβολή

της λειτουργίας του θυρεοειδικού κυττάρου με άμεσο αποτέλεσμα την εξασθένηση της παραγωγής της T<sub>3</sub> και T<sub>4</sub>. Ένας καταρράκτης αντιδράσεων με σκοπό την παραγωγή κυτοκινών έχει σαν αποτέλεσμα την επεξεργασία των προϊόντων τα οποία ευθέως ρυθμίζονται διαμέσου της θυρεοειδικής λειτουργίας ή την παρόξυνση της άνοσης απάντησης η οποία τελικά έχει το ίδιο αποτέλεσμα. Αυτές οι κυτταρικές αντιδράσεις εν κατακλείδι έχουν αποτέλεσμα την διήθηση από λεμφοκύτταρα και την επακόλουθη ίνωση, η οποία μειώνει τον αριθμό και την αποτελεσματικότητα των ενήλικων θυλακίων. Όσο διαρκεί αυτό το αυτοάνοσο φαινόμενο, μπορούμε να ανιχνεύσουμε την παρουσία αντισωμάτων δεσμευτικών της TSH. Τα θυρεοειδικά μικροσωματικά αντισώματα που παράγονται αποτελούν τους ενδιάμεσους μεσολαβητές για την αρχική πρόοδο της δέσμευσης του συμπληρώματος. Όσο αυτή η αυτοάνοση αντίδραση διαρκεί οι μεταβολές της θυρεοειδικής λειτουργίας θα μεταβάλλονται σε αναλογία με τα επίπεδα αυτών των αντισωμάτων. Στο τέλος, εδραιώνεται μια υποθυρεοειδική κλινική κατάσταση στους ασθενείς με εμμένοντα δεσμευτικά αντισώματα της TSH [1,2].





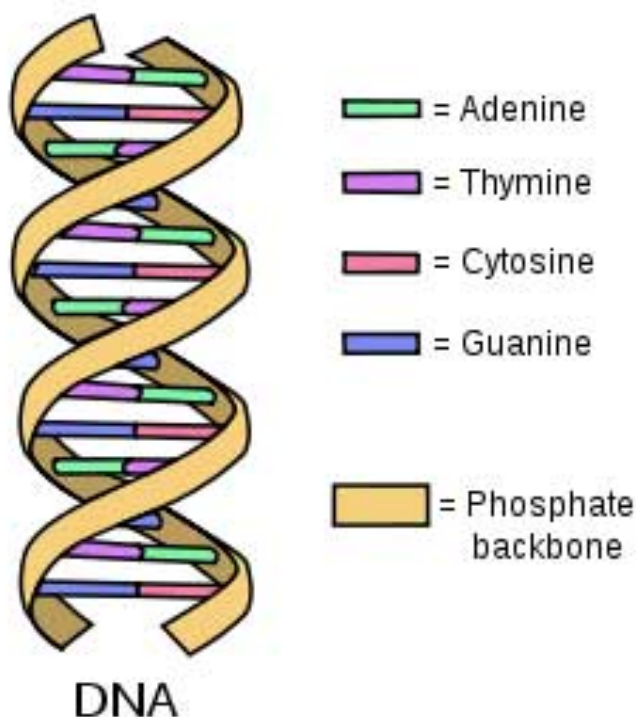
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ

## ΜΟΡΙΑΚΗ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΑΣΗ ΤΟΥ ΚΑΡΚΙΝΟΥ

## 2.1 Γενικά

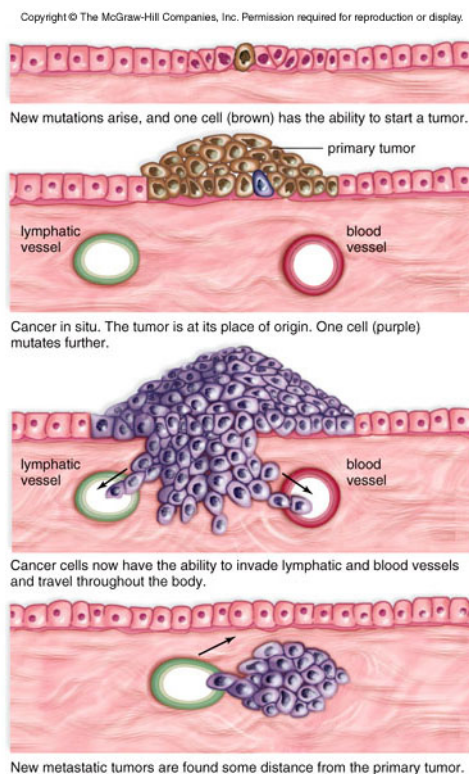
Το κύτταρο αποτελεί τη βασική δομική και λειτουργική μονάδα της ζωής. Ο ανθρώπινος οργανισμός αποτελείται από εκατομμύρια κύτταρα, η αναπτυξη και ο πολλαπλασιασμός των οποίων ρυθμίζεται με στόχο την ομαλή και αρμονική λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού. Η ρύθμιση της κυτταρικής ανάπτυξης και του κυτταρικού πολλαπλασιασμού επιτελείται μέσω γενετικών πληροφοριών που τα κύτταρα φέρουν στο γονιδίωμα τους (DNA).

Στις εικόνες που ακολουθούν ανασκοπούνται η δομή του δίκλωνου μορίου του δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως (DNA), όπου είναι αποθηκευμένη η γενετική πληροφορία του κυττάρου (Εικόνα 2.1), η δομή του μονόκλωνου μορίου του ριβονουκλεϊκού οξέως (RNA), όπου μεταγράφεται η γενετική πληροφορία του μορίου DNA (Εικόνα 2.2), μέσω της διαδικασίας της μεταγραφής (Εικόνα 2.3), για να ακολουθήσει στη συνέχεια η διαδικασία της μετάφρασης, μέσω της οποίας συντίθενται τα πρωτεϊνικά μόρια του κυττάρου (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.1. Το δίκλωνο μόριο δεοξυριβονουκλεϊκού οξέως.





**Εικόνα 2.4.** Στάδια διήθησης της βασικής μεμβράνης.

Με τον τρόπο αυτό στη συνέχεια, μέσω των λεμφικών και αιμοφόρων αγγείων, μεθίστανται σε απομακρυσμένα όργανα (μετάσταση).

Η διαδικασία της καρκινογένεσης είναι πολυσταδιακή. Διακρίνονται τρία στάδια καρκινογένεσης: το στάδιο έναρξης (initiation), το στάδιο προαγωγής (promotion) και το στάδιο μετεξέλιξης (progression), κατά την διάρκεια των οποίων πραγματοποιείται προοδευτικά η καρκινική εξαλλαγή των κυττάρων. Σε ορισμένες περιπτώσεις καρκίνου, υπάρχουν προκαρκινικές αλλοιώσεις, οι οποίες στην συνέχεια εξελίσσονται σε κακοήθη νεοπλάσματα.

Για τα στάδια της καρκινογένεσης στον θυρεοειδή αδένα, περισσότερα στοιχεία αναλύονται στο Κεφάλαιο I.

Η διαδικασία της καρκινογένεσης είναι πολυπαραγοντική. Μια σειρά από περιβαλλοντικούς, γενετικούς και επιγενετικούς παράγοντες επιδρούν στην μετατροπή του φυσιολογικού κυττάρου σε καρκινικό. Οι γενετικές αλλοιώσεις που δημιουργούνται, αντιστρεπτές και μη, αυξάνουν το ογκογενετικό δυναμικό των κυττάρων και αθροιστικά τα ωθούν στην κακοήθη εξαλλαγή. Οι αλλοιώσεις αυτές αφορούν την ποιοτική και ποσοτική λειτουργία συγκεκριμένων γονιδίων, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της αύξησης και της διαφοροποίησης του κυττάρου. Τα γονίδια αυτά διακρίνονται σε δυο βασικές κατηγορίες : τα ογκογονίδια (oncogenes) και τα ογκοκατασταλτικά γονίδια (onco-suppressor genes).

## **2.2. Παράγοντες καρκινογένεσης**

### **2.2.1. Φυσικοί παράγοντες**

Αν και η ευαισθησία των ιστών διαφέρει, η ιονίζουσα ακτινοβολία μπορεί να προκαλέσει όλες τις μορφές καρκίνου στον άνθρωπο, ενώ η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί καρκίνο του δέρματος συμπεριλαμβανομένου και του μελανώματος. Η ακτινοβολία φαίνεται πως προκαλεί άμεσα γενετικές βλάβες, όπως απαλείψεις και μεταθέσεις χρωμοσωμικών τμημάτων και σπανιότερα σημειακές μεταλλάξεις. Η υπεριώδης ακτινοβολία προκαλεί επιπλέον αλλοιώσεις στην δομή και τη λειτουργία γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την διόρθωση βλαβών που φυσιολογικά συμβαίνουν κατά την αντιγραφή του DNA. Ο μηχανισμός αυτός συμβάλλει στη δημιουργία κακοήθων δερματικών όγκων σε πάσχοντες από το σύνδρομο της μελαγχρωστικής ξηροδερμίας (xeroderma pigmentosum).

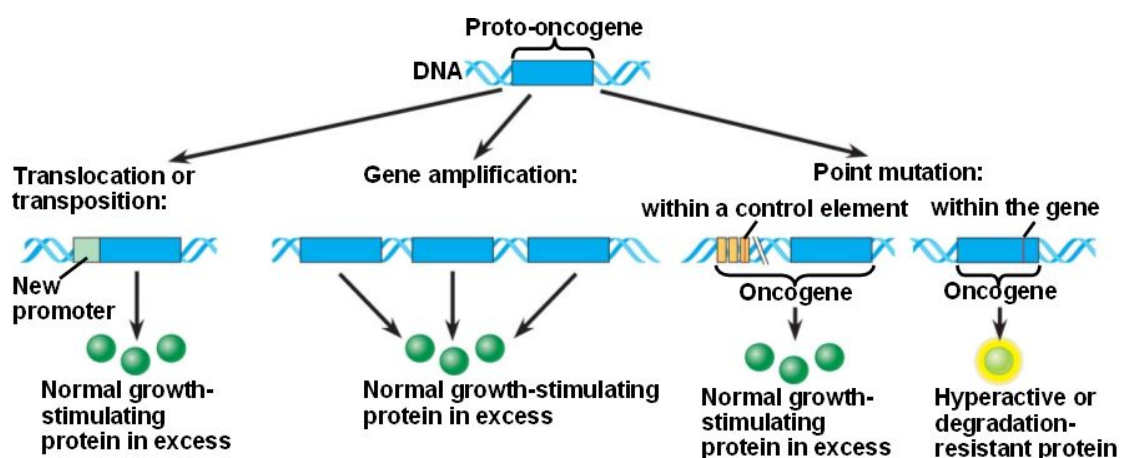
Η έκθεση σε ίνες αμιάντου προκαλεί καρκίνο στους πνεύμονες και τον υπεζωκότα. Το καρκίνωμα του πλακώδους επιθηλίου της ουροδόχου κύστης είναι στενά συνδεδεμένο με την χρόνια φλεγμονώδη αντίδραση που προκαλείται από μόλυνση της ουροδόχου κύστης από το *schistosoma haematobium*. Η μεταμόσχευση τεχνητού μέλους σπάνια συνδέεται με την ανάπτυξη σαρκώματος.

### **2.2.2. Χημικοί παράγοντες**

Παρά το γεγονός πως οι περισσότερες χημικές ουσίες δεν είναι καρκινογόνες, τα χημικά καρκινογόνα ενέχονται στις περισσότερες μορφές καρκίνου στον άνθρωπο. Οι ουσίες αυτές συνήθως μετατρέπονται από συγκεκριμένα ενζυμικά συστήματα του κυττάρου (π.χ. το κυτόχρωμα P-450) σε ενεργούς μεταβολίτες που δρούν άμεσα στο DNA του κυττάρου προκαλώντας από σημειακές γονιδιακές μεταλλάξεις έως μείζονες χρωμοσωμικές ανωμαλίες [9]. Το αλκοόλ και το κάπνισμα έχουν συσχετιστεί με την εκδήλωση αρκετών τύπων καρκίνου, όπως ο καρκίνος της κεφαλής και του τραχήλου, του αναπνευστικού, ανώτερου γαστρεντερικού και της ουροδόχου κύστης. Σε λιγότερο ανεπτυγμένες χώρες το ηπατοκυτταρικό καρκίνωμα προκαλείται από αφλατοξίνες, οι οποίες παράγονται από μύκητες. Η σύγχρονη διατροφή αποτελεί βασικό πατάγοντα καρκινογένεσης. Η χαμηλή διατροφική πρόσληψη ινών έχει συσχετιστεί με τον καρκίνο του παχέος εντέρου, ενώ η χρήση συντηρητικών στα τρόφιμα έχει ενοχοποιηθεί για διάφορους τύπους καρκίνου. Παλιότερα ο κίνδυνος καρκινογένεσης από χημικές ουσίες σχετιζόταν με την έκθεση των ανθρώπων σε βιομηχανικά προϊόντα όπως διάφορες χρωστικές, το βενζόλιο και το χλωριούχο βινύλιο.

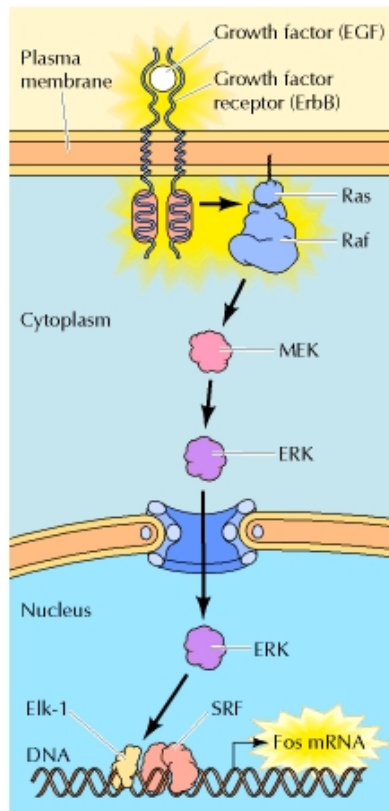
### 2.3. Ογκογονίδια

Τα ογκογονίδια είναι γονίδια, κυτταρικά ή ιικά, των οποίων η δράση συνεισφέρει στην κακοήθη εξαλλαγή του κυττάρου. Τα κυτταρικά ογκογονίδια ταυτοποιήθηκαν αρχικά ως ομόλογα ιικών γονιδίων ογκογόνων ρετρο-ιών, οι οποίοι εμφανίζουν την ικανότητα επαγωγής όγκων σε πειραματόζωα και μετασχηματισμού κυτταρικών σειρών *in vitro*. Στη συνέχεια όμως αποδείχτηκε ότι τα γονίδια των ρετροϊών είναι κυτταρικά γονίδια, τα οποία απέσπασαν εξελικτικά οι ρετρο-ιοί κατά την ενσωμάτωσή τους στο κυτταρικό γονιδίωμα των θηλαστικών. Αντίθετα, τα ογκογονίδια των DNA ιών δεν παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία με τα κυτταρικά ογκογονίδια.



Εικόνα 2.5. Τρόποι ενεργοποίησης ενός πρώτο-ογκογονιδίου σε ογκογονίδιο.

Τα ογκογονίδια προέρχονται από την ενεργοποίηση φυσιολογικών κυτταρικών ή ιικών γονιδίων (πρωτο-ογκογονίδια) λόγω της επίδρασης των παραγόντων καρκινογένεσης. Η ενεργοποίηση των πρωτο-ογκογονιδίων μπορεί να πραγματοποιηθεί με μια σειρά από αλλοιώσεις (Εικόνα 2.5), όπως οι σημειακές μεταλλάξεις, η γονιδιακή επέκταση, η μετάθεση χρωμοσωμικού τμήματος, η αύξηση του αριθμού των χρωμοσωμάτων, η ενσωμάτωση ιικών αλληλουχιών και η αύξηση της έκφρασης του γονιδίου λόγω μετεγραφικών, μετα-μεταγραφικών, μεταφραστικών και μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων. Η ενεργοποίηση εντοπίζεται τόσο σε ποιοτικό όσο και σε ποσοτικό επίπεδο, με αποτέλεσμα είτε την απευθείας αλλοίωση του γονιδιακού προϊόντος και την παραγωγή μεταλλαγμένης πρωτεΐνης, είτε την παραγωγή σε υπερβολικές ποσότητες (υπερέκφραση) της φυσιολογικής πρωτεΐνης, ενώ είναι επίσης δυνατή η ενεργοποίηση και στα δύο επίπεδα.



**Εικόνα 2.6.** Κυτταρική εντόπιση πρωτεϊνικών προϊόντων διάφορων ογκογονιδίων.

Τα πρώτο-ογκογονίδια στο φυσιολογικό κύτταρο κωδικοποιούν μια σειρά από πρωτεΐνες (Εικόνα 2.6), οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης, της σταθερότητας του DNA και της διαφοροποίησης, συμμετέχοντας σε ένα πολύπλοκο μηχανισμό επαγωγής σημάτων στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα πρωτεϊνικά προϊόντα των πρώτο-ογκογονιδίων, είναι κυρίως αυξητικοί και αγγειογενετικοί παράγοντες, διαμεμβρανικοί ή ενδοκυττάριοι υποδοχείς και πρωτεΐνες που ρυθμίζουν ως μεταγραφικοί παράγοντες τη μεταγραφή του κυττάρου.

#### 2.4. Αυξητικοί και αγγειογενετικοί παράγοντες

Παραδείγματα αυξητικών παραγόντων που κωδικοποιούνται από ογκογονίδια αποτελούν ο αυξητικός παράγοντας των αιμοπεταλίων (PDGF), ο οποίος παράγεται από το ογκογονίδιο *sis*, οι επιδερμοειδείς αυξητικοί παράγοντες (EGFs) και ο αυξητικός παράγοντας των ινοβλαστών (FGF), προϊόν του ογκογονιδίου *int-2* καθώς και διάφοροι αγγειογενετικοί παράγοντες όπως ο VEGF, οι οποίοι επάγουν τη διαδικασία της αγγειογένεσης. Η ενεργοποίηση των ογκογονιδίων αυτών είναι κυρίως συνέπεια της μεταγραφικής τους απορύθμισης, με αποτέλεσμα την υπερέκφραση των φυσιολογικών πρωτεϊνών τους. Με τον τρόπο αυτό το κύτταρο δέχεται έναν μεγάλο αριθμό μιτογονικών σημάτων τόσο από το ίδιο (αυτοκτινής επαγωγή) ή το μικροπεριβάλλον του, όσο και από πλέον μακρινά σημεία, γεγονός που επιδρά στην ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και του καρκινικού μετασχηματισμού του κυττάρου.

## 2.5. Διαμεμβρανικοί υποδοχείς και κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες

Οι καλύτερα μελετημένοι υποδοχείς είναι αυτοί, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μια εξωτερική περιοχή πρόσδεσης, μια διαμεμβρανική περιοχή και ένα κυτταροπλασματικό επίτοπο, ο οποίος παρουσιάζει ενεργότητα κινάσης της τυροσίνης. Παραδείγματα ογκογονιδίων που κωδικοποιούν διαμεμβρανικούς υποδοχείς με δράση κινάσης της τυροσίνης αποτελούν τα γονίδια *erbB-1*, *erbB-2*, και *fms*, ενώ το γονίδιο *erbA* κωδικοποιεί έναν ενδοκυττάριο υποδοχέα με δράση κινάσης της τυροσίνης. Άλλοι διαμεμβρανικοί υποδοχείς που ενοχοποιούνται για την καρκινογένεση είναι οι υποδοχείς που δεσμεύουν νουκλεοτίδια γουανίνης, υποδοχείς με ενεργότητα κινάσης της σερίνης/θρεονίνης, υποδοχείς για λεμφοκίνες, κυτταροκίνες και αυξητικούς παράγοντες (π.χ. ιντερλευκίνη-1, ιντερλευκίνη-2, GM-CSF, ερυθροποιητίνη), υποδοχείς με ενεργότητα φωσφατάσης της φωσφοτυροσίνης, οι οποίοι δύνανται να αντιπροσωπεύουν ένα ανταγωνιστικό σύστημα έναντι των υποδοχέων της κινάσης της τυροσίνης καθώς και κανάλια ιόντων.

Παραδείγματα ογκογονιδίων που κωδικοποιούν κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που δεσμεύουν νουκλεοτίδια γουανίνης αποτελούν τα γονίδια *ras*, ενώ τα γονίδια *raf* και *mos* κωδικοποιούν κυτταροπλασματικές κινάσες της σερίνης/θρεονίνης. Τα γονίδια *scr*, *abl*, *yes* κωδικοποιούν κυτταροπλασματικές κινάσες της τυροσίνης. Οι πρωτεΐνες αυτές φαίνεται να συμμετέχουν στη μετάδοση σημάτων που δέχεται το κύτταρο μέσω των υποδοχέων του, τα οποία είναι απαραίτητα για τον έλεγχο της κυτταρικής αύξησης και της κυτταρικής διαφοροποίησης.

## 2.6. Μεταγραφικοί παράγοντες

Μια σημαντική κατηγορία ογκογονιδίων κωδικοποιεί πρωτεΐνες που παρεμβαίνουν ρυθμιστικά στη διαδικασία μεταγραφής του γενετικού υλικού. Παράδειγματα αποτελούν τα γονίδια *myc*, *jun*, *fos*, *myb* και *ski*, τα προϊόντα των οποίων προσδένονται και αλληλεπιδρούν με συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA επιδρώντας ως μεταγραφικοί παράγοντες στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης του κυττάρου. Το γονίδιο *myc* κωδικοποιεί μια πυρηνική πρωτεΐνη 62 kDa με ικανότητα πρόσδεσης στο DNA. Η έκφραση του γονιδίου εμπλέκεται στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Η απώλεια της ρύθμισης του γονιδίου λόγω γονιδιακής επέκτασης, ανακατατάξεων στο 5' άκρο του, μετατοπίσεων οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του γονιδίου που θεωρείται βασικός παράγοντας καρκινογένεσης.



## 2.7. Πολυλειτουργικά ογκογονίδια

Πρόσφατα έχουν βρεθεί ογκογονίδια, πρωτεΐνες των οποίων έχουν την ικανότητα να εκτελούν πολλαπλές συγκεκριμένες λειτουργίες. Παράδειγμα αποτελεί το ογκογονίδιο bcr, η αμινοτελική περιοχή της πρωτεΐνης του οποίου έχει δράση κινάσης της σερίνης, η καρβοξυτελική έχει δράση GTPάσης, ενώ η ενδιάμεση περιοχή παρουσιάζει ομολογία με τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων. Ο ακριβής ρόλος των πολυλειτουργικών ογκογονιδίων δεν έχει ακόμα διευκρινιστεί, είναι ωστόσο πιθανό ότι οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούν λειτουργούν ως γέφυρες σε συγκεκριμένα σημεία του μηχανισμού της ρύθμισης του κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

## 2.8. Ογκοκατασταλτικά γονίδια

Τα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι κυτταρικά γονίδια, η απενεργοποίηση των οποίων οδηγεί στην καρκινική εξαλλαγή του κυττάρου. Στο φυσιολογικό κύτταρο τα προϊόντα των γονιδίων αυτών ασκούν αρνητικό έλεγχο στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, ενώ παράλληλα εμπλέκονται και στη ρύθμιση των μηχανισμών του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (απόπτωση).

Σε αντίθεση με τα ογκογονίδια, τα οποία δρουν ως επικρατή, τα ογκοκατασταλτικά γονίδια παρουσιάζουν υπολειπόμενη ογκογενετική δράση, υπό την έννοια ότι απαιτείται μετάλλαξη ή έλλειψη και στα δυο αλληλόμορφα (απώλεια ετεροζυγωτίας) του γονιδίου για την καταστολή της φυσιολογικής δράσης. Η απώλεια της ετεροζυγωτίας μπορεί να είναι το αποτέλεσμα των ενδιάμεσων ελλείψεων, απάλειψης χρωμοσώματος ή μη φυσιολογικών ανασυνδυασμών και αποτελεί σύνηθες χαρακτηριστικό πολλών νεοπλασιών όπου ενοχοποιείται η απενεργοποίηση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων. Η απενεργοποίηση ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου δύναται να πραγματοποιηθεί και με την βοήθεια σημειακών μεταλλάξεων. Αυτές οι μεταλλάξεις έχουν συνήθως επικρατούντα αρνητικό χαρακτήρα, που σημαίνει πως η μετάλλαγμένη πρωτεΐνη μπορεί να προσδένεται με την φυσιολογική και την απενεργοποιεί.

Οι πιο γνωστοί αντιπρόσωποι της ομάδας ογκοκατασταλτικών γονιδίων είναι το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος rb και το γονίδιο p53. Το γονίδιο του ρετινοβλαστώματος rb ήταν το πρώτο ογκοκατασταλτικό γονίδιο που κλωνοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε η αλληλουχία του. Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί είναι μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη που προσδένεται στο DNA και παίζει σημαντικό ρόλο στη διαφοροποίηση του κυττάρου. Η απενεργοποίηση του γονιδίου ευνοεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τον καρκινικό μετασχηματισμό και παρατηρείται κυρίως στο ρετινοβλάστωμα καθώς και σε καρκίνους της ουροδόχου κύστεως και του πνεύμονα. Το γονίδιο p53 κωδικοποιεί μια πυρηνική φωσφοπρωτεΐνη, που προσδένεται στο DNA και ενεργοποιεί την μεταγραφή γονιδίων, τα οποία συμμετέχουν στην αύξηση και τη διαφοροποίηση του κυττάρου. Η πρωτεΐνη ευτή εντοπίστηκε για πρώτη φορά εξαιτίας της πρόσδεσης της στο μεγάλο T αντιγόνο του ιού SV40. Η πρόσδεση αυτή προκαλεί την απενεργοποίηση της p53 με άμεσες ογκογενετικές συνέπειες για το κύτταρο, το οποίο προσβάλλεται από το DNA του ογκογόνου ιού. Απενεργοποίηση του γονιδίου p53 εμφανίζεται σε πολλούς τύπους καρκίνου, όπως του παχέος εντέρου, του πνεύμονα, του οστεοσαρκώματος,



ενώ κληρονομούμενες μεταλλάξεις του γονιδίου φαίνεται πως συνδέονται με το κληρονομικό σύνδρομο Li-Fraumeni.

Άλλα ογκοκατασταλτικά γονίδια είναι το γονίδιο WT-1, το οποίο είναι υπεύθυνο για μια ποικιλία όγκων του Wilms, το NF-1, το οποίο είναι υπεύθυνο για την νευροϊνωμάτωση τύπου I, το γονίδιο APC το οποίο σχετίζεται με την προδιάθεση για τον καρκίνο του παχέος εντέρου, το nm3, το οποίο εμπλέκεται στον καρκίνο του μαστού και του τραχήλου της μήτρας και το MTS1, η έλλειψη του οποίου εμφανίζεται συχνά σε κυτταρικές σειρές από όγκους του πνεύμονα, του μαστού, του δέρματος, των ωοθηκών και των λεμφοκυττάρων.

## 2.9. Γονιδιακή θεραπεία

Η κατανόηση της μοριακής και γενετικής βάσης της καρκινογένεσης αναζωπυρώνει την ελπίδα για νέες θεραπευτικές προσεγγίσεις εναντίον του καρκίνου. Η ανεύρεση μοριακών στόχων σε διάφορους καρκίνους στον άνθρωπο καθώς και η ανάπτυξη μεθόδων γονιδιακής μεταφοράς με υψηλή αποτελεσματικότητα οδήγησε στην διαμόρφωση της ιδέας ότι η γονιδιακή θεραπεία μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο μέλλον για τη θεραπεία του καρκίνου [10]. Με τον όρο γονιδιακή θεραπεία αναφερόμαστε στην παρέμβαση στο γενετικό υλικό του ανθρώπου με στόχο τη διόρθωση των γενετικών αλλοιώσεων, οι οποίες ενοχοποιούνται για την εκδήλωση της νόσου. Αρχικό στόχο των πρώτων κλινικών μελετών γονιδιακής θεραπείας αποτέλεσαν κληρονομικές νόσοι που οφείλονται σε ελαττωματικά γονίδια, όπως ανοσοεπάρκειες π.χ. λόγω της έλλειψης της απαμινάσης της αδενοσίνης. Σήμερα, λόγω του συνεχούς αυξανόμενου ερευνητικού ενδιαφέροντος στο χώρο της ογκολογίας, η πλειοψηφία των κλινικών μελετών γονιδιακής θεραπείας αφορούν τον καρκίνο. Στην αντιστροφή αυτή συνέβαλε και το γεγονός ότι οι στρατηγικές που έχουν εφαρμοστεί για την γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου δεν επηρεάζονται σημαντικά από τεχνικές δυσκολίες, που συνδέονται με τη γονιδιακή θεραπεία κληρονομούμενων γενετικών νόσων, για την οποία απαιτείται μακροχρόνια και ρυθμιζόμενη έκφραση του μεταφερόμενου γονιδίου στα κύτταρα.

Στον Πίνακα 2.1 παρουσιάζονται οι στρατηγικές, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί στη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου. Βασική προϋπόθεση για την επιτυχία των στρατηγικών αυτών αποτελεί η ικανότητα των οχημάτων γονιδιακής μεταφοράς να αναγνωρίζουν μόνο τα κύτταρα-στόχους καθώς και η ασφάλεια τους με την πρόκληση όσο το δυνατόν λιγότερων ανεπιθύμητων ενεργειών.

**Πίνακας 2.1.** Προσεγγίσεις στη γονιδιακή θεραπεία του καρκίνου.

Αποκατάσταση λειτουργίας ογκοκατασταλτικών γονιδίων/ογκογονιδίων Αντικατάσταση μεταλλαγμένων ογκοκατασταλτικών γονιδίων, π.χ. p53, BRAC1 Αντικατάσταση μεταλλαγμένων ογκογονιδίων, π.χ. ras, myc
Γονιδιακή μεταφορά ως κυτταροτοξική θεραπεία Χρήση γονιδίων “αυτοκτονίας”, π.χ. απαμινάση της κυτοσίνης, κινάση της θυμιδίνης του ιού του έρπητα.
Γονιδιακή μεταφορά ως μέσο ανοσοθεραπείας Χρήση γονιδίων της ιντερλευκίνης-2 ή του αυξητικού παράγοντα GM-CSF
Γονιδιακή μεταφορά ως μέσο τροποποίησης της απόκρισης στη χημειοθεραπεία Τροποποίηση αιμοποιητικών κυττάρων με την εισαγωγή του γονιδίου MDR-1, που επιφέρει αντικατάσταση στη χημειοθεραπεία.

Στο μέλλον, η βελτίωση των οχημάτων γονιδιακής μεταφοράς όσο αφορά την αποτελεσματικότητα, την εκλεκτικότητα και την ασφάλεια τους αναμένεται να οδηγήσουν στη βελτίωση της κλινικής αποτελεσματικότητας της γονιδιακής θεραπείας. Επιπλέον, ο σχεδιασμός θεραπευτικών στρατηγικών που στοχεύουν σε συνδιασμό συγκεκριμένων μοριακών στόχων αναμένεται να συμβάλει σημαντικά στην αποτελεσματική θεραπευτική αντιμετώπιση των ασθενών με καρκίνο καθιστώντας τη γονιδιακή θεραπεία αναπόσπαστο εργαλείο της θεραπευτικής του μέλλοντος.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

## ΙΟΙ ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

**3.1. Ιστορική Αναδρομή**

Στο τέλος του 19<sup>ου</sup> αιώνα, οι ιοί είχαν κατηγοριοποιηθεί σαν μικροί λοιμογόννοι παράγοντες που, σε αντίθεση με τα κύτταρα και τα βακτήρια, διαπερνούσαν φίλτρα με μικρούς πόρους. Αργότερα, το 1911, ο Peyton Rous παρατήρησε ένα συσχετισμό μεταξύ των ιών και του καρκίνου, δείχνοντας ότι ένας παράγοντας που βρισκόταν σε διηθήματα ελεύθερα κυττάρων, προερχόμενα από σαρκώματα πουλερικών, προκαλούσε την ίδια νόσο σ'αυτά τα πειραματόζωα [11,12]. Αν και αυτή η ανακάλυψη αποτέλεσε τη βάση της μοντέρνας ογκολογικής ιολογίας, απαιτήθηκε αρκετός χρόνος ώστε η επιστημονική κοινότητα να δεχθεί το μοντέλο της καρκινογένεσης μέσω ρετροϊών [13]. Πράγματι, λίγο αργότερα, η μελέτη του ιού του σαρκώματος που είχε ανακαλύψει ο Rous, ανεστάλη, και το ενδιαφέρον μετατοπίστηκε στην αναζήτηση φυσικών και χημικών ογκογεννητικών παραγόντων [11]. Το 1933, οι Richard Shope και E. Weston Hurst, ανακοίνωσαν την ανακάλυψη ενός ιού που προκαλούσε κονδυλώματα στο δέρμα άγριων κουνελιών. Η ογκογόνος φύση των κονδυλωμάτων, επιβεβαιώθηκε, σε συνεργασία με τον Rous, ενώ σήμερα, είναι γνωστό ότι προκαλείται από τον ιό του θηλώματος των κουνελιών. Το 1936, ο Bittner εδραίωσε τον ογκογεννητικό ρόλο του ιού των μαστών των ποντικών [14], ενώ το 1951, ο Gross επιβεβαίωσε το υϊκό αίτιο της λευχαιμίας σε ποντίκια [15]. Το 1964, ο Epstein και οι συνεργάτες του, έδειξαν τη συσχέτιση ενός ιού, με το λέμφωμα Burkitt [16].

Ο σημαντικός ρόλος των ιών στην καρκινογένεση, πιστοποιήθηκε τελικά στο δεύτερο μισό του 20<sup>ου</sup> αιώνα, και συνοδεύτηκε με την ανακάλυψη ογκογόνων ιών τρωκτικών, και τη συσσώρευση γνώσης που συσχέτιζε τους ιούς με τον καρκίνο στον άνθρωπο. Πράγματι, ο Rous τιμήθηκε τελικά με το βραβείο Nobel το 1966, σε αναγνώριση της σημαίνουσας ανακάλυψης των καρκινογόνων ιών. Επίσης, εκείνη την περίοδο, το 1964 συγκεκριμένα, ξεκίνησε ένα Ειδικό Πρόγραμμα Ιογενούς Ογκολογίας από το Αμερικανικό Κογκρέσσο, διαθέτοντας ένα μεγάλο οικονομικό κεφάλαιο στην έρευνα του ρόλου των ιών στον ανθρώπινο καρκίνο. Αν και το πρόγραμμα απέτυχε να ταυτοποιήσει υποψήφιους ιούς, και κατηγορήθηκε ότι είχε πολιτικές προεκτάσεις, παρείχε μεγάλο ποσό πληροφορίας σχετικά με τη μοριακή βιολογία και τους μηχανισμούς της καρκινογένεσης της σχετιζόμενης με τους ιούς, αλλά και του καρκίνου γενικότερα [11].

Περαιτέρω πρόοδος στην ογκολογική ιολογία πραγματοποιήθηκε τα τελευταία χρόνια του 20<sup>ου</sup> καθώς και στην αρχή του 21<sup>ου</sup> αιώνα. Αρκετοί ερευνητές πρότειναν την ιογενή αιτιολογία του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Το 1974, ο Beral και συν. θεώρησαν τον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας σαν μια σεξουαλικά μεταδιδόμενη νόσο [17], ενώ ο zur Hausen πρότεινε τον ιό του ανθρώπινου θηλώματος σαν ογκογόνο ιό [18]. Οι David Baltimore, Renato Dulbecco και Howard M. Temin, μοιράστηκαν το βραβείο Nobel του 1975, για την

αλληλεπίδραση μεταξύ των ογκογόνων ιών και του γενετικού υλικού του κυττάρου. Την ίδια χρονική περίοδο, ο Vogel και συν. παρουσίασε δεδομένα για το ρόλο του ιού της Ηπατίτιδας Β στον καρκίνο του ήπατος [19,20], ενώ αργότερα, ο συσχετισμός αυτός επεκτάθηκε, για να συμπεριλάβει και τον ιό της Ηπατίτιδας C. Οι Michael J. Bishop και Harold E. Varmus τιμήθηκαν με βραβείο Nobel το 1989, για την κυτταρική προέλευση των ογκογονιδίων των ρετροϊών, ενώ το 1991, ο Harold zur Hausen πρότεινε ότι ένα μεγάλο ποσοστό των καρκίνων του ανθρώπου, συγκεκριμένα 1 στους 5, σχετίζονται με ιογενείς λοιμώξεις [21]. Ο ίδιος, τιμήθηκε με το βραβείο Nobel το 2008, για την ανακάλυψη της ογκογεννητικής δράσης των ιών του ανθρώπινου θηλώματος στον καρκίνο του τραχήλου της μήτρας.

### 3.2. Εισαγωγή

Περί το 12% των περιστατικών καρκίνων παγκοσμίως, προκαλούνται από ιούς, με ακόμη μεγαλύτερο ποσοστό στις υπό ανάπτυξη χώρες [22]. Η ανακάλυψη του Rous, που έθεσε τις βάσεις της ογκολογικής ιολογίας, εισήγαγε το μοντέλο της καρκινογένεσης από τους ρετροϊούς. Οι ρετροϊοί έχουν συμπεριφερθεί σαν παράγοντες εξαλλαγής σε πειραματόζωα. Μετά την κλωνοποίηση του γονιδίου v-src του ιού του σαρκώματος του Rous σε πουλερικά, ταυτοποιήθηκε μια ομάδα γονιδίων, γνωστά ως ιικά ογκογονίδια, τα οποία είναι υπεύθυνα για την ογκογένεση που προκαλείται από τους ρετροϊούς. Το δεδομένο αυτό, μαζί με την ανακάλυψη των ευκαρυωτικών ομολόγων αυτών των γονιδίων (κυτταρικά πρωτο-ογκογονίδια), και τα αποτελέσματα των μεταλλάξεων των τελευταίων, ερμηνεύει το σχηματισμό καρκίνου που προκαλείται από μεταλλάξεις κυτταρικών γονιδίων. Η μετέπειτα μελέτη της εξαλλαγής όγκων από DNA ιούς, πρόσθεσε μια νέα διάσταση, υποδεικνύοντας την παρουσία μιας νέας ομάδας κυτταρικών γονιδίων, των ογκοκατασταλτικών γονιδίων, η απώλεια της λειτουργίας των οποίων, είτε μέσω απενεργοποιητικών μεταλλάξεων, είτε μέσω παρεμβολής των γονιδίων που προέρχονται από DNA καρκινογόνους ιούς, μπορεί να προδιαθέσει το κύτταρο σε κακοήγη εξαλλαγή [13].

Είναι πλέον γνωστό ότι οι καρκινογόνοι ιοί επηρεάζουν τον κυτταρικό έλεγχο της απόπτωσης. Κάποιοι από αυτούς τους ιούς, έχουν αναπτύξει μηχανισμούς για να ξεφεύγουν από τα αποπτωτικά σήματα, κυρίως μέσω της έκφρασης ιικών ογκογονιδίων. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας αυτής, η απορρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και των μονοπατιών απόπτωσης μπορούν να οδηγήσουν σε κυτταρικές αλλαγές οι οποίες με τη σειρά τους προωθούν την καρκινογένεση.

Μέχρι σήμερα, 7 ιοί έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί ως καρκινογόνοι, σχετιζόμενοι στενά με κακοήθειες του ανθρώπου. Οι ιοί αυτοί, οι κακοήθειες με τις οποίες σχετίζονται, κάποιοι από τους μηχανισμούς που χρησιμοποιούνται απ'αυτούς για την αποφυγή της απόπτωσης και την προώθηση της εξαλλαγής των κυττάρων, καθώς και τα κύτταρα-ξενιστές τους, παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.1.

Virus	Associated cancers	Host cell origin	Mechanism
HPV	Anogenital cancers, cervical cancer	Mucosa epithelium	Inhibits p53, Bak, FaDD, procaspase 8, activates caspases 8
HBV	Hepatocellular cancer	Hepatocyte	Activates caspases 3 and 8
HCV	Same as above	Same as above	Suppresses p53-mediated apoptosis
KSHV/HHV8	Kaposi sarcoma, pleural effusion lymphoma	B and endothelial cells	Binds to p53 and inhibits p53-dependent apoptosis
HTLV	Human T cell lymphoma	T cell	Regulation of cell-cycle, NFκβ, chromatin remodeling
EBV	Burkitt lymphoma, nasopharyngeal carcinoma, Hodgkin's disease	B cell, epithelial cell and T cell	Binds Rb and promotes cell cycle progression, inhibits p53 induced apoptosis
MCV	Merkel cell carcinoma	Endocrine epithelial cells	Inactivates pRb and p53

**Πίνακας 3.1.** Οι καρκινογόνοι ιοί, οι σχετιζόμενες κακοήθειες, τα κύτταρα-ξενιστές και οι μηχανισμοί καρκινογένεσης.

Στους ιούς αυτούς συμπεριλαμβάνονται 2 λεμφοτρόποι ερπητοϊοί, ο ιός Epstein Barr (EBV) και ο ιός που σχετίζεται με το σάρκωμα Kaposi/ ερπητοϊός τύπου 8 (KSHV/HHV8). Ο EBV είναι ο αιτιολογικός παράγοντας της λεμφοϋπερπλαστικής διαταραχής μετά από μεταμόσχευση, του λεμφώματος Burkitt (BL), καθώς και του καρκινώματος του ρινοφάρυγγα (NPC), ενώ θεωρείται επικουρικός παράγοντας σε μια υποκατηγορία γαστρικού καρκίνου. Ο KSHV/HHV8 είναι ο αιτιολογικός παράγοντας για το σάρκωμα Kaposi, σε συνδυασμό ή όχι με τον HIV [23,24], λεμφώματα υπεζωκοτικών συλλογών, γνωστά ως λεμφώματα κοιλοτήτων του ανθρώπου [25], καθώς και της πολυεστιακής νόσου του Castleman. Δύο ιοί ηπατίτιδας, ο ιός της ηπατίτιδας B και ο ιός της ηπατίτιδας C (HBV και HCV), σχετίζονται με την ανάπτυξη ηπατοκυτταρικού καρκινώματος (HCC). Τόσο οι υψηλού, όσο και οι χαμηλού κινδύνου ιοί του ανθρώπινου θηλώματος (HPVs), είναι οι παράγοντες που ευθύνονται για την ανάπτυξη καρκίνου του τραχήλου της μήτρας. Ο ιός του ανθρώπινου λεμφώματος εκ T λεμφοκυττάρων (HTLV), είναι το παθογόνο που ευθύνεται για την ανάπτυξη λεμφώματος T κυττάρων που ενδημεί στη νοτιοδυτική Ιαπωνία, και σε άλλες περιοχές του κόσμου. Ένας νέος πολυόμα ιός, ο Merkel cell (MCV), προστέθηκε στη λίστα, μετά την ταυτοποίησή του το 2008 [26]. Ο MCV, είναι το παθογόνο ενός σπάνιου, αλλά επιθετικού καρκίνου του δέρματος, του Merkel cell καρκινώματος (MCC), το οποίο συνήθως προσβάλλει ηλικιωμένους και ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, ένα χαρακτηριστικό ενδεικτικό λοιμώδους αιτιολογίας.

Είναι γνωστό ότι κάθε ένας από τους γνωστούς καρκινογόνους ιούς κωδικοποιεί τουλάχιστον ένα ογκογονίδιο: για παράδειγμα το Tax γονίδιο του HTLV, το X αντιγόνο του HBV

(HBx), και το latent membrane protein (LMP1) του EBV [27]. Μία εξαίρεση είναι ο HCV. Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτά τα ιϊκά γονίδια, έχουν πρωταγωνιστικό ρόλο στη βιογένεση των αντίστοιχων κακοηθειών [13].

Η μελέτη των μηχανισμών με τους οποίους οι ιοί ρυθμίζουν την απόπτωση, συνεισφέρει στην ανάπτυξη θεραπειών εναντίων λοιμογόνων παραγόντων καθώς και του καρκίνου [28]. Η έρευνα στο πεδίο των κακοηθειών που σχετίζονται με λοιμώξεις, μπορεί σε μεγάλο βαθμό να διευκολύνει το σχεδιασμό στρατηγικών πρόληψης, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις εκείνες όπου ο εμβολιασμός αποδεικνύεται αποτελεσματικός στον περιορισμό της επίπτωσης αυτών των καρκίνων. Τα προγράμματα εμβολιασμού για τον HPV και τον HBV, που έχουν εκπονηθεί για την πρόληψη του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας και του ηπατοκυτταρικού καρκίνου αντίστοιχα, έχουν μειώσει σημαντικά την επίπτωση των ανωτέρω νόσων.

Νεότερα εργαστηριακά δεδομένα υποδεικνύουν ότι περισσότεροι ιοί πιθανώς παίζουν ρόλο στην ανάπτυξη καρκίνου στον άνθρωπο. Νέες προσθήκες στη λίστα των καρκινογόνων ιών αναμένονται, καθώς σταδιακά επιβεβαιώνονται τρέχουσες ερευνητικές υποθέσεις. Καθώς οι ανθρώπινοι καρκινογόνοι ιοί είναι πανταχού παρόντες, και παρ'όλα αυτά προκαλούν σπάνια καρκίνο στους ασθενείς που έχουν μολυνθεί, η συγκέντρωση επαρκών αποδείξεων για την εγκατάσταση συσχετισμού μεταξύ ενός ιού και της ανάπτυξης καρκίνου αποτελεί πρόκληση.

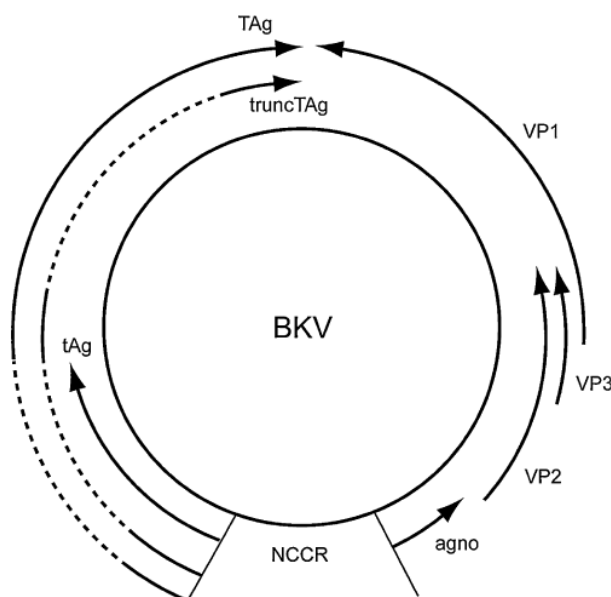
## ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

## Ο ΙΟΣ ΒΚV

## 4.1. Γενικά

Ο ιός ΒΚV είναι ένα μέλος της οικογένειας των polyoma ιών του ανθρώπου, ο οποίος απομονώθηκε πρώτη φορά το 1971, από τα ούρα ενός ανοσοκατεσταλμένου ασθενούς, που είχε υποβληθεί σε μεταμόσχευση νεφρού [29]. Φέρει ένα εικοσάεδρο καψίδιο χωρίς φάκελο, εντός του οποίου βρίσκεται ένα μικρό γονιδίωμα μεγέθους 5 kb, που αποτελείται από DNA διπλής αλύσου [30-32]. Το εικοσάεδρο καψίδιο αποτελείται από 72 πενταμερή της κύριας καψιδικής πρωτεΐνης VP1, που διατάσσονται σε ένα T-7 εικοσάεδρο δίκτυο. Κάθε ένα από τα πενταμερή αλληλεπιδρά με ένα μονομερές μόριο της ελάσσονος πρωτεΐνης VP2 ή VP3 [33-37]. Αυτή η αλληλεπίδραση, συνδέει επίσης το ιικό γονιδίωμα με το εξωτερικό περίβλημα που αποτελείται από τα πενταμερή των VP1 πρωτεϊνών.

Το γονιδίωμα του ιού ΒΚ, χωρίζεται σε 3 λειτουργικές περιοχές, την πρώιμη περιοχή, την όψιμη περιοχή, και τη ρυθμιστική ιική περιοχή, που επίσης ονομάζεται μη κωδικοποιητική ρυθμιστική περιοχή (NCCR- non coding control region). Τα πρώιμα και τα όψιμα γονίδια, μεταγράφονται από αντίθετες αλύσους του γονιδιώματος, όπως φαίνεται στην Εικόνα 4.1. Η έναρξη της μεταγραφής, πραγματοποιείται στη ρυθμιστική περιοχή, η οποία περιέχει αλληλουχίες που εμπλέκονται στη ρύθμιση της μεταγραφής τόσο των πρώιμων, όσο και των όψιμων γονιδίων, ενώ περιέχει και την προέλευση της μεταγραφής του DNA [31,38].



**Εικόνα 4.1.** Το γονιδίωμα του ΒΚV. Σχηματική αναπαράσταση του κυκλικού DNA διπλής έλικας του ιού, όπου φαίνονται η πρώιμη και όψιμη περιοχή, καθώς και η μη κωδικοποιούσα περιοχή ελέγχου (NCCR).

Το γονιδίωμα του BKV, κωδικοποιεί για τουλάχιστον 7 ιϊκές πρωτεΐνες, 3 από την πρώιμη περιοχή, και 4 από την όψιμη περιοχή. Οι πρώιμες πρωτεΐνες περιλαμβάνουν ο μείζον καρκινικό αντιγόνο (TAG), το έλασσον καρκινικό αντιγόνο (tAg), καθώς και το περικομένο καρκινικό αντιγόνο (truncTAG) που ανακαλύφθηκε πρόσφατα [39]. Όλες οι πρώιμες πρωτεΐνες μεταφράζονται από εναλλακτικά ματισμένα μεταγραφήματα προερχόμενα από ένα κοινό πρόδρομο mRNA. Στις όψιμες πρωτεΐνες περιλαμβάνονται οι καψιδικές πρωτεΐνες VP1, VP2 και VP3, καθώς και η agnoprotein [38].

#### 4.2. Παθογένεια

Ο κύκλος ζωής του ιού BK, ξεκινά με την αλληλεπίδραση της καψιδικής πρωτεΐνης VP1 με κυτταρικούς γαγγλιοσιδικούς υποδοχείς [40]. Ο ιός στη συνέχεια εισέρχεται στο κύτταρο μέσω κενοτοπιο-διαμεσολαβούμενης εδοκυττάρωσης, και το κενοτόπιο που τον περιέχει, φτάνει στο ενδοπλασματικό δίκτυο, αφού πρώτα περάσει μέσα από ένα δίκτυο μικροσωληνίσκων [41,43]. Η αποκάλυψη του ιού πραγματοποιείται πιθανώς στο ενδοπλασματικό δίκτυο, η οποία τελικά οδηγεί στην παράδοση του γονιδιώματος στον πυρήνα, και στη μετέπειτα έκφραση των πρώιμων γονιδίων. Το Tag συγκεκριμένα, είναι απαραίτητο για τον ιϊκό πολλαπλασιασμό, συμπεριλαμβανομένου του ξεδιπλώματος της περιοχής της έναρξης της αντιγραφής του DNA, καθώς και της επιστράτευσης του συμπλέγματος της DNA πολυμεράσης  $\alpha$ /πριμάσης του ξενιστή [44]. Την ίδια στιγμή, το Tag καταστέλλει τη μεταγραφή των πρώιμων γονιδίων και προάγει την έκφραση των όψιμων γονιδίων [38]. Μετά την αντιγραφή του ιϊκού DNA και την παραγωγή των δομικών πρωτεϊνών, νέα ιϊκά σωματίδια συναρμολογούνται και απελευθερώνονται από το κύτταρο.

Μετά τη λοίμωξη του κυττάρου από, 2 πιθανά σενάρια μπορούν να προκύψουν: 1) ο ξενιστής επιτρέπει την αντιγραφή του ιού, οπότε η είσοδος του ιού έχει σαν αποτέλεσμα τον πολυμερισμό του ιϊκού DNA, την παραγωγή νέων βιρίων, και τη λύση του κυττάρου, 2) ο ξενιστής δέν επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό του ιού, οδηγώντας σε μια άκαρπη λοίμωξη, ή κυτταρικό μετασχηματισμό γνωστό ως ογκογένεση, μέσω μιας συνεχούς έκφρασης των πρώιμων γονιδίων [30-32].

Ορολογικές μελέτες υποδεικνύουν ότι η πρωτογενής λοίμωξη από τον BKV συμβαίνει σε μικρή ηλικία, και η ορομετατροπή αγγίζει το 90% σε ηλικία 10 ετών [45]. Η φυσιολογική οδός μετάδοσης δέν έχει εξακριβωθεί. Η μικρή ηλικία ορομετατροπής, σε συνδυασμό με την ανίχνευση του ιού στι στοχοποίησε την αναπνευστική οδό μετάδοσης [46]. Άλλες υποψήφιες οδοί μετάδοσης είναι τα ούρα, το σπέρμα, η μετάγγιση αίματος, και η μεταμόσχευση οργάνων [47-49]. Η πρωτογενής έκθεση στον ιό είναι συνήθως ασυμπτωματική, και συνοδεύεται από την εγκατάσταση μιας εφ'όρου ζωής εμμένουσα λοίμωξη, ιδιαίτερα στο νεφρό και την ουροφόρο οδό [50-53]. Πολλοί τύποι κυττάρων, συμπεριλαμβανομένων αυτών της ουρογεννητικής οδού, μονοπύρηνων περιφερικού αίματος, καθώς και εγκεφαλικών κυττάρων, έχουν προταθεί για τη συμμετοχή τους στη διασπορά και τη διατήρηση του BKV [54-60]. Σποραδική αντιγραφή του



ιού, με αποτέλεσμα την ιουρία μπορεί να προκύψει κατά τη διάρκεια της χρόνιας φορέας του ΒΚV σ'ένα μικρό ποσοστό υγιών ανθρώπων και εγκύων γυναικών [61-64].

Η επανενεργοποίηση της λοίμωξης του ΒΚV συμβαίνει όταν κατασταλεί η ανοσοαπόκριση, κυρίως λόγω ανοσοκατασταλτικών θεραπειών, οπότε μπορεί να προκύψει ιουρία, αιμία, και να προκληθεί σοβαρή νόσος [65]. Αυτή η επανενεργοποίηση παρατηρείται συνήθως σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση μυελού των οστών ή νεφρού, και μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές επιπλοκές όπως αιμορραγική κυστίτιδα και νεφροπάθεια σχετιζόμενη με polyoma ιό αντίστοιχα [66-70]. Η επανενεργοποίηση του ΒΚV έχει παρατηρηθεί και σε άλλες καταστάσεις μεταβολής του ανοσολογικής κατάστασης, όπως σε ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε μεταμόσχευση άλλων συμπαγών οργάνων, καθώς και σε αυτούς με αυτοάνοσες νόσους [71,72]. Μέχρι σήμερα, δέν έχει βρεθεί συγκεκριμένη αντιϊκή αγωγή. Η συνήθης στρατηγική για την αντιμετώπιση της επανενεργοποίησης του ιού, είναι η μείωση του βαθμού της ανοσοκαταστολής, έτσι ώστε το ανοσοποιητικό σύστημα να ανακτήσει τον έλεγχο της λοίμωξης. Αντιϊκά φάρμακα όπως η cidofovir και η fluoroquinolone ελέγχονται για τις περιπτώσεις νόσου σχετιζόμενης με τον ΒΚV [73].

#### 4.3. Ογκογεννητικότητα του ΒΚV

Ο ΒΚV έχει χαρακτηριστεί σαν καρκίνο-σχετιζόμενος ιός, λόγω της συμπεριφοράς του *in vitro* καθώς και σε πειραματόζωα. Η έκφραση των πρώιμων γονιδίων του ΒΚV, οδηγεί στην εξαλλαγή κυττάρων τρωκτικών σε κυτταροκαλλιέργεια, και τον απαθανατισμό ανθρώπινων κυττάρων, είτε μεμονωμένα, είτε με τη συνύπαρξη άλλων ογκογονιδίων συμπεριλαμβανομένων του *ras*, του *myc*, καθώς και του αδενιοιού E1A [74-88]. Ο ενοφθαλμισμός του ΒΚV σε νεογέννητα ποντίκια, αρουραίους και hamsters, οδηγεί στην ανάπτυξη διαφόρων τύπων όγκων, όπως επενδυωμάτων, νευροβλαστωμάτων, γλοιωμάτων, νεφροβλαστωμάτων, όγκων των παγρεατικών νησιδίων, ινοσαρκωμάτων, λιποσαρκωμάτων και οστεοσαρκωμάτων [32,89].

Οι ογκογενετικές ιδιότητες του ΒΚV, προκύπτουν από τη δράση των 2 ογκοπρωτεϊνών της πρώιμης περιοχής του γονιδιώματος, του Tag και του tAg. Το Tag, μια φωσφοπρωτεΐνη στον πυρήνα αποτελούμενη από 695 αμινοξέα, αλληλεπιδρά και αδρανοποιεί λειτουργικά κυτταρικές ογκοκατασταλτικές πρωτεΐνες συμπεριλαμβανομένων του p53, του pRb, καθώς και των σχετιζόμενων με το pRb πρωτεϊνών p107 και p130, οδηγώντας τα κύτταρα του ξενιστή σε ανεξέλεγκτο πολλαπλασιασμό [90,91]. Το tAg είναι μια ογκοπρωτεΐνη 172 αμινοξέων πλούσια σε κυστεΐνη, η οποία αναστέλει την πρωτεϊνική φωσφατάση 2A (PP2A), με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του μονοπατιού της MAP κινάσης και του επακόλουθου κυτταρικού πολλαπλασιασμού [92,93].

#### 4.4. BKV και κακοήθειες στον άνθρωπο

Πολλές αναφορές σχετικά με την παρουσία ή την απουσία αλληλουχιών και πρωτεϊνών του BKV έχουν γίνει τις τελευταίες 3 δεκαετίες. Τεχνολογικές καινοτομίες στην polymerized chain reaction (PCR), έχουν επιτρέψει την ανίχνευση DNA και RNA σε μικρά δείγματα βιοψίας, με υψηλό ποσοστό ευαισθησίας.

Παρά τις πολλές μελέτες που έχουν διεξαχθεί, ο ρόλος του BKV στις ανθρώπινες νεοπλασίες, παραμένει αμφιλεγόμενος, με πολλές αντικρουόμενες αναφορές σχετικές με την παρουσία ή όχι BKV DNA και πρωτεϊνών σε ανθρώπινους καρκινικούς ιστούς. Οι πιο πειστικές πληροφορίες σχετικά με την ογκολογική συμπεριφορά του BKV, παρουσιάζονται σε μεμονωμένες παρουσιάσεις περιστατικών ουροθηλιακών κακοηθειών και νεφροσωληναριακών καρκίνων, συνήθως στο πλαίσιο μεταμόσχευσης νεφρού [94-96]. Σε άλλες μελέτες, δέν ανιχνεύεται ο BKV σε αντίστοιχους όγκους [97,98]. Αυτές οι αναφορές υποδεικνύουν την πολυπλοκότητα του πεδίου, και την ανάγκη διεξαγωγής μεγαλύτερων μελετών, με τη χρήση αυστηρών, εκτεταμένων πρωτοκόλλων, που ιδανικά περιλαμβάνουν διάφορες συμπληρωματικές διαγνωστικές διαδικασίες. Υπάρχουν επίσης αναφορές για την ανίχνευση DNA του BKV σε άλλους όγκους, π.χ σε κολοορθικούς καρκίνους, λεμφώματα, παγκρεατικούς καρκίνους, καρκίνο του εγκεφάλου, προστατικούς καρκίνους και σε διάφορους τύπους σαρκώματος [99], καθώς και σε non-UV light σχετιζόμενα μελανώματα [100]. Η ερμηνεία των πληροφοριών αυτών των μελετών, είναι αμφιλεγόμενη. Παρ'όλα αυτά, με βάση το γεγονός της "ανεπαρκούς απόδειξης" σε ανθρώπους και της "επαρκούς απόδειξης" σε πειραματόζωα, ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO), κατέταξε τον BKV σαν "πιθανώς καρκινογόνο παθογόνο για τον άνθρωπο" [101].

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

## Ο ΙΟΣ EBV

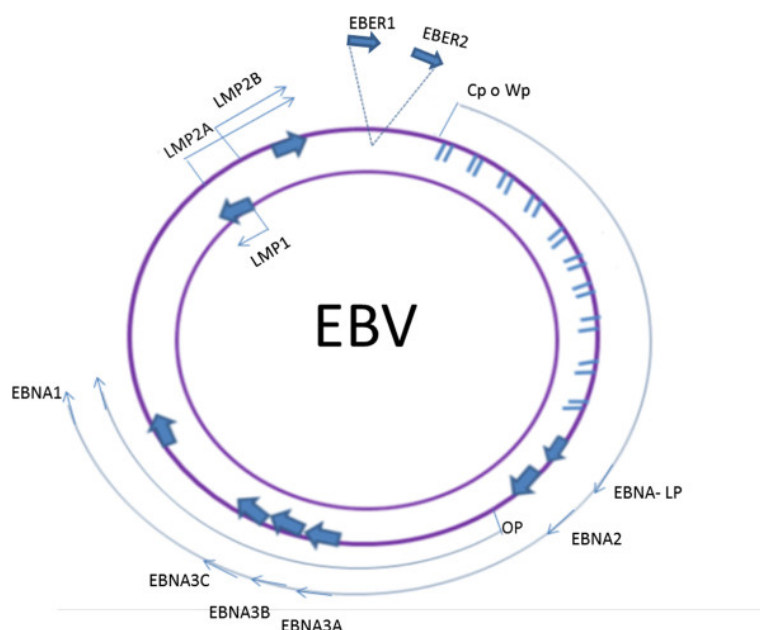
## 5.1. Γενικά

Ο ιός EBV, ήταν ο πρώτος ιός που ταξινομήθηκε ως καρκινογόνος, ένας ορισμός που στηρίχθηκε σε χρόνια μελετών κλινικής συμπεριφοράς, επιδημιολογίας, και κυτταρικής βιολογίας [102]. Αρχικά, ο Denis Burkitt ανακοίνωσε τη δεκαετία του 1950, την εμφάνιση μιας νέας μορφής παιδικού λεμφώματος Β-κυττάρων σε μια ευρεία περιοχή της Αφρικής όπου ενδημούσε η ελονοσία, και υπέθεσε ότι ο αιτιολογικός παράγοντας της νόσου, θα μπορούσε να είναι ένας ιός που μεταδιδόταν μέσω ενός αρθροπόδου-φορέα [103]. Τότε, το 1965, οι Tony Epstein και Yvonne Barr, έδειξαν, μέσω της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, την παρουσία ενός σωματιδίου που έμοιαζε με ερπητοϊό σε κάποιες από τις σειρές κυττάρων λεμφώματος Burkitt που είχαν απομονώσει. Οι Werner και Gertrude Henle, απέδειξαν ότι αυτός ο ιός, ήταν βιολογικά και αντιγονικά ξεχωριστός, σε σχέση με τους ήδη γνωστούς ως τότε ιούς. Τα αυξημένα ποσοστά οροθετικότητας των ανθρώπινων πληθυσμών στον EBV παγκοσμίως, απέτρεψαν τους ερευνητές από το να συμπεράνουν ότι ο ιός, θα μπορούσε να είναι ο αιτιολογικός παράγοντας του Αφρικανικού λεμφώματος Burkitt. Παρόλα αυτά, ο αρχικός συσχετισμός μεταξύ του EBV και του λεμφώματος, ενισχύθηκε, λόγω των αυξημένων τίτλων αντισωμάτων έναντι των αντιγόνων του EBV, στους ασθενείς με λέμφωμα Burkitt. Μετέπειτα μελέτες έδειξαν ότι το λέμφωμα Burkitt χαρακτηρίζεται από μια συγκεκριμένη χρωμοσωμική μετατόπιση, t(8;14)(q24;q32), όπου το γονίδιο *Myc* μετατοπίζεται στη ενεργό θέση της ανοσοσφαιρίνης. Τελικά ξεκαθαρίστηκε ότι η λοίμωξη από τον EBV αποτελεί ένα μέσο επιβίωσης που συντηρεί την κλωνική επέκταση σε πρώιμο στάδιο της ανάπτυξης καρκίνου [104].

Ο EBV, που ανήκει στη gamma-1 υποοικογένεια των ερπητοϊών, και επίσης ονομάζεται λεμφοκρυπτοϊός (*lymphocryptovirus*- LCV), είναι ένας μεγάλος (περίπου 200 nm) ερπητοϊός που φέρει φάκελο [28,105]. Περιέχει γονιδίωμα που αποτελείται από ευθύγραμμο DNA διπλής αλύσου, μεγέθους 184 kb, τοποθετημένο μέσα σ'ένα εικοσάεδρο πρωτεϊνικό καψίδιο (Εικόνα 5.1).

Το γονιδίωμα του ιού, περιέχει μία βραχεία Us και μία μακρά UL περιοχή, οι οποίες κωδικοποιούν την πλειοψηφία των ιικών πρωτεϊνών, την εσωτερική περιοχή (internal region-IR1), και την τελική περιοχή παράλληλων επαναλήψεων (tandem repeat region-TR). Μετά τη λοίμωξη του κυττάρου από τον ιό, κάτι το οποίο απαιτεί την παρουσία ενός μόνο βιρίου, τα άκρα του ευθύγραμμου γονιδιώματος συνδέονται μεταξύ τους, και το γονιδίωμα παραμένει σαν επισωμικό DNA [106]. Κατά τη διάρκεια της λανθάνουσας φάσης-η οποία αναλύεται στη συνέχεια-, δέν υπάρχει παραγωγή EBV, και εκφράζεται μόνο ένας μικρός αριθμός ιικών γονιδίων. Αυτά τα γονίδια, επηρεάζουν τους φυσιολογικούς μηχανισμούς ανάπτυξης των Β-λεμφοκυττάρων, οδηγώντας σε απαθανατισμό αυτών των κυττάρων [107]. Η λανθάνουσα λοίμωξη των απαθανατισμένων Β κυττάρων, σχετίζεται με 6 πυρηνικά αντιγόνα, τα EBNA1,

EBNA2, EBNA3A, EBNA3B, EBNA3C, καθώς και την κύρια πρωτεΐνη EBNA-LP, με 3 μεμβρανικές πρωτεΐνες, τις LMP-1,-2A και -2B, 2 μικρά πυρηνικά RNAs, EBER1 και EBER2, καθώς και προϊόντα μεταγραφής από την περιοχή BART, που κωδικοποιεί την πλειοψηφία των micro RNAs (miRNAs) του EBV [108]. Η έκφραση του πλήρους ρεπερτορίου των ιικών γονιδίων της λανθάνουσας φάσης, αναφέρεται ως Λανθάνουσα Φάση III [109,110].



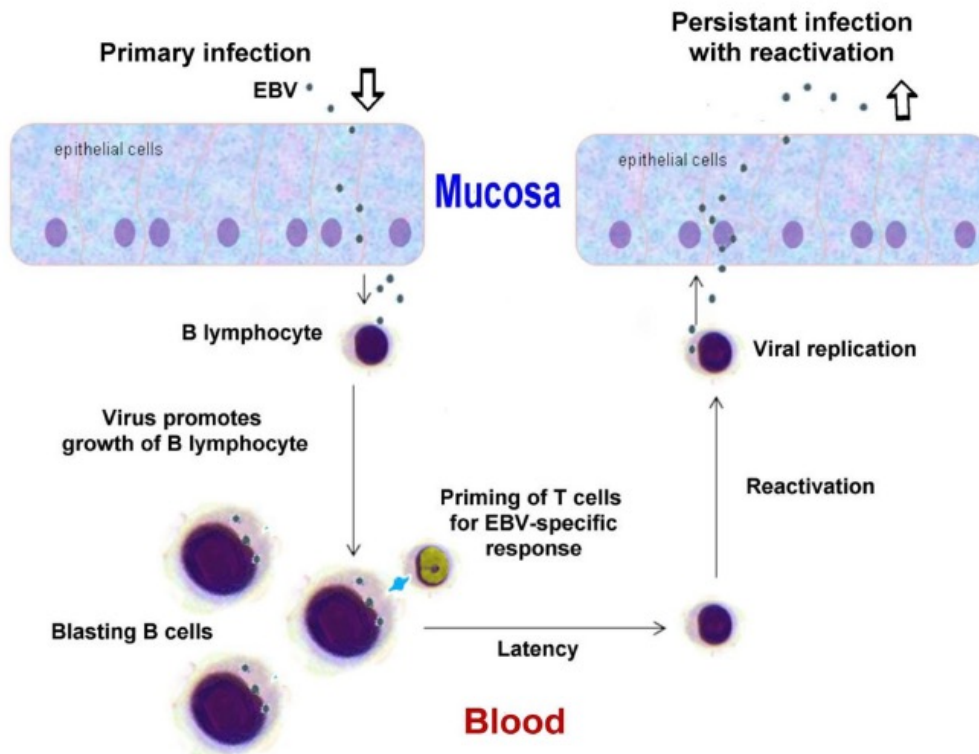
**Εικόνα 5.1.** Το γονιδίωμα του EBV. Σχηματική αναπαράσταση της εντόπισης των γονιδίων λανθάνουσας φάσης του ιού.

Οι πρωτεΐνες BZLF1 και BRLF1, είναι οι κύριοι διαμεσολαβητές της μετάβασης από τον λανθάνοντα κύκλο, στο λυτικό κύκλο ζωής του ιού. Αυτές οι πρωτεΐνες, είναι οι διενεργοποιητές άλλων γονιδίων που σχετίζονται με το λυτικό κύκλο και επάγουν την έκφραση της ιικής DNA πολυμεράσης. Για την πραγματοποίηση της αντιγραφής, περί τις 80 ιικές πρωτεΐνες εκφράζονται κατά τη διάρκεια της λυτικής φάσης, συμπεριλαμβανομένων ενεργοποιητών της μεταγραφής, παραγόντων της αντιγραφής του DNA, και δομικών πρωτεϊνών, όπως των αντιγόνων που σχηματίζουν το ιικό καψίδιο [28].

## 5.2. Παθογένεια

Ο EBV, αποτελεί το γνωστότερο μέλος των gamma-1 ερπητοϊών, με κλασσικά χαρακτηριστικά ερπητοϊών, κυριότερο των οποίων είναι η χρόνια λοίμωξη και παραμονή στον άνοσο ξενιστή ως λανθάνουσα λοίμωξη, που όμως, έχει επιπλέον χαρακτηριστικά, τα οποία τον ξεχωρίζουν από τους υπόλοιπους έρπητες [111]. Τα χαρακτηριστικά αυτά είναι ο περιορισμός του ιού σε ξενιστές-πρωτεύοντα, ο ευδιάκριτος τροπισμός για λανθάνουσα λοίμωξη μέσα στα B-

λεμφοκύτταρα, και η ικανότητα του ιού (τόσο in vivo, όσο και in vitro), για την εξαλλαγή των B-λεμφοκυττάρων, μέσω της συντεταγμένης έκφρασης των λανθανόντων γονιδίων [112], που αναφέρθηκαν νωρίτερα. Το βασικό μοτίβο της λοίμωξης από τον EBV, φαίνεται στην Εικόνα 5.2.



**Εικόνα 5.2.** Σχηματική αναπαράσταση του κύκλου αντιγραφής και του μοτίβου λοίμωξης του EBV.

Τα βασικά συμβάντα κατά τη λοίμωξη με τον EBV, με χρονολογική σειρά, είναι τα εξής: 1) αρχική αντιγραφή του, δια του στόματος μεταδιδόμενου ιού, σε επιτρεπτικά κύτταρα του στοματοφάρυγγα. Αυτή η αρχική “λυτική” λοίμωξη, στην οποία συμμετέχουν πλακώδη επιθηλιακά κύτταρα, και πιθανώς τοπικά λεμφοκύτταρα, οδηγεί σε υψηλά επίπεδα απελευθέρωσης βιρίων στο φάρυγγα, 2) αποικισμός του ξενιστή μέσω μιας λανθάνουσας λοίμωξης που μετασχηματίζει τα αναπτυσσόμενα B-λεμφοκύτταρα στους λεμφογενείς ιστούς του στοματοφάρυγγα, 3) παραμονή του ιού εφ’όρου ζωής, μέσα στα κυκλοφορούντα B-κύτταρα μνήμης, και εγκατάσταση μιας σιωπηλής λοίμωξης, με πλήρως κατεσταλμένη την έκφραση των λανθανόντων γονιδίων. Αυτά τα μολυσμένα, αλλά σε ηρεμία κύτταρα μνήμης, υπόκεινται στους κανόνες που φυσιολογικά επηρεάζουν τη συμπεριφορά των κυττάρων μνήμης μέσα στο δίκτυο όλου του πληθυσμού των B-κυττάρων, συμπεριλαμβανομένης της πιθανότητας διαφοροποίησης των τελευταίων σε πλασματοκύτταρα και της αντίδρασης βλαστικού κέντρου, 4) αυτή η διαφοροποίηση σε πλασματοκύτταρα, μπορεί να πυροδοτήσει την περιστασιακή είσοδο του λανθανόντος μολυσμένου B-κυττάρου στο λυτικό κύκλο. Αν αυτό συμβεί σε μια βλεννογονική

επιφάνεια, τα σωματίδια του ιού που παράγονται, μπορούν να σχηματίσουν νέες εστίες αντιγραφής του ιού σε περιοχές του στοματοφάρυγγα, και την ίδια στιγμή, να ξεκινήσουν νέες λοιμώξεις μετασχηματισμού της ανάπτυξης των Β-λεμφοκυττάρων. Τόσο οι λυτικές, όσο και οι λανθάνουσες λοιμώξεις, είναι μια πλούσια πηγή ιικών αντιγόνων, που προκαλούν ισχυρή ανοσοαπόκριση από τον ανοσοεπαρκή ξενιστή, διαμεσολαβούμενη από το σκέλος της κυτταρικής ανοσίας [113,114]. Η ανοσοαπόκριση, εμπλέκει τα κύτταρα φυσικούς φονείς (Natural Killer cells-NK cells), τα CD4<sup>+</sup> T κύτταρα, και ιδιαίτερα τα CD8<sup>+</sup> T κύτταρα, τα οποία λειτουργούν συλλογικά, όχι μόνο για να ελέγξουν την πρωτογενή λοίμωξη, αλλά επίσης, και για να περιορίσουν μακροπρόθεσμα την επανενεργοποίηση του ιού από τη δεξαμενή των Β-κυττάρων μνήμης, και την επανεμφάνιση των Β-λεμφοϋπερπλαστικών βλαβών που μετασχηματίστηκαν απ'τον ιό [111].

Η εμφάνιση ευκαιριακών λεμφωμάτων σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς, παρέχει έναν *in vivo* συσχετισμό με τον *in vitro* απαθανατισμό των Β λεμφοκυττάρων, διαμεσολαβούμενη από τον EBV. Και στις 2 περιπτώσεις, εκφράζεται το πλήρες φάσμα των γονιδιακών παραγώγων, κάποια απ'τα οποία προκαλούν κυτταρική εξαλλαγή. Οι ιικές πρωτεΐνες ενεργοποιούν το κυτταρικό πρόγραμμα πολλαπλασιασμού μ'ένα αριθμό μηχανισμών, για παράδειγμα μέσω της επαγωγής του NF-κΒ [13,115].

-LMP1: Κύριο μέσο της εξαλλακτικής δυνατότητας του EBV, αποτελεί το LMP1, ένα ιικό ομόλογο του ευκαρυωτικού CD40 ενεργοποιητή του Τ-λεμφοκυττάρου, και μεσολαβεί στη μεταγωγή σήματα ανάπτυξης, πολλαπλασιασμού, και απόπτωσης [13]. Πειραματικά δεδομένα έχουν προτείνει ότι η διαμεμβρανική πρωτεΐνη LMP1 του EBV, συνεισφέρει στην ανάπτυξη του ρινοφαρυγγικού καρκινώματος (NPC) και του λεμφώματος Burkitt(BL), με τους ακόλουθους μηχανισμούς:

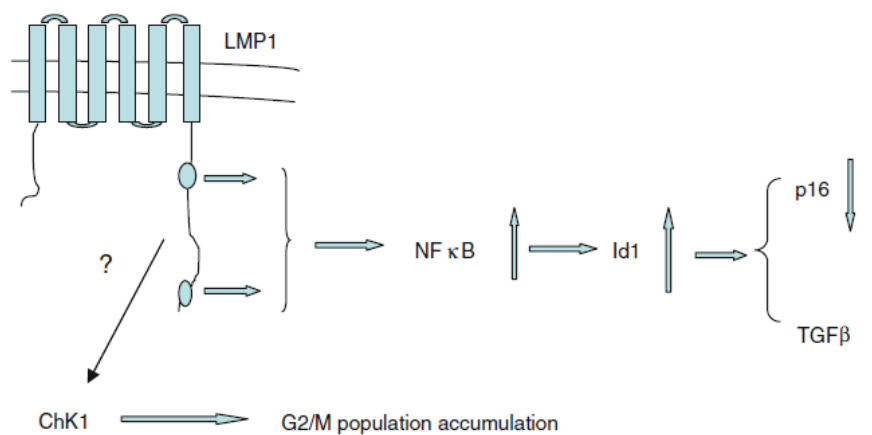
i) Διέγερση του πολλαπλασιασμού. Το LMP1, είναι πρωτεύων υποψήφιος για την καθοδήγηση της καρκινογένεσης, δεδομένης της δυνατότητάς του να ενεργοποιήσει πολλαπλά μοριακά μονοπάτια, και ν'αλλάξει την έκφραση και τη δραστηριότητα μιας ποικιλίας στόχων. Η επαγωγή του -εξαρτώμενου από τον NF-κΒ παράγοντα- μεταγραφικού παράγοντα Id1, από το LMP1, καταστέλει τον καταστολέα του πολλαπλασιασμού p16, και αναστέλει τη σηματοδότηση του TGF beta, συνεισφέροντας στην κλωνική επέκταση των προ-κακοήθων κυττάρων του ρινοφάρυγγα [116,117]. Η αντίσταση στη διαμεσολαβούμενη από τον TGF-β κυτταρόσταση, είναι μια από τις επιδράσεις εξαλλαγής του LMP1 [118].

ii) Ρύθμιση της εισόδου στον κυτταρικό κύκλο. Έχει παρατηρηθεί ότι ο EBV, μέσω του LMP1, τροποποιεί τον κυτταρικό κύκλο και ελέγχει τον πολλαπλασιασμό των μολυσμένων κυττάρων, ρυθμίζοντας την πρόοδο στη G2/M φάση [119]. Το LMP1 έχει αντίκτυπο στο σημείο ελέγχου της G2 φάσης σε ρινοφαρυγγικά επιθηλιακά κύτταρα, αφού μέσω της ελαττωματικής ενεργοποίησης της Chk1, προκαλεί το σχηματισμό μή επισκευάσιμων εκτροπών τύπου χρωματίδων, κατά τη μετάφαση [118](Εικόνα 5.3).

iii) Επαγωγή γονιδιωματικής αστάθειας. Το LMP1, καθώς και τα πυρηνικά αντιγόνα EBNA1 και EBNA3C, ανεξάρτητα προωθούν τη γονιδιωματική αστάθεια, όπως έχει ανιχνευτεί από τις μή κλωνικές χρωμοσωμικές εκτροπές [120]. Συγκεκριμένα, το LMP1 αναστέλλει την επιδιόρθωση

του DNA, μέσω της μειορρύθμισης της DNA-damage-sensing kinase ataxia telangiectasia mutated (ATM). Μείωση της φωσφορυλίωσης του κατάντη στόχου Chk2, οδηγεί στην αδρανοποίηση του σημείου ελέγχου της G2 φάσης [121].

iv) Αναστολή της απόπτωσης. Μέσω της μίμησης της λειτουργίας του CD40, το LMP1 παρέχει εσφαλμένα σήματα επιβίωσης στα μολυσμένα B κύτταρα του βλαστικού κέντρου [122]. Το LMP1, συμβάλει στο νεοπλασματικό μετασχηματισμό και εξέλιξη, διαμορφώνοντας το μονοπάτι του υποδοχέα του TNF, μέσω της αλληλεπίδρασης με τις περιοχές CTAR1 και CTAR2, μέσω προσδετο-ανεξάρτητης αλληλεπίδρασης [123]. Οι τελικοί στόχοι των αλληλεπιδράσεων αυτών, είναι αντι-αποπτωτικοί παράγοντες-κλειδιά, όπως τα μόρια Bcl-2 και A20.



Εικόνα 5.3. Σχηματική αναπαράσταση των ογκογενετικών ιδιοτήτων του LMP1.

-**EBNA1**: Όπως αναφέρθηκε πριν, το πυρηνικό αντιγόνο EBNA1, το οποίο εκφράζεται σε όλα τα θετικά για EBV κύτταρα, προωθεί τη γονιδιωματική αστάθεια και τη βλάβη του DNA, κάτι που επιτυγχάνεται μέσω της επαγωγής της γένεσης αντιδραστικών ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species-ROS) [124]. Το EBNA1, έχει επίσης φανεί να έχει αντι-αποπτωτική δράση στα BL κύτταρα [125].

-**EBERs**: Τα EBERs είναι μικρά dsRNA μόρια, τα οποία, μαζί με το EBNA1, έχουν προταθεί ως ικανοί και επαρκείς παράγοντες για την προώθηση της κακοήθους ανάπτυξης των BL κυττάρων *in vivo*, ακόμα και απουσία οποιασδήποτε άλλης πρωτεϊνικής λανθάνουσας φάσης του EBV [126,127]. Συγκεκριμένα, τα EBERs είναι αναστολείς της πρωτεϊνικής κινάσης R (Protein Kinase R-PKR), ενός κεντρικού τελεστή πολλών αποπτωτικών και stress signaling μονοπατιών, η οποία ενεργοποιείται από dsRNA μόρια, μεταξύ άλλων [128]. Με την πρόσδεσή τους σ' αυτή, τα EBERs, εμποδίζουν την αλληλεπίδραση της PKR με άλλα dsRNAs, και αποκλείουν την επαγωγή αντι-ϊικών και αποπτωτικών μονοπατιών. Η δυνατότητα των κυττάρων που εκφράζουν ανενεργό PKR για κακοήθη εξαλλαγή, έχει τεκμηριωθεί ξεκάθαρα [129]. Εκτός από την αναστολή της PKR, τα EBERs έχουν εμπλακεί στην αντίσταση στην απόπτωση, μέσω της

τροποποίησης της έκφρασης του κεντρικού αντι-αποπτωτικού παράγοντα Bcl-2, αυξημένη έκφραση του οποίου έχει φανεί σε κλώνους BL κυττάρων που εκφράζουν το EBER [130].

### 5.3. EBV και ανθρώπινη νόσος

Αν και η μεγάλη πλειοψηφία των λοιμώξεων από τον EBV είναι ασυμπτωματικές, ο ιός αυτός, αποτελεί το αίτιο, τόσο καλοήθων, όσο και κακοήθων καταστάσεων για τον άνθρωπο.

Ο EBV, είναι το αίτιο της μονοπυρήνωσης, μιας ασθένειας που είναι συχνότερη στους εφήβους, αναφερόμενη και ως “νόσος του φιλιού”, λόγω του τρόπου μετάδοσής της. Η νόσος, εκδηλώνεται με πυρετό, πονόλαιμο, κόπωση, και διογκωμένους λεμφαδένες. Πιθανώς, είναι αποτέλεσμα της αδυναμίας του ανοσολογικού συστήματος να διαχειριστεί κατάλληλα τον ιό, σ’ αυτό το στάδιο της ζωής. Αυτοί που αντιμετωπίζουν τον ιό σε βρεφική ηλικία, σπάνια αναπτύσσουν συμπτώματα [105].

Εκτός από τη μονοπυρήνωση, ο EBV έχει ογκογεννητικό δυναμικό, και αποτελεί αίτιο κακοηθειών, τόσο B-κυτταρικής, όσο και μί B-κυτταρικής αρχής [111].

i) Όγκοι B-κυτταρικής αρχής: Όλοι οι θετικοί για EBV B-κυτταρικοί όγκοι, θεωρείται ότι προκύπτουν από σπάνια ατυχήματα στον κύκλο ζωής του ιού στο B-κυτταρικό σύστημα. Σχεδόν όλοι φέρουν σωματικές μεταλλάξεις στα γονίδια των ανοσοσφαιρινών, οπότε προκύπτουν από κύτταρα που έχουν περάσει από μια αντίδραση βλαστικού κέντρου. Οι κύριοι B-κυτταρικοί όγκοι, είναι:

*B-λεμφοϋπερπλαστική νόσος των ανοσοκατεσταλμένων*: Αποτελεί την πιο άμεση απόδειξη της ογκογεννητικής δραστηριότητας του EBV, με βλάβες θετικές για EBV, που αναπτύσσονται σε λήπτες μυελού των οστών και συμπαγών οργάνων, μέσα στον πρώτο χρόνο μετά τη μεταμόσχευση, όταν η καταστολή των T-κυττάρων είναι εντονότερη [131,132].

*Λέμφωμα Hodgkin(HL)*: Ο EBV σχετίζεται με αρκετές περιπτώσεις κλασσικού λεμφώματος Hodgkin παγκοσμίως, ειδικά των τύπων της μεικτής κυτταροβρίθειας, ή της λεμφοκυτταρικής ένδειας. Αυτοί είναι οι κύριοι υπότυποι του HL που συναντώνται στις υποανάπτυξη χώρες, όπου το 80-90% των όγκων, είναι θετικοί για EBV. Στη Δύση, η κατανομή των υποτύπων αλλοιώνεται από την παρουσία μιας έξαρσης του τύπου της οζώδους σκλήρυνσης σε νέους ενήλικες, με θετικότητα για EBV<20% [133].

*Λέμφωμα Burkitt(BL)*: Όλες σχεδόν οι περιπτώσεις της “ενδημικής” μορφής του BL, που συναντώνται στην ισημερινή Αφρική και στους Παπούα-Νέα Γουϊνέα, είναι θετικές για το γονιδίωμα του EBV. Το BL συναντάται επίσης σε παιδιά εκτός των προαναφερθεισών περιοχών, σε “σποραδική” μορφή. Η επίπτωση και ο βαθμός συσχέτισης του EBV με τη σποραδική μορφή του BL, ποικίλουν με τη γεωγραφική περιοχή, αλλά ο ακριβής τρόπος συσχέτισης, δέν έχει ξεκαθαριστεί πλήρως [111].

*Άλλα B-κυτταρικά λεμφώματα*: Ο EBV σχετίζεται επίσης μ’ ένα αριθμό άλλων, λιγότερο συχνών B-κυτταρικών όγκων, πολλοί εκ των οποίων κατηγοριοποιούνται ιστολογικά σαν



υπότυποι “διάχυτου λεμφώματος εκ μεγάλων Β-κυττάρων”(DLBCL). Αυτά τα λεμφώματα, αναπτύσσονται σε ειδικές συνθήκες, και είναι διακριτά από τα DLBCLs που εμφανίζονται στο γενικό πληθυσμό. Έτσι, όλες οι περιπτώσεις του “λεμφώματος του πυοθώρακα”, που εμφανίζεται σε ασθενείς με χρόνια φλεγμονή του πνεύμονα που προκαλείται λόγω της χειρουργικής αντιμετώπισης του πνευμοθώρακα, είναι θετικές για τον EBV [134], όπως επίσης και >50% των DLBCLs που εμφανίζονται σε ηλικιωμένους ασθενείς-κάτι που πιθανώς αντανακλά την ηλικιο-εξαρτώμενη έκπτωση της ανοσολογικής επιτήρησης από τα Τ-κύτταρα [135]- και >50% των Β-κυτταρικών λεμφωμάτων που εμφανίζονται ως “όψιμοι όγκοι μετά από μεταμόσχευση”, σε λήπτες συμπαγών οργάνων που παραμένουν σε ήπια ανοσοκαταστολή εφ’όρου ζωής [136]. Επιπλέον, 3 σπάνιοι Β-κυτταρικοί όγκοι που εμφανίζονται σε ασθενείς με AIDS, σχετίζονται με τον EBV. Ένας από αυτούς, το AIDS-DLBCL κεντροβλαστικού τύπου, είναι θετικό για EBV στο 30% των περιπτώσεων, ενώ το σχετιζόμενο με AIDS πλασματοκυτταροβλαστικό λέμφωμα που τυπικά εμφανίζεται στη στοματική κοιλότητα, είναι θετικό σε ποσοστό περί το 80% [137,138]. Τέλος, οι ασθενείς με AIDS προχωρημένου σταδίου, οι οποίοι επίσης μολύνονται με τον KSHV, έχουν αυξημένο κίνδυνο ν’αναπτύξουν “λέμφωμα υπεζωκοτικής συλλογής”, το οποίο είναι τυπικά θετικό για τον KSHV, όμως, είναι συχνά θετικό και για το γονιδίωμα του EBV [139].

ii) Όγκοι μί Β-κυτταρικής αρχής: Όλοι οι EBV θετικοί όγκοι μί Β-κυτταρικής αρχής, αναμφισβήτητα προκύπτουν από σπάνιες περιπτώσεις, κατά τις οποίες ο ιός εισέρχεται σ’ένα μί φυσικό τύπο κυττάρου-ξενιστή, μια κατάσταση όπου τα ενδοκυττάρια σήματα που καθορίζουν τη συμπεριφορά του ιού στα φυσιολογικά κύτταρα-ξενιστές του, παύουν να λειτουργούν.

*Λέμφωμα από Τ/NK κύτταρα*: Αν και η λοίμωξη του λεμφικού συστήματος από τον EBV, φυσιολογικά περιορίζεται στα Β-κύτταρα, ο ιός, σχετίζεται επίσης με ένα σπάνιο όγκο της ρινός, Τ/NK κυτταρικής προέλευσης, ο οποίος, αν και συνήθως συναντάται σε Ασιατικούς πληθυσμούς, εμφανίζεται παγκοσμίως σε χαμηλή συχνότητα. Όλα τα περιστατικά, είναι θετικά για το γονιδίωμα του EBV [140].

*Ρινοφαρυγγικό καρκίνωμα (NPC)*: Αυτός ο όγκος, ειδικά στη μί-διαφοροποιημένη του μορφή, έχει τεράστιες διαφορές στην επίπτωσή του μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών, παρ’όλα αυτά όμως, όλες οι περιπτώσεις, είναι θετικές για EBV. Είναι σπάνιο στο Δυτικό Κόσμο, έχει ενδιαμέση επίπτωση στη Βόρεια και Ανατολική Αφρική, και αυξημένη στην Νοτιοανατολική Ασία, ιδιαίτερα στη Νότια Κίνα [141].

*Γαστρικό καρκίνωμα*: Ο ιός ανευρίσκεται κυρίως σε γαστρικά καρκινώματα με λεμφοεπιθηλιακό ιστολογικό τύπο-παρουσία θετικών για τον EBV επιθηλιακών καρκινικών κυττάρων σε συνδυασμό μ’ένα πλούσιο λεμφοκυτταρικό διήθημα [142,143], καθώς και σ’ένα μικρό ποσοστό τυπικών γαστρικών αδενοκαρκινωμάτων [143,144].

*Λειμμοσάρκωμα των ανοσοκατεσταλμένων*: Η σοβαρή ανοσοκαταστολή που συνοδεύει το AIDS τελικού σταδίου- ειδικά στα θετικά για HIV βρέφη-, αλλά και περιπτώσεις συγγενούς, ή ιατρογενούς ανοσοανεπάρκειας, έφερε στο φώς τη σχέση αυτών των όγκων και του EBV, οι οποίοι είναι σπάνιοι και δέ σχετίζονται με τον EBV, σε απουσία ανοσοανεπάρκειας [145,146].



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI

### ΟΙ ΙΟΙ HPV

#### 6.1. Γενικά

Ο πρώτος συσχετισμός μεταξύ των ανθρώπινων θηλωμάτων και των ιών, έγινε το 1907 από τον Ιταλό ιατρό Giuseppe Ciuffu, ο οποίος ανακοίνωσε ότι ένα εκχύλισμα ελεύθερο κυττάρων, το οποίο προερχόταν από ένα θήλωμα, προκαλούσε νόσο [147,148]. Η σύνδεση της λοίμωξης από ιούς του θηλώματος με την ανάπτυξη καρκίνου, έγινε το 1935, όταν οι Rous και Beard έδειξαν ότι ο ιός του θηλώματος των κουνελιών, προκαλούσε καρκινώματα δέρματος σ'αυτά τα πειραματόζωα [149].

Οι ιοί του ανθρώπινου θηλώματος (*HPVs- Human Papilloma viruses*) είναι μικροί ιοί, φέρουν ένα εικοσάεδρο καψίδιο χωρίς φάκελο, και το γονιδίωμά τους αντιγράφεται μέσα στον πυρήνα των μολυσμένων κυττάρων του ξενιστή [150]. Το γονιδίωμα όλων των HPVs αποτελείται από κυκλικό DNA διπλής αλύσου, και έχει μέγεθος περίπου 8 kb. Εντός των βιρίων, το DNA του HPV βρίσκεται άμεσα σχετιζόμενο με τις ιστόνες του κυττάρου, οπότε σχηματίζονται συμπλέγματα που μοιάζουν με χρωματίνη [151]. Το γονιδίωμα του ιού φέρει κατά μέσο όρο 8 κύρια open reading frames (ORFs), και αυτά εκφράζονται από πολυσιστρονικά mRNAs τα οποία μεταγράφονται από μία μονήρη αλυσίδα DNA.

Το γονιδίωμα του HPV οργανώνεται σε τρεις διακριτές περιοχές [28](Εικόνα 6.1). Η πρώιμη περιοχή έκφρασης (*E-early*), κωδικοποιεί πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην αντιγραφή και στον έλεγχο της ιϊκής μεταγραφής (E1 και E2), όπως και πρωτεΐνες που εμπλέκονται στην κυτταρική εξαλλαγή και απαθανατισμό (E5, E6 και E7) [152]. Η όψιμη περιοχή έκφρασης (*L-late*), περιλαμβάνει γονίδια που εμπλέκονται στο σχηματισμό του καψιδίου, τα L1 και L2. Τέλος, η περιοχή που φέρει τις θέσεις πρόσδεσης για πολλούς παράγοντες που ελέγχουν τη μεταγραφή και την αντιγραφή του ιού, είναι γνωστή ως Long Control Region, LCR, ή URR [153](Εικόνα 6.1).

#### 6.2. Παθογένεια

Ο κύκλος ζωής του HPV, συνδέεται με το πρόγραμμα διαφοροποίησης του μολυσμένου κυττάρου-ξενιστή, του κερατινοκυττάρου, με την παραγωγή ώριμων βιρίων που περιορίζονται στα διαφοροποιημένα υπερβασικά κύτταρα. Η λοίμωξη από τον HPV πραγματοποιείται μέσω μικροπληγών του επιθηλίου, κατά τις οποίες εκτίθενται τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας στην είσοδο του ιού.

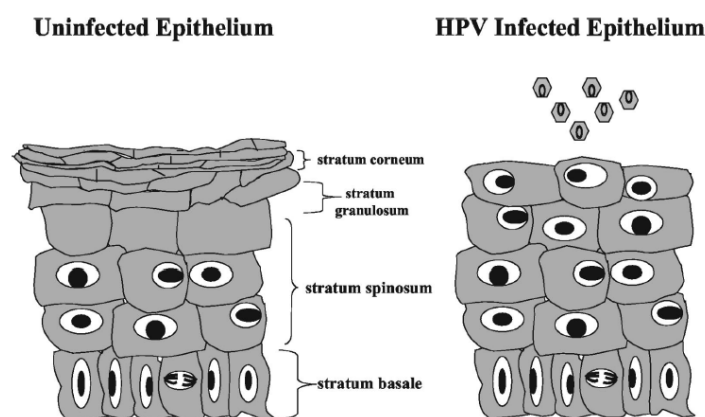
Παρά το γεγονός ότι ο υποδοχέας για την είσοδο του ιού στα κύτταρα είναι για την ώρα άγνωστος, η θειϊκή ηπαρίνη διαμεσολαβεί την άρχική πρόσδεση των βιρίων στα κύτταρα (Εικόνα 6.2) [154]. Ο πληθυσμός των κυττάρων της βασικής στοιβάδας αποτελείται από stem cells καθώς και τα παράγωγά τους (transit-amplifying cells), τα οποία πολλαπλασιάζονται



αντίστοιχες περιοχές των πρωτεϊνών του αδενοϊού [162], ενώ η CR3, περιέχει το μοτίβο πρόσδεσης της human tumor suppressor retinoblastoma susceptibility protein (pRb) [163]. Ενώ η pRb φυσιολογικά φωσφορυλιώνεται στα τελευταία στάδια της G1 φάσης του κυτταρικού κύκλου ώστε να εκλυθεί ο αντιγραφικός παράγοντας E2F, ο οποίος επιτρέπει την είσοδο στην S φάση, η αλληλεπίδραση της pRb με την E7 αποτρέπει την πρόσδεση του E2F στο pRb, προωθώντας τη μή προγραμματισμένη εξέλιξη του κυττάρου-ξενιστή στην S φάση [164]. Αυτό το αποτέλεσμα, προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και οδηγεί στην κακοήθη εξαλλαγή του κυττάρου.

Καθώς τα κύτταρα της βασικής στοιβάδας που έχουν μολυνθεί από τον HPV διαιρούνται, τα ιικά γονιδιώματα κατανέμονται στα θυγατρικά κύτταρα, το ένα από τα οποία αποκολλάται από τη βασική στοιβάδα, μεταναστεύει προς την κοκκώδη στοιβάδα, και διαφοροποιείται (Εικόνα 6.2). Σε φυσιολογικά, μή μολυσμένα επιθήλια, τα κύτταρα εξέρχονται από τον κυτταρικό κύκλο καθώς μεταναστεύουν από τη βασική στοιβάδα, και αυτό συνεπάγεται την απώλεια του πυρήνα στα υπερβασικά κύτταρα. Καθώς τα μολυσμένα κύτταρα μεταναστεύουν από τη βασική στοιβάδα, παραμένουν ενεργά εντός του κυτταρικού κύκλου, λόγω της δράσης της πρωτεΐνης E7 [165]. Τα διαφοροποιημένα κύτταρα επανεισέρχονται στη φάση S, και ενεργοποιούν την έκφραση των κυτταρικών παραγόντων αντιγραφής, που απαιτούνται για την αντιγραφή του ιού. Η παρουσία της πρωτεΐνης E7 οδηγεί στη διατήρηση του πυρήνα σε όλες τις στοιβάδες του μολυσμένου επιθηλίου (Εικόνα 6.2).

Η λειτουργία των πρωτεϊνών E4 και E5 δεν είναι πλήρως ξεκάθαρη. Παρ'όλα αυτά, και οι 2 έχουν προταθεί να συμμετάσχουν στη ρύθμιση των όψιμων ιικών λειτουργιών [166]. Οι L1 και L2 πρωτεΐνες, συναρμολογούνται όψιμα και αυθόρμητα σχηματίζουν εικοσάεδρα καψίδια. Μετά το σχηματισμό των βιρίων, οι ώριμοι ιοί, απελευθερώνονται από τις πλέον επιφανειακές στοιβάδες του επιθηλίου [155] (Εικόνα 6.2).



**Εικόνα 6.2.** Σχηματική απεικόνιση φυσιολογικού (αριστερά) και μολυσμένου από HPV (δεξιά) επιθηλίου, όπου φαίνονται οι διαφοροποιημένες στοιβάδες, καθώς και η παραγωγή των ιικών σωματιδίων.

### 6.3. HPVs και ανθρώπινη νόσος

Οι ιοί του ανθρώπινου θηλώματος (HPVs), μολύνουν δερματικούς και βλεννογονικούς επιθηλιακούς ιστούς της πρωκτογεννητικής περιοχής, των χεριών και των ποδιών (Εικόνα 6.3, Εικόνα 6.4).



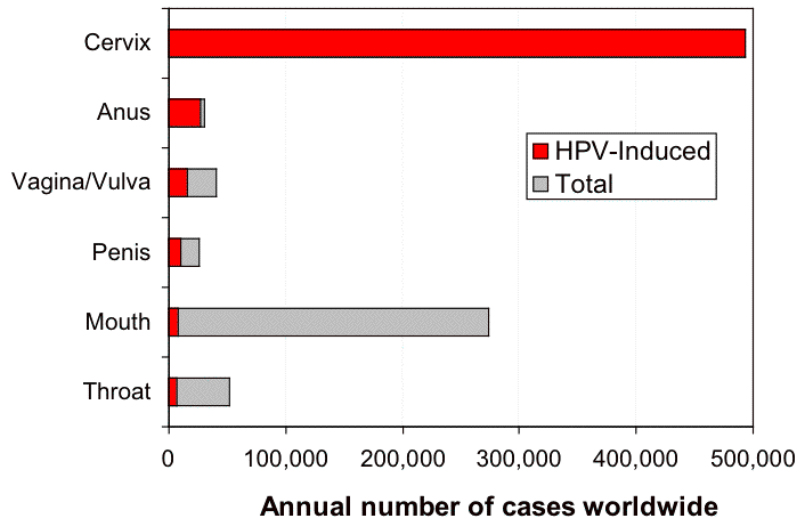
Εικόνα 6.3. Θηλώματα δέρματος.



Εικόνα 6.4. Κονδυλώματα πρωκτού.

Μέχρι σήμερα, πάνω από 100 διαφορετικοί τύποι έχουν ταυτοποιηθεί, και περίπου το 1/3 από αυτούς μολύνουν επιθηλιακά κύτταρα της γεννητικής οδού. Οι τύποι ιών που μολύνουν τη γεννητική οδό χωρίζονται σε 2 κατηγορίες: υψηλού και χαμηλού κινδύνου. Οι τύποι υψηλού κινδύνου σχετίζονται με την ανάπτυξη καρκίνου της πρωκτογεννητικής περιοχής, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του τραχήλου της μήτρας,-του δεύτερου σε συχνότητα καρκίνου, καθώς και του δεύτερου αιτίου θανάτου από καρκίνο σε γυναίκες παγκοσμίως [167]-, στον οποίο ανιχνεύεται HPV DNA σε ποσοστό 99% [168], ενώ η λοίμωξη με τύπους HPV χαμηλού κινδύνου, προκαλεί μόνο καλοήγη θηλώματα της γεννητικής περιοχής.

Οι σχετιζόμενες με τον HPV κακοήθειες, καθώς και το ποσοστό αυτών που αποδίδονται στον HPV, φαίνονται στην Εικόνα 6.5.



**Εικόνα 6.5.** Γραφική αναπαράσταση των κακοηθειών που σχετίζονται με τη λοίμωξη από HPV, καθώς και του ποσοστού αυτών που αποδίδονται στον HPV.

Στους τύπους υψηλού κινδύνου συμπεριλαμβάνονται οι HPV-16, HPV-18, HPV-31, HPV-33, και HPV-45, ενώ οι HPV-6 και HPV-11, είναι οι τύποι χαμηλού κινδύνου. Οι HPVs που μολύνουν τη γεννητική οδό, μεταδίδονται σεξουαλικά και υπολογίζεται ότι περί τα 2/3 των ατόμων που είχαν σεξουαλική επαφή με ένα μολυσμένο ερωτικό σύντροφο θα μολυνθούν, αν και η πλειοψηφία των λοιμώξεων αυτών είναι υποκλινική [150,169].

Η λοίμωξη της γεννητικής οδού από τους HPVs, μπορεί αρχικά να προκαλέσει χαμηλόβαθμη δυσπλασία, ή ενδοεπιθηλιακή νεοπλασία τραχήλου βαθμού I. Αυτές οι βλάβες παρουσιάζουν μόνο ελάχιστη διαφοροποίηση της ιστικής αρχιτεκτονικής, και πολλές από αυτές απομακρύνονται από το ανοσοποιητικό σύστημα, μέσω της κυτταρικής ανοσοαπόκρισης, σε διάστημα μικρότερο του 1 έτους [170,171]. Κάποιες από αυτές τις βλάβες, μπορούν να παραμείνουν για αρκετές δεκαετίες. Η επιμονή της λοίμωξης από υψηλού κινδύνου HPVs είναι ο σημαντικότερος παράγοντας κινδύνου για την ανάπτυξη πλακώδους καρκινώματος, ή σπανιότερα αδenoκαρκινώματος του τραχήλου της μήτρας [172]. Περί τις 470.000 νέες περιπτώσεις διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο, με μέση ηλικία για την ανάπτυξη κακοήθειας τα 52 έτη [173,174]. Παράγοντες κινδύνου για την ανάπτυξη καρκίνου περιλαμβάνουν επίμονη λοίμωξη με HPVs υψηλού κινδύνου, μεγάλο αριθμό ερωτικών συντρόφων στη διάρκεια της ζωής, συν-λοίμωξη με τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), ανοσοκαταστολή και κάπνισμα [175]. Οι περισσότερες περιπτώσεις ανευρίσκονται εκτός Ηνωμένων Πολιτειών και Δυτικής Ευρώπης. Στις Ηνωμένες Πολιτείες, ο αριθμός των περιπτώσεων καρκίνου του

τραχήλου της μήτρας έχει μειωθεί κατά τουλάχιστον 80% τα τελευταία 50 χρόνια, λόγω της καθιέρωσης του test Pap [169]. Ενώ ο αριθμός των περιπτώσεων μειώνεται δραματικά, περίπου 10.000 γυναίκες διαγιγνώσκονται και 5.000 πεθαίνουν λόγω αυτής της νόσου κάθε χρόνο [176].

Πρόσφατες έρευνες, έχουν προσπαθήσει να συσχετίσουν τη λοίμωξη από HPV, με συγκεκριμένους ιστολογικούς τύπους καρκίνου του ρινοφάρυγγα [13]. Έχει ανακοινωθεί ότι ο ογκογενητικός HPV έχει ανιχνευθεί σε καλά διαφοροποιημένα ρινοφαρυγγικά καρκινώματα, π.χ τύπου I κατά WHO, ή ακόμα και σε σχετιζόμενα με EBV ρινοφαρυγγικά καρκινώματα σε συγκεκριμένες περιοχές του κόσμου, αλλά όχι σε σχετιζόμενα με τον EBV, αδιαφοροποίητα WHO III περιστατικά σε ενδημικές περιοχές [177-179].



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ VII

### 7.1. ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 7.1.1. Συλλογή δειγμάτων

Για την παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δείγματα, χειρουργικώς εξαιρεθέντων ιστοτεμαχίων από οζίδια θυρεοειδούς. Τα δείγματα συλλέχθηκαν στο χρονικό διάστημα από τον Ιούνιο του 2003 έως τον Μάιο του 2006 στην 1<sup>η</sup> Χειρουργική κλινική του 251 Γενικού Νοσοκομείου Αεροπορίας, Αθηνών. Κάθε δείγμα εξετάστηκε παθολογοανατομικά για την επιβεβαίωση της ιστολογίας του. Κατεγράφησαν ατομικό και οικογενειακό ιστορικό των ασθενών, δημογραφικά και κλινικά στοιχεία. Μείζον κριτήριο αποτέλεσε η σποραδικότητα των όγκων. Δείγματα ιστών (φυσιολογικών και οζιδιακών), τελικά, απο 30 άτομα (24 γυναίκες- 6 άνδρες) πληρούσαν κριτήρια υψηλής καταλληλότητας. Όλοι οι ασθενείς από τους οποίους προήλθαν τα δείγματα ήταν Έλληνες, λευκοί, με αρνητικό προηγούμενο ατομικό ή οικογενειακό ιστορικό καρκίνου του θυρεοειδούς. Η μέση ηλικία ήταν 48,8 έτη. Οι ιστοί διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία μείον ογδόντα βαθμούς Κελσίου (-80 °C), στο εργαστήριο Κλινικής Ιολογίας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Κρήτης.

#### 7.1.2. Εκχύλιση DNA από τους ιστούς

Το DNA απομονώθηκε σύμφωνα με γνωστά πρωτόκολλα απομόνωσης DNA από συμπαγείς ιστούς. Ο ιστός τεμαχίζεται και ομογενοποιείται σε διάλυμα λύσης. Ο ομογενοποιημένος ιστός επωάζεται σε θερμοκρασία 60 °C για διάστημα 36-48 ωρών, προσθέτοντας ανά 12ωρο πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 100μg/ml. Ακολουθεί εκχύλιση των νουκλεϊνικών οξέων με φαινόλη-χλωροφόρμιο, που συντελεί ταυτόχρονα στην απενεργοποίηση της πρωτεΐνάσης K. Στην υδατική φάση που παραμένει προστίθεται το 1/20 του όγκου 5M NaCl και 2,5 όγκοι ψυχρής (-20 °C) απόλυτης αιθανόλης για την κατακρήμνιση του DNA. Το DNA επανακτάται σαν ίζημα με φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C, πλένεται με ψυχρή αιθανόλη 70% για απομάκρυνση των αλάτων και αφήνεται μετά να στεγνώσει. Επαναδιαλύεται με 30-50 ml δισαπεσταγμένου-αποστειρωμένου ύδατος και διατηρείται σε θερμοκρασία 4 °C, ή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία -20 °C.

#### 7.1.3. Έλεγχος της ποιότητας του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο έλεγχος της ποιότητας εκχύλισης του DNA γίνεται με την ανάλυση του σε πήκτωμα αγαρόζης παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου. Το DNA γίνεται ορατό κάτω από λάμπα υπεριώδους φωτός.

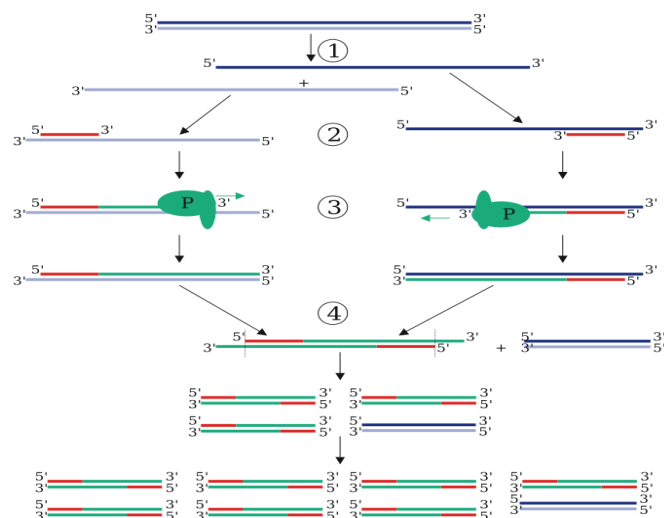
#### 7.1.4. Φωτομέτρηση DNA

Για να προσδιοριστεί η ποσότητα και η καθαρότητα του DNA κάθε δείγματος, έγινε φωτομέτρηση τους στα 260 και στα 280nm. Από την απορρόφηση στα 260nm προσδιορίζεται η συγκέντρωσή του, ενώ ο λόγος 260/280 δίνει την καθαρότητά του (κατά πόσο υπάρχουν υπολείμματα πρωτεϊνών). Λόγοι από 1.5 έως 1.8 είναι ιδανικοί για το DNA.

#### 7.1.5. Αλυσιδωτή αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction)

- **Αρχή μεθόδου:** Η αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR) επινοήθηκε το 1985 από τον Mullis και συν. και έφερε πραγματική επανάσταση στην μοριακή βιολογία με εφαρμογές από την μοριακή έρευνα στην κλινική πράξη. Η μέθοδος αυτή επιτυγχάνει σε ελάχιστο χρόνο, που δεν υπερβαίνει τις 2-3 h, την ενίσχυση με εκθετικό τρόπο, συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA, ώστε να είναι δυνατή η μελέτη τους και ο περαιτέρω χειρισμός τους. Η τεράστια απόδοση της αντίδρασης κάνει δυνατή την ενίσχυση αλληλουχιών, ακόμα και όταν αυτές βρίσκονται σε ελάχιστο αριθμό αντιγράφων ή το DNA έχει υποστεί μία σχετική αποδιάταξη.

Το υπόστρωμα DNA επωάζεται σε ρυθμιστικό διάλυμα που περιέχει την θερμοανθεκτική *Taq* DNA πολυμεράση που προέρχεται από θερμοφιλα βακτήρια, μείγμα δεσοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPS) και το ζεύγος των εκκινήτων (primers). Αρχικά γίνεται θερμική αποδιάταξη του DNA στους 95°C για 5min και ακολουθούν 30-40 κύκλοι 95°C (αποδιάταξη), 55-60°C (υβριδισμός των εκκινήτων) και 72°C (πολυμερισμός), διάρκειας περίπου 30sec το κάθε βήμα. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η εκθετική αύξηση του αριθμού των αντιγράφων του DNA σύμφωνα με την εξίσωση  $N=N_0(1+e)^n$ , όπου N η τελική ποσότητα του προϊόντος,  $N_0$  η αρχική ποσότητα του υποστρώματος, e η απόδοση της αντίδρασης και n ο αριθμός των κύκλων της PCR αντίδρασης (Εικόνα 7.1).



Εικόνα 7.1: Σχηματική απεικόνιση των φάσεων της PCR.

**Παράγοντες που επιδρούν στην PCR:** Οι κυριότεροι παράγοντες που συνεισφέρουν στην επίτευξη ικανοποιητικής αντίδρασης πολυμερισμού όσον αφορά την ευαισθησία, την εξειδίκευση αλλά και την απόδοση, περιγράφονται στην συνέχεια:

Επιλογή κατάλληλων εκκινητών: Η ειδικότητα της PCR αντίδρασης ως προς την αλληλουχία που πρόκειται να ενισχυθεί εξαρτάται από τους εκκινητές. Ο καλός σχεδιασμός για την επιλογή εκκινητών αποτελεί σημαντικότερο παράγοντα για την επιτυχία της PCR. Στατιστικά, έχει βρεθεί ότι όταν μία αλληλουχία DNA έχει μήκος τουλάχιστον 20 bp, τότε είναι μοναδική στο γονιδίωμα και κατά συνέπεια, για να επιτευχθεί ειδική ενίσχυση αλληλουχιών πρέπει οι εκκινητές να είναι τουλάχιστον 20-μερή. Προτιμούνται εκκινητές που (α) έχουν περιεκτικότητα σε γουανίνη (G) και κυτοσίνη (C) παρόμοια με το τμήμα DNA που θα ενισχυθεί, (β) δεν έχουν σημαντική δευτεροταγή δομή ούτε αλληλεπικάλυψη ειδικά στο 3' άκρο, (γ) δεν έχουν εκτάσεις από πολυουρίνες ή πολυπυριμιδίνες και (δ) το ζεύγος των εκκινητών δεν εμφανίζει συμπληρωματικότητα και δε σχηματίζει διμερή (primer dimers) με αποτέλεσμα την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων.

Επιλογή θερμοκρασίας υβριδοποίησης εκκινητών (annealing temperature): Η θερμοκρασία υβριδισμού ποικίλλει ανάλογα με το μήκος και τη σύσταση των εκκινητών σε βάσεις GC, και το είδος του υποστρώματος DNA. Ως ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού  $T_m$  θεωρείται αυτή στην οποία το 50% των μορίων είναι αποδιατεταγμένο. Υψηλές θερμοκρασίες επιτυγχάνουν περισσότερο εξειδικευμένο υβριδισμό, χαμηλής όμως απόδοσης. Η επιλογή χαμηλότερης θερμοκρασίας αυξάνει την απόδοση σε βάρος της ειδικότητας, με αποτέλεσμα τον κίνδυνο δημιουργίας παραπροϊόντων της PCR.

Επιλογή συγκέντρωσης δεσόξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) και ιόντων Mg: Τα ιόντα  $Mg^{2+}$  είναι μεταλλικός συμπαράγοντας της Taq πολυμεράσης και η μεν περίσσεια τους μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση του μη ειδικού προϊόντος λόγω αύξησης της ενεργότητας της πολυμεράσης, η δε έλλειψή της οδηγεί σε μειωμένη απόδοση προϊόντος. Με δεδομένο ζεύγος εκκινητών, συνήθως η κανονικοποίηση των συνθηκών σε μία αντίδραση PCR, περιλαμβάνει πειράματα όπου σταδιακά μεταβάλλονται ανεξάρτητα μεταξύ τους η θερμοκρασία αναδιάταξης και η συγκέντρωση ιόντων  $Mg^{2+}$ .

Αριθμός κύκλων: Συνήθως ο βέλτιστος αριθμός κύκλων είναι 25-30 και προσδιορίζεται πειραματικά με βάση την καλύτερη δυνατή απόδοση προϊόντος με το λιγότερο μη ειδικό προϊόν. Μετά από έναν αριθμό κύκλων η αντίδραση φτάνει σε μια στατική φάση (plateau) κατά την οποία νέα αύξηση του αριθμού των κύκλων δεν οδηγεί σε αύξηση της απόδοσης. Για ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων της PCR απαραίτητη προϋπόθεση είναι να τερματίσει η αντίδραση, ενώ ακόμα βρίσκεται στην εκθετική της φάση. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να γίνει γραμμική αντιστοίχιση της τελικής ποσότητας προϊόντος στην αρχική ποσότητα υποστρώματος. Συνήθως επιτελούνται προκαταρκτικά πειράματα με διαδοχικές αραιώσεις αρχικού υποστρώματος (δημιουργία πρότυπης καμπύλης), ώστε να βρεθούν οι συνθήκες εκείνες όπου διατηρείται η γραμμική αυτή σχέση. Ακόμα περισσότερο αξιόπιστη είναι η συνενίσχυση με την αλληλουχία στόχο, σταθερής ποσότητας υποστρώματος στο οποίο οι θέσεις αναγνώρισης των

εκκινητών ταυτίζονται με αυτή της αλληλουχίας-στόχου. Με τον τρόπο αυτό επιτελείται συναγωνισμός ανάμεσα στις δύο αλληλουχίες που συνενισχύονται, οπότε η αφθονία των αρχικών αντιγραφών της αλληλουχίας στόχου εκφράζεται σαν ο λόγος της ως προς την ένταση της ζώνης που αντιστοιχεί στο συναγωνιστή.

*Παρουσία ενισχυτών και αναστολέων:* Αναστολείς μπορεί να υπάρχουν είτε στα βιολογικά δείγματα είτε στα χημικά αντιδραστήρια. Παράδειγμα αναστολέων είναι ιοντικά επιφανειοδραστικά όπως το SDS. Ουσίες-ενισχυτές της αντίδρασης αποτελούν το φορμαμίδιο (5%), πολυαιθανογλυκόλη (PEG) (5-15%) κ.α.

#### 7.1.6. Συνθήκες αντιδράσεων PCR και εκκινητές

Virus	Gene	Primer pair sequence	Tm °C	PCR product (bp)
<b>BKV</b>	VP1	5'-AGT GGA TGG GCA GCC TAT GTA-3' (S) 5'-TCA TAT CTG GGT CCC CTG GA-3' (A)	60 °C	95
	LMP1	5'-CGG AAG AGG TGG AAA ACA AA-3' (S) 5'-GTG GGG GTC GTC ATC ATC TC-3' (A)	52 °C	161
<b>EBV</b>	EBNA-2	5'-GCC ACC TGG CAG CCC TAA AG-3' (S) 5'-AGG CTG CCC ACC CTG AGG AT-3' (A)	56 °C	168
	EBER1	5'- GTT TTG CTA GGG AGG AGA CG-3' (S) 5'- GAC CGA AGA CGG CAG AAA GC-3' (A)	54 °C	118
<b>HPV</b>	L1	5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC-3' (S) 5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CA-3' (A)	44 °C	150
	<i>beta-actin</i>	5'-CGG CAT CGT CAC CAA CTG-3' (S) 5'-GGC ACA CGC AGC TCA TTG-3' (A)	60 °C	120bp

Σημείωση. S = Sence primer, A = Antisence primer.

**Πίνακας 7.1.** Συνθήκες αντιδράσεων PCR και εκκινητές.

Η ποιότητα και η ακεραιότητα του DNA κάθε δείγματος, επιβεβαιώθηκε με ενίσχυση του γονιδίου της β-ακτίνης με PCR. Κάθε αντίδραση είχε όγκο 20 μl. Η αντίδραση περιείχε 2,5 μl από 10 x ρυθμιστικό διάλυμα πολυμεράσης, 2,5 μl από 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 μl dNTPs (0,2 mM), 2μl από κάθε forward και reverse εκκινητή (0,5 μM), 0,2 μl από 0,625 U Taq DNA πολυμεράση (5U/μl) (MBI Fermentas), καθώς και 100ng (2μl) DNA. Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σ'ένα MJ Research, Inc. thermocycler. Οι ακόλουθες συνθήκες χρησιμοποιήθηκαν:

**VP1:** για την ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές sense 5'-AGT GGA TGG GCA GCC TAT GTA-3' και 5'-TCA TAT CTG GGT CCC CTG GA-3' antisense. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι οι εξής: 95 °C για 30 sec, 60 °C για 30 sec και 72 °C για 30 sec, για 39

κύκλους. 10 µl από το κάθε προϊόν της PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση της προς έλεγχο περιοχής 95bp.

**LMP1:** για την ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 5'-CGG AAG AGG TGG AAA ACA AA-3' sense και 5'-GTG GGG GTC GTC ATC ATC TC-3' antisense. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι οι εξής: 94 °C για 60 sec, 52 °C για 60 sec και 72 °C για 60 sec, για 35 κύκλους. 10 µl από το κάθε προϊόν της PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση της προς έλεγχο περιοχής 161bp.

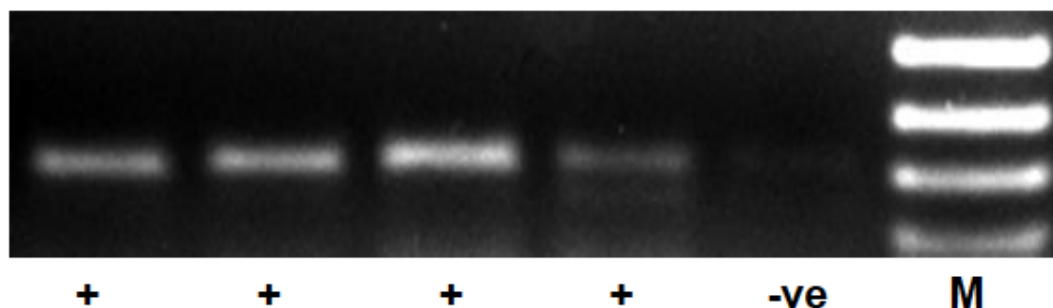
**EBNA2:** για την ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 5'-GCC ACC TGG CAG CCC TAA AG-3' sense 5'-AGG CTG CCC ACC CTG AGG AT-3'antisense. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι οι εξής: 94 °C για 60 sec, 56 °C για 60 sec και 72 °C για 60 sec για 45 κύκλους. 10 µl από το κάθε προϊόν της PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση της προς έλεγχο περιοχής 168bp.

**EBER1:** για την ενίσχυση της περιοχής του γονιδίου, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 5'- GTT TTG CTA GGG AGG AGA CG-3' sense 5'- GAC CGA AGA CGG CAG AAA GC-3' antisense. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι οι εξής: 94 °C για 30 sec, 54 °C για 30 sec και 72 °C για 30 sec, για 35 κύκλους. 10 µl από το κάθε προϊόν της PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση της προς έλεγχο περιοχής 118bp.

**L1:** για την ενίσχυση του DNA του HPV, χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC-3' sense 5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CA-3' antisense. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι οι εξής: 95 °C για 30 sec, 44 °C για 60 sec και 72 °C για 90 sec, για 40 κύκλους. 10 µl από το κάθε προϊόν της PCR αναλύεται σε πήκτωμα αγαρόζης και εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, ώστε να πιστοποιηθεί η ενίσχυση της προς έλεγχο περιοχής 150bp.

#### 7.1.7. Ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%

Δέκα µl από το προϊόν της PCR, ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα αγαρόζης. Η πήξη επιτυγχάνεται με στερεοποίηση της αγαρόζης, μετά από πτώση της θερμοκρασίας. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται σε υδατικό μέσο με ρυθμιστικό διάλυμα 0.5× TBE (0.09 Tris-HCl, 0.09M Βορικό οξύ, 2.5mM EDTA, pH 8.3)(Εικόνα 7.2).



**Εικόνα 7.2.** Πήκτωμα αγαρόζης 2%, όπου διακρίνονται 4 θετικά, και 1 αρνητικό δείγμα για τις αλληλουχίες του γονιδίου της beta-actin. -ve= negative control, M= molecular weight marker.

### **7.1.8. Χρώση νουκλεϊκών οξέων με βρωμιούχο αιθίδιο**

Η χρώση του DNA σε πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιείται με την προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου σε συγκέντρωση 10ng/mL κατά την παρασκευή του πηκτώματος. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες του DNA γίνονται ορατές κατόπιν έκθεσης του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

### **7.1.9. DNA sequencing**

Η πραγματοποίηση του DNA sequencing, έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο MacroGen Advancing Through Genomics, μετά από καθαρισμό των προϊόντων της PCR με τη χρήση του Qiagen Gel Extraction kit. Η συγκέντρωση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 5 pmol/μl, ενώ το προϊόν της PCR είχε συγκέντρωση 50ng/μl και ένα λόγο A260/280 1,8, σύμφωνα με το NanoDrop Spectrophotometer. Το προϊόν της PCR είχε όγκο 20 μl. Το σωστό μέγεθος των προϊόντων της PCR πριν τη sequencing ανάλυση, επιβεβαιώθηκε με τη χρήση πηκτώματος αγαρόζης 2%.

### **7.1.10. Στατιστική ανάλυση**

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε σχέση με τα κλινικοπαθολογικά στοιχεία των ασθενών έγινε με τη χρήση του προγράμματος SPSS 11.5. Τα στατιστικά τεστ που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Chi-square, Fisher's exact, Student's T, Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis H, Spearman's rho και Kaplan-Meier. Η στατιστική σημαντικότητα ορίστηκε όταν  $P < 0.05$

## **7.2. ΥΛΙΚΑ**

### **7.2.1. Διαλύματα**

#### **7.2.1.1. Διαλύματα απομόνωσης DNA, RNA και πρωτεϊνών**

- Φαινολικό διάλυμα απομόνωσης RNA και πρωτεϊνών: TRIzol (Invitrogen)
- Ισοπροπανόλη 100% (Merck)
- EtOH 70% και 100% (Merck)
- dH<sub>2</sub>O κατεργασμένο με DEPC (Invitrogen)
- 0.1M κιτρικό νάτριο σε 10% αιθανόλη
- 0.3M υδροχλωρική γουανιδίνη σε 95% αιθανόλη
- 1% SDS
- Reagent A: Tris-base (10mM), Sucrose (320mM), MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (5mM), Triton-X-100 (1% v/v). Ρύθμιση pH=8.0 χρησιμοποιώντας HCl 37%
- Reagent B: Tris-base (400mM), NaCl (150mM), EDTA (60mM), SDS (1% w/v). Ρύθμιση pH=8.0 χρησιμοποιώντας HCl 37%. Το SDS προστίθεται μετά την αποστείρωση του διαλύματος.

### 7.2.1.2. Ηλεκτροφορητικά διαλύματα

- Διάλυμα ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου (0.5× TBE): 0.09 TrisHCl, 0.09M Βορικό οξύ, 2.5mM EDTA, pH 8.3
- Διάλυμα φόρτωσης DNA: 0.25% κυανούν της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανούν του ξυλενίου και 40% γλυκερόλη

### 7.2.2. Ένζυμα

- Platinum Taq DNA πολυμεράση (Invitrogen)
- Thermoscript αντίστροφη μεταγραφή (Invitrogen)
- Rnase free Dnase I (Invitrogen)
- Rnase OUT (Invitrogen)
- XbaI (Fermentas)
- Πρωτεΐνάση K (Invitrogen)

### 7.2.3. Υλικά και εταιρείες προέλευσης

Υλικό	Εταιρία		Υλικό	Εταιρία
Αγαρόζη	Invitrogen		Μεθανόλη	Fluka
Αιθανόλη	Merck		MOPS	Sigma
Ακρυλαμίδιο	BDH		Οξεϊκό οξύ	BDH
Ανθρακικό νάτριο	Sigma		SDS	BDH
Βορικό οξύ	BDH		TEMED	Sigma
Bromophenol blue	Sigma		Tris base	BDH
Βρωμιούχο αιθίδιο	BDH		Tween 20	Sigma
CAPS	Sigma		Υδροξείδιο του Νατρίου	Sigma
Γλυκερόλη	Invitrogen		Υδροχλωρικό οξύ	BDH
Διθειοθρεϊτόλη	Sigma		Υδροχλωρική γουανιδίνη	BDH
dNTPS	Invitrogen		Φαινόλη	BDH
EDTA	BDH		Φορμαλδεύδη	BDH
Ισοπροπανόλη	BDH		Χλωριούχο νάτριο	Sigma
Κιτρικό νάτριο	BDH		Χλωροφόρμιο	Fluka
SYBR® Green I	Fermentas		R1881	PerkinElmer
Flutamide	LKT Labs		Bicalutamide	LKT Labs





## ΚΕΦΑΛΑΙΟ VIII

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΜΕΛΕΤΗΣ ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ ΑΔΕΝΑ

## 8.1. Δείγματα και ασθενείς που αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης

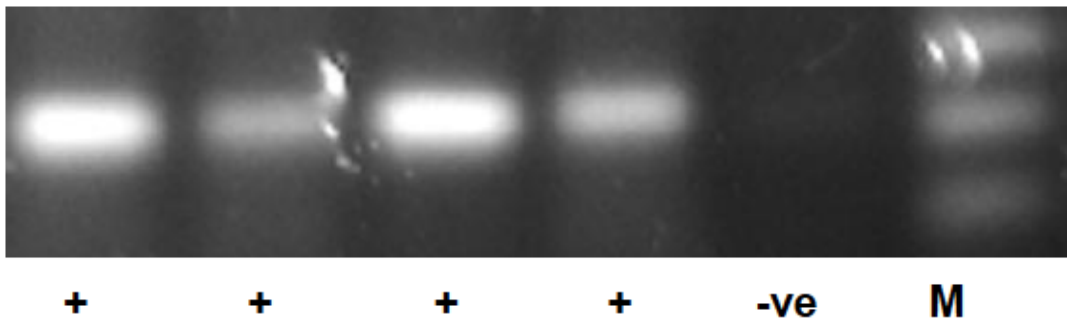
Στα πλαίσια της μελέτης της ανίχνευσης αλληλουχιών σε επίπεδο DNA των γονιδίων VP1, LMP1, EBNA2, EBER1 και GP5/6, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 30 ζεύγη δειγμάτων ιστού απο θυρεοειδή αδένα (Πίνακας 8.1). Κάθε ζεύγος αποτελούνταν από οζιδιακό ιστό και παρακείμενο φυσιολογικό ιστό από τον ίδιο ασθενή, ο οποίος εκτιμήθηκε παθολογοανατομικά ως φυσιολογικός-ελεύθερος κακοήθειας [βλέπε Κεφ. VII , συλλογή δειγμάτων]. Ο οζιδιακός ιστός, περιελάμβανε τόσο καλοήθεις βλάβες (πολυζώδης υπερπλασία θυρεοειδούς αδένα), όσο και κακοήθεις βλάβες (θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς αδένα).

	Number	Mean age-years (+/-SD)	Thyroid Cancer (%)	Multinodular Hyperplasia (%)
<b>Males</b>	6	48.0+/-19.3	2/6 (33.3)	4/6 (66.6)
<b>Females</b>	24	48.9+/-12.5	12/24 (50.0)	12/24 (50.0)
<b>Total</b>	30	48.8+/-13.7	14/30 (46.7)	16/30 (53.3)

Πίνακας 8.1. Δημογραφικά και ιστολογικά στοιχεία των ασθενών και των ιστών που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

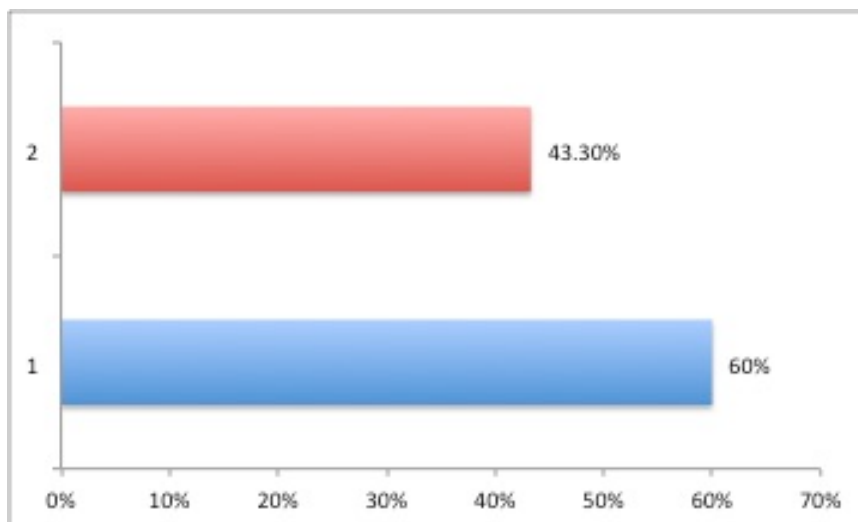
## 8.2. Ανίχνευση αλληλουχιών του ιού BKV (γονίδιο VP1)

Χρησιμοποιώντας την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR), η περιοχή του γονιδίου VP1 του BKV ενισχύθηκε σε δείγματα τόσο οζιδιακού ιστού, όσο και σε παρακείμενου φυσιολογικού ιστού από τον ίδιο ασθενή. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τόσο θετικών, όσο και αρνητικών δειγμάτων, φαίνονται στην Εικόνα 8.1.



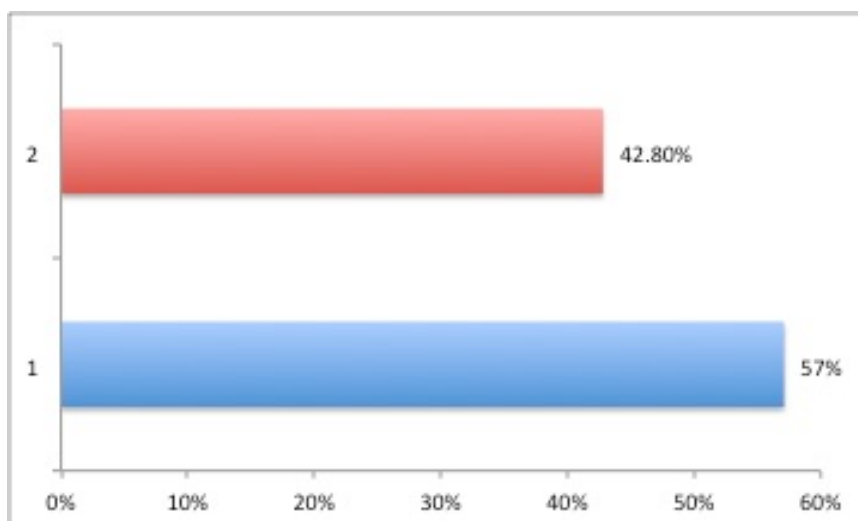
Εικόνα 8.1. Πήκτωμα αγαρόζης 2%, όπου διακρίνονται 4 θετικά, και 1 αρνητικό δείγμα για τις αλληλουχίες του γονιδίου VP1. -ve= negative control, M= molecular weight marker.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης, ανέδειξαν την παρουσία αλληλουχιών του VP1 στο 60.0%(18/30) των δειγμάτων οζιδιακού ιστού, ο οποίος, όπως προαναφέρθηκε, περιελάμβανε τόσο θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς, όσο και πολυοζώδη υπερπλασία. Οι αντίστοιχοι παρακείμενοι φυσιολογικοί ιστοί, περιείχαν αλληλουχίες του γονιδίου σε ποσοστό 43.3%(13/30) (Γράφημα 8.1).



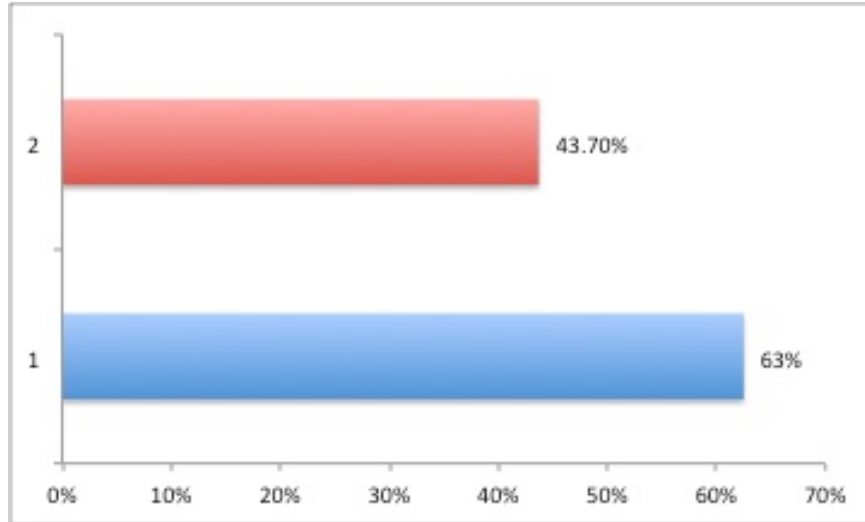
**Γράφημα 8.1.** Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης της αλληλουχίας του γονιδίου VP1 στο σύνολο των οζιδίων. Bar No1: ποσοστό θετικών δειγμάτων οζιδιακού ιστού. Bar No2: ποσοστό θετικών δειγμάτων παρακείμενων φυσιολογικών ιστών.

Το 57.1% (8/14) των δειγμάτων καρκινώματος περιείχαν αλληλουχίες του VP1, σε σύγκριση με το 42.8% των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών (6/14)(Γράφημα 8.2).



**Γράφημα 8.2.** Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης της αλληλουχίας του γονιδίου VP1 στα δείγματα θυρεοειδικού καρκίνου. Bar No1: ποσοστό θετικών δειγμάτων καρκινικού ιστού. Bar No2: ποσοστό θετικών δειγμάτων παρακείμενων φυσιολογικών ιστών.

Όσον αφορά τα δείγματα πολυοζώδους υπερπλασίας, αλληλουχίες του VP1 ανιχνεύθηκαν στο 62.5% των δειγμάτων (10/16), σε σύγκριση με το 43.7% (7/16) των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών(Γράφημα 8.3).



**Γράφημα 8.3.** Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης της αλληλουχίας του γονιδίου VP1 στα δείγματα πολυοζώδους υπερπλασίας. Bar No1: ποσοστό θετικών δειγμάτων οζιδιακού ιστού. Bar No2: ποσοστό θετικών δειγμάτων παρακείμενων φυσιολογικών ιστών.

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της μελέτης, φαίνονται στον Πίνακα 8.2.

	Tissue	Cancer (%)	Multinodular Hyperplasia (%)	Total nodules (%)
VP1 positive samples	Nodular	8/14 (57.1)	10/16 (62.5)	18/30 (60.0)
	Normal	6/14 (42.8)	7/16 (43.7)	13/30 (43.3)

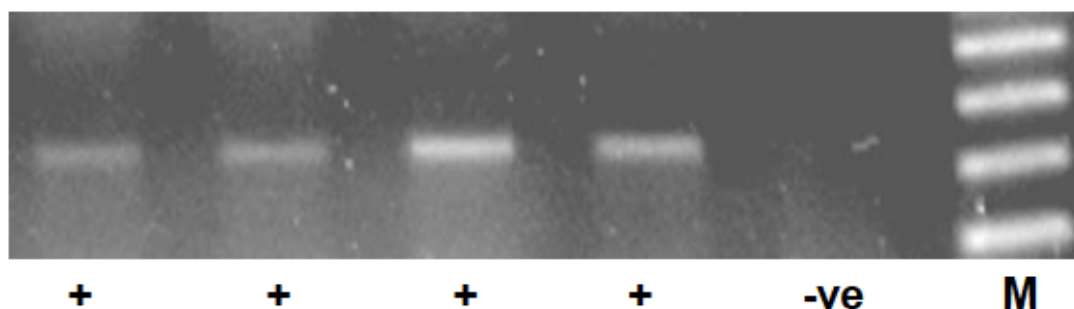
**Πίνακας 8.2.** Συχνότητα της ανίχνευσης των αλληλουχιών του γονιδίου VP1 στο σύνολο των οζιδίων, στα δείγματα καρκίνου, στα δείγματα πολυοζώδους υπερπλασίας, καθώς και στους αντίστοιχους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς.

### 8.3. Ανίχνευση αλληλουχιών του ιού EBV (γονίδια *LMP1*, *EBNA2*, *EBER1*)

Χρησιμοποιώντας την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης με πολυμεράση (PCR), ελέγχθηκε η παρουσία αλληλουχιών 3 γονιδίων του ιού Epstein- Barr, του LMP1, του EBNA2, και του EBER1.

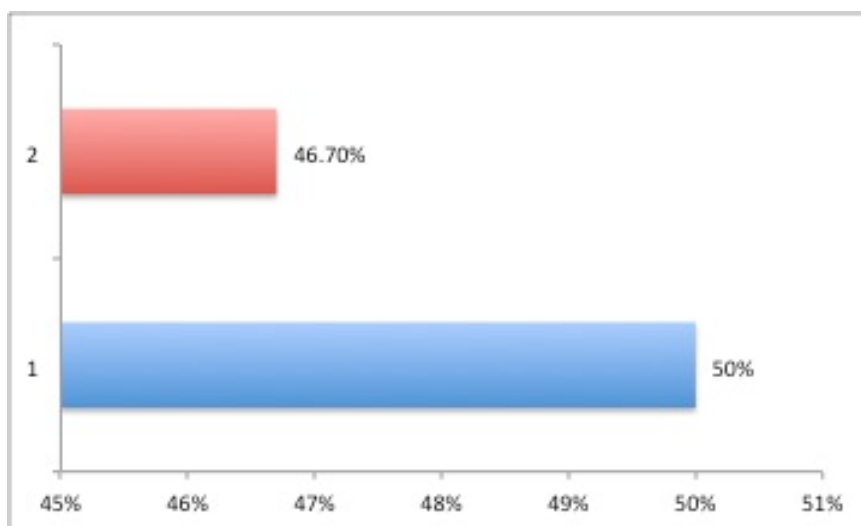
### 8.3.1 Ανίχνευση αλληλουχιών του γονιδίου *LMP1*

Η περιοχή του γονιδίου *LMP1* του EBV ενισχύθηκε σε δείγματα οζιδιακού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού από τον ίδιο ασθενή. Η απεικόνιση τόσο θετικών, όσο και αρνητικών δειγμάτων, φαίνονται στην Εικόνα 8.2.



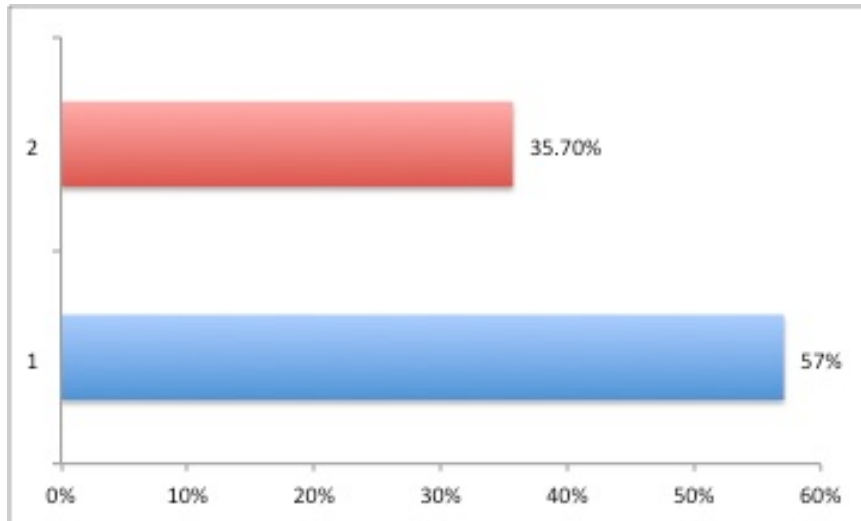
**Εικόνα 8.2.** Πήκτωμα αγαρόζης 2%, όπου διακρίνονται 4 θετικά, και 1 αρνητικό δείγμα για τις αλληλουχίες του γονιδίου *LMP1*. -ve= negative control, M= molecular weight marker.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης, ανέδειξαν την παρουσία αλληλουχιών του *LMP1* στο 50.0% (15/30) των δειγμάτων οζιδιακού ιστού (θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς και πολυοζώδης υπερπλασία). Οι αντίστοιχοι παρακείμενοι φυσιολογικοί ιστοί, περιείχαν αλληλουχίες του γονιδίου σε ποσοστό 46.7% (14/30)(Γράφημα 8.4).



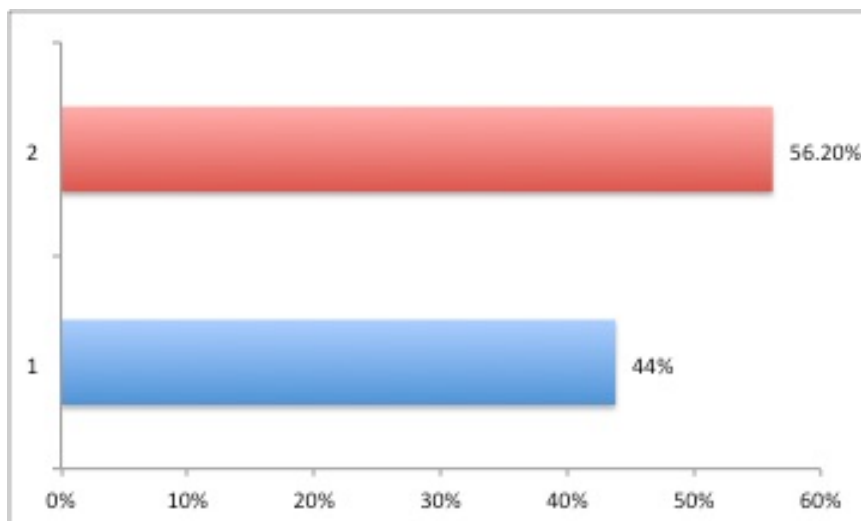
**Γράφημα 8.4.** Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης της αλληλουχίας του γονιδίου *LMP1* στο σύνολο των οζιδίων. Bar No1: ποσοστό θετικών δειγμάτων οζιδιακού ιστού. Bar No2: ποσοστό θετικών δειγμάτων παρακείμενων φυσιολογικών ιστών.

Συγκεκριμένα, το 57.1% (8/14) των δειγμάτων καρκινώματος περιείχαν αλληλουχίες του LMP1, σε σύγκριση με το 35.7% των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών(5/14)(Γράφημα 8.5).



**Γράφημα 8.5.** Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης της αλληλουχίας του γονιδίου LMP1 στα δείγματα θυρεοειδικού καρκίνου. Bar No1: ποσοστό θετικών δειγμάτων καρκινικού ιστού. Bar No2: ποσοστό θετικών δειγμάτων παρακείμενων φυσιολογικών ιστών.

Όσον αφορά τα δείγματα πολυζώδους υπερπλασίας, αλληλουχίες του LMP1 ανιχνεύθηκαν στο 43.8% των δειγμάτων (7/16), σε σύγκριση με το 56.2% (9/16) των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών(Γράφημα 8.6).



**Γράφημα 8.6.** Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης της αλληλουχίας του γονιδίου LMP1 στα δείγματα πολυζώδους υπερπλασίας. Bar No1: ποσοστό θετικών δειγμάτων οζιδιακού ιστού. Bar No2: ποσοστό θετικών δειγμάτων παρακείμενων φυσιολογικών ιστών.

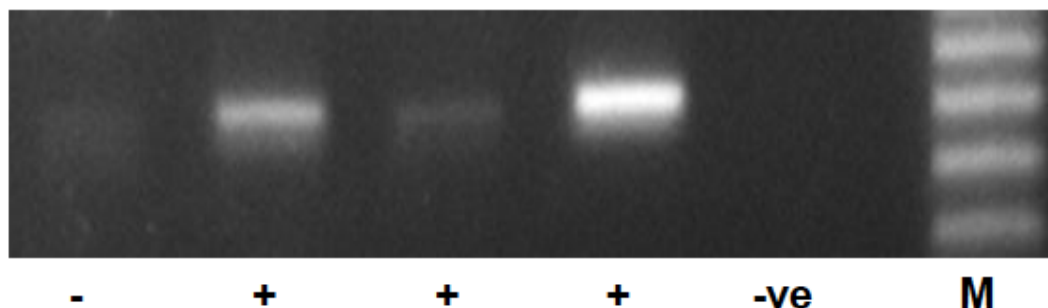
Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της μελέτης, φαίνονται στον Πίνακα 8.3.

	Tissue	Cancer (%)	Multinodular Hyperplasia (%)	Total nodules (%)
LMP1 positive samples	Nodular	8/14 (57.1)	7/16 (43.8)	15/30 (50.0)
	Normal	5/14 (35.7)	9/16 (56.2)	14/30 (46.7)

**Πίνακας 8.3.** Συχνότητα της ανίχνευσης των αλληλουχιών του γονιδίου LMP1 στο σύνολο των οζιδίων, στα δείγματα καρκίνου, στα δείγματα πολυοζώδους υπερπλασίας, καθώς και στους αντίστοιχους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς.

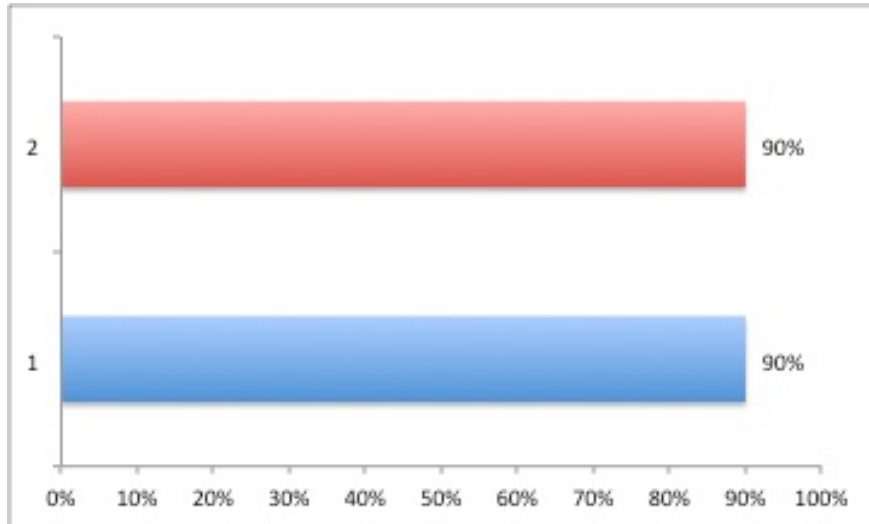
### 8.3.2 Ανίχνευση αλληλουχιών του γονιδίου EBNA2

Η περιοχή του γονιδίου EBNA2 του EBV ενισχύθηκε σε δείγματα οζιδιακού και παρακείμενου φυσιολογικού ιστού από τον ίδιο ασθενή. Η απεικόνιση τόσο θετικών, όσο και αρνητικών δειγμάτων, φαίνονται στην Εικόνα 8.3.



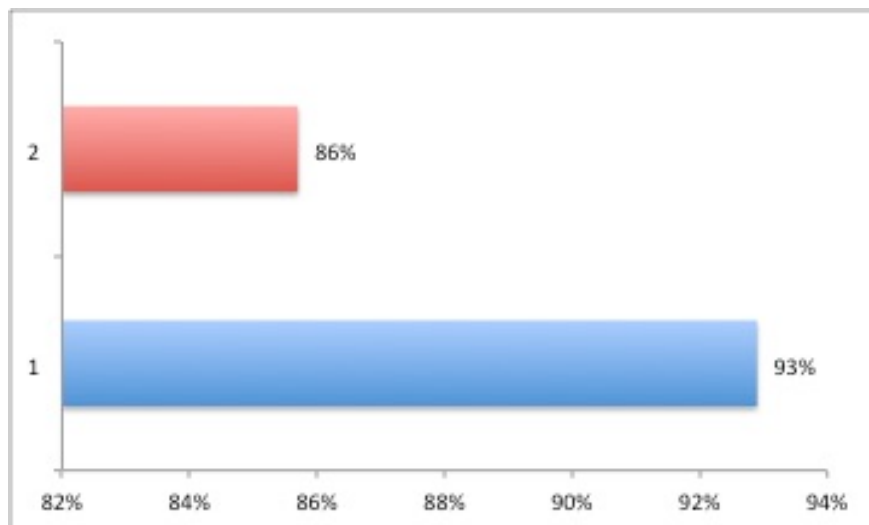
**Εικόνα 8.3.** Πήκτωμα αγαρόζης 2%, όπου διακρίνονται 3 θετικά, και 2 αρνητικά δείγματα για τις αλληλουχίες του γονιδίου EBNA2. -ve= negative control, M= molecular weight marker.

Σύμφωνα με τη μελέτη, το 90% (27/30) των δειγμάτων οζιδιακού ιστού έφερε αλληλουχίες του EBNA2, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στους αντίστοιχους παρακείμενους φυσιολογικούς θυρεοειδικούς ιστούς, ήταν επίσης 90% (27/30)(Γράφημα 8.7).



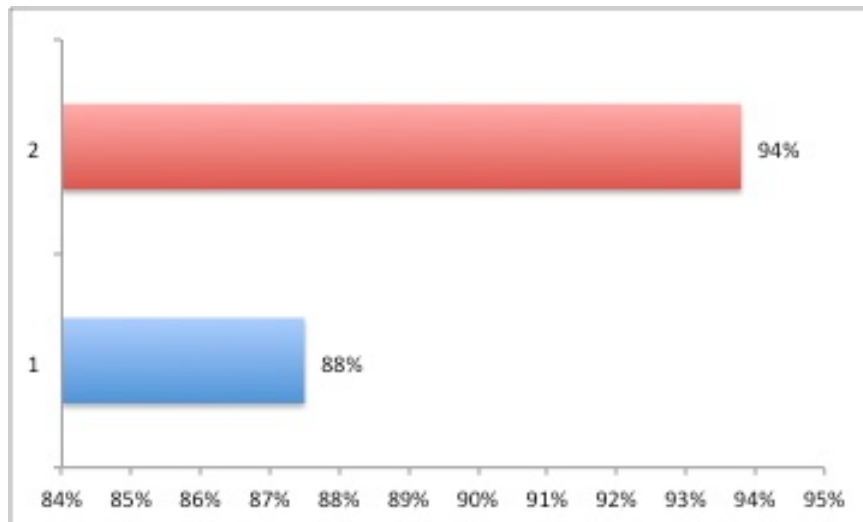
**Γράφημα 8.7.** Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης της αλληλουχίας του γονιδίου EBNA2 στο σύνολο των οζιδίων. Bar No1: ποσοστό θετικών δειγμάτων οζιδιακού ιστού. Bar No2: ποσοστό θετικών δειγμάτων παρακείμενων φυσιολογικών ιστών.

Ειδικότερα, το 92.9% (13/14) των δειγμάτων κακοήθειας περιείχαν αλληλουχίες του EBNA2, σε σύγκριση με το 85.7% των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών (12/14)(Γράφημα 8.8).



**Γράφημα 8.8.** Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης της αλληλουχίας του γονιδίου EBNA2 στα δείγματα θυρεοειδικού καρκίνου. Bar No1: ποσοστό θετικών δειγμάτων καρκινικού ιστού. Bar No2: ποσοστό θετικών δειγμάτων παρακείμενων φυσιολογικών ιστών.

Αλληλουχίες του EBNA2 ανιχνεύθηκαν στο 87.5% (14/16) των δειγμάτων πολυζώδους υπερπλασίας, σε σύγκριση με το 93.8% (15/16) των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών(Γράφημα 8.9).



**Γράφημα 8.9.** Αναπαράσταση των αποτελεσμάτων της ανίχνευσης της αλληλουχίας του γονιδίου EBNA2 στα δείγματα πολυοζώδους υπερπλασίας. Bar No1: ποσοστό θετικών δειγμάτων οζιδιακού ιστού. Bar No2: ποσοστό θετικών δειγμάτων παρακείμενων φυσιολογικών ιστών.

Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα της μελέτης, φαίνονται στον Πίνακα 8.4.

	Tissue	Cancer (%)	Multinodular Hyperplasia (%)	Total nodules (%)
EBNA2 positive samples	Nodular	13/14 (92.9)	14/16 (87.5)	27/30 (90.0)
	Normal	12/14 (85.7)	15/16 (93.8)	27/30 (90.0)

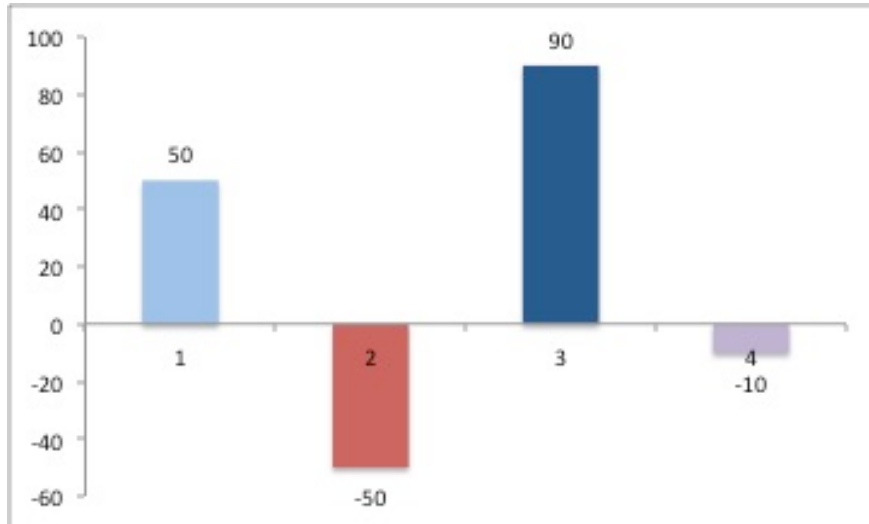
**Πίνακας 8.4.** Συχνότητα της ανίχνευσης των αλληλουχιών του γονιδίου EBNA2 στο σύνολο των οζιδίων, στα δείγματα καρκίνου, στα δείγματα πολυοζώδους υπερπλασίας, καθώς και στους αντίστοιχους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς.

### 8.3.3 Σύγκριση των αποτελεσμάτων *LMP1-EBNA2*

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε σύγκριση των αποτελεσμάτων για τα γονίδια *LMP1* και *EBNA2* του ιού EBV.

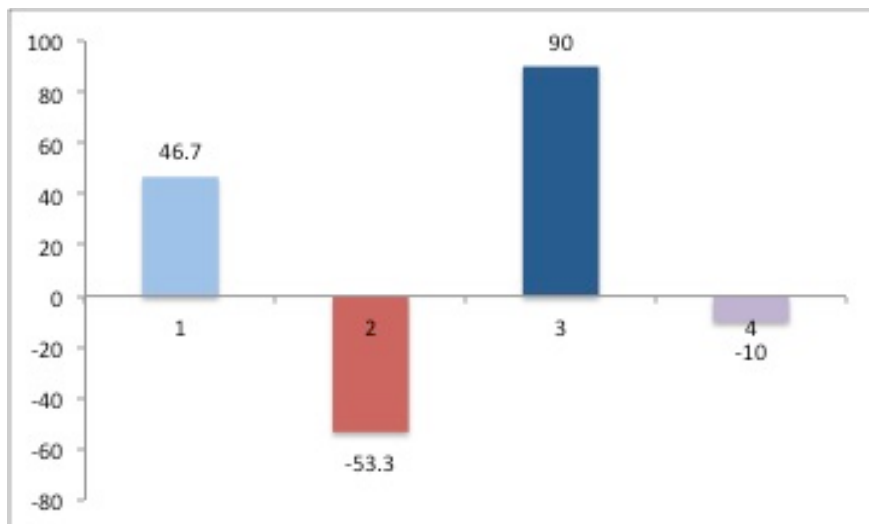
Σύμφωνα με τη στατιστική ανάλυση, η συχνότητα ανίχνευσης της αλληλουχίας του γονιδίου *LMP1* στον οζιδιακό ιστό (15/30 θετικά δείγματα και 15/30 αρνητικά δείγματα), παρουσίασε στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τη συχνότητα ανίχνευσης της αλληλουχίας του γονιδίου *EBNA2* στον ίδιο τύπο ιστού (27/30 θετικά δείγματα και 3/30 αρνητικά δείγματα),  $p=0.0015$  by Fisher's exact test, OR=9.00, 95% CI, 2.24-36.2 (Γράφημα 8.10).





**Γράφημα 8.10.** Αναπαράσταση των θετικών, σε σχέση με τα αρνητικά δείγματα για τα γονίδια LMP1 και EBNA2 στο σύνολο των οζιδίων. Bar No1: θετικά δείγματα για το LMP1 , Bar No2: αρνητικά δείγματα για το LMP1, Bar No3: θετικά δείγματα για το EBNA2 , Bar No4: αρνητικά δείγματα για το EBNA2.

Στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, η συχνότητα ανίχνευσης της αλληλουχίας του γονιδίου *LMP1* (14/30 θετικά δείγματα έναντι 16/30 αρνητικών δειγμάτων), εμφάνισε επίσης στατιστικά σημαντική διαφορά σε σχέση με τη συχνότητα ανίχνευσης της αλληλουχίας του γονιδίου *EBNA2* στον ίδιο τύπο ιστού (27/30 θετικά δείγματα έναντι 3/30 αρνητικών δειγμάτων),  $p=0.0006$  by Fisher's exact test,  $OR=10.3$ , 95% CI, 2.55-41.4.



**Γράφημα 8.11.** Αναπαράσταση των θετικών, σε σχέση με τα αρνητικά δείγματα για τα γονίδια LMP1 και EBNA2 στο σύνολο των παρακείμενων φυσιολογικών ιστών. Bar No1: θετικά δείγματα για το LMP1 , Bar No2: αρνητικά δείγματα για το LMP1, Bar No3: θετικά δείγματα για το EBNA2 , Bar No4: αρνητικά δείγματα για το EBNA2.

### 8.3.4 Ανίχνευση αλληλουχιών του γονιδίου *EBER1*

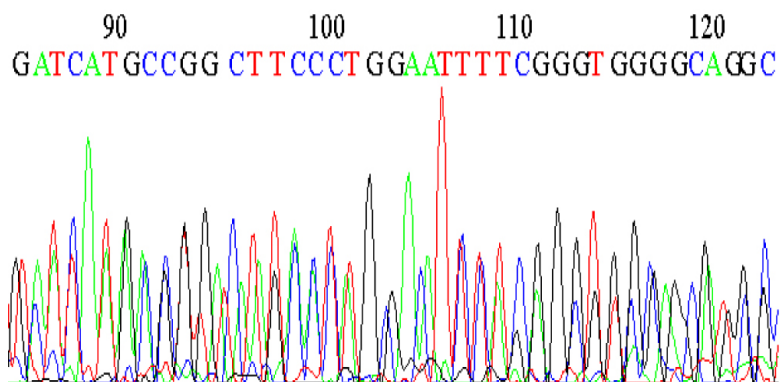
Η αλληλουχία του γονιδίου *EBER1*, δέν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα δείγματα που εξετάστηκαν.

### 8.4 Ανίχνευση αλληλουχιών του του ιού HPV (γονίδιο *L1*)

Η αλληλουχία του γονιδίου *L1* του HPV, δέν ανιχνεύθηκε σε κανένα από τα δείγματα που εξετάστηκαν.

### 8.5 DNA sequencing

Όπως προαναφέρθηκε, μέρος της μελέτης, μετά το πέρας των αντιδράσεων αλυσιδωτής αντίδρασης με τη χρήση πολυμεράσης, αποτέλεσε το DNA sequencing, για την αποφυγή των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα του DNA sequencing, επιβεβαίωσαν την παρουσία ιικού DNA στα δείγματα θυρεοειδούς που μελετήθηκαν (Εικόνα 8.4).



Εικόνα 8.4. DNA sequencing του γονιδίου *EBNA2*.

### 8.6 Συγκεντρωτικά στοιχεία

Τα συγκεντρωτικά στοιχεία για τα 3 γονίδια στα οποία ανιχνεύθηκε ιικό DNA, δηλαδή τα VP1, LMP1 και EBNA2, φαίνονται στον Πίνακα 8.5.

Αρ. δείγματος	Ασθενής (όζος/φυσιολογικός)	VP1 +	VP1 -	LMP1 +	LMP1 -	EBNA2 +	EBNA2 -
1	1 ο	*		*		*	
2	1 φ	*		*		*	
3	2 ο		*	*		*	
4	2 φ		*	*		*	
5	3 ο	*		*		*	
6	3 φ	*		*			*
7	4 ο		*	*		*	
8	4 φ	*		*		*	
9	5 ο	*		*		*	
10	5 φ		*	*		*	
11	6 ο	*		*		*	
12	6 φ	*		*		*	
13	7 ο		*	*		*	
14	7 φ		*	*		*	
15	8 ο	*		*		*	
16	8 φ		*	*		*	
17	9 ο		*		*		*
18	9 φ		*	*		*	
19	10 ο	*		*		*	
20	10 φ		*	*		*	
21	11 ο		*		*	*	
22	11 φ		*	*		*	
23	12 ο		*	*		*	
24	12 φ	*		*		*	
25	13 ο	*		*		*	
26	13 φ		*	*		*	
27	14 ο	*			*	*	
28	14 φ		*		*	*	
29	15 ο		*		*		*
30	15 φ		*		*	*	
31	16 ο		*	*		*	
32	16 φ	*		*		*	
33	17 ο	*		*		*	
34	17 φ		*		*	*	
35	18 ο		*	*		*	
36	18 φ		*		*		*
37	19 ο	*			*	*	
38	19 φ	*			*	*	
39	20 ο		*		*	*	
40	20 φ		*		*	*	
41	21 ο	*			*	*	
42	21 φ		*		*	*	
43	22 ο	*			*	*	
44	22 φ	*			*		*
45	23 ο	*		*		*	
46	23 φ		*		*	*	
47	24 ο	*			*		*
48	24 φ	*			*	*	
49	25 ο	*			*	*	
50	25 φ	*			*	*	
51	26 ο		*		*	*	
52	26 φ	*			*	*	
53	27 ο	*			*	*	
54	27 φ	*			*	*	
55	28 ο		*		*	*	
56	28 φ	*			*	*	
57	29 ο	*			*	*	
58	29 φ		*		*	*	
59	30 ο	*			*	*	
60	30 φ		*		*	*	

Πίνακας 8.5. Συγκεντρωτικά αποτελέσματα από την ανίχνευση ιικού DNA στα δείγματα θυρεοειδούς αδένου που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΧ

## ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, μια ποικιλία ιικών αλληλουχιών ανιχνεύθηκε σε μια σειρά από ζεύγη οζιδιακών (πολυοζώδης υπερπλασία και καρκίνωμα θυρεοειδούς) και αντίστοιχων παρακείμενων φυσιολογικών ιστών. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων μας, έδειξε ότι η οι αλληλουχίες του γονιδίου EBNA2 του ιού EBV, ήταν 9 φορές πιθανότερο ν'ανιχνευθούν στους οζιδιακούς ιστούς, σε σχέση με το γονίδιο LMP1. Παράλληλα, αλληλουχίες του EBNA2 ανιχνεύθηκαν 10 φορές συχνότερα σε σύγκριση με αλληλουχίες του LMP1 σε παρακείμενους φυσιολογικούς θυρεοειδικούς ιστούς.

Σχετικά πρόσφατα αποδείχθηκε η εμπλοκή των ιών στην παθογένεια των νόσων του θυρεοειδούς αδένος [180-190]. Χρησιμοποιώντας ποικίλες μοριακές τεχνικές, αποδείχθηκε πρόσφατα η παρουσία ιικών αλληλουχιών σε δείγματα θυρεοειδικού ιστού (Πίνακας 9.1).

Virus detected/ Nucleic acid	Histopathological Diagnosis	Method	Reference
<b>HSV/DNA</b>	AITD, FA, FTC, FVPC, PTC, ATC	PCR	K. Jensen et al. 2010 [180]
<b>Parvovirus B19/DNA</b>	NTT, PTC, FA, TMC, FTC	Nested PCR	JH. Wang et al. 2008 [181]
<b>Parvovirus B19/DNA</b>	AITD(Hashimoto's thyroiditis), NTT, NTMG, FTC, TMC	Nested PCR	JH. Wang et al. 2010 [182]
<b>Enterovirus/RNA</b>	MG, AITD, FA, PTC, TMC	Real -Time RT PCR	R. Desailoud et al. 2009 [183]
<b>CMV/DNA</b>	Benign thyroid tumor specimens (Not specified)	PCR	JH. Tsai et al. 2005 [184]
<b>HCV/RNA</b>	Not specified	RT PCR	T. Laskus et al. 1998 [185]
<b>SV40/DNA</b>	PTC	PCR, Southern blot	F. Pacini et al. 1998 [186]
<b>SV40/DNA SV40 mRNA</b>	PTC, ATC, NTT, AITD(Grave's disease)	PCR, RT-PCR	A. Vivaldi et al. 2003 [187]
<b>SV40/DNA</b>	PTC, Benign thyroid nodules	PCR	A. Ozdarendeli et al. 2004 [188]
<b>EBV/DNA</b>	TL, CLTH	PCR, Southern blot	Y. Tomita et al.1995 [189]
<b>EBV/DNA</b>	PTC, Undifferentiated carcinoma, SCC	Nested PCR	M. Shimakage et al. 2003 [190]

AITD: autoimmune disease; FA: follicular adenoma; FTC: follicular cancer; PTC: papillary cancer; FVPC: follicular variant of papillary thyroid cancer; ATC: anaplastic cancer; TMC: thyroid medullary cancer; MG: multinodular goiter; NTT: normal thyroid tissue; NTMG: non-toxic multinodular goiter; TL: thyroid lymphoma; CLTH: chronic lymphocytic thyroiditis; SCC: squamous cell cancer

**Πίνακας 9.1.** Ανίχνευση ιικών αλληλουχιών σε δείγματα θυρεοειδούς αδένος.

Στην παρούσα μελέτη, αλληλουχίες του γονιδίου VP1 του BKV, ανιχνεύθηκαν στο 60.0% των θυρεοειδικών οζιδίων. Το αντίστοιχο ποσοστό ανίχνευσης στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, ήταν 43.3%. Συγκεκριμένα, ο BKV ανιχνεύθηκε σε περίπου 6 από τις 10 περιπτώσεις κακοηθειών και βλαβών πολυοζώδους υπερπλασίας.

Η παρούσα μελέτη, είναι η πρώτη που διερευνά την παρουσία αλληλουχιών του BKV σε δείγματα ανθρώπινου θυρεοειδικού ιστού. Τρεις μελέτες [186-188], διερεύνησαν την παρουσία του SV40, ενός polyoma ιού που μολύνει νεφρικά κύτταρα ρέζους πιθήκων, που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του εμβολίου για την πολιομυελίτιδα, σε δείγματα ανθρώπινου θυρεοειδικού ιστού [191]. Καθώς ο SV40 έχει αποδειχθεί καρκινογόνος σε τρωκτικά [186,192,193], κι έχει δυνατότητα εξαλλαγής ανθρώπινων κυττάρων in vitro [186], η ευρεία διάδοση των, μολυσμένων από SV40, εμβολίων στην αρχή της δεκαετίας του 1960, προκάλεσε ανησυχία για τη δυνητική επαγωγή όγκων στους ανθρώπους [192].

Η πρώτη από τις 3 μελέτες, διερεύνησε την παρουσία αλληλουχιών του SV40 σε 69 ασθενείς με θηλώδες καρκίνωμα θυρεοειδούς, χρησιμοποιώντας το στύπωμα κατά Southern (Southern blotting) και την αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση (PCR) [186]. Εκτός από τα θηλώδη καρκινώματα, μελετήθηκαν 7 δείγματα φυσιολογικών θυρεοειδικών ιστών πέριξ των όγκων, 4 δείγματα αίματος από ασθενείς με θηλώδες καρκίνωμα, 1 δείγμα θυρεοειδίτιδας Hashimoto, 5 δείγματα διάχυτης τοξικής βρογχοκήλης, 3 δείγματα μυελοειδούς καρκινώματος θυρεοειδούς και 9 δείγματα καρκινώματος μαστού. Το στύπωμα κατά Southern, που πραγματοποιήθηκε αρχικά, ήταν θετικό για 3 από τα δείγματα θηλώδους καρκινώματος (4.3%). Η PCR, που ακολουθήθηκε από sequencing ανάλυση, επιβεβαίωσε την παρουσία αλληλουχιών του SV40, συμπεριλαμβανομένου του αμινοτελικού άκρου του μείζονος T αντιγόνου, μεγέθους 203 bp, τμήματος του γονιδίου VP1, μεγέθους 294 bp, καθώς και ολόκληρης της ρυθμιστικής περιοχής μεγέθους 483 bp, τα οποία είχαν ενσωματωθεί στο DNA των προαναφερθέντων ιστικών δειγμάτων. Όλα τα υπόλοιπα δείγματα, ήταν αρνητικά για τον ιό SV40 [186]. Η ανοίστοχημεία, που πραγματοποιήθηκε για το μείζον T αντιγόνο, ανέδειξε κυτταροπλασματική στίξη στα 3 δείγματα που ήταν θετικά για τον SV40, σε αντίθεση με τους αρνητικούς μάρτυρες [186].

Μια άλλη μελέτη [187], που συμπεριέλαβε 109 ασθενείς (80 γυναίκες/29 άνδρες), που πραγματοποιήθηκε από την ίδια ερευνητική ομάδα, διερεύνησε την παρουσία DNA του ιού SV40 σε μία ευρύτερη ποικιλία παθολογικών θυρεοειδικών ιστών, στους οποίους συμπεριλαμβάνονταν 29 δείγματα θηλώδους καρκινώματος, 20 μυελοειδή καρκινώματα, 20 αναπλαστικά καρκινώματα, και 20 δείγματα νόσου Graves'. Στη μελέτη συμπεριλήφθησαν δείγματα φυσιολογικού θυρεοειδικού ιστού, 10 παρακείμενου στα θηλώδη καρκινώματα, 10 παρακείμενου στα αναπλαστικά καρκινώματα και 20 από ασθενείς με πολυοζώδη βρογχοκήλη. Επίσης, αναλύθηκαν 20 δείγματα περιφερικού αίματος από συγγενείς ασθενών με σποραδικό μυελοειδές καρκίνωμα θυρεοειδούς. Η ανάλυση με αλυσιδωτή αντίδραση με πολυμεράση του αμινοτελικού άκρου του μείζονος αντιγόνου (Tag) του ιού SV40, μεγέθους 172 bp, καθώς και ο filter υβριδισμός, επιβεβαίωσαν την παρουσία ιικών αλληλουχιών, σ'ένα ποσοστό που κυμαινόταν από 66% στα θηλώδη καρκινώματα ( $P=0.02$ ), έως και 100% στα αναπλαστικά

καρκινώματα ( $P=0.01$ ), ενώ το 90% των μυελοειδών καρκινωμάτων, ήταν θετικά για την αλληλουχία ( $P=0.01$ ). Αλληλουχίες του SV40 ανιχνεύθηκαν σε παρόμοια ποσοστά, που κυμαίνονταν μεταξύ 60-100% στους αντίστοιχους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά ανίχνευσης σε δείγματα που ελήφθησαν από ασθενείς με πολυοζώδη βρογχοκήλη και νόσο του Grave's, ήταν 10% και 20% αντιστοίχως. Όσον αφορά τα δείγματα αίματος, 25% από αυτά, ήταν θετικά για την παρουσία DNA από το SV40 Tag [187]. Τα θετικά δείγματα, αναλύθηκαν περαιτέρω για την παρουσία αλληλουχιών της ρυθμιστικής και της VP1 περιοχής του SV40, μεγέθους 314bp και 294bp αντίστοιχα [187]. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν με την πραγματοποίηση DNA sequencing. Η επακόλουθη PCR πραγματικού χρόνου (RT-PCR) που πραγματοποιήθηκε στα 24 δείγματα θυρεοειδικού καρκίνου στα οποία είχε ανιχνευτεί DNA του SV40 με τη συμβατική PCR, ανίχνευσε mRNA ειδικό για το Tag του SV40 στο 69% (9/13) των δειγμάτων θηλώδους καρκινώματος, και στο 73% (8/11) των δειγμάτων αναπλαστικού καρκινώματος. Καί τα 30 δείγματα που είχαν βρεθεί να είναι αρνητικά για το DNA του SV40, ήταν αρνητικά για την παρουσία mRNA του SV40 με την RT-PCR. Τελικά, πραγματοποιήθηκε ανοσοϊστοχημεία στα δείγματα που είχαν βρεθεί θετικά με την RT-PCR, ενώ τα 30 δείγματα που ήταν αρνητικά για τον SV40, χρησιμοποιήθηκαν σαν αρνητικοί μάρτυρες. Το 33% (3/9) των δειγμάτων θηλώδους καρκινώματος και το 100% (8/8) των δειγμάτων αναπλαστικού καρκινώματος ήταν θετικά, και είχαν κυρίως κυτταροπλασματική στίξη.

Η τρίτη μελέτη περιελάμβανε 99 ασθενείς (21 άνδρες/78 γυναίκες) με οζίδια θυρεοειδούς, 8 από τους οποίους (8.08%) είχαν διαγνωστεί με θηλώδες καρκίνωμα, ενώ 91 από αυτούς (91.02%) είχαν καλοήγη οζίδια, 8 από τα οποία είχαν στοιχεία θυρεοειδίτιδας Hashimoto [188]. Τόσο οζώδης, όσο και φυσιολογικός ιστός ελήφθη από κάθε ασθενή. Καί τα 198 δείγματα διερευνήθηκαν για την παρουσία του SV40, μέσω ενίσχυσης των αλληλουχιών που κωδικοποιούν το Tag, με τη χρήση της PCR [188]. Αλληλουχίες του ανιχνεύθηκαν σε 4 από τα 99 οζίδια, 2 από τα οποία αντιστοιχούσαν σε θηλώδες καρκίνωμα, ενώ τα υπόλοιπα ήταν καλοήγη οζίδια. Η παρουσία του DNA του SV40 στα θυρεοειδικά οζίδια επιβεβαιώθηκε με ανάλυση sequencing με τη χρήση του SV40P1 εκκινητή, και με κλωνοποίηση του προϊόντος της PCR, μεγέθους 243bp, στο φορέα κλωνοποίησης TopoXL [188].

Η συχνότητα ανίχνευσης αλληλουχιών του EBV, ήταν παρόμοια στον οζιδιακό και τον παρακείμενο φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό. Οι αλληλουχίες του LMP1, ανευρέθηκαν στο 50% των θυρεοειδικών οζιδίων, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς ήταν 46.7%. Οι αλληλουχίες του LMP1 ανιχνεύθηκαν στο 57.1 % των δειγμάτων θηλώδους καρκινώματος, και στο 43.8% των δειγμάτων πολυοζώδους υπερπλασίας. Οι αλληλουχίες του EBNA2, ανιχνεύθηκαν σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό τόσο στον οζιδιακό, όσο και στον παρακείμενο φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό, όπως προαναφέρθηκε. Αλληλουχίες του EBNA2 ανιχνεύθηκαν στο 90% των κακοήθων βλαβών, και στο 87.5% των βλαβών πολυοζώδους υπερπλασίας. Τα υψηλά ποσοστά ανίχνευσης του EBV, συμβαδίζουν με τα υψηλά ποσοστά της προσφάτως ανακοινωθείσας οροθετικότητας του EBV, που αγγίζει το 87% [194].

Η ανίχνευση αλληλουχιών DNA του EBV σε δείγματα θυρεοειδικού καρκίνου, έχει αποδειχθεί αμφιλεγόμενη [184,189,190,195-198]. Η ικανότητα του EBV να παραμένει χρονίως

στα Β-λεμφοκύτταρα, και η εμπλοκή του στην ανάπτυξη Β-κυτταρικών λεμφωμάτων [102], οδήγησε στην αρχική διερεύνηση των λεμφωμάτων του θυρεοειδούς αδένου, για την παρουσία του ιού [189,195,196]. Μετέπειτα μελέτες, διερεύνησαν την παρουσία του EBV σε άλλους τύπους κακοηθειών του θυρεοειδούς αδένου [190].

Τρεις μελέτες, διερεύνησαν την παρουσία του EBV σε δείγματα λεμφώματος θυρεοειδούς [189,195,196]. Η παρουσία τόσο του mRNA του EBV, όσο και των αντίστοιχων πρωτεϊνικών προϊόντων, διερευνήθηκαν σε 32 δείγματα λεμφώματος θυρεοειδούς, και σε 30 δείγματα θυρεοειδίτιδας Hashimoto, με τη χρήση in situ υβριδισμού και ανοσοϊστοχημείας [195]. Η παρουσία του EBER, αναδείχθηκε σε 3 δείγματα λεμφώματος θυρεοειδούς, ενώ γονιδιακά παράγωγα -οι πρωτεΐνες BHLF1, LMP, and BZLF1- ανιχνεύθηκαν σε 2 από τα θετικά για EBER δείγματα [195]. Η δεύτερη μελέτη, συμπεριέλαβε 30 ασθενείς με λέμφωμα θυρεοειδούς και 28 ασθενείς με χρόνια λεμφοκυτταρική θυρεοειδίτιδα (10 άνδρες/48 γυναίκες). Μόνο 24 δείγματα λεμφώματος και 16 δείγματα χρόνιας λεμφοκυτταρικής θυρεοειδίτιδας χρησιμοποιήθηκαν τελικά στη μελέτη, καθώς το DNA των υπόλοιπων δειγμάτων ήταν ανεπαρκώς διατηρημένο, οπότε αποκλείστηκαν από τη μελέτη [189]. Η ενίσχυση με PCR ανέδειξε την παρουσία γονιδιακών παραγώγων του EBV σε 1 δείγμα χρόνιας λεμφοκυτταρικής θυρεοειδίτιδας, και 2 δείγματα λεμφώματος θυρεοειδούς, ενώ ο in situ υβριδισμός, είχε θετικό σήμα στον πυρήνα καρκινικών κυττάρων μόνο σε 1 εκ των 2 θετικών απ'την PCR λεμφωμάτων θυρεοειδούς, ενώ το LMP1 εκφραζόταν επίσης στο κυτταρόπλασμα των κυττάρων του λεμφώματος [189]. Η τρίτη και πιο πρόσφατη μελέτη, ανέλυσε τα κλινικοπαθολογικά χαρακτηριστικά των πρωτοπαθών και δευτεροπαθών λεμφωμάτων θυρεοειδούς του Κινεζικού πληθυσμού του Hong Kong σε μια περίοδο 3 δεκαετιών και διερεύνησε την έκφραση των γονιδίων του EBV με τη χρήση in situ υβριδισμού και ανοσοϊστοχημείας [196]. Η μελέτη συμπεριέλαβε 23 ασθενείς με πρωτοπαθή νόσο, 15 από τους οποίους είχαν θυρεοειδίτιδα Hashimoto, καθώς και 9 ασθενείς με δευτεροπαθή νόσο. Η παρουσία mRNA του EBV, ανεδείχθη σε 1 πρωτοπαθές και 1 δευτεροπαθές λέμφωμα θυρεοειδούς [196].

Η συμμετοχή του EBV στην εξέλιξη του καρκίνου του θυρεοειδούς, η οποία ορίζεται ως η σταδιακή αποδιαφοροποίηση των καρκινικών κυττάρων, που τελικά οδηγεί σ'ένα περισσότερο αδιαφοροποίητο τύπο καρκίνου, μελετήθηκε πρόσφατα [190]. Για την διεξαγωγή της μελέτης, χρησιμοποιήθηκαν 10 δείγματα θηλώδους καρκινώματος θυρεοειδούς, φυσιολογικός θυρεοειδικός ιστός από την περιφέρεια τεσσάρων από τα θηλώδη καρκινώματα, 11 δείγματα αδιαφοροποίητου καρκινώματος θυρεοειδούς, 1 δείγμα θυρεοειδικού καρκινώματος εκ πλακωδών κυττάρων, καθώς και αρνητικοί μάρτυρες στους οποίους συμπεριλαμβάνονταν 2 δείγματα οζώδους υπερπλασίας και 2 δείγματα νόσου Graves', όλα εκ των οποίων ελήφθησαν από Ιάπωνες ασθενείς. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε PCR, reverse-transcriptase PCR, in situ υβριδισμού του mRNA, και έμμεσο ανοσοφθορισμό. Η PCR πραγματοποιήθηκε σε συνολικά 13 δείγματα (9 θηλώδη καρκινώματα, 3 αδιαφοροποίητα καρκινώματα και 1 θυρεοειδικό καρκίνωμα εκ πλακωδών κυττάρων), όλα εκ των οποίων ανέδειξαν ενίσχυση του DNA του EBV στην περιοχή του *BamHIW* γονιδίου. Ο in situ υβριδισμός, για την ανίχνευση της έκφρασης του mRNA του EBV, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας *BamHIW*, EBER1 and EBNA2 probes, ενώ



ο ανοσοφθορισμός για την ανίχνευση των πρωτεϊνών του EBV, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας 4 μονοκλωνικά αντισώματα, το αντι-EBNA2, το αντι-LMP1, το αντι-BZLF1 και το αντι-CD21. Παρά το γεγονός ότι η λοίμωξη από τον EBV και η παρουσία του mRNA και των πρωτεϊνών του ιού ανιχνεύθηκε σε όλα τα δείγματα καρκινώματος ανεξαρτήτως από το βαθμό ιστολογικής διαφοροποίησης, η έκφραση τόσο του mRNA, όσο και των πρωτεϊνών του ιού, ήταν πολύ πιο εμφανής στα αδιαφοροποίητα καρκινώματα. Τόσο τα δείγματα φυσιολογικού θυρεοειδικού ιστού, όσο και τα δείγματα πολυοζώδους υπερπλασίας και νόσου Graves', ήταν αρνητικά κατά τον *in situ* υβριδισμό [190].

Σε αντίθεση με τις ανωτέρω αναφερθείσες μελέτες, αρνητικά αποτελέσματα σχετικά με το συσχετισμό του EBV με το θυρεοειδικό καρκίνο, έχουν επίσης ανακοινωθεί [184,197,198]. Κανένα από τα 45 δείγματα θηλώδους καρκινώματος που ελήφθησαν από ασθενείς στο νότιο Kyushu, στην Ιαπωνία, και υπεβλήθησαν σε *in situ* υβριδισμό για το EBER1, δεν ήταν θετικό για τον EBV, παρά το γεγονός ότι λίγα λεμφοκύτταρα που βρέθηκαν εντός ενός από τα δείγματα (2.2%), ανέδειξαν θετικότητα για το EBER1 [197]. Επιπλέον, δεν ανεδείχθη θετικό αποτέλεσμα για τον EBV σε κανένα από τα 12 δείγματα που ελήφθησαν από ασθενείς (11 females/1 male) με ογκοκυτταρικό θηλώδες καρκίνωμα με λεμφοειδές στρώμα (Warthin-like tumor), με την PCR, τον *in situ* υβριδισμό για το EBER, και την ανοσοϊστοχημεία [198]. Τέλος, καί τα 16 δείγματα καλοήθων όγκων θυρεοειδούς που ελήφθησαν από γυναίκες 34-56 ετών από την Ταϊβάν, και χρησιμοποιήθηκαν σαν δείγματα-μάρτυρες σε μια μελέτη που συσχέτισε τον μή-οικογενή καρκίνο του μαστού με ιογενείς παράγοντες, ήταν αρνητικά για τον EBV μετά από έλεγχο με PCR και υβριδισμό κατά Southern [184].

Η ανεύρεση των αλληλουχιών του VP1, του LMP1 και του EBNA2, ήταν συχνή, τόσο σε οζώδη, όσο και σε φυσιολογικό θυρεοειδικό ιστό, όπως ανέδειξε η παρούσα μελέτη. Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τ'αποτελέσματα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η "λοίμωξη" από τον EBV και τον BKV, αποτελεί ένα πρώιμο σύμβαμα, το οποίο προφανώς συμβαίνει σε φυσιολογικό ιστό. Όσον αφορά τις αλληλουχίες του LMP1, παρατηρήθηκε ότι αυτές ανιχνεύθηκαν συχνότερα στα κακοήθη δείγματα, συγκριτικά με τα δείγματα φυσιολογικού ιστού.

Τα ευρήματά μας, δεν επιτρέπουν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με το δυνητικά ογκογόνο ρόλο των εξετασθέντων ιών και πιθανώς συνιστούν ένα μοτίβο συνύπαρξης, ή "ενδημικότητας", παρά ένα αιτιογενετικό παράγοντα.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι η παρούσα μελέτη είχε σαφείς περιορισμούς, καθώς ο αριθμός των εξετασθέντων δειγμάτων ήταν μικρός, ενώ όλα τα δείγματα προέρχονταν από το ίδιο νοσοκομείο. Χρειάζονται περαιτέρω μελέτες, ώστε να εκτιμηθούν αυτές οι παρατηρήσεις σε σχέση με τοπικοπεριοχικά χαρακτηριστικά.



## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Townsend CM, Beauchamp RD, Evers BM, Mattox KL eds. Sabiston Textbook of Surgery 18<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders W.B. Co. 2008.
2. Brunicaardi FC, Andersen DK, Billiar TR, Dunn DL, Hunter JG, Matthews JB, Pollock RE eds. Schwartz's Principles of Surgery 9<sup>th</sup> ed. New York: Mc Graw – Hill 2009.
3. Bhajjee F, Nikiforov YE (2011). Molecular Analysis of Thyroid Tumors. *Endocr Pathol* 22:126-33.
4. Nikiforov YE (2011). Molecular analysis of thyroid tumors. *Modern Pathology* 24:S34-S43.
5. Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW 2nd, Tallini G, et al. (2003). RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2318-26.
6. Ricarte-Filho JC, Ryder M, Chitale DA, Rivera M, Heguy A, Ladanyi M, et al. (2009). Mutational profile of advanced primary and metastatic radioactive iodine-refractory thyroid cancers reveals distinct pathogenetic roles for BRAF, PIK3CA, and AKT1. *Cancer Res* 69:4885-93.
7. Roy M, Chen H, Sippel RS (2013). Current understanding and management of medullary thyroid cancer. *Oncologist* 18:1093-100.
8. Spandidos, D. A. (2004). "The cancer story." *Cancer Biol Ther* 3(11): 1184-6.
9. Smith, G., L. A. Stanley, et al. (1995). "Metabolic polymorphisms and cancer susceptibility." *Cancer Surv* 25: 27-65.
10. Mulligan, R. C. (1993). "The basic science of gene therapy." *Science* 260(5110): 926-32.
11. Javier RT, Butel JS. (2008). The history of tumor virology. *Cancer Res* 68:7693-7706.
12. Rous P (1911). A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exp Med* 13:397-411.
13. Zhang X, Zhang Z, Zheng B, He Z, Winberg G, Ernberg I. (2013). An update on viral association of human cancers. *Arch Virol* 158:1433-43.

14. Bittner JJ (1936). Some possible early effects of nursing on the mammary gland tumor incidence in mice. *Science* 84:162.
15. Gross L (1951). "Spontaneous" leukemia developing in C3H mice following inoculation in infancy, with AK-leukemic extracts, or AK-embryos. *Proc Soc Exp Biol Med* 76:27-32.
16. Epstein MA, Barr YM, Achong BG (1965). Studies with Burkitt's lymphoma. *Wistar Inst Symp Monogr* 4:69-82.
17. Beral V (1974). Cancer of the cervix: a sexually transmitted infection? *Lancet* 1:1037-40.
18. Zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW (1974). Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 13:650-6.
19. Vogel CL, Anthony PP, Mody N, Barker LF (1970). Hepatitis-associated antigen in Ugandan patients with hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2:621-4.
20. Vogel CL, Anthony PP, Sadikali F, Barker LF, Peterson MR (1972). Hepatitis-associated antigen and antibody in hepatocellular carcinoma: results of a continuing study. *J Natl Cancer Inst* 48:1583-8.
21. Zur Hausen H (1991). Viruses in human cancers. *Science* 254:1167-73.
22. Parkin DM (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer* 118:3030-44.
23. Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles DM, et al. (1994). Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266:1865-9.
24. Schalling M, Ekman M, Kaaya EE, Linde A, Biberfeld P (1995). A role for a new herpes virus (KSHV) in different forms of Kaposi's sarcoma. *Nat Med* 1:707-8.
25. Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW, Knowles DM (1995). Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas. *N Engl J Med* 332:1186-91.
26. Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS (2008). Clonal integration of a polyomavirus in human merkel cell carcinoma. *Science* 319:1096-100.
27. Zheng ZM (2010). Viral oncogenes, noncoding RNAs, and RNA splicing in human tumor viruses. *Int J Biol Sci* 6:730-55.

28. Fuentes-Gonzalez AM, Contreras-Paredes A, Manzo-Merino J, Lizano M (2013). The nodulation of apoptosis by oncogenic viruses. *Virology* 6;10:182.
29. Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B (1971). New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1:1253-7.
30. Imperiale MJ (2000). The human polyomaviruses, BKV and JCV: molecular pathogenesis of acute disease and potential role in cancer. *Virology* 267:1-7.
31. Imperiale MJ (2001). Oncogenic transformation by the human polyomaviruses. *Oncogene* 20:7917-23.
32. Tognon M, Corallini A, Martini F, Negrini M, Barbanti-Brodano G (2003). Oncogenic transformation by BK virus and association with human tumors. *Oncogene* 22:5192-200.
33. Rayment I, Baker TS, Caspar DL, Murakami WT (1982). Polyoma virus capsid structure at 22.5 Å resolution. *Nature* 295:110-5.
34. Liddington RC, Yan Y, Moulai J, Sahli R, Benjamin TL, Harrison SC (1991). Structure of simian virus 40 at 3.8-Å resolution. *Nature* 354:278-84.
35. Li TC, Takeda N, Kato K, Nilsson J, Xing L, Haag L et al. (2003). Characterization of self-assembled virus-like particles of human polyomavirus BK generated by recombinant baculoviruses. *Virology* 311:115-24.
36. Nilsson J, Miyazaki N, Xing L, Wu B, Hammar L, Li TC et al. (2005). Structure and assembly of a T-1 virus-like particle in BK polyomavirus. *J Virol* 79:5337-45.
37. Stehle T, Gamblin SJ, Yan Y, Harrison SC (1996). The structure of simian virus 40 refined at 3.1 Å resolution. *Structure* 4:165-82.
38. Cole CN, Conzen SD. Polyomaviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields virology*, vol. 2, Fourth ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. P. 2141-74.
39. Abend JR, Joseph AE, Das D, Campbell-Cecen DB, Imperiale MJ (2009). A truncated T antigen expressed from an alternatively spliced BK virus early mRNA. *J Gen Virol* in press.
40. Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ (2006). Identification of gangliosides GD1b and GT1b as receptors for BK virus. *J Virol* 80:1361-6.

41. Jiang M, Abend JR, Tsai B, Imperiale MJ (2009). Early events during BK virus entry and disassembly. *J Virol* 83:1350-8.
42. Moriyama T, Marquez JP, Wakatsuki T, Sorokin A (2007). Caveolar endocytosis is critical for BK virus infection of human renal proximal tubular epithelial cells. *J Virol* 81:8552-62.
43. Moriyama T, Sorokin A (2008). Intracellular trafficking pathway of BK virus in human renal proximal tubular epithelial cells. *Virology* 371:336-49.
44. Waga S, Bauer G, Stillman B (1994). Reconstitution of complete SV40 DNA replication with purified replication factors. *J Biol Chem* 269:10923-34.
45. Knowles WA (2006). Discovery and epidemiology of the human polyomavirus BK virus (BKV) and JC virus (JCV). *Adv Exp Med Biol* 577:19-45.
46. Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, van Strien A, van der Noordaa J (1982). The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol* 10:91-9.
47. Bofill-Mas S, Formiga-Cruz M, Clemente-Casares P, Calafell F, Girones R (2001). Potential transmission of human polyomaviruses through the gastrointestinal tract after exposure to virions or viral DNA. *J Virol* 75:10290-9.
48. Bofill-Mas S, Pina S, Girones R (2000). Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl Environ Microbiol* 66:238-45.
49. Hirsch HH, Steiger J (2003). Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 3:611-23.
50. Chesters PM, Heritage J, Mc Cance DJ (1983). Persistence of DNA sequences of BK virus and JC virus in normal human tissues and in diseased tissues. *J Infect Dis* 147:676-84.
51. Heritage J, Chesters PM, Mc Cance DJ (1981). The persistence of papovavirus BK DNA sequences in normal renal tissue. *J Med Virol* 8:143-50.
52. Nickeleit V, Singh HK, Mihatsch MJ (2003). Polyomavirus nephropathy: morphology, pathophysiology, and clinical management. *Curr Opin Nephrol Hypertension* 12:599-605.
53. Shinohara T, Matsuda M, Cheng SH, Marshall J, Fujita M, Nagashima K (1993). BK virus infection of the human urinary tract. *J Med Virol* 41:301-5.

54. Dorries K (2006). Human polyomavirus JC and BK persistent infection. *Adv Exp Med Biol* 577:102-16.
55. Elsner C, Dorries K (1992). Evidence of human polyomavirus BK and JC infection in normal brain tissue. *Virology* 191:72-80.
56. Monini P, Rotola A, Di Luca D, De Dellis L, Chiari E, Corallini A, et al. (1995). DNA rearrangements impairing BK virus productive infection in urinary tract tumors. *Virology* 214:273-9.
57. Martini F, Iaccheri L, Martinelli M, Martinello R, Grandi E, Mollica G, et al. (2004). Papilloma and polyoma DNA tumor virus sequences in female genital tumors. *Cancer Invest* 22:697-705.
58. Chatterjee M, Weyandt TB, Frisque RJ (2000). Identification of archetype and rearranged forms of BK virus in leukocytes from healthy individuals. *J Med Virol* 60:353-62.
59. Pietropaolo V, Fioriti D, Simeone P, Videtta M, Di Taranto C, Arancio A et al. (2003). Detection and sequence analysis of human polyomaviruses DNA from autoptic samples of HIV-1 positive and negative subjects. *Int J Immunopathol Pharmacol* 16:269-76.
60. Dorries K, Vogel E, Gunther S, Czub S (1994). Infection of human polyomaviruses JC and BK in peripheral blood leukocytes from immunocompetent individuals. *Virology* 198:59-70.
61. Chang D, Wang M, Ou WC, Lee MS, Ho HN, Tsai RT (1996). Genotypes of human polyomaviruses in urine samples of pregnant women in Taiwan. *J Med Virol* 48:95-101.
62. Doerries K. Latent and persistent polyomavirus infection. In: Khalili K, Stoner GL, eds. *Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives*. New York: Wiley-Liss;2001:p.197-235.
63. Arthur RR, Shah KV (1989). The occurrence and significance of papovaviruses BK and JC in the urine. *Prog Med Virol* 36:42-61.
64. Markowitz RB, Eaton BA, Kubik MF, Latorra D, McGregor JA, Dynan WS (1991). BK virus and JC virus shed during pregnancy have predominantly archetypal regulatory regions. *J Virol* 65:4515-9.

65. Jiang M, Abend JR, Johnson SF, Imperiale MJ (2009). The role of polyomaviruses in human disease. *Virology* 384:266-73.
66. Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, Sebille V, Andre-Garnier E, Imbert-Marcille BM (2005). A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant patients. *Am J Transplant* 5:1926-33.
67. Egli A, Binggeli S, Bodaghi S, Dumoulin A, Funk GA, Khanna N et al. (2007). Cytomegalovirus and polyomavirus BK posttransplant. *Nephrol Dial Transplant* 22:viii72-82.
68. Hirsch HH, Knowles W, Dickenmann M, Passweg J, Klimkait T, Mihatsch MJ et al. (2002). Prospective study of polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *N Engl J Med* 347:488-96.
69. Fogazzi GB, Cantu M, Saglimbeni L (2001). "Decoy cells" in the urine due to polyomavirus BK infection:easily seen by phase-contrast microscopy. *Nephrol Dial Transplant* 16:1496-8.
70. Bogdanovic G, Priftakis P, Giraud G, Kuzniar M, Ferraldeshi R, Kokhaei P et al. (2004). Association between a high BK virus load in urine samples of patients with graft-versus-host disease and development of hemorrhagic cystitis after hematopoietic stem cell transplantation. *J Clin Microbiol* 42:5394-6.
71. Sundsfjord A, Osei A, Rosenqvist H, Van Ghelue M, Silsand Y, Haga HJ, et al. (1999). BK and JC viruses in patients with systemic lupus erythematosus: prevalent and persistent BK viruria, sequence stability of the viral regulatory regions, and nondetectable viremia. *J Infect Dis* 180:1-9.
72. Munoz P, Fogeda M, Bouza E, Verde E, Palomo J, Banares R (2005). Prevalence of BK virus replication among recipients of solid organ transplants. *Clin Infect Dis* 41:1720-5.
73. Rinaldo CH, Hirsch HH (2007). Antivirals for the treatment of polyomavirus BK replication. *Expert Rev Anti Infect Ther* 5:105-15.
74. Costa J, Howley PM, Legallais F, Yee C, Young N, Rabson AS (1977). Oncogenicity of a nude mouse cell line transformed by a human papovavirus. *J Natl Cancer Inst* 58:1147-9.



75. Grossi MP, Corallini A, Valieri A, Balboni PG, Poli F, Caputo A et al. (1982). Transformation of hamster kidney cells by fragments of BK virus DNA. *J Virol* 41:319-25.
76. Grossi MP, Caputo A, Meneguzzi G, Corallini A, Carra L, Portolani M, et al. (1982). Transformation of human embryonic fibroblasts by BK virus, BK virus DNA and a subgenomic BK virus DNA fragment. *J Gen Virol* 63:393-403.
77. Major EO, Di Mayorca G (1973). Malignant transformation of BHK21 clone 13 cells by BK virus- a human papovavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 70:3210-2.
78. Mason Jr DH, Takemoto KK (1977). Transformation of rabbit kidney cells by BKV(MM) human papovavirus. *Int J Cancer* 19:391-5.
79. Pagnani M, Corallini A, Caputo A, Altavilla G, Selvatici R, Catozzi L, et al. (1988). Co-operation in cell transformation between BK virus and the human c-Harvey-ras oncogene. *Int J Cancer* 42:405-13.
80. Portolani M, Barbanti-Brodano G, Placa ML (1975). Malignant transformation of hamster kidney cells by BK virus. *J Gen Virol* 38:369-74.
81. Portolani M, Borgatti M (1978). Stable transformation of mouse, rabbit and monkey cells and abortive transformation of human cells by BK virus, a human papovavirus. *J Gen Virol* 38:369-74.
82. Seehafer J, Downer DN, Salmi A, Colter JS (1979). Isolation and characterization of BK virus-transformed rat and mouse cells. *J Gen Virol* 42:567-78.
83. Seehafer J, Salmi A, Colter JS (1977). Isolation and characterization of BK-virus transformed hamster cells. *Virology* 77:356-66.
84. Takemoto KK, Martin MA (1975). Transformation of hamster kidney cells by BK papovavirus DNA. *J Virol* 17:247-53.
85. Tanaka R, Koprowski H, Iwasaki Y (1976). Malignant transformation of hamster brain cells in vitro by human papovavirus BK. *J Natl Cancer Inst* 56:671-3.
86. van der Noordaa J (1976). Infectivity, oncogenicity and transforming ability of BK virus and BK virus DNA. *J Gen Virol* 30:371-3.

87. Vasavada R, Eager KB, Barbanti-Brodano G, Caputo A, Ricciardi RP (1986). Adenovirus type 12 early region 1 A proteins repress class I HLA expression in transformed human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5257-61.
88. Watanabe S, Kotake S, Nozawa A, Muto T, Uchida S (1982). Tumorigenicity of human BK papovavirus plaque isolates, wild-type and plaque morphology mutant, in hamsters. *Int J Cancer* 29:583-6.
89. Corallini A, Tongton M, Negrini M, Barbanti-Brodano G. Evidence for BK virus as a human tumor virus. In:Khalili K, Stoner GL eds. *Human polyomaviruses: molecular and clinical perspectives*. New York: Wiley-Liss Inc.;2001. p.431-60.
90. Harris KF, Christensen JB, Imperiale MJ (1996). BK virus large T antigen: interactions with the retinoblastoma family of tumor suppressor proteins and effects on cellular growth control. *J Virol* 70:2378-86.
91. Harris KF, Christensen JB, Radany EH, Imperiale MJ (1998). Novel mechanisms of E2F induction by BK virus large -T antigen:requirement of both the pRb-binding and the J domains. *Mol Cell Biol* 18:1746-56.
92. Rundell K, Major EO, Lampert M (1981). Association of cellular 56,000- and 32,000-molecular-weight protein with BK virus and polyoma virus t-antigens. *J Virol* 37:1090-3.
93. Sontag E, Fedorov S, Kamibayashi C, Robbins D, Cobb M, Mumby M (1993). The interaction of SV40 small tumor antigen with protein phosphatase 2 A stimulates the map kinase pathway and induces cell proliferation. *Cell* 75:887-97.
94. Emerson LL, Carney HM, Layfield LJ, Sherbotie JR (2008). Collecting duct carcinoma arising in association with BK nephropathy post-transplantation in a pediatric patient. A case report with immunohistochemical and in situ hybridization study. *Pediatr Transplant* 12:600-5.
95. Geetha D, Tong BC, Racusen L, Markowitz JS, Westra WH (2002). Bladder carcinoma in a transplant recipient:evidence to implicate the BK human polyomavirus as a causal transforming agent. *Transplantation* 73:1933-6.
96. Narayanan M, Szymanski J, Slavcheva E, Rao A, Kelly A, Jones K, Jaffers G (2007). BK virus associated renal cell carcinoma:case presentation with optimized PCR and other diagnostic tests. *Am J Transplant* 7:1666-71.

97. Kausman JY, Somers GR, Francis DM, Jones CL (2004). Association of renal adenocarcinoma and BK virus nephropathy post transplantation. *Pediatr Nephrol* 19:459-62.
98. Loghavi S, Bose S (2011). Polyomavirus infection and urothelial carcinoma. *Diagn Cytopathol* 39:531-7.
99. Abend JR, Jiang M, Imperiale MJ (2009). BK virus and human cancer:innocent until proven guilty. *Semin Cancer Biol* 19:252-60.
100. Giraud G, Ramqvist T, Ragnarsson -Olding B, Dalianis T (2008). DNA from BK virus, JC virus, KI, WU and MC polyomaviruses as well as from Simian Virus 40 is not detected in non-UV light associated primary malignant melanomas of mucous membranes. *J Clin Microbiol* 46:3595-8.
101. Bouvard V, Baan RA, Grosse Y, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L et al. (2012). WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, 2012. Carcinogenicity of malaria and of some ppolyomaviruses. *Lancet Oncol* 13:339-40.
102. Sarid R, Gao SJ (2011). Viruses and human cancer:From detection to causality. *Cancer Letters* 305:218-27.
103. Burkitt DP (1983). The discovery of Burkitt's lymphoma. *Cancer* 51:1777-86.
104. Bornkamm GW (2009). Epstein-Barr virus and its role in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma:an unresolved issue. *Semin Cancer Biol* 19:351-65.
105. Grinde B (2013). Herpesviruses:latency and reactivation-viral strategies and host response. *J Oral Microbiology* 25;5.
106. Kutok JL, Wang F (2006). Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* 1:375-404.
107. Given D, Yee D, Griem K, Kieff E (1979). DNA of Epstein-Barr virus. V. Direct repeats of the ends of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* 30:852-62.
108. Cai X, Schafer A, Lu S, Bilello JP, Desrosiers RC, Edwards R, Raab-Traub N, Cullen BR (2006). Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathol* 2(Suppl 3):e23.
109. van der Bosch CA (2004). Is endemic Burkitt's lymphoma an alliance between three infections and a tumour promoter? *Lancet Oncol* 5:738-46.

110. Polack A, Hortnagel K, Pajic A, Christoph B, Baier B, Falk M, et al. (1996). c-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:10411-6.
111. Rickinson AB (2014). Co-infections, inflammation and oncogenesis:future directions for EBV research. *Semin Cancer Biol* 26:99-115.
112. Longnecker R, Kieff E, Cohen JI. Epstein-Barr virus. In:Knipe, Howley PM, Cohen JI, Griffith DE, Lamb RA, Martin RA, Racaniello V, Roizman B, eds. *Fields virology*. 6<sup>th</sup> ed. Philadelphia:Lippincott Williams & Wilkins;2013. p.1898-959.
113. Hislop AD, Taylor GS, Sauce D, Rickinson AB (2007). Cellular responses to viral infection in humans: lessons from Epstein-Barr virus. *Annu Rev Immunol* 25:587-617.
114. Rickinson AB, Long HM, Palendira U, Munz C, Hislop AD. Cellular immune controls over Epstein-Barr virus infection: new lessons from the clinic and the laboratory. *Trends Immunol* 2014 February, pii:S1471-4906.
115. Cahir-McFarland ED, Davidson DM, Schauer SL, Duong J, Kieff E (2000). NF-kappa B inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:6055-60.
116. Li HM, Zhuang ZH, Wang Q, Pang JC, Wang XH, Wong HL, et al. (2004). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) upregulates Id1 expression in nasopharyngeal epithelial cells. *Oncogene* 23:4488-94.
117. Lo AK, Dawson CW, Lo KW, Yu Y, Young LS (2010). Upregulation of Id1 by Epstein-Barr virus-encoded LMP1 confers resistance to TGF beta-mediated growth inhibition. *Mol Cancer* 9:155.
118. Deng W, Pang PS, Tsang CM, Hau PM, Yip YL, Cheung ALM, et al. (2012). Epstein-Barr virus-encoded latent membrane Protein 1 Impairs G2 checkpoint in human nasopharyngeal epithelial cells through defective Chk1 activation. *PLoS ONE* 7:e39095.
119. Floettmann JE, Ward K, Rickinson AB, Rowe M (1996). Cytostatic effect of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 analyzed using tetracycline-regulated expression in B cell lines. *Virology* 223:29-40.

120. Gruhne B, Kamranvar SA, Masucci MG, Sompallae R (2009). EBV and genomic instability-a new look at the role of the virus in the pathogenesis of Burkitt's lymphoma. *Sem Cancer Biol* 19:394-400.
121. Kamranvar SA, Gruhne B, Szeles A, Masucci MG (2007). Epstein-Barr virus promotes genomic instability in Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 26:5115-23.
122. Panagopoulos D, Victoratos P, Alexiou M, Kollias G, Mosialos (2004). Comparative analysis of signal transduction by CD40 and the Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1 in vivo. *J Virol* 78:13253-61.
123. Mosialos G, Birkenbach M, Yalamanchili R, VanArsdale T, Ware C, Kieff E (1995). The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signalling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80:389-99.
124. Gruhne B, Sompallae R, Marescotti D, Kamranvar SA, Gastaldello S, Masucci MG (2009). The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:2313-8.
125. Kutok JL, Wang F (2006). Spectrum of Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Pathol* 1:375-404.
126. Kennedy G, Komano J, Sudgen B (2003). Epstein-Barr virus provides a survival factor to Burkitt's lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:14269-74.
127. Yamamoto N, Takizawa T, Iwanaga Y, Shimizu N, Yamamoto N (2000). Malignant transformation of B lymphoma cell line BJAB by Epstein-Barr virus-encoded small RNAs. *FEBS Lett* 484:153-8.
128. Nanbo A, Inoue K, Adachi-Takasawa K, Takada K (2002). Epstein-Barr virus RNA confers resistance to interferon-alpha-induced apoptosis in Burkitt's lymphoma. *EMBO J* 21:954-65.
129. Meurs EF, Galabru J, Barber GN, Katze MG, Hovanessian AG (1993). Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:232-6.
130. Komano J, Maruo S, Kurozumi K, Oda T, Takada K (1999). Oncogenic role of Epstein-Barr virus-encoded RNAs in Burkitt's lymphoma cell line Akata. *J Virol* 73:9827-31.

131. Green M, Michaels MG (2013). Epstein-Barr virus infection and post-transplant lymphoproliferative disorder. *Am J Transplant* 13:41-54.
132. Nourse JP, Jones K, Gandhi MK (2011). Epstein-Barr Virus-related- post-transplant lymphoproliferative disorders: pathogenetic insights for targeted therapy. *Am J Transplant* 11:888-95.
133. Ambinder RF (2007). Epstein-Barr virus and hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematop Educ Program* 20:4-9.
134. Aozasa K (2006). Pyothorax-associated lymphoma. *J Clin Exp Hematop* 46:5-10.
135. Ok CY, Papathomas TG, Medeiros LJ, Young KH (2013). EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma of the elderly. *Blood* 122:328-40.
136. Glotz D, Chapman JR, Dharnidharka VR, Hanto DW, Castro MC, Hirsch HH, et al. (2012). The Seville expert workshop for progress in posttransplant lymphoproliferative disorders. *Transplantation* 94:784-93.
137. Carbone A (2002). AIDS-related non-Hodgkin's lymphomas:from pathology and molecular pathogenesis to treatment. *Hum Pathol* 33:392-404.
138. Carbone A, Cesarman E, Spina M, Gloghini A, Sculz TF (2009). HIV-associated lymphomas and gamma-herpesviruses. *Blood* 113:1213-24.
139. Cesarman E (2014). Gammaherpesviruses and lymphoproliferative disorders. *Annu Rev Pathol* 9:349-72.
140. Fox CP, Shannon-Lowe C, Rowe M (2011). Deciphering the role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of T and NK cell lymphoproliferations. *Herpesviridae*:8.
141. Hildesheim A, Wang CP (2012). Genetic predisposition factors and nasopharyngeal carcinoma risk: a review of epidemiological association studies,2000-2011:Rosetta Stone for NPC:genetics, viral infection, and other environmental factors. *Semin Cancer Biol* 22:127-36.
142. Gourzones C, Barjon C, Busson P (2012). Host-tumor interactions in nasopharyngeal carcinomas. *Semin Cancer Biol* 22:127-36.
143. Shibata D, Tokunaga M, Uemura Y, Sato E, Tanaka S, Weiss LM (1991). Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration. Lymphoepithelioma-like carcinoma. *Am J Pathol* 139:469-74.

144. Shibata D, Weiss LM (1992). Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma . *Am J Pathol* 140:769-74.
145. McClain KL, Leach CT, Jenson HB, Joshi VV, Pollock BH, Parmley RT, et al. (1995). Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in children with AIDS. *N Engl J Med* 332:12-8.
146. Nur S, Rosenblum WD, Katta UD, Islam H, Brown K, Ramaswamy G (2007). Epstein-Barr virus-associated multifocal leiomyosarcomas arising in a cardiac transplant recipient: autopsy case report and review of the literature. *J Heart Lung Transplant* 26:944-52.
147. Ciuffo G (1907). Innesto positivo con infiltrado di verrucae volgare. *Ital Mal Venereol* 48:12-5.
148. Human papillomaviruses, IARC Monogr. Eval Carcinog Risks Hum 90 (2007), 1-636.
149. Rous P, Beard JW (1935). The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). *J Exp Med* 62:523-48.
150. Longworth MS, Laimins LA (2004). Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* 68:362-72.
151. Howley PM (1996). Papillomaviridae: the viruses and their replication. p.947-978. In BN Fields, DM Knipe, PM Howley, eds. *Fields virology*, 3<sup>rd</sup> ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa.
152. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S (2007). Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet* 370:890-907.
153. Pientong C, Wongwarissara P, Ekalaksananan T, Swangphon P, Kleebkaow P, Kongyingyoes B, et al. (2013). Association of human papillomavirus type 16 long control region mutation and cervical cancer. *Virology* 10:30-7.
154. Joyce JG, Tung JS, Przysiecki CT, Cook JC, Lehman ED, Sands JA, et al. (1999). The L1 major capsid protein of human papillomavirus type 11 recombinant virus-like particles interacts with heparin and cell-surface glycosaminoglycans on human keratinocytes. *J Biol Chem* 274:5810-22.
155. Hummel M, Hudson JB, Laimins LA (1992). Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J Virol* 66:6070-80.

156. Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TS (1999). Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem* 274:2696-705.
157. Frattini MG, Laimins LA (1994). Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:12398-402.
158. Mohr IJ, Clark R, Sun S, Androphy EJ, MacPherson P, Botchan MR (1990). Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* 250:1694-9.
159. Hughes FJ, Romanos MA (1993). E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res* 21:5817-23.
160. Cripe TP, Haugen TH, Turk JP, Tabatabai F, Schmid III PG, Durst M, et al. (1987). Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocytes-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *EMBO J* 6:3745-53.
161. Chen TH, Huang CC, Yeh KT, Chang SH, Chang SW, Sung WW, et al. (2012). Human papilloma virus 16 E6 oncoprotein associated with p53 inactivation in colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 18:4051-8.
162. Vousden KH, Jat PS (1989). Functional similarity between HPV16E7, SV40 large Tand adenovirus E1a proteins. *Oncogene* 4:153-8.
163. Liu X, Clements A, Zhao K, Marmorstein R (2006). Structure of the human papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem* 281:153-8.
164. Morris EJ, Dyson NJ (2001). Retinoblastoma protein partners. *Adv Cancer Res* 82:1-54.
165. Cheng S, Schmidt-Grimminger D, Murrant T, Broker T, Chow L (1995). Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev* 9:2335-49.
166. Fehrmann F, Klumpp DJ, Laimins (2003). Human papillomavirus type 31 E5 protein supports cell cycle progression and activates late viral functions upon epithelial differentiation *J Virol* 77:2819-31.



167. Lizano M, Berumen J, Garcia-Carranca A (2009). HPV-related carcinogenesis: basic concepts, viral types and variants. *Arch Med Res* 40:428-34.
168. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah V, et al. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-9.
169. Singer A, Ho L, Terry G, Kwie TS (1995). Association of human papillomavirus with cervical cancer and precancer, p.105-29. In: A. Mindel (ed.), *Genital warts: human papillomavirus infection*. Edward Arnold, London, United Kingdom.
170. Hopfl R, Heim K, Christensen N, Zumbach K, Wieland U, Volgger B, et al. (2000). Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV-16 oncoprotein E7. *Lancet* 356:1985-6.
171. Jenson AB, Kurman RJ, Lancaster WD (1991). Tissue effects of and host response to human papillomavirus infection. *Dermatol Clin* 9:203-9.
172. zur Hausen H (1996). Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1288:F55-F78.
173. Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S (1994). Cancer statistics, 1994. *CA Cancer J Clin* 44:7-26.
174. Pisani P, Bray F, Parkin DM (2002). Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 97:72-81.
175. Kjellberg L, Hallmans G, Ahren AM, Johansson R, Bergman F, Wadell G, et al. (2000). Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br J Cancer* 82:1332-8.
176. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2001). Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 94:153-6.
177. Lo EJ, Bell D, Woo JS, Li G, Hanna EY, El-Naggar AK, et al. (2010). Human papillomavirus and WHO type I nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope* 120:1990-7.
178. Laantri N, Attaleb M, Kandil M, Naji F, Mouttaki T, Dardari R, et al. (2011). Human papillomavirus detection in Moroccan patients with nasopharyngeal carcinoma. *Infect Agent Cancer* 6:3.

179. Huang CC, Hsiao JR, Yang MW, Wu YH, Hsu KF, Chang Y, et al. (2011). Human papilloma virus detection in neoplastic and non-neoplastic nasopharyngeal tissues in Taiwan. *J Clin Pathol* 64:571-7.
180. Jensen K, Patel A, Larin A, Hoperia V, Saji M, Bauer A, et al. (2010). Human herpes simplex viruses in benign and malignant thyroid tumours. *J Pathol* 221:193-200.
181. Wang JH, Zhang WP, Liu HX, Wang D, Li YF, Wang WQ, et al. (2008). Detection of human parvovirus B19 in papillary thyroid carcinoma. *Br J Cancer* 98:611-8.
182. Wang J, Zhang W, Liu H, Wang D, Wang W, Li Y, et al. (2010). Parvovirus B19 infection associated with Hashimoto's thyroiditis in adults. *J Infect* 60:360-70.
183. Desaillood R, Goffard A, Page C, Kairis B, Fronval S, Chatelain D, et al. (2009). Detection of enterovirus RNA in postoperative thyroid tissue specimens. *Clin Endocrinol* 70:331-4.
184. Tsai JH, Tsai CH, Cheng MH, Lin SJ, Xu FL, Yang CC (2005). Association of Viral Factors With Non-Familial Breast Cancer in Taiwan by Comparison With Non-Cancerous, Fibroadenoma, and Thyroid Tumor Tissues. *J Med Virol* 75:276-81.
185. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Jang SJ, Vargas H, Rakela J (1998). Hepatitis C virus quasispecies in patients infected with HIV-1: correlation with extrahepatic viral replication. *Virology* 248:164-71.
186. Pacini F, Vivaldi A, Santoro M, Fedele M, Fusco A, Romei C, et al. (1998). Simian virus 40-like DNA sequences in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene* 16:665-9.
187. Vivaldi A, Pacini F, Martini F, Iaccheri L, Pezzetti F, Elisei R, et al. (2003). Simian Virus 40-Like Sequences from Early and Late Regions in Human Thyroid Tumors of Different Histotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 88:892-9.
188. Ozdarendeli A, Camci C, Aygen E, Kirkil C, Toroman ZA, Doqru O, et al. (2004). SV40 in human thyroid nodules. *Journal of Clinical Virology* 30:337-40.
189. Tomita Y, Ohsawa M, Kanno H, Matsuzuka F, Kuma K, Aozasa K (1995). Sporadic activation of Epstein-Barr virus in thyroid lymphoma. *Leuk Lymphoma* 19:129-34.
190. Shimakage M, Kawahara K, Sasagawa T, Inoue H, Yutsudo M, Yoshida A, et al. (2003). Expression of Epstein-Barr Virus in Thyroid Carcinoma Correlates With Tumor Progression. *Hum Pathol* 34:1170-7.

191. Sweet BH, Hilleman MR (1960). The vacuolating virus S.V. 40. Proc Soc Exp Biol Med 105:420-7.
192. Dalianis T, Hirsch HH (2013). Human polyomaviruses in disease and cancer. Virology 437:63-72.
193. Gjoerup O, Chang Y (2010). Update on human polyomaviruses and cancer. Adv Cancer Res 106:1-51.
194. Levine H, Balicer RD, Rozhavski V, Halperin T, Shreberk M, Davidovitch N, et al. (2012). Seroepidemiology of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus among Israeli male young adults. Ann Epidemiol 22:783-8.
195. Takahashi K, Kashima K, Daa T, Yokoyama S, Nakayama I, Noguchi S (1995). Contribution of Epstein-Barr virus to development of malignant lymphoma of the thyroid. Pathol Int 45:366-74.
196. Lam KY, Lo CY, Kwong DL, Lee J, Srivastava G (1999). Malignant lymphoma of the thyroid. A 30-year clinicopathologic experience and an evaluation of the presence of Epstein-Barr virus. Am J Clin Pathol 112:263-70.
197. Kijima Y, Hokita S, Takao S, Baba M, Natsugoe S, Yoshinaka H, et al. (2001). Epstein-Barr Virus Involvement is Mainly Restricted to Lymphoepithelial Type of Gastric Carcinoma Among Various Epithelial Neoplasms. J Med Virol 64:513-8.
198. Ludvikova M, Ryska A, Korabecna M, Rydlova M, Michal M. (2001). Oncocytic papillary carcinoma with lymphoid stroma (Warthin-like tumour) of the thyroid: a distinct entity with favourable prognosis. Histopathology 39:17-24.



# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

# Investigation of BK virus, Epstein-Barr virus and human papillomavirus sequences in postoperative thyroid gland specimens

Dimitris Stamatou<sup>1,2</sup>, Stavros P. Derdas<sup>1</sup>, Emmanouil K. Symvoulakis<sup>1</sup>, Georgios H. Sakorafas<sup>3</sup>, Odysseas Zoras<sup>2</sup>, Demetrios A. Spandidos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Clinical Virology, Medical School, University of Crete, Heraklion - Greece

<sup>2</sup> Department of Surgical Oncology, University Hospital of Heraklion, Crete, Heraklion - Greece

<sup>3</sup> Fourth Department of Surgery, Medical School, University of Athens, Athens - Greece

## ABSTRACT

**Background:** Although recent evidence has implicated viruses in the regulation of epithelial-to-mesenchymal transition and tumor progression, little is known regarding viral infections in thyroid malignancies. Thus the aim of this study was to detect sequences of 3 potentially oncogenic viruses – BK virus (BKV), Epstein-Barr virus (EBV) and human papillomavirus (HPV) – in a series of postoperative thyroid gland specimens.

**Methods:** Thirty patients with thyroid nodules who underwent surgery for thyroid disease within a 3-year period were enrolled. Both nodular and adjacent normal thyroid tissue was surgically excised from each patient. Viral gene sequences of BKV (VP1), EBV (LMP1, EBNA2 and EBER1) and HPV were amplified by PCR. The PCR results were confirmed by direct sequencing analysis.

**Results:** VP1 gene sequences were detected in 60% (18/30) of thyroid cancer or multinodular hyperplasia lesions compared with in 43.3% (13/30) of adjacent normal thyroid tissue specimens. Fifteen of thirty (50%) of thyroid cancer or multinodular hyperplasia samples revealed LMP1 sequences compared with 46.7% (14/30) of corresponding normal thyroid tissues. EBNA2 gene sequences were detected in 90% (27/30) of thyroid cancer or multinodular hyperplasia samples, compared with 90% (27/30) of adjacent normal thyroid tissue specimens. All samples were negative for EBER1 sequences, while HPV DNA was not detected in either nodular or normal thyroid tissue.

**Conclusions:** This study suggests that BKV and EBV “infection” is an early event, occurring within normal tissue. Our findings do not show a clear role for the viruses examined, instead they suggest an “endemicity” pattern rather than a causal effect.

**Keywords:** BKV, Cancer, EBV, HPV, PCR, Thyroid gland

Accepted: August 14, 2014

## INTRODUCTION

Thyroid cancer represents the most common endocrine malignancy (1, 2). Most cases arise from thyroid follicular epithelial cells and include well-differentiated papillary (80%) and follicular (15%) carcinoma, the latter further divided into the conventional and oncocytic (Hürthle cell) types, poorly differentiated carcinoma and anaplastic carcinoma (2-4). Poorly differentiated, as well as anaplastic carcinoma may either arise de novo, or from papillary and follicular thyroid carcinoma (2-4). Patients with a diagnosis of early-stage well-differentiated papillary or follicular carcinoma, usually have an excellent prognosis, while those with either aggressive tumors or distant metastases have a 5-year survival rate of 40% (5).

Major risk factors known to predispose to thyroid cancer acquisition include radiation exposure, either through medical treatment or radioactive fallout from nuclear accidents during childhood (6), and history of thyroid nodules or goiter, as well as a family history of thyroid cancer (6). Thyroid cancer incidence rates significantly increased for men and women of all ages, but particularly for women between 55 to 64 years of age, during the period of 1999 through 2008 (7). Increased rates referred to tumors of all stages, though these were mostly noted in localized disease (7). The reasons for this increase remain largely unknown (7). Despite the fact that enhanced medical scrutiny – through ultrasound imaging and fine needle aspiration cytological confirmation – of small lesions that may have otherwise gone undiagnosed, has been

suggested to account for the rising incidence rates (8, 9), the increased incidence of both small and large tumors across sexes and multiple racial/ethnic groups suggests that it may not be solely this enhanced medical scrutiny that has driven this trend (7, 10-12).

Over recent decades, knowledge of the genetic alterations involved in thyroid cancer has drastically expanded (1, 2). More than 70% of papillary carcinomas are known to contain BRAF, a serine-threonine kinase of the RAF protein family, and RAS, an intracellular G protein that propagates signals from receptor tyrosine kinases and G coupled receptor-point mutations, as well as RET/PTC, the fusion between the 3' portion of the cell membrane receptor tyrosine kinase encoded by the RET protooncogene and the 5' portion of other unrelated genes and TRK rearrangements (1, 2, 13-16). All of the above mutually exclusive mutations may activate the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway (1).

The metastatic potential of thyroid cancer has been associated with the induction of an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), which involves the invasive ability of epithelial cells to enter into the surrounding tissues (17). Although oncogene mutations have been linked to a contribution to the EMT, secondary factors are considered necessary (18). Recent evidence has implicated viruses in direct EMT regulation and the development of metastases (18). Epstein-Barr virus (EBV) proteins may potentially lead to the development of metastases through the regulation of the metastasis suppressor Nm23 (19) and control the expression of Twist (20). Metastatic potential is also enhanced by viral infection through the induction of angiogenesis and affects on the tumor microenvironment (21).

BK virus (BKV) has been implicated in tumorigenesis due to its behavior both *in vitro* and *in vivo* in animal models (22). The expression of BKV sequences may transform rodent cells in culture and immortalize human cells, while its inoculation in animal models may cause the development of different tumor types (22). BKV DNA sequences have been mostly reported in urinary tract malignancies, particularly prostate and bladder cancers (22). EBV has been associated with malignancies of the lymphoid and epithelial origin, including Hodgkin's lymphoma, NK/T lymphoma, posttransplantation lymphoproliferative disorders (PTLD) and nasopharyngeal carcinoma (23). Human papillomavirus (HPV) replicates in the stratified layers of the skin and mucosa, giving rise to either benign lesions such as warts, or lesions that progress to intraepithelial neoplasia and cancer, depending on the specific HPV type (24). Low-risk HPV types, such as HPV-6 and HPV-11, are associated with benign lesions, while high-risk types such as HPV-16 are associated with cancer (24).

The aim of this study was to detect sequences of 3 potentially oncogenic viruses, BKV, EBV and HPV, in the same postoperative thyroid gland specimens. BKV and

EBV, but not HPV DNA was detected both in pathological and normal thyroid tissues, suggesting an "endemic" pattern of infection.

## MATERIALS AND METHODS

### *Study design and subjects*

In this study, 30 patients with thyroid nodules who underwent surgery for thyroid disease within a 3-year period (from June 2003 to May 2006), at the First Department of Surgery, 251 Hellenic Air Force Hospital, Athens, Greece, were included. Both nodular and phenotypically adjacent normal thyroid tissue was obtained from each patient. All samples were immediately frozen after surgical excision and stored at -80°C until use.

Thirty patients (24 women and 6 men) were enrolled in this study. The mean age ( $\pm$ SD) of the patients was 48.8 $\pm$ 13.7 years. Fourteen out of 30 patients (46.7%) had cancer lesions, while 53.3% (16/30) of the patients had multinodular hyperplasia. With regard to sex differences, the mean age of the women was 48.9 $\pm$ 12.5 years. Half of the female patients (12/24) had thyroid cancer, while the remainder had multinodular hyperplasia. The mean age of the men was 48.0 $\pm$ 19.3 years. Two out of 6 male patients had cancer lesions, while 4 out of 6 had multinodular hyperplasia.

The study was approved by the ethics committees of the University of Crete and the 251 Hellenic Air Force Hospital, and written informed consent was obtained from all patients.

### *DNA extraction*

DNA extraction was performed using the Genomic DNA Purification Kit (Genomed, Lohne, Germany), according to the manufacturer's protocols. Dissected material was resuspended in 10  $\mu$ L of cell lysis buffer with 30  $\mu$ g of proteinase K and incubated at 56°C for 2-3 days, with the daily addition of 30  $\mu$ g of proteinase K. After proteinase K inactivation and protein removal, genomic DNA was precipitated with isopropanol and washed with ethanol. DNA was subsequently dried and rehydrated with hydration buffer, and stored at -20°C until use.

### *Polymerase chain reaction*

Gene sequences of BKV (VP1), EBV (LMP1, EBNA2 and EBEB1) and HPV (GP5/6) were amplified using the primer pairs listed in Table I. The quality and integrity of the DNA in each sample was confirmed after amplification of the  $\beta$ -actin gene by PCR. Each PCR was set up in a total volume of 20  $\mu$ L, containing 2  $\mu$ L of  $\times$ 10 reaction buffer, 2.5  $\mu$ L of 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5  $\mu$ L dNTPs (0.2 mM), 2  $\mu$ L each

**TABLE I** - PRIMER SEQUENCES USED FOR THE DETECTION OF BKV, EBV, HPV AND  $\beta$ -ACTIN IN THYROID SAMPLES

Virus	Gene	Primer pair sequence	Temp. °C	PCR product (base pairs)
BKV	VP1	5'-AGT GGA TGG GCA GCC TAT GTA-3' (S) 5'-TCA TAT CTG GGT CCC CTG GA-3' (A)	60°C	95
EBV	LMP1	5'-CGG AAG AGG TGG AAA ACA AA-3' (S) 5'-GTG GGG GTC GTC ATC ATC TC-3' (A)	52°C	161
	EBNA-2	5'-GCC ACC TGG CAG CCC TAA AG-3' (S) 5'-AGG CTG CCC ACC CTG AGG AT-3' (A)	56°C	168
	EBER1	5'- GTT TTG CTA GGG AGG AGA CG-3' (S) 5'- GAC CGA AGA CGG CAG AAA GC-3' (A)	54°C	118
HPV	GP5/6	5'-TTT GTT ACT GTG GTA GAT AC-3' (S) 5'-GAA AAA TAA ACT GTA AAT CA-3' (A)	44°C	150
	$\beta$ -Actin	5'-CGG CAT CGT CAC CAA CTG-3' (S) 5'-GGC ACA CGC AGC TCA TTG-3' (A)	60°C	120

S = sense primer; A = antisense primer; BKV = BK virus; EBV = Epstein-Barr virus; HPV = human papillomavirus.

of forward and reverse primers (0.5  $\mu$ M), 0.2  $\mu$ L of 0.625 U Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ L) (MBI Fermentas) and 100 ng DNA. The reactions were carried out in a MJ Research Inc. thermocycler according to the reaction programs as follows: after initial denaturation at 94°C for 5 min, the samples were subjected to 40 cycles of amplification, comprised of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing (for T<sub>m</sub> of each gene see Tab. I) for 30 sec and elongation at 72°C for 30 sec, followed by a final step at 72°C for 5 min. Ten microliters of the PCR product was electrophoresed on a 2% agarose gel and visualized under a UV transilluminator after staining with ethidium bromide.

#### DNA sequencing

DNA sequencing was performed according to the MacroGen Advancing Through Genomics protocol, after purifying the PCR products using the Qiagen Gel Extraction kit. The primer concentration was 5 pmol/ $\mu$ L, while the PCR product had a concentration of 50 ng/ $\mu$ L and an A260/280 ratio of 1.8 according to a NanoDrop Spectrophotometer. A total volume of 20  $\mu$ L of PCR product was achieved. The correct size of the PCR products prior to sequencing analysis was confirmed using a 2% agarose gel.

#### Statistical analysis

Data were analyzed using the SPSS 16.0 statistical package (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Variables were presented as counts and proportions. Fisher's exact chi-square test was performed for comparisons among different subgroups, and odd ratios (OR) with 95% confidence interval (95% CI) were presented. A p value <0.05 was considered as statistically significant.

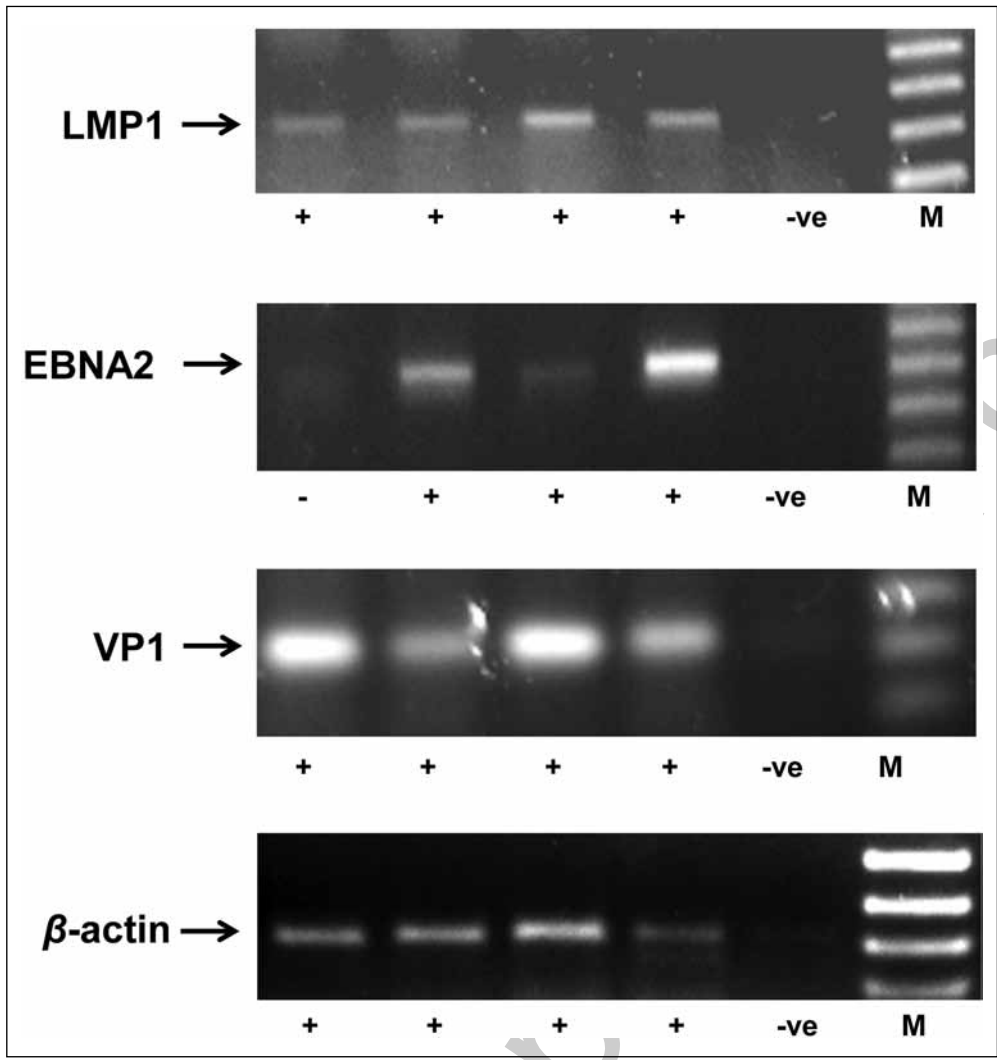
## RESULTS

All specimens were tested by PCR for the presence of BKV, EBV and HPV DNA. Representative examples of PCR-positive samples are shown in Figure 1.

Eighteen of the 30 (60.0%) thyroid cancer or multinodular hyperplasia lesions were positive for the VP1 sequences, compared with 43.3% (13/30) of the corresponding adjacent normal thyroid tissue specimens. Among the 14 malignant specimens, 8 specimens were positive (57.1%), compared with 42.8% (6/14) of the adjacent normal thyroid tissues. In the multinodular hyperplasia lesions alone, VP1 sequences were detected in 62.5% (10/16), compared with 43.7% (7/16) of the corresponding normal tissue.

We subsequently investigated the incidence of EBV in the same series of samples. Considering the LMP1 gene, 50.0% (15/30) of the thyroid cancer or multinodular hyperplasia samples revealed LMP1 sequences, compared with 46.7% (14/30) of the corresponding normal thyroid tissue. Eight of the 14 (57.1%) malignant specimens were found to be positive, compared with 35.7% (5/14) of the adjacent normal thyroid tissue. Multinodular hyperplasia lesions alone presented LMP1 sequences in 43.8% (7/16) of the specimens, compared with 56.2% (9/16) of the adjacent normal tissue. Of note, EBNA2 gene sequences were detected in 90.0% (27/30) of the thyroid cancer or multinodular hyperplasia samples, compared with 90.0% (27/30) of the adjacent normal thyroid tissue specimens. The vast majority of the malignant thyroid specimens (13/14, 92.9%) were EBNA2-positive, compared with 85.7% (12/14) of the adjacent normal thyroid tissues. Fourteen of 16 (87.5%) of the multinodular hyperplasia lesions were PCR-positive for





**Fig. 1** - Representative examples of PCR-positive specimens for the viral sequences LMP1, EBNA2 and VP1. -ve = negative control; M = molecular weight marker.

EBNA2 sequences, compared with 93.8% (15/16) of the corresponding normal tissue.

In the cancer or multinodular hyperplasia cases, the LMP1 sequence frequency (15/30 positive and 15/30 negative) presented a significant difference compared with the EBNA2 sequence frequency (27/30 positive and 3/30 negative;  $p=0.0015$  by Fisher's exact test,  $OR=9.00$ , 95% CI, 2.24-36.2). In the normal thyroid tissue cases, the LMP1 sequence frequency (14/30 positive and 16/30 negative) presented a significant difference compared with the EBNA2 sequence frequency (27/30 positive and 3/30 negative;  $p=0.0006$  by Fisher's exact test,  $OR=10.3$ , 95% CI, 2.55-41.4). The EBER1 sequence was not detected in any sample tested.

Finally, the prevalence of HPV was tested in the same series of samples using the general set of primers GP5+/GP6+; however, HPV DNA was not amplified in either nodular or normal thyroid tissues.

**DISCUSSION**

In the present study, various viral sequences were detected in a series of paired nodular and adjacent normal thyroid tissues. The statistical analysis of our results showed that EBNA2 sequences were 9 times more likely to be found than LMP1 sequences in cancer or multinodular hyperplasias, while EBNA2 sequences were 10 times more likely to be found than LMP1 sequences in normal tissue.

Recently, viruses have been found to be involved in the development of thyroid disease (18, 25-35). Sequences of several viruses have been detected in human thyroid specimens, using molecular-based detection methods (Tab. II).

In the current study, VP1 sequences were detected in 60.0% of thyroid nodules (malignant or not), compared with 43.3% of adjacent normal thyroid tissue. More specifically, BKV was detected in almost 6 of 10 cases of malignant and multinodular hyperplasia lesions. The

**TABLE II - VIRAL SEQUENCES DETECTED IN HUMAN THYROID SAMPLES**

<b>Virus detected/nucleic acid</b>	<b>Histopathological diagnosis</b>	<b>Method</b>	<b>Reference</b>
HSV/DNA	AITD, FA, FTC, FVPC, PTC, ATC	PCR	Jensen et al., 2010 (18)
Parvovirus B19/DNA	NTT, PTC, FA, TMC, FTC	Nested PCR	Wang et al., 2008 (25)
Parvovirus B19/DNA	AITD (Hashimoto's thyroiditis), NTT, NTMG, FTC, TMC	Nested PCR	Wang et al., 2010 (26)
Enterovirus/RNA	MG, AITD, FA, PTC, TMC	Real -Time RT PCR	Desailloud et al., 2009 (27)
CMV/DNA	Benign thyroid tumor specimens (Not specified)	PCR	Tsai et al., 2005 (28)
HCV/RNA	Not specified	RT PCR	Laskus et al., 1998 (29)
SV40/DNA	PTC	PCR, Southern blot	Pacini et al., 1998 (30)
SV40/DNA SV40 mRNA	PTC, ATC, NTT, AITD (Grave's disease)	PCR, RT-PCR	Vivaldi et al., 2003 (31)
SV40/DNA	PTC, Benign thyroid nodules	PCR	Ozdarendeli et al., 2004 (32)
EBV/DNA	TL, CLTH	PCR, Southern blot	Tomita et al., 1995 (33)
EBV/DNA	PTC, Undifferentiated carcinoma, SCC	Nested PCR	Shimakage et al., 2003 (34)

AITD = autoimmune disease; FA = follicular adenoma; FTC = follicular cancer; PTC = papillary cancer; FVPC = follicular variant of papillary thyroid cancer; ATC = anaplastic cancer; TMC = thyroid medullary cancer; MG = multinodular goiter; NTT = normal thyroid tissue; NTMG = nontoxic multinodular goiter; TL = thyroid lymphoma; CLTH = chronic lymphocytic thyroiditis; SCC = squamous cell cancer.

presence of BKV sequences in human thyroid specimens has never been studied thus far. Sequences of SV40, a monkey polyomavirus which was thought to be transmitted to humans via contaminated vaccines (36), has been detected in human thyroid tissue instead (30-32). In a previous study (32), both normal as well as nodular tissue was obtained from each of 99 patients with thyroid nodules who underwent thyroidectomy: papillary carcinoma was found in 8 cases and benign thyroid nodules in 91 cases of those presenting Hashimoto's thyroiditis. SV40 Tag sequences were found in 4 of 99 (4.04%) nodules, 2 of which were papillary thyroid carcinomas, while the remaining were benign nodules. No sequences were found in the 99 normal thyroid tissue or Hashimoto's thyroiditis specimens. In a separate study (30), SV40 sequences coding for the Large T-Antigen, VP1 and the regulatory region were detected in 3 cases (4.3%) of papillary carcinoma, 2 of which featured histological characteristics of Hashimoto's thyroiditis, while they were not detected in any of the 7 normal peritumoral thyroid tissue, 1 Hashimoto's thyroiditis, 5 toxic diffuse goiter, 3 medullary carcinoma and 9 breast carcinoma specimens. Furthermore, SV40 sequences were detected with a prevalence ranging from 66% in papillary carcinomas, to 100% in anaplastic carcinomas, while the corresponding frequency in adjacent normal thyroid tissue ranged from 60% to 100% (31). This prevalence differed significantly from the detection frequencies in patients with multinodular goiter and Graves' disease, which were 10% and 20%, respectively, while SV40 sequences were detected in 25% of blood samples.

EBV sequences were detected in our study with a comparable incidence in both nodular and adjacent normal thyroid tissue. The same was also observed with LMP1 sequences which were found in 50% of thyroid nodules, while the corresponding percentage for the adjacent normal tissue was 46.7%. LMP1 sequences were positive in 57.1% of malignant specimens and 43.8% of multinodular lesion specimens. EBNA2 sequences were detected at a much higher percentage in both nodular and adjacent normal thyroid tissue. EBNA2 sequences were positive in 90% of malignant lesions and 87.5% of multinodular lesion specimens. These high percentages are in accord with the recently reported seroprevalence rate of 87% for EBV (37). The detection of EBV DNA sequences in thyroid specimens, has proven controversial (28, 33-35, 38-40). One study (34) investigated the potential role of EBV in the progression of differentiated thyroid carcinoma to the undifferentiated form, by testing 10 papillary carcinomas, 11 undifferentiated carcinomas and 1 squamous cell carcinoma with PCR, reverse-transcriptase PCR, mRNA in situ hybridization and indirect immunofluorescence staining. The examination included normal thyroid tissue adjacent to 4 papillary carcinoma specimens, while 2 specimens of Graves' disease as well as 2 specimens of thyroid nodular hyperplasia were used as negative controls. EBV DNA in the region of *Bam*HIW was amplified. The expression of EBNA2 and LMP1 was more prominent in the undifferentiated carcinoma than in the papillary carcinoma samples. Another study (33) investigated the presence of the EBV genome in 30 specimens with thyroid lymphoma

and 28 with chronic lymphocytic thyroiditis, using PCR. EBV DNA was detected in 2 and 1 case, respectively. Similarly (35), EBV mRNA and gene expression investigated in 23 cases of primary and 9 of secondary thyroid lymphoma, respectively, using in situ hybridization and immunohistochemistry, revealed positive results in 1 case of primary and 1 case of secondary thyroid lymphoma. In contrast to the above studies, negative results for either EBV genome presence (28, 39, 40) or gene expression (38, 39) in thyroid specimens have been reported. EBV DNA was not detected in any benign thyroid tumor specimen tested using PCR (28), while EBER-1 in situ hybridization was negative for 45 thyroid papillary carcinomas tested in another study (38). No positive sample for EBV using PCR and in situ hybridization was revealed in a Warthin-like thyroid tumor, a papillary carcinoma variant (39). Considering autoimmune thyroid disease, EBV DNA was undetectable in 50 specimens of all 50 cases of autoimmune thyroid disease, as well as in 50 cases of multinodular goiter used as controls (40).

The frequency of VP1, LMP1 and EBNA2 sequences is referred to our study. Taking these results into consideration, we suggest that BKV and EBV "infection" is a very early event, occurring within normal tissue. As regards

LMP1, we noted that malignant specimens more commonly harbor the above-mentioned sequences in comparison with normal ones. Our findings do not allow assumptions on the potential oncogenic role of the examined virus to be made, and perhaps suggest a coexistence or "endemicity" pattern, rather than a causal effect.

This study did not lack limitations, as the number of samples was limited and from one hospital source. Further studies are required to assess these observations in relation to locality features.

**Financial Support:** No grants or funding have been received for this study.

**Conflict of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

Address for correspondence:  
 Prof. Demetrios A. Spandidos, PhD, DSc, FRCPath, FRSB, FASA  
 Laboratory of Clinical Virology  
 Medical School  
 University of Crete  
 Heraklion 71003, Crete, Greece  
 spandidos@spandidos.gr

## REFERENCES

- Bhajibee F, Nikiforov YE. Molecular analysis of thyroid tumors. *Endocr Pathol.* 2011; 22(3): 126-133.
- Nikiforov YE. Molecular analysis of thyroid tumors. *Mod Pathol.* 2011; 24(Suppl 2): S34-S43.
- DeLellis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C, eds. World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of tumours of endocrine organs. Lyon: IARC; 2004.
- Nikiforov YE. Thyroid tumors: classification and general considerations. In: Nikiforov YE, Biddinger PW, Thompson LDR, eds. *Diagnostic pathology and molecular genetics of the thyroid.* Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins; 2009; 94-102.
- Gulcelik MA, Gulcelik NE, Kuru B, Camlibel M, Alagol H. Prognostic factors determining survival in differentiated thyroid cancer. *J Surg Oncol.* 2007; 96(7): 598-604.
- Ron E, Schneider A. Thyroid cancer. In: Schottenfeld D, Fraumeni J, eds. *Cancer epidemiology and prevention.* 3<sup>rd</sup> edition. New York: Oxford University Press; 2006; 975-994.
- Simard EP, Ward EM, Siegel R, Jemal A. Cancers with increasing incidence trends in the United States: 1999 through 2008. *CA Cancer J Clin.* 2012; 62(2): 118-128.
- Davies L, Welch HG. Increasing incidence of thyroid cancer in the United States, 1973-2002. *JAMA.* 2006; 295(18): 2164-2167.
- Davies L, Ouellette M, Hunter M, Welch HG. The increasing incidence of small thyroid cancers: where are the cases coming from? *Laryngoscope.* 2010; 120(12): 2446-2451.
- Aschebrook-Kilfoy B, Ward MH, Sabra MM, Devesa SS. Thyroid cancer incidence patterns in the United States by histologic type, 1992-2006. *Thyroid.* 2011; 21(2): 125-134.
- Chen AY, Jemal A, Ward EM. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in the United States, 1988-2005. *Cancer.* 2009; 115(16): 3801-3807.
- Enewold L, Zhu K, Ron E, et al. Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18(3): 784-791.
- Kimura ET, Nikiforova MN, Zhu Z, Knauf JA, Nikiforov YE, Fagin JA. High prevalence of BRAF mutations in thyroid cancer: genetic evidence for constitutive activation of the RET/PTC-RAS-BRAF signaling pathway in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Res.* 2003; 63(7): 1454-1457.
- Soares P, Trovisco V, Rocha AS, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etio-pathogenesis of PTC. *Oncogene.* 2003; 22(29): 4578-4580.

15. Frattini M, Ferrario C, Bressan P, et al. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. *Oncogene*. 2004; 23(44): 7436-7440.
16. Adeniran AJ, Zhu Z, Gandhi M, et al. Correlation between genetic alterations and microscopic features, clinical manifestations, and prognostic characteristics of thyroid papillary carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2006; 30(2): 216-222.
17. Vasko V, Espinosa AV, Scouten W, et al. Gene expression and functional evidence of epithelial-to-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma invasion. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(8): 2803-2808.
18. Jensen K, Patel A, Larin A, et al. Human herpes simplex viruses in benign and malignant thyroid tumours. *J Pathol*. 2010; 221(2): 193-200.
19. Kaul R, Murakami M, Lan K, Choudhuri T, Robertson ES. EBNA3C can modulate the activities of the transcription factor Necdin in association with metastasis suppressor protein Nm23-H1. *J Virol*. 2009; 83(10): 4871-4883.
20. Horikawa T, Yang J, Kondo S, et al. Twist and epithelial-mesenchymal transition are induced by the EBV oncoprotein latent membrane protein 1 and are associated with metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*. 2007; 67(5): 1970-1978.
21. Tsuji A, Wakisaka N, Kondo S, Murono S, Furukawa M, Yoshizaki T. Induction of receptor for advanced glycation end products by EBV latent membrane protein 1 and its correlation with angiogenesis and cervical lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(17): 5368-5375.
22. Abend JR, Jiang M, Imperiale MJ. BK virus and human cancer: innocent until proven guilty. *Semin Cancer Biol*. 2009; 19(4): 252-260.
23. Pattle SB, Farrell PJ. The role of Epstein-Barr virus in cancer. *Expert Opin Biol Ther*. 2006; 6(11): 1193-1205.
24. Li TT, Zhao LN, Liu ZG, Han Y, Fan DM. Regulation of apoptosis by the papillomavirus E6 oncogene. *World J Gastroenterol*. 2005; 11(7): 931-937.
25. Wang JH, Zhang WP, Liu HX, et al. Detection of human parvovirus B19 in papillary thyroid carcinoma. *Br J Cancer*. 2008; 98(3): 611-618.
26. Wang J, Zhang W, Liu H, et al. Parvovirus B19 infection associated with Hashimoto's thyroiditis in adults. *J Infect*. 2010; 60(5): 360-370.
27. Desaillood R, Goffard A, Page C, et al. Detection of enterovirus RNA in postoperative thyroid tissue specimens. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2009; 70(2): 331-334.
28. Tsai JH, Tsai CH, Cheng MH, Lin SJ, Xu FL, Yang CC. Association of viral factors with non-familial breast cancer in Taiwan by comparison with non-cancerous, fibroadenoma, and thyroid tumor tissues. *J Med Virol*. 2005; 75(2): 276-281.
29. Laskus T, Radkowski M, Wang LF, Jang SJ, Vargas H, Rakela J. Hepatitis C virus quasispecies in patients infected with HIV-1: correlation with extrahepatic viral replication. *Virology*. 1998; 248(1): 164-171.
30. Pacini F, Vivaldi A, Santoro M, et al. Simian virus 40-like DNA sequences in human papillary thyroid carcinomas. *Oncogene*. 1998; 16(5): 665-669.
31. Vivaldi A, Pacini F, Martini F, et al. Simian virus 40-like sequences from early and late regions in human thyroid tumors of different histotypes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003; 88(2): 892-899.
32. Ozdarendeli A, Camci C, Aygen E, et al. SV40 in human thyroid nodules. *J Clin Virol*. 2004; 30(4): 337-340.
33. Tomita Y, Ohsawa M, Kanno H, Matsuzuka F, Kuma K, Aozasa K. Sporadic activation of Epstein-Barr virus in thyroid lymphoma. *Leuk Lymphoma*. 1995; 19(1-2): 129-134.
34. Shimakage M, Kawahara K, Sasagawa T, et al. Expression of Epstein-Barr virus in thyroid carcinoma correlates with tumor progression. *Hum Pathol*. 2003; 34(11): 1170-1177.
35. Lam KY, Lo CY, Kwong DL, Lee J, Srivastava G. Malignant lymphoma of the thyroid: a 30-year clinicopathologic experience and an evaluation of the presence of Epstein-Barr virus. *Am J Clin Pathol*. 1999; 112(2): 263-270.
36. Barbanti-Brodano G, Martini F, De Mattei M, Lazzarin L, Corallini A, Tognon M. BK and JC human polyomaviruses and simian virus 40: natural history of infection in humans, experimental oncogenicity, and association with human tumors. *Adv Virus Res*. 1998; 50: 69-99.
37. Levine H, Balicer RD, Rozhavski V, et al. Seroepidemiology of Epstein-Barr virus and cytomegalovirus among Israeli male young adults. *Ann Epidemiol*. 2012; 22(11): 783-788.
38. Kijima Y, Hokita S, Takao S, et al. Epstein-Barr virus involvement is mainly restricted to lymphoepithelial type of gastric carcinoma among various epithelial neoplasms. *J Med Virol*. 2001; 64(4): 513-518.
39. Ludvíková M, Ryska A, Korabecná M, Rydlová M, Michal M. Oncocytic papillary carcinoma with lymphoid stroma (Warthin-like tumour) of the thyroid: a distinct entity with favourable prognosis. *Histopathology*. 2001; 39(1): 17-24.
40. AL-Zarzour N, Monem F. Are human herpes viruses associated with autoimmune thyroid disease? *J Infect Dev Ctries*. 2011; 5(12): 890-892.