

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
ONCOLOGIA E PATOLOGIA SPERIMENTALE

Ciclo XXIX

Settore Concorsuale di afferenza: 06/F4

Settore Scientifico disciplinare: Med/33

IDENTIFICAZIONE DI BIOMARCATORI PROGNOSTICI NEL SIERO DI
PAZIENTI CON SARCOMA MEDIANTE ANALISI PROTEOMICA

Presentata da: Dott.ssa Amalia Conti

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. Pier Luigi Lollini

Chiar.mo Prof. Pier Luigi Lollini

Esame finale anno 2017

RINGRAZIO:

- La Dott.ssa Maria Serena Benassi, per tutti i suoi insegnamenti durante questi anni trascorsi insieme, per avermi fatto crescere sia professionalmente che umanamente, per avermi costantemente spronata, per aver sempre accettato il mio contributo scientifico nonché per l'assistenza nella stesura del testo;
- il Direttore Dott. Piero Picci, per avermi dato la possibilità di far parte della grande famiglia del Laboratorio di Oncologia Sperimentale dell'Istituto Ortopedico Rizzoli e per avermi fatto sentire "importante" come ricercatrice di questo prestigioso IRCCS;
- il Professor Pier Luigi Lollini, per la sua estrema gentilezza e disponibilità;
- le mie colleghe Laura, Irene, Serena, Cristina, Giovanna, Gabriella e Stefania per gli insegnamenti ed i consigli datimi e per avermi sostenuto quotidianamente con il loro costante aiuto;
- la mia famiglia, per aver sempre continuato a supportarmi in questi anni di studio, come fosse sempre il primo giorno di scuola.

INDICE

1	INTRODUZIONE.....	pag. 1
1.1	I sarcomi delle parti molli.....	pag. 1
1.2	Il sistema di stadiazione dei sarcomi delle parti molli...	pag. 7
1.3	La progressione metastatica.....	pag. 9
1.4	Lo studio del proteoma nei tumori.....	pag.11
1.5	La ricerca clinica ed i biomarcatori.....	pag.13
1.6	Nanoparticle technology.....	pag.16
1.7	Coinvolgimento dei microRNA nei tumori.....	pag.21
2	SCOPO.....	pag.27
3	MATERIALI E METODI.....	pag.29
3.1	Casistica.....	pag.29
3.2	Sintesi e caratterizzazione di <i>core-shell hydrogel nanoparticles</i>	pag.32
3.3	Incubazione dei campioni con le nanoparticle.....	pag.35
3.4	Preparazione dei campioni ed analisi di spettrometria di massa delle proteine sieriche.....	pag.36
3.5	Identificazione delle proteine differenzialmente abbondanti dagli Spectral Index (SpI) ed analisi bioinformatica.....	pag.37

3.6	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	pag.37
3.7	Tissue Microarray e analisi immunoistochimica.....	pag.38
3.8	Estrazione di RNA.....	pag.40
3.9	Analisi di espressione dei miRNA nei campioni di sarcoma delle parti molli.....	pag.40
3.10	Analisi di espressione di mRNA di MET e KIT nei campioni di tumore primario.....	pag.42
3.11	Analisi dei dati.....	pag.43
4	RISULTATI.....	pag.45
4.1	Identificazione di candidati biomarcatori mediante <i>core-shell hydrogel nanoparticles</i> e spettrometria di massa.....	pag.45
4.2	Ruolo prognostico delle proteine selezionate.....	pag.49
4.3	Saggi ELISA.....	pag.52
4.4	Analisi immunoistochimica.....	pag.54
4.5	Identificazione di MET come ipotetico target del miR-125 nei sarcomi delle parti molli.....	pag.55
4.6	L'espressione della proteina Met nei campioni di sarcomi delle parti molli corrispondente ai parametri clinici.....	pag.61
5	DISCUSSIONE.....	pag.63
6	BIBLIOGRAFIA.....	pag.69

1-INTRODUZIONE

1.1 I sarcomi delle parti molli

I sarcomi delle parti molli (SPM) sono un gruppo eterogeneo di tumori rari che colpiscono i tessuti derivanti dal mesoderma embrionale, ovvero i tessuti adiposi, fibrosi, muscolari, i vasi sanguigni e tutti i tessuti di sostegno del corpo umano [1]. Tali tumori sono, inoltre, estremamente complessi e variegati, dal momento che sono stati individuati all'incirca 50 differenti istotipi benigni ed altri 50 diversi istotipi maligni, che possono insorgere come una massa asintomatica in una estremità del corpo, o nel tronco, nel retroperitoneo oppure nella testa e nel collo. Le neoformazioni benigne sono molto più frequenti di quelle maligne, che rappresentano una frazione inferiore all'1% di tutti i tumori negli adulti e sono il 7-10% dei tumori pediatrici. Questi sarcomi sono per più del 99% benigni e l'incidenza di quelli maligni è circa 4 o 5 volte quella dei tumori maligni che originano dall'osso. (Figura 1)

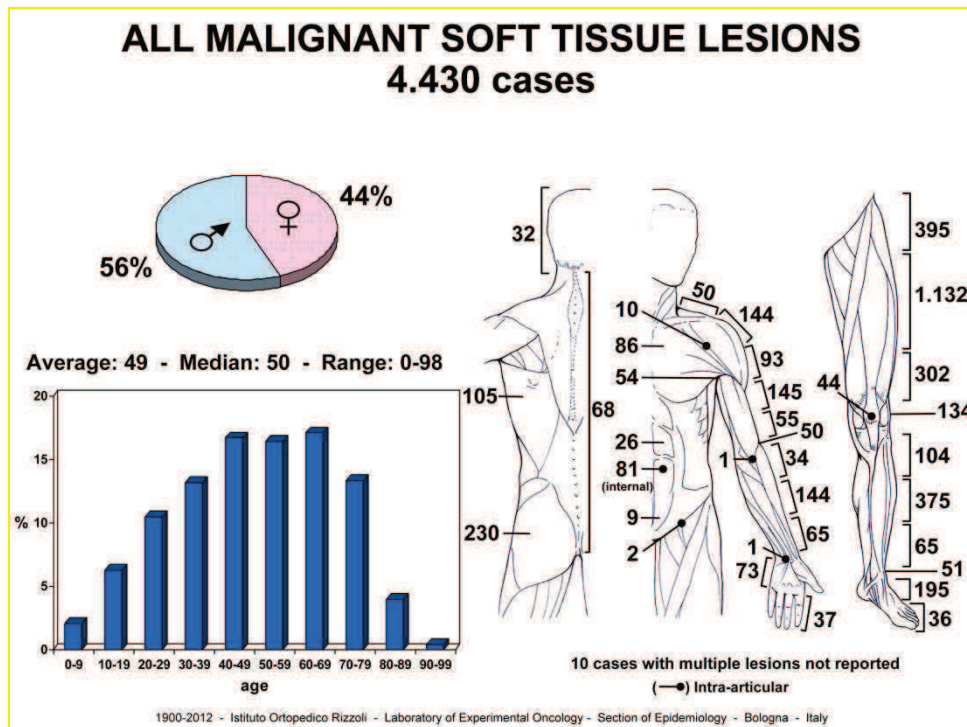


Figura 1. Casi totali di sarcomi delle parti molli maligni raccolti dall'Istituto Ortopedico Rizzoli tra il 1900 ed il 2012 (Rizzoli Syllabus, Atlas of musculoskeletal tumors and tumorlike lesions, 2014).

La rarità dei tumori delle parti molli causa problemi per la diagnosi, la stadiazione e per l'approccio terapeutico. Durante gli ultimi decenni ci sono stati cambiamenti significativi nella diagnosi e nel trattamento di tali tumori.

Diversi sviluppi nel campo della radiologia, patologia e chirurgia hanno cambiato significativamente il modo in cui essi sono oggi diagnosticati e trattati, migliorando la prognosi e la qualità della vita dei pazienti affetti da tali malattie rare.

Per quanto riguarda la radiologia, fino all'introduzione degli ultrasuoni e della tomografia computerizzata (TC), i sarcomi delle parti molli erano generalmente diagnosticati in uno stadio avanzato della malattia o quando avevano già raggiunto dimensioni notevoli, soprattutto per i tumori asintomatici e localizzati nei tessuti profondi, a causa della loro bassa incidenza e per le caratteristiche cliniche non specifiche.

L'unica tecnica di immagine adottata era la radiografia convenzionale, con una scarsissima sensibilità per le lesioni delle parti molli. Sebbene questi nuovi metodi avessero un importante impatto sulla diagnostica di tali sarcomi, gli ultrasuoni hanno scarsa specificità e la TC ha scarsa risoluzione di contrasto. Molti di questi problemi sono stati risolti con l'introduzione dell'Imaging tramite Risonanza Magnetica (MRI). Queste moderne tecniche di immagine non solo sono di grande importanza per la diagnosi differenziale dei sarcomi delle parti molli, ma giocano anche un ruolo fondamentale nel monitorare gli effetti dei trattamenti non chirurgici e sono essenziali per le diagnosi precoci di ricadute locali o a distanza durante il follow-up post-operatorio. [2-6]

La chirurgia è il trattamento d'elezione di tali patologie. L'estensione della chirurgia dipende dal grado istologico del tumore e dal suo comportamento biologico. Fino agli anni '70, l'amputazione era la chirurgia praticata più frequentemente per i sarcomi maligni. Oggi, in più del 95% dei casi, si cerca di conservare l'arto e ciò è stato reso possibile grazie alla migliore comprensione del comportamento biologico di queste lesioni, all'introduzione di nuove tecniche di Imaging nonché alla radioterapia e/o chemioterapia adiuvante.

I sarcomi delle parti molli sono classificati secondo la loro istogenesi ed il loro comportamento biologico (Tabella 1). L'Istiocitoma Fibroso Maligno (35%), il Liposarcoma (25%), il Leiomiomasarcoma (10%) ed il Sarcoma Sinoviale (10%) sono gli istotipi maligni più comuni, mentre il Rbdomiosarcoma è l'istotipo che colpisce maggiormente i pazienti pediatrici.

A causa della loro rarità e delle loro vaste varietà istologiche la loro classificazione e la loro diagnosi sono estremamente complesse [7]. L'introduzione della immunohistochimica ha avuto un importante impatto sulla loro classificazione tanto che, se fino agli anni '80 l'Istiocitoma Fibroso Maligno (IFM) rappresentava circa il 75% di tutti i sarcomi delle parti molli, con l'applicazione

dell'immunoistochimica divenne possibile riclassificare molte di queste lesioni, per esempio come Leiomiosarcoma e Rbdomiosarcoma Pleomorfo.

ISTOGENESI	BENIGNO	BASSO GRADO	ALTO GRADO
Adipociti	Lipoma (angioliipoma, a cellule fusate, pleomorfo, lipoblastoma, ibernoma)	Liposarcoma (ben differenziato, mixoide)	Liposarcoma (pleomorfo, a cellule rotonde, dedifferenziato)
Fibroblasti e Miofibroblasti	Fibromatosi/Tumore Desmoide, Elastofibroma, Miosite Ossificante	Fibrosarcoma, Fibrosarcoma Infantile, Tumore Fibroso Solitario, Sarcoma Miofibroblastico	Fibrosarcoma, Sarcoma Miofibroblastico
Fibroistiociti	TCG della Guaina del Tendine, Istiocitoma Fibroso Benigno	DFSP, Fibroxantoma Atipico, Mixofibrosarcoma	IFM/Sarcoma Pleomorfo Indifferenziato, Mixofibrosarcoma
Muscolo liscio	Leiomioma (vascolare, profondo)	Leiomiosarcoma	Leiomiosarcoma
Muscolo scheletrico	Rbdomioma (adulto, fetale)		Rbdomiosarcoma (embrionale, alveolare, pleomorfo)
Periciti	Tumore del Glomo, Miopericitoma		Tumore del Glomo Maligno
Vasi	Emangioma, Emangioma Eptelioide	Emangioendotelioma, Sarcoma di Kaposi	Angiosarcoma, Sarcoma di Kaposi
Guaine nervose e Neuroectoderma	Schwannoma, Neurofibroma		MPNST, Neuroepitelioma Periferico, Sarcoma di Ewing/PNET
Cartilagine e Osso	Condroma		Condrosarcoma Mesenchimale, Osteosarcoma Extrascheletrico
Sinovia	SVNP, Condromatosi Sinoviale	Condrosarcoma Sinoviale	SVNP Maligno
Altro	Mixoma Intramuscolare, Tumore a Cellule Granulari	Condrosarcoma Mixoide Extrascheletrico	Sarcoma Sinoviale, Sarcoma Alveolare, Sarcoma Eptelioide, Sarcoma a Cellule Chiare dei Tendini

Tabella 1. Classificazione dei tumori delle parti molli (Rizzoli Syllabus, *Atlas of musculoskeletal tumors and tumorlike lesions*, 2014) (TCG = Tumore a Cellule Giganti; DFSP = Dermatofibrosarcoma Protuberans; IFM = Istiocitoma Fibroso Maligno; MPNST = Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumor o Tumore Maligno della Guaina dei Nervi Periferici; PNET = Tumore Neuroectodermico Primitivo; SVNP = Sinovite Villonodulare Pigmentata).

ANTIGENE	TESSUTI NORMALI	NEOPLASIE
ACTINA	Tessuto muscolare liscio, striato e cardiaco Miofibroblasti Cellule mioepiteliali	Tumori benigni e maligni del muscolo liscio, striato e cardiaco, tumori e pseudotumori miofibroblastici
CD 34	Cellule staminali emopoietiche Endotelio Cellule dendritiche dermiche e periannessiali Cellule dendritiche endoneurali	Dermatofibrosarcoma protuberans, tumore fibroso solitario, tumori vascolari, sarcoma epitelioide, tumori vascolari benigni e maligni
CITOCHERATINE	Epitelio, mesotelio	Carcinomi, sarcoma epitelioide, sarcoma sinoviale, alcuni angiosarcomi, mesoteliomi, tumore rabdoide extrarenale
DESMINA	Tessuto muscolare liscio, striato e cardiaco	Tumori benigni e maligni del muscolo liscio, striato e cardiaco
ANTIGENE EPITELIALE DI MEMBRANA (EMA)	Epitelio, perinervio, cellule meningoteliali	Carcinomi, sarcoma epitelioide, sarcoma sinoviale, alcuni tumori delle guaine dei nervi, meningiomi, linfomi anaplastici a grandi cellule
FATTORE VIII	Endotelio vascolare Endotelio linfatico (variabile)	Tumori vascolari benigni e maligni
PROTEINA S-100	Cellule di Schwann, cellule gliali, muscolo scheletrico, condrociti, adipociti, sottotipi di macrofagi, cellule mioepiteliali	Melanoma, tumori benigni e maligni delle guaine dei nervi periferici, tumori cartilaginei, lipomi, alcuni liposarcomi, neuroblastomi
VIMENTINA	La maggior parte dei tessuti mesenchimali	La maggior parte dei tumori mesenchimali, melanomi, linfomi ed alcuni carcinomi

Tabella 2. Distribuzione degli antigeni più comuni nei tessuti normali e nelle neoplasie mesenchimali.

Per tale motivo l'incidenza attuale dell'IFM, che secondo la classificazione dell'Organizzazione Mondiale di Sanità del 2002 è ora chiamato Sarcoma Pleomorfo Indifferenziato di alto grado, è scesa a circa il 35% tra tutti gli istotipi maligni. (Tabella 2) [8-13]

Negli anni '90 l'introduzione della citogenetica e dell'analisi genetica molecolare non ha solo incrementato le nostre conoscenze sulla biologia dei sarcomi delle parti molli ma ha anche portato ad una ulteriore sottoclassificazione di queste lesioni. Questo approccio ha avuto un impatto rivoluzionario nel trattamento di questi tumori consentendo di somministrare cure più mirate e specifiche. Infatti, la citogenetica selettiva e le alterazioni genetiche molecolari oggi giorno giocano un importante ruolo nella diagnosi di molti sarcomi delle parti molli, come per il Sarcoma di

Ewing/PNET, il Sarcoma Sinoviale, il Rbdomiosarcoma Alveolare, il Sarcoma a Cellule Chiare, il Liposarcoma Mixoide a Cellule Rotonde, il Dermatofibrosarcoma Protuberans ed il Condrosarcoma Mixoide Extrascheletrico. [14-18]

TUMORE	TRASLOCAZIONE	TRASCRITTO
Sarcoma sinoviale	t(X;18)(q11;q11)	SYT-SSX1 SYT-SSX2 SYT-SSX4
Fibrosarcoma infantile	t(12;15)(p13;q25)	ETV6- NTRK3
Tumore desmoplastico a piccole cellule rotonde	t(11;22)(q13;q12)	EWS-WT1
Liposarcoma mixoide	t(12;16)(q13;p11)	TLS-CHOP
Sarcoma a cellule chiare	t(12;22)(q13;q12)	EWS-ATF1
Sarcoma alveolare delle parti molli	t(X;17)(p11;q25)	TFE3/ASPL
Condrosarcoma mixoide extraosseo	t(9;22)(q22;q12) t(9;15)(q22;q21)	EWS-TEC CHN-TFC12
Dermatofibrosarcoma protuberans	t(17;22)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB
Tumore miofibroblastico infiammatorio	t(1;2)(q25;p23) t(2;19)(p23;q13) t(2;17)(p23;q23)	TPM3/ALK ALK/TPM4 ALK/CLTC
Rbdomiosarcoma alveolare	t(2;13)(q35;q14) t(1;13)(p36;q14)	PAX3/FKHR PAX7/FKHR
Sarcoma di Ewing/pPNET extraosseo	t(11;22)(q24;q12) t(21;22)(q22;q12) t(17;22)(q12;q12) t(7;22)(p22;q12)	FLI1/EWS ERG/EWS E1AF/EWS ETV1/EWS

Tabella 3. Traslocazioni specifiche e trascritti nei sarcomi delle parti molli.

Dal punto di vista genetico è possibile dividere i sarcomi in 2 gruppi: un gruppo è caratterizzato da un assetto cariotipico diploide con pochi riarrangiamenti cromosomici, per lo più traslocazioni che determinano la comparsa di geni di fusione ovvero traslocazioni istotipo-specifiche che oggi sono di grande aiuto per l'anatomopatologo nella diagnosi (Tabella 3), il secondo gruppo viene invece definito cariotipo complesso, con assenza di traslocazioni istotipo-specifiche (Tabella 4) e con evidenti segni di aneuploidia e caratteristiche di forte instabilità genetica.

SARCOMI CON CARIOTIPO COMPLESSO
Fibrosarcoma non congenito
Leiomiomasarcoma
Istiocitoma Fibroso Maligno
Ostosarcoma
Condrosarcoma non mixoide
Liposarcoma non mixoide
Rabdomiosarcoma embrionale

Tabella 4. Sarcomi associati a cariotipo complesso.

A quest'ultimo cariotipo sono spesso associate anomalie numeriche, amplificazioni di regioni che contengono oncogeni e disordini nei geni che intervengono nel ciclo cellulare; queste osservazioni potrebbero portare all'identificazione di target con il ruolo fondamentale di possibili marcatori di queste neoplasie [19].

Inoltre, due pazienti con uno stesso istotipo tumorale possono presentare un tumore con comportamento biologico differente, per la presenza di alterazioni differenti, ed il tutto può essere complicato ancor di più dalla eterogeneità biologica intra-individuale. Tali sarcomi presentano inoltre difficoltà di carattere diagnostico dal momento che lesioni benigne possono essere confuse per l'alta cellularità e l'indice mitotico elevato con lesioni maligne, mentre lesioni maligne possono essere riconosciute erroneamente come benigne a causa di una leggera anaplasia. [20, 21]

La mortalità associata a tali sarcomi è circa del 50%, dal momento che sono tumori in grado di sviluppare metastasi facilmente. Ad oggi pochi sono i fattori affidabili correlabili all'outcome clinico di questi tumori per cui è prioritario individuare dei marcatori molecolari sia diagnostici che prognostici in grado di facilitare la diagnosi differenziale dei vari sarcomi, predire il loro comportamento clinico ed il possibile sviluppo di metastasi, consentendo così l'identificazione dei pazienti a maggior rischio di malattia metastatica e la selezione di strategie terapeutiche mirate. [22]

1.2 Il sistema di stadiazione dei sarcomi delle parti molli

Proprio a causa della rarità di tali tumori, pochi centri altamente specializzati hanno casistiche idonee per la ricerca di base e la ricerca clinica [7]. Tra questi, un ruolo di rilievo lo ha l'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna, uno dei pochi centri con più di 100 anni di esperienza nel campo dei tumori muscolo-scheletrici. I dati del primo caso trattato risalgono, infatti, al 28 settembre 1900, mentre l'archivio contiene materiale originario (cartelle cliniche, lastre, blocchetti in paraffina, ecc.) di più di 38.000 casi: circa 28.000 lesioni ossee e 10.000 lesioni dei tessuti molli.

In generale, si crede che i sarcomi delle parti molli non originino da trasformazione maligna o da dedifferenziazione di tumori benigni e, in contrasto con i vari tipi istologici esistenti, presentano molte caratteristiche cliniche e patologiche in comune, stabilite dalla localizzazione anatomica (profondità), dal grado istologico e dall'estensione del tumore. Il pattern dominante di metastasi è ematico e le metastasi linfonodali sono rare, fatta eccezione per alcuni tipi istologici.

Il sistema di stadiazione adottato, per i tumori primari benigni e maligni dell'osso e delle parti molli, è stato ideato da Enneking nel 1980. Questo sistema è basato su tre parametri classici: **G**, **T** ed **M**.

G è il grado del tumore, principalmente dettato dall'istologia: G0 è il tumore benigno, G1 è il maligno a basso grado e G2 è il maligno ad alto grado. Quando è utilizzata una classificazione di malignità con quattro gradi, i gradi istologici 1 e 2 sono bassi mentre i gradi 3 e 4 sono alti.

T è l'estensione anatomica del tumore: T0 è il tumore benigno intra-capsulare; T1 è il tumore benigno o maligno che non mostra una reale capsula, che è originato da uno spazio extra-compartimentale o che si è espanso violando le barriere naturali.

M sono le metastasi, sia regionali che a distanza: M0 significa assenza e M1 presenza di metastasi.

I tumori benigni, dell'osso e delle parti molli, possono essere di stadio 1 (latente o inattivo), 2 (attivo) e 3 (aggressivo). (Tabella 5)

STADIO	GRADO	SITO	METASTASI	DEFINIZIONE
1	G0	T0	M0	Latente o inattivo
2	G0	T0	M0	Attivo
3	G0	T1-T2	M0-1	Aggressivo

Tabella 5. Stadi chirurgici dei tumori muscolo-scheletrici benigni (Rizzoli Syllabus, Atlas of musculoskeletal tumors and tumorlike lesions, 2014).

Inoltre, lo stadio può essere I (malignità a basso grado), II (malignità ad alto grado) e III (con le metastasi) ed ognuno di questi tre stadi è suddiviso in A e B: nello stadio I e II se il tumore è intra o extra-compartimentale, nello stadio III se è di alto o basso grado. (Tabella 6)

STADIO	GRADO	SITO	METASTASI	DEFINIZIONE
IA	G1	T1	M0	Basso grado A Intra-compartimentale
	IB	G1	T2	M0 B Extra-compartimentale
IIA	G2	T1	M0	Alto grado A Intra-compartimentale
	IIB	G2	T2	M0 B Extra-compartimentale
IIIA-B	G1-2	T1-2	MI	Metastatico Entrambi i gradi (A o B) Metastasi a distanza

Tabella 6. Stadi chirurgici dei tumori muscolo-scheletrici maligni (Rizzoli Syllabus, *Atlas of musculoskeletal tumors and tumorlike lesions*, 2014).

Il sistema di Enneking è il più adatto per i sarcomi che sorgono dall'estremità, ma non include il tipo, la dimensione e la profondità del tumore e per questo gli oncologi preferiscono l'*American Joint Committee System* (AJCS) poiché è applicabile ad ogni sito ed è basato sul sistema **TNMG**.

T è la dimensione e l'estensione del tumore: T1 se il tumore ha dimensioni minori di 5cm; T2 se è 5cm o più grande; T3 se c'è il coinvolgimento di ossa, vasi e nervi.

N è il coinvolgimento dei linfonodi: N0 se non ci sono metastasi ai linfonodi regionali; N1 se ci sono metastasi linfonodali.

M è la presenza delle metastasi: M0 se non ci sono metastasi a distanza; M1 in caso di presenza di metastasi a distanza.

G è il tipo ed il grado di tumore: G1 se il tumore è di basso grado e ben differenziato; G2 se è moderato (moderatamente ben differenziato); G3 se è di alto grado e scarsamente differenziato. [23-28] (Tabella 7)

STADIO	GRADO	SITO	METASTASI AI LINFONODI	METASTASI A DISTANZA	DEFINIZIONE
IA	G1	T1	N0	M0	Basso grado senza metastasi
IB	G1	T2	N0	M0	
IIA	G2	T1	N0	M0	Grado moderato senza metastasi
IIB	G2	T2	N0	M0	
IIIA	G3	T1	N0	M0	Alto grado senza metastasi
IIIB	G3	T2	N0	M0	
IIIC	G1-3	T1-2	N1	M0	Tumori con metastasi linfonodali
IVA	G1-3	T3	N0-1	M0	Tumori che coinvolgono ossa, vasi, nervi con o senza metastasi linfonodali
IVB	G1-3	T1-3	N0-1	M1	Tumori con metastasi a distanza

Tabella 7. American Joint Committee system (Rizzoli Syllabus, *Atlas of musculoskeletal tumors and tumorlike lesions*, 2014).

1.3 La progressione metastatica

La principale causa di morte correlata al cancro è la crescita progressiva di focolai tumorali secondari a distanza rispetto alla lesione primaria, ovvero l'evento metastatico. La progressione metastatica si compone di una serie di eventi correlati tra loro ed ognuno fondamentale, in quanto per una cellula l'incapacità di compierne anche solo uno comporterebbe l'arresto dell'intero processo (Figura 2).

Nel 1889 il chirurgo e patologo inglese James Paget elaborò un modello chiamato *seed and soil*, considerato ancora oggi valido, secondo il quale l'esito finale del processo di metastasi dipende non solo dalle proprietà intrinseche delle cellule tumorali ma anche dal responso del tessuto bersaglio, tra i quali c'è un continuo dialogo a livello molecolare.

Il tumore in crescita progressiva necessita di quantità sempre maggiori di sostanze nutritive e, quindi, di una neoformazione di vasi o angiogenesi per permettere alla massa tumorale di superare i 2mm di diametro. Nel tessuto circostante ha origine una rete di capillari a seguito della sintesi e della secrezione di fattori angiogenici. Alcune cellule tumorali incominciano ad invadere lo stroma locale mediante diversi meccanismi paralleli, fino al distacco e all'embolizzazione di singole cellule, o di loro aggregati, che entrano nella circolazione sanguigna o linfatica. Le cellule tumorali che riescono a sopravvivere al passaggio nella circolazione si arrestano nei letti capillari di organi distali aderendo all'endotelio del vaso o alla membrana basale subendoteliale. A questo punto può avvenire l'extravasazione con meccanismi simili a quelli invasivi. I focolai metastatici sono monoclonali, ovvero originano da una singola cellula tumorale che prolifera nel parenchima dell'organo bersaglio e, per crescere ulteriormente, la metastasi deve sviluppare una rete vascolare ed evadere i meccanismi di difesa dell'ospite [29].

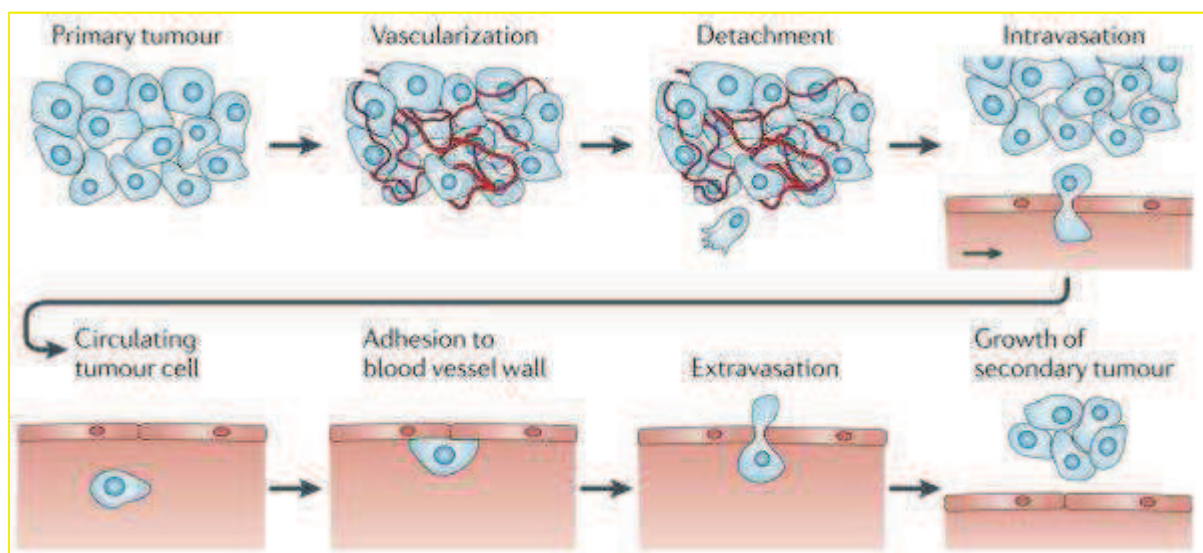


Figura 2. Eventi principali coinvolti nella progressione metastatica (Wirtz D: *The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis*. Nature Reviews Cancer 2011 Jun 24; 11(7): 512-522).

Le scoperte più recenti hanno rivisto e corretto il modello *seed and soil*, aggiungendo altri due principi: i tumori primari sono estremamente eterogenei, poichè costituiti da cellule tumorali e cellule dell'ospite con sottopopolazioni geneticamente e fenotipicamente diverse e che probabilmente sono in grado di portare avanti solo una parte dei meccanismi coinvolti nella progressione metastatica; le metastasi possono avere origine solo in specifici organi, dal momento che il microambiente di diversi organi e tessuti è biologicamente unico. Il fenotipo delle metastasi che si svilupperanno è influenzato dai differenti recettori di membrana e fattori di crescita espressi

dalle cellule endoteliali della rete vascolare di diversi organi, per cui la progressione metastatica dipende da interazioni multiple, o da un *cross-talk* tra le cellule metastatizzanti ed i meccanismi omeostatici che la cellula tumorale può sfruttare a suo vantaggio. Quindi le nuove terapie contro le metastasi non devono avere come bersaglio solo le cellule tumorali, ma anche i fattori omeostatici che promuovono la crescita tumorale, la sopravvivenza, l'angiogenesi, l'invasione e la metastatizzazione [30, 31].

1.4 Lo studio del proteoma nei tumori

Così come il termine genoma indica l'insieme di tutti i geni appartenenti ad un singolo organismo, il termine proteoma indica l'insieme di proteine presenti in un distretto ben preciso ed in un dato momento temporale. Il genoma contiene l'informazione, ma non è in grado di trasmetterla alle cellule, il proteoma rappresenta l'espressione funzionale dell'informazione e come tale è influenzata dalla temporale regolazione della sintesi proteica, dalle interazioni cellula-cellula e dalle modificazioni post-traduzionali.

Nonostante oggi sia possibile disporre dell'intera sequenza del genoma umano, questo non risulta sufficiente per capire a fondo le funzioni biologiche caratterizzanti un organismo, che dipendono da molteplici vie regolatorie e metaboliche [32].

Il genoma è, infatti, statico ed uguale in tutte le cellule ed in qualunque momento della vita di un essere vivente, il proteoma è dinamico e riflette lo stato biologico del sistema variando qualitativamente e quantitativamente in relazione al tipo cellulare, allo stadio di differenziazione, alle condizioni ambientali ed in funzione del tempo. In ogni singolo momento della vita di un organismo vengono espresse e regolate diverse migliaia di proteine che svolgono un ruolo cruciale in tutti i processi biologici con funzione di catalizzatori, trasmettitori di energia ed informazioni o supporti strutturali. Questo ampio spettro di attività deriva dal fatto che le proteine sono in grado di interagire tra di loro e con specifici substrati; attraverso la loro conoscenza è possibile comprendere le basi molecolari della vita e risolvere importanti questioni biologiche in termini molecolari.

Per tale motivo, l'introduzione di tecniche di studio del proteoma (western blotting, analisi bidimensionale (2DE), spettrometria di massa, reverse phase protein microarrays (RPMA)), la cui espressione è alterata in seguito a trasformazioni avvenute nelle cellule, è essenziale per la

caratterizzazione delle funzioni cellulari a livello molecolare, ha un enorme impatto in quasi tutte le discipline biomediche, ma soprattutto ha lo scopo di favorire la scoperta di nuovi marcatori molecolari di aiuto alla diagnosi, in particolare nel riconoscimento dei primi stadi della malattia, alla prognosi ed al monitoraggio della progressione tumorale.

Dal momento che la complessità di un sistema biologico è aggravata dalla mancanza di linearità nei rapporti tra le diverse componenti, poiché l'espressione proteica è influenzata da diversi fattori, è necessario raggiungere delle conoscenze complementari, come quelle generate dalla genomica e dalla proteomica, per poter comprendere più a fondo le basi che governano i meccanismi di varie patologie. E' ormai, infatti, evidente che i livelli di espressione di mRNA, e delle corrispondenti proteine codificate, non sono necessariamente correlati e che l'identificazione di una *Open Reading Frame* (ORF), derivante dal sequenziamento di un genoma, non implica l'esistenza di un gene funzionale codificante per una proteina [33]. In passato, l'analisi dei processi post-genomici veniva effettuato mediante studio degli mRNA, ma si è visto che non sempre l'espressione dei messaggeri è correlata al contenuto proteico. D'altronde, numerose alterazioni o modificazioni che non emergono dalla semplice sequenza genica, riguardanti l'attività e la funzione di una proteina, possono intervenire a livello trascrizionale, traduzionale e post-traduzionale: amplificazione genica, splicing alternativo dell'RNA, modificazioni co-traduzionali e post-traduzionali, isoforme, interazioni proteiche, stabilità e secrezione differenziale [34].

Lo scopo della proteomica è quello di studiare l'intero profilo proteico e, all'interno di quest'ottica, di capire quali proteine siano presenti in una cellula o in un tessuto, con quali altre proteine interagisce la proteina di interesse (quindi identificazione del *network*) e come appare una particolare proteina dal punto di vista strutturale, e tutto ciò ha importanti applicazioni nel campo della ricerca medica: può essere usata per verificare la presenza di specifici marcatori che sono correlati a malattie genetiche o a stati patologici.

Un altro aspetto di grande importanza clinica è la possibilità di identificare delle proteine "chiave" nei vari processi che portano al cancro, come la tumorigenesi e la metastatizzazione, al fine di sviluppare nuovi farmaci in grado di contrastare gli effetti delle proteine correlate al processo della cancerogenesi. Questi nuovi "bersagli" favoriranno lo sviluppo di nuove strategie terapeutiche, basate sull'applicazione di terapie molecolari combinate e individualizzate, il cui effetto potrebbe essere monitorato sul profilo globale delle proteine, incluse quelle sieriche.

Durante il processo di trasformazione e progressione tumorale la cellula deve acquisire particolari proprietà e, quindi, le vie molecolari più frequentemente alterate a livello delle quali cercare marcatori diagnostici e potenziali target per una terapia molecolare mirata sono le seguenti:

- 1) proliferazione indipendente da stimoli esterni (es. attivazione delle pathway delle RAS chinasi, EGF, IGF);
- 2) perdita di sensibilità a stimoli antiproliferativi (es. perdita della funzione di Rb);
- 3) inattivazione dell'apoptosi in risposta ai danni a carico del DNA (es. perdita della funzione di p53, attivazione di Bcl2);
- 4) abilità delle cellule di dividersi (es. attivazione delle telomerasi);
- 5) neoangiogenesi (es. attivazione del VEGF);
- 6) invasione e metastasi (es. perdita dei meccanismi di adesione, attivazione di MMP).

Oggi è possibile valutare lo stato di intere porzioni delle suddette pathway, o delle cascate di segnale, osservando i substrati chinasi attraverso analisi con anticorpi fosfospecifici [35, 36, 37].

1.5 La ricerca clinica ed i biomarcatori

La ricerca clinica condotta e sviluppata negli ultimi decenni rappresenta una rivoluzione nella comprensione della patogenesi del cancro. Adesso possediamo conoscenza in abbondanza circa i meccanismi molecolari alla base dell'insorgenza del tumore ma, nonostante ciò, piccoli progressi sono stati fatti nella comprensione dell'eziologia per prevenire la malattia e curarla. Per tale ragione la ricerca clinica, applicata allo studio della malattia neoplastica, si propone, tra i tanti obiettivi, anche quello di identificare dei *biomarcatori neoplastici* o *marcatori tumorali* che possano essere utilizzati per una diagnosi più celere e più accurata.

Un biomarcatore non è altro che un indicatore biologico, molecolare, anatomico, fisiologico o biochimico, che possa essere utilizzato per misurare la progressione di una patologia o la risposta ad un trattamento terapeutico ed è prodotto direttamente dal tumore, come gli ormoni, enzimi o altre proteine più o meno correlate alla crescita numerica delle cellule tumorali, o dall'organismo in risposta alla malattia, come le proteine della fase acuta dell'infiammazione.

Esso deve poter essere facilmente misurabile ed oggettivamente valutabile, pertanto deve assolvere in maniera ottimale al ruolo di indicatore di stato. Se evidenzia la presenza di un processo patologico, si parlerà allora di *marcatore diagnostico*; se invece identifica una risposta farmacologica ad un trattamento terapeutico, si parlerà di *marcatore terapeutico*.

Il marcatore è, quindi, un segnale che indica la malattia prima della comparsa dei sintomi clinici ed, in particolare, il marcatore tumorale è un segnale di neoplasia, o della sua evoluzione, in assenza o presenza di segni clinici, capace quindi di indirizzare in modo più preciso la diagnosi iniziale o una diagnosi di ripresa di malattia. [38]

Negli anni '60 si incominciò a studiare per la prima volta i marcatori tumorali circolanti, quando l'immunologia dei tumori iniziò a parlare di "antigeni tumore-associati" (TAA) [38, 39].

Per essere definito tale un marcatore tumorale deve possedere delle caratteristiche ben precise, ovvero deve:

- 1) essere sensibile e specifico: per poter permettere la diagnosi precoce di neoplasia, o l'identificazione di soggetti a rischio, il marcatore tumorale diagnostico deve essere sensibile, cioè essere presente in tutti i pazienti con quella neoplasia, e specifico, ovvero assente in tutti i soggetti non neoplastici. Per escludere la presenza di falsi negativi, ovvero marcatore tumorale negativo in soggetto neoplastico, e di falsi positivi, cioè marcatore tumorale positivo in soggetto con patologia benigna, la sua sensibilità e la sua specificità dovrebbero essere del 100%. Solo in tale caso il marcatore tumorale si può definire ideale e potrà essere utilizzato nello screening. Anche quando il marcatore tumorale ha il ruolo di identificare precocemente la ripresa di malattia, o nel caso posseda un valore prognostico di malattia, l'elevata sensibilità e specificità sono indispensabili;
- 2) essere predittivo della patologia o della progressione della stessa;
- 3) essere robusto;
- 4) potere essere facilmente rilevabile in un tessuto e/o in un fluido: le principali fonti di biomarcatori sono infatti i fluidi (siero, urine, liquido cerebrospinale) o i tessuti. Se si utilizza come fonte il siero, è necessario paragonare il siero sano con quello malato. Il confronto, infatti, permette di visualizzare marcatori differenzialmente espressi nei due sieri.

Da sempre la ricerca cerca di individuare una caratteristica "specificata" del tumore, ovvero un "quid" che il tumore ha in più rispetto al normale, da utilizzare per colpire la cellula tumorale che sa mimetizzarsi molto bene poiché presenta caratteristiche molto simili alla cellula normale.

Ad oggi, i marcatori tumorali che si conoscono sono presenti anche in altre condizioni, inclusa la normalità, e quindi non sono peculiarità specifiche del tumore. Quello che però la ricerca si pone come obiettivo nella diagnostica della patologia tumorale è la possibilità di rilevare delle molecole che siano differenzialmente espresse nel soggetto sano e nel soggetto affetto da patologia neoplastica oppure differenzialmente espresse in soggetti che sviluppano metastasi. Questo ci riporta ad un altro importantissimo concetto, ovvero quello del valore soglia, che deriva dalla valutazione statistica della distribuzione del marcatore tumorale in un gruppo di soggetti sani di riferimento e che permette su base quantitativa di distinguere il soggetto neoplastico da quello non

neoplastico, dal momento che il marcatore tumorale qualitativo, quello cioè presente solo nel tumore, attualmente non esiste.

Ad oggi, non esistono marcatori tumorali da poter essere usati nella diagnosi precoce e negli screening di massa di una neoplasia ma, insieme ad altre indagini strumentali, tali marcatori possono aiutare nel differenziare la patologia benigna da quella maligna. I marcatori tumorali hanno migliore efficacia nell'identificazione precoce di recidive o metastasi nel paziente neoplastico libero da malattia: dopo aver stabilito un valore soglia fisiologico per ogni paziente, basato sull'andamento del marcatore durante il controllo, un suo aumento sarà correlato alla ripresa della malattia, escludendo altre patologie benigne parallele. Il marcatore tumorale può anche aiutare durante il monitoraggio della terapia, dal momento che le sue differenze di concentrazione sono correlate al successo o all'insuccesso di una terapia.

Quindi questi non solo si propongono di monitorare la patologia, ma anche di mettere in risalto il valore diagnostico e le indicazioni terapeutiche.

Oggi, in ambito diagnostico, i marcatori utilizzati sono:

- **AFP**, alfafetoproteina, marcatore del tumore del fegato;
- **CA 15-3**, antigene carboidrato 15-3, marcatore associato al tumore mammario, ma solo negli stadi avanzati;
- **CA 19-9**, antigene carboidrato 19-9, marcatore più utile per il tumore pancreatico, ma può essere anche utilizzato per tumori del colon-retto insieme al CEA, dello stomaco e delle vie biliari;
- **CA 125**, antigene carboidrato 125, marcatore del carcinoma ovarico;
- **PSA**, antigene prostatico specifico, marcatore specifico della prostata e non del tumore prostatico, dal momento che può aumentare anche in caso di ipertrofia prostatica benigna;
- **CT**, calcitonina, marcatore del carcinoma midollare della tiroide. E' l'unico marcatore con sensibilità e specificità tali da poter essere utilizzato nella diagnosi di tumore e nello screening di rischio di tumore;
- **S100**, marcatore usato per monitorare il paziente operato di melanoma e come risponde alla terapia;
- **TG**, tireoglobulina, marcatore di metastasi nel controllo del paziente con tumore tiroideo.

[40]

Ad oggi, non esistono test di laboratorio che permettano una diagnosi precoce affidabile per i sarcomi delle parti molli. La scoperta di nuovi biomarcatori circolanti potrebbe quindi essere particolarmente utile per stratificare i pazienti ad alto rischio su cui intervenire precocemente con una terapia più adeguata, la cui efficacia possa essere monitorata da un punto di vista biologico.

1.6 Nanoparticle technology

Oggi, l'area di nuovo interesse da parte dei ricercatori per l'identificazione di biomarcatori è rappresentata dall'insieme di piccole proteine intatte, o da piccoli frammenti di proteine più grandi, presenti nei fluidi biologici, quali siero, urina, liquido cerebrospinale, sudore, saliva, agoaspirati e liquido amniotico, ovvero ciò che prende nome di *low molecular weight region* del proteoma. Tali proteine sono: meno dell'1% di tutte le molecole presenti nei campioni, ovvero in scarsa concentrazione e, quindi, difficilmente individuabili con le tecniche più classiche di immunodetection ma anche mediante le tecniche più sofisticate di spettrometria di massa; in genere camuffate da proteine più grandi quali albumina e immunoglobuline; legate in circolo endogenamente e non covalentemente a proteine carrier, che sono più del 95% delle proteine circolanti e un miliardo di volte più concentrate di queste piccole proteine, rendendo eccessivamente complicata la loro identificazione; estremamente labili con emivita molto breve, perché dopo che il campione è prelevato, trasportato e conservato, sono subito degradate da proteinasi endogene ed esogene.

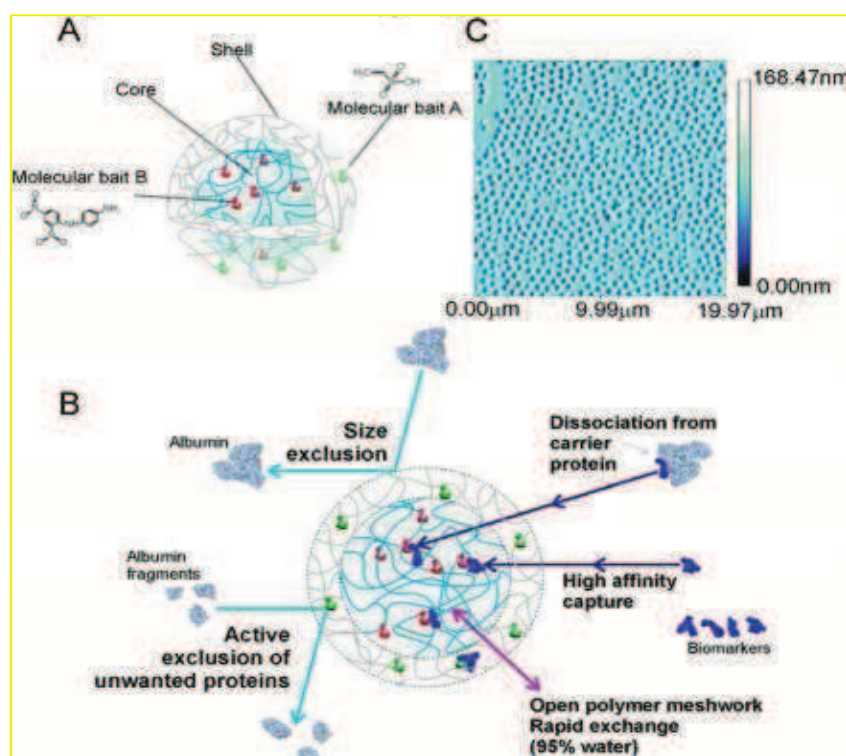


Figura 3. A. Rappresentazione schematica delle *core-shell hydrogel nanoparticles*. B. La natura porosa del guscio delle nanoparticelle permette di legare solo proteine a basso peso molecolare, dissociandole dalle proteine carrier. C. Le nanoparticelle possono essere prodotte in grande quantità con una distribuzione di misura uniforme (Tamburro D: *Multifunctional core-shell nanoparticles: discovery of previously invisible biomarkers*. J Am Chem Soc. 2011 November 30; 133(47): 19178-19188).

Negli ultimi anni una nuova nanotecnologia è stata inventata, messa a punto e brevettata dal Professor Lance Liotta, Direttore del Center for Applied Proteomic and Molecular Medicine della George Mason University (Manassas, Virginia, USA). Tale tecnica riesce a catturare selettivamente le proteine, escludendo quelle ad alto peso molecolare, concentrando le altre fino a 10.000 volte, proteggendole dalla degradazione enzimatica per poi riuscire ad individuarle con analisi di spettrometria di massa o altri sistemi di immunoassay, e consiste nell'utilizzo di nanoparticelle che permettono di non legare l'albumina, o altre proteine non desiderate, ma che hanno alta affinità di legame con le *low molecular weight proteins*, per cui le catturano dissociandole dalle proteine carrier. Inoltre, prolungando l'incubazione del campione con le nanoparticelle, aumenta la concentrazione di tali proteine legate alle nanoparticelle, mentre diminuisce il loro legame con le proteine carrier, quali l'albumina. (Figura 3) [41]

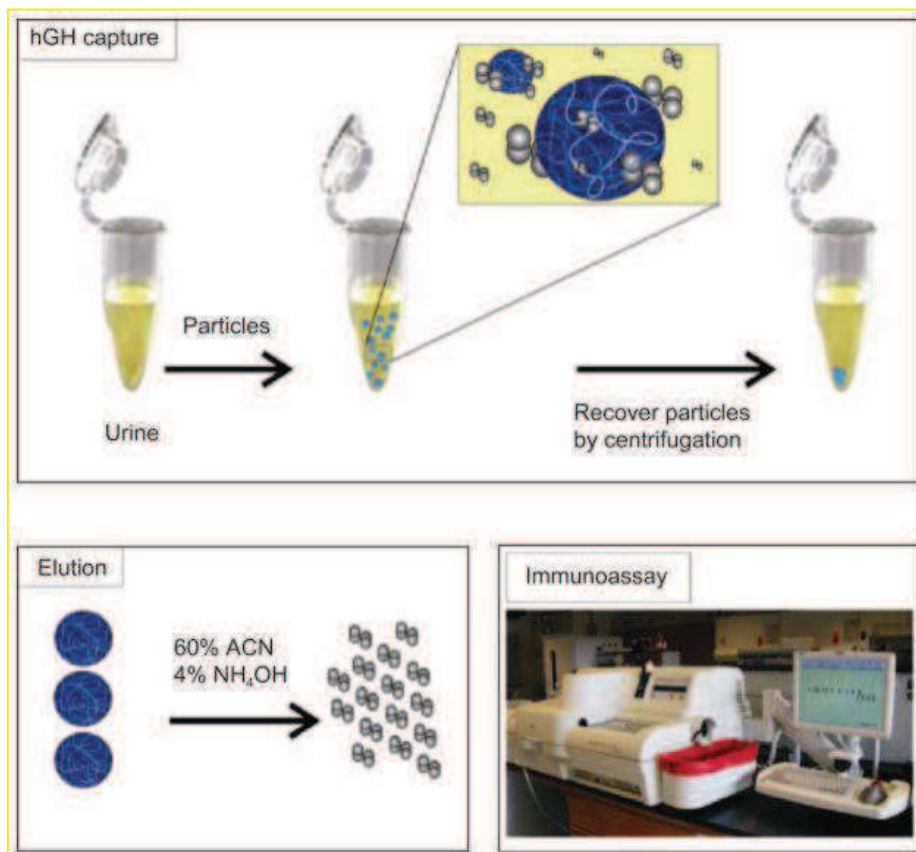


Figura 4. Rappresentazione schematica delle varie fasi di utilizzo delle *core-shell hydrogel nanoparticles*. Le particelle sono aggiunte al campione, catturano le proteine a basso peso molecolare e scarsamente concentrate e sono separate per centrifugazione. L'eluizione delle proteine dalle particelle si ha mediante utilizzo di acetonitrile e idrossilammina. L'immunoassay è praticato sulle proteine eluite dalle particelle. (Fredolini C: *Concentration and preservation of very low abundance biomarkers in urine, such as human Growth Hormone (hGH), by Cibacron Blue F3G-A loaded hydrogel particles*. Nano Res. 2008 Dec; 1(6): 502-518).

La più importante caratteristica chimica-fisica delle nanoparticelle è l'altissima idrofilia, che permette loro di assorbire più del 90% del volume d'acqua, consentendo così di filtrare la soluzione e di concentrare in poco volume i potenziali biomarcatori. A seguito dell'incubazione delle nanoparticelle con il campione, l'eluizione dei biomarcatori catturati è possibile per centrifugazione ed utilizzo di un buffer di eluizione costituito da acetonitrile (ACN) ed idrossilammina (NH₄OH) che non altera né la quantificazione proteica, né la successiva detection con immunoassay, migliorando l'efficacia anche di una tecnica classica quale western blotting o saggio ELISA, dal momento che la funzione delle particelle è quella di purificare il campione. Infine, per stabilire l'esatto quantitativo del biomarcatore nel campione, bisognerà sapere il quantitativo preciso di soluzione di partenza e di buffer di eluizione finale, le cui proporzioni saranno importanti clinicamente. (Figura 4) [42]

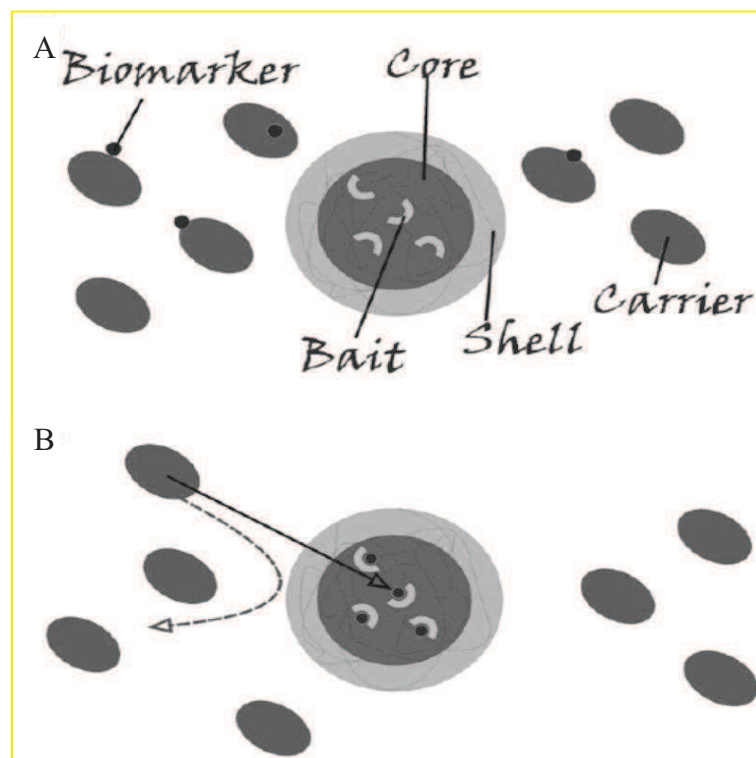


Figura 5. Rappresentazione schematica della struttura e della funzione delle particelle. **A.** Le particelle sono costruite con un *core* contenente un'esca o *bait* e sono circondate da un guscio esterno. **B.** Quando sono aggiunte ad un campione, come il siero, le *core-shell particles* catturano con alta affinità le proteine a basso peso molecolare, dissociandole dalle proteine carrier come l'albumina ed escludendo tutte le proteine ad alto peso molecolare. (Luchini A: *Nanoparticle technology: addressing the fundamental roadblocks to protein biomarker discovery*. *Curr Mol Med*. 2010 Mar; 10(2): 133-141).

Se inizialmente le nanoparticelle erano sintetizzate in silice, oggi si è potuto constatare che le più efficaci sono di *hydrogel*, con diametro di 700nm e stabili a temperatura ambiente nel tempo. Sono

dette *core-shell hydrogel nanoparticles*, poiché sono formate da un cuore interno e da un guscio esterno e l'elemento fondamentale che le costituisce è il NIPAm o N-isopropilacrilammide, con alta affinità di legame per le proteine. Il guscio è inoltre composto da un cross-linker, il BIS o N,N'-metilenebisacrilammide che, in base alla propria concentrazione, forma delle maglie di differente porosità che permettono di selezionare le proteine da legare, sullo stesso principio di un gel utilizzato per l'analisi di western blotting. Così facendo, è possibile escludere finanche le catene leggere delle immunoglobuline (22-27kDa). (Figura 5) [43]



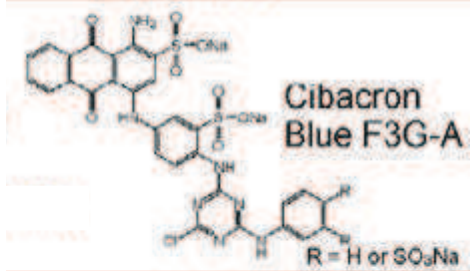
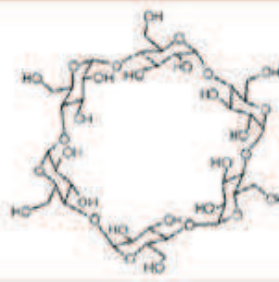

TARGET	BAIT
Proteine e polipeptidi cationici	Acido acrilico 
Proteine e polipeptidi anionici	Allilammina 
Proteine e polipeptidi	 Cibacron Blue F3G-A R = H or SO ₃ Na
Steroidi, piccole molecole e colesterolo	 Ciclodestrina
Polisaccaridi, glicopeptidi ed RNA	 Acido P-vinilfenilboronico e acido N-acrioloil-m-aminofenilboronico (NAAPBA)
Fosfopeptidi	Nanoparticelle di biossido di titanio (TiO ₂) incorporate in biglie di NIPAM

Tabella 8. Lista di *bait* chimici (Luchini A: *Nanoparticle technology: addressing the fundamental roadblocks to protein biomarker discovery*. *Curr Mol Med*. 2010 Mar; 10(2): 133-141).

Oltre alle suddette molecole, tante altre possono essere utilizzate come *bait* o esche, a seconda di ciò che si vuole legare selettivamente: acido acrilico per proteine e polipeptidi cationici; allilamina per proteine e polipeptidi anionici; Cibacron Blue F3G-A per proteine e polipeptidi; ciclodestrina per steroidi, piccole molecole e colesterolo; acido P-vinilfenilboronico e acido N-acriloil-*m*-aminofenilboronico (NAAPBA) per polisaccaridi, glicopeptidi ed RNA; nanoparticelle di biossido di titanio (TiO₂) incorporate in biglie di NIPAm per fosfopeptidi (Tabella 8) [43].

La sintesi delle nanoparticelle è articolata in due step: la prima fase prevede la sintesi di particles di allilamina, dai monomeri di NIPAm o N-isopropilacrilammide, allilamina, metilenebisacrilammide o BIS utilizzato come cross-linker e permanganato di potassio (KPS) che ha ruolo di iniziatore della reazione o di polimerizzatore; la seconda fase prevede l'introduzione nelle particles del Cibacron Blue F3G-A, un *dye* o colorante con alta affinità per le proteine a basso peso molecolare e che le protegge dalla degradazione enzimatica (Figura 6) [43].

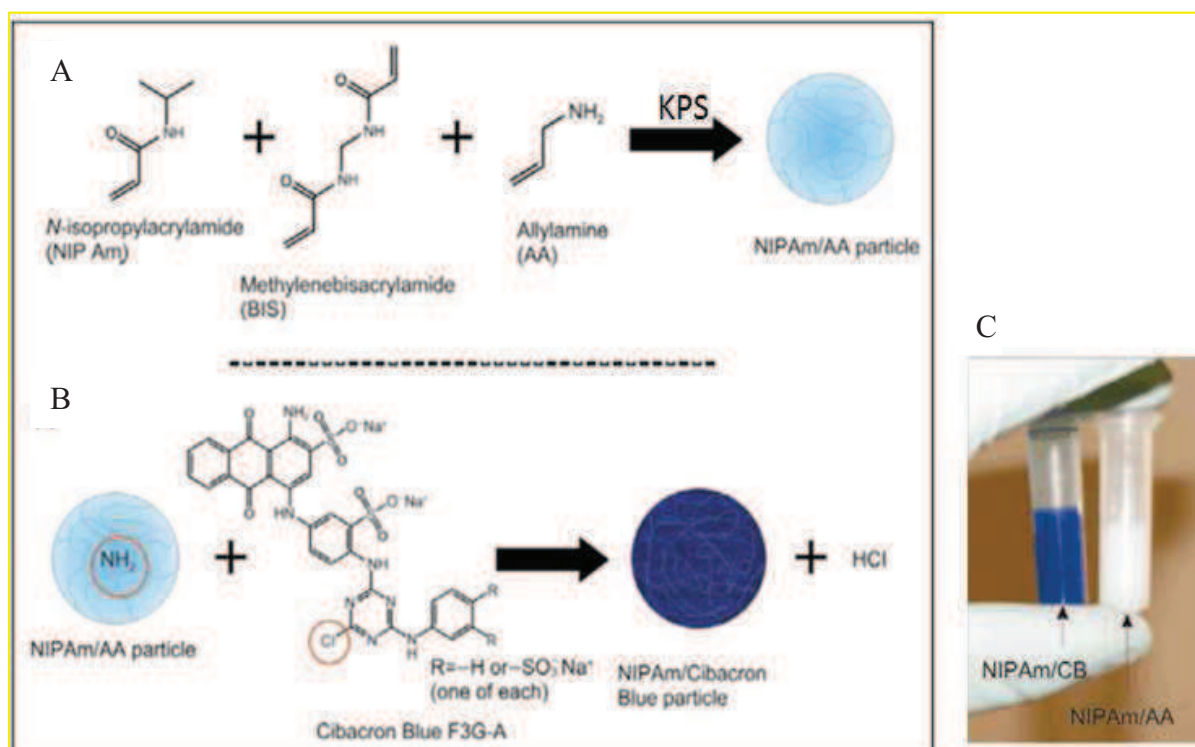


Figura 6. Sintesi delle nanoparticelle. **A.** La prima fase prevede la sintesi di particles di allilamina, dai monomeri di NIPAm o N-isopropilacrilammide, allilamina, BIS utilizzato come cross-linker e permanganato di potassio che ha ruolo di iniziatore della reazione o di polimerizzatore. **B.** La seconda fase prevede l'introduzione nelle particles del Cibacron Blue F3G-A, un *dye* o colorante con alta affinità per le proteine a basso peso molecolare e che le protegge dalla degradazione enzimatica. **C.** Al termine della prima fase, le particles di allilamina sono bianche. Successivamente, con l'aggiunta del Cibacron il loro colore diventa blu. (Luchini A: *Nanoparticle technology: addressing the fundamental roadblocks to protein biomarker discovery*. *Curr Mol Med*. 2010 Mar; 10(2): 133-141).

1.7 Coinvolgimento dei microRNA nei tumori

Il dogma centrale della biologia molecolare è un principio formulato negli anni cinquanta del XX secolo secondo cui l'informazione genetica conservata nel DNA viene trascritta sotto forma di RNA, che a sua volta è tradotto in proteine. Nel secolo scorso si pensava che solo una parte di RNA fosse importante per la sintesi proteica ed il resto era etichettato come "RNA spazzatura" o *non coding (ncRNA)*. Negli ultimi venti anni in realtà si è scoperto che proprio tali RNA, al quale gruppo fanno parte anche i microRNA o miRNA, ritenuti per la cellula pezzi superflui di acido nucleico, hanno molteplici funzioni, svolgono un ruolo importante in quasi tutti i processi biologici e sono di fondamentale importanza nella regolazione della tumorigenesi e nella progressione dei tumori.

I microRNA sono brevi RNA non codificanti di circa 22 nucleotidi presenti in tutte le cellule eucariotiche. Il primo miRNA identificato è stato il *lin-4* del verme *Caenorhabditis elegans* nel 1993 e da allora molti laboratori hanno concentrato la loro ricerca sullo studio di questi piccoli RNA non codificanti, così da formulare un database chiamato MiRBase che al mese di giugno del 2014 mostra una lista di ben 2588 miRNA negli esseri umani e circa 1915 nei topi. [44]

Tumor suppressor miRs			OncomiRs		
Let-7	Lung Breast	Down Down	miR-21	Lung Esophagus Colon Liver Pancreas	Up Up Up Up Up
miR-221/222	Glioblastoma	Down		Breast Glioblastoma	Up Up
miR-181c	Stomach	Down		Myeloma	Up
miR-31	Breast Stomach Ovary	Down Down Down	miR-221/221	Lung Breast Liver	UP UP UP
miR-34	Colon Ovary Glioblastoma	Down Down Down	miR-181b	Liver Myeloma	Up Up
miR-200c	Breast	Down	miR-200a/b	Ovary	Up
miR-107	Colon Pancreas	Down Down	miR-10b	Breast Esophagus Glioblastoma	Up Up Up
miR-126	Stomach Breast	Down Down	miR-196	Esophagus Glioblastoma Colon	Up Up Up
miR-96	Pancreas	Down			
miR-196	Pancreas	Down			

Tabella 9. Espressione aberrante dei microRNA nei tumori (Acunzo M: *MicroRNA and cancer. A brief overview*. Advances in Biological Regulation, 2015; 57: 1-9).

I microRNA regolano circa il 60% dei geni e sono implicati in processi biologici come il controllo del ciclo cellulare, l'apoptosi, il metabolismo, lo sviluppo e la differenziazione; sono coinvolti anche in molte malattie: da quelle neurodegenerative ai disturbi metabolici, al cancro.

La prima associazione tra deregolazione dei miRNA e tumore è stata individuata nel 2002 da Croce e colleghi, studiando una regione critica del cromosoma 13 (13q14) spesso delecto nella Leucemia Linfatica Cronica (LLC). Così si scoprì che tale regione contiene due geni codificanti per il miR-15a ed il miR-16-1 e che l'assenza di questi due importanti miRNA, che agiscono come oncosoppressori, provoca lo sviluppo della forma indolente di LLC. [45]

Dopo questo primo studio un gran numero di microRNA è stato trovato deregolato nel tumore e nel 2004 Calin e collaboratori mostrarono che la metà dei microRNA mappano in regioni genomiche frequentemente alterate nei tumori, supportando l'idea che l'espressione aberrante dei miRNA sia la regola in oncologia e non l'eccezione, dal momento che questi controllano rilevanti processi tumorali quali proliferazione, apoptosi, migrazione e invasione. La loro espressione è repressa rispetto ai tessuti normali, quando si comportano come oncosoppressori, o possono presentarsi overespressi, quando agiscono da oncomiR. (Tabella 9) [46]

Un altro meccanismo che può condurre ad una espressione aberrante dei microRNA e quindi al tumore è la funzione alterata degli enzimi coinvolti nella loro biogenesi, quali Drosha e Dicer, dal momento che una diminuita espressione dei loro livelli è stata trovata nel 39% dei pazienti con tumore ovarico (Figura 7) [47].

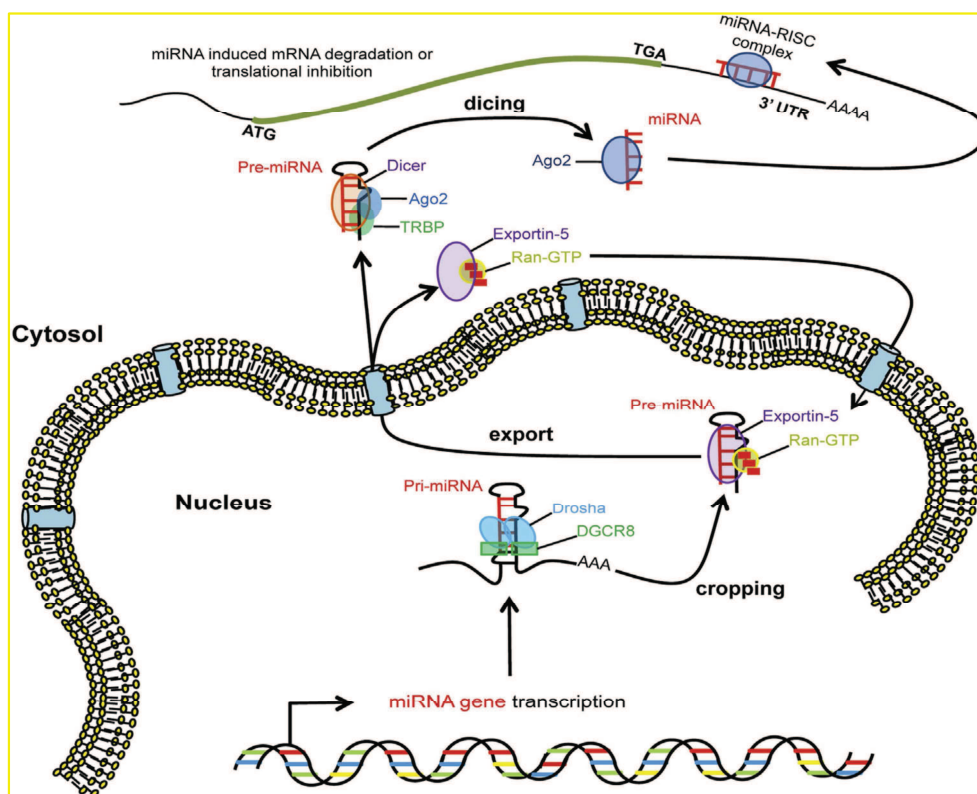


Figura 7. Rappresentazione schematica della biogenesi dei microRNA (Acunzo M: *MicroRNA and cancer. A brief overview*. Advances in Biological Regulation, 2015; 57: 1-9).

Anche il controllo della loro trascrizione è un altro meccanismo di modulazione dei microRNA importante e complesso. Considerando che la perdita di p53 è una delle maggiori alterazioni genetiche nei tumori, il legame tra la famiglia dei miR-34a e la p53 è un importante esempio di regolazione trascrizionale dei microRNA, poiché la p53 stimola la trascrizione della famiglia dei miR-34 inducendo apoptosi e senescenza, mentre si è visto che la perdita della p53 induce la loro down-regolazione in una alta percentuale di pazienti con carcinoma ovarico e con la p53 mutata. [48]

Oltre ad essere coinvolti direttamente nello sviluppo dei tumori, i microRNA sono anche in grado di regolare la formazione di cellule staminali tumorali e l'acquisizione del fenotipo di transizione epitelio-mesenchimale, meccanismi entrambi associati alla resistenza ai farmaci. La chemioterapia, la chirurgia e la radioterapia sono validi approcci nel trattamento del cancro. In particolare, la chemioterapia è molto spesso efficace nel ridurre la crescita delle cellule tumorali e contrastare la progressione metastatica.

Tuttavia, soprattutto nel tumore avanzato, è spesso inefficace a causa dello sviluppo della chemioresistenza. Come risultato della resistenza ai farmaci, i tumori spesso ricorrono più aggressivamente e acquisiscono la capacità di metastatizzare in organi distanti. Anche nel meccanismo di resistenza ai farmaci i miRNA giocano un ruolo chiave, non solo bersagliando le proteine coinvolte in questo processo, ma anche modulando i loro effettori a valle o influenzando l'espressione di altri microRNA. La loro espressione nelle cellule tumorali chemioresistenti spesso differisce da quella delle cellule chemiosensibili: il miR-19, il miR-21 ed il cluster miR-221/222 è stato trovato essere up-regolato diverse volte nella resistenza ai farmaci. In altri casi l'effetto dei microRNA nella chemioresistenza è tessuto-specifico, dal momento che il miR-27a è indirettamente legato alla chemiosensibilità del tumore alle ovaie, ma può essere direttamente coinvolto nella resistenza ai farmaci nella leucemia. I microRNA possono anche influenzare l'espressione dei bersagli molecolari di un farmaco, come è stato dimostrato per il miR-126 ed il fattore di crescita endoteliale vascolare (VEGF) nel tumore al polmone non a piccole cellule. Il VEGF è il target dell'inibitore dell'angiogenesi Bevacizumab e la presenza del miR-126 nelle cellule resistenti al Bevacizumab ripristina la sensibilità al farmaco. [47, 49]

Negli ultimi 10 anni centinaia di studi hanno dimostrato che i profili di miRNA possono distinguere i tessuti normali da quelli tumorali, individuare differenti sottotipi di particolari tumori e predire l'outcome o la risposta alla terapia. Infatti le nuove tecnologie, quali microarray e next generation sequencing (NGS), ci hanno permesso di studiare a lungo la relazione tra i microRNA ed i tumori mediante i profili di espressione di questa classe di piccoli RNA non codificanti nei tumori. Nel 2005 Volinia e collaboratori hanno usato una piattaforma di microarray per individuare microRNA

in sei tumori solidi umani. Il profilo, ottenuto confrontando il tessuto normale con quello tumorale, ha rivelato che l'allora prevalente idea che i microRNA erano solo down-regolati nel tumore era sbagliata, dal momento che potevano essere anche sovraespressi [50]. Da allora, si è ottenuto un profilo di espressione di microRNA più accurato e sensibile che ha dimostrato di variare a seconda del tipo di tumore, facilitando la loro classificazione sulla base di espressione dei microRNA, tanto che uno studio condotto su 22 tipologie diverse di tumori ha dimostrato che un profilo di espressione di microRNA è in grado di classificarli a seconda del tessuto di origine con una precisione superiore al 90% [51].

I microRNA possono, inoltre, anche essere utili per la predizione dell'outcome metastatico nei pazienti, dal momento che nel carcinoma mammario alcune loro variazioni di espressione sono state trovate correlate al processo metastatico e potrebbero essere utilizzate come efficienti biomarcatori di questo evento e come indicatori nella scelta della terapia clinica. Ad esempio, i livelli di espressione di miR-145 inversamente correlati con il riarrangiamento BCR-ABL nella Leucemia Mieloide Cronica (LMC) al momento della diagnosi e durante il trattamento potrebbero essere utilizzati per monitorare la terapia ed ottenere un miglior outcome [52].

Alcuni anni fa si scoprì che i microRNA sono presenti anche nel sangue, e ciò ha dato il via ad una serie di studi sui microRNA circolanti, dove possono essere rilevati nel plasma, nelle piastrine, negli eritrociti e nelle cellule nucleate. I miRNA del plasma sono molto stabili a diverse condizioni di pH e temperatura grazie al loro impacchettamento in piccole particelle quali esosomi e microvescicole o per la loro associazione con proteine leganti l'RNA, come l'Argonaute 2 o complessi lipoproteici che ne impediscono la degradazione. In particolare, la deregolazione di specifici microRNA circolanti è stata trovata nei tumori come in altre malattie e così, di recente, si sta pensando di utilizzare anche i microRNA circolanti come biomarcatori per la diagnosi precoce dei tumori e per l'individuazione dei pazienti che presenteranno resistenza ai farmaci. [47]

Negli ultimi anni la chemioterapia ha aumentato la sopravvivenza dei pazienti e ridotto il tasso di mortalità. Tuttavia, è necessario lo sviluppo di nuovi farmaci che abbiano bersagli più specifici. L'applicazione terapeutica dei microRNA nel tumore è un approccio nuovo che permetterà di interferire con il meccanismo molecolare delle neoplasie. La prima possibile loro applicazione si basa sulla reintroduzione di un singolo o di molteplici microRNA detti *mimic* (ovvero frammenti di RNA simili ai microRNA e non normalmente a doppio filamento) in un gruppo di cellule tumorali, cercando così di ristabilire il normale profilo di espressione e far recuperare alla cellula la funzione persa [53]. Lo sviluppo di nuovi strumenti per la progettazione di microRNA artificiali multitarget in grado di bersagliare simultaneamente diversi geni, o *amiRNA*, potrebbe essere estremamente utile come valida alternativa all'impiego di siRNA, permettendo l'utilizzo di poche molecole per

l'inibizione di bersagli multipli. Questo, accoppiato con i recenti progressi nello sviluppo di efficienti vettori per l'introduzione intracellulare di piccoli RNA, come nanoparticelle e sistemi virali, ha reso immaginabile la creazione di terapie basate su questa promettente tecnologia. Un'altra strategia per l'applicazione dei microRNA come strumenti terapeutici è quella di inibire i miRNA oncogeni utilizzando l'RNA messaggero antagonista. Tali anti-miR o antagomir (miRNA antagonisti) sono molecole di RNA a singolo filamento di 21-23 nucleotidi di lunghezza che, mediante accoppiamento complementare con i miRNA bersaglio, ne inibiscono la funzione. [47]

Tuttavia, l'utilizzo dei microRNA *mimic* presenta alcune incertezze circa l'efficacia della terapia, soprattutto per quanto riguarda la diffusione in vivo di queste molecole. Uno dei migliori approcci è l'uso di nanoparticelle in grado di consegnare piccoli RNA interferenti (siRNA o *short interfering RNA*) e microRNA nel tumore in modo specifico. Purtroppo un vero e proprio sistema di consegna tumore-specifico utilizzando le nanoparticelle è ancora un "work in progress" e l'effetto delle differenti tipologie di nanoparticelle sul corpo umano è ancora sconosciuto.

Poiché in uno studio precedente del Laboratorio di Oncologia Sperimentale dell'Istituto Ortopedico Rizzoli [54], tramite analisi di microarray, sono stati identificati 20 microRNA significativamente down-regolati in pazienti con sarcomi delle parti molli rispetto ai controlli sani, l'espressione di 12 di questi miRNA, principalmente correlati allo sviluppo ed alla progressione dei tumori, sarà validata sulla casistica selezionata e, attraverso l'utilizzo di tools bioinformatici, saranno individuati i possibili target dei miRNA analizzati e saranno fatte possibili correlazioni con le proteine identificate, mediante nanoparticle technology, nel siero dei pazienti affetti da SPM.

Per concludere possiamo affermare che le ultime scoperte nel campo della biologia molecolare hanno sicuramente fatto capire che la tumorigenesi e la progressione dei tumori è più complessa di ciò che si credeva, vedendo la partecipazione di altri protagonisti. D'altra parte, proprio i recenti studi sui microRNA, sulle loro modalità di funzione e sul loro coinvolgimento nella chemioresistenza potrà permettere il loro utilizzo come biomarcatori diagnostici, predittivi e prognostici e lo sviluppo di nuove target therapy.

2-SCOPO DELLA TESI

I sarcomi delle parti molli sono tumori rari, di istogenesi incerta, che spesso presentano problemi di diagnosi e di prognosi.

La rarità di tali tumori ha come conseguenza una scarsa disponibilità di campioni tumorali umani utili al fine di approfondire le conoscenze su tali patologie. Ad oggi, non esistono test di laboratorio che permettano una diagnosi precoce affidabile. Recentemente, lo sviluppo di tecniche “high throughput screening” ha consentito di avviare indagini globali del background molecolare del tumore del singolo paziente, fornendo dati per la selezione di biomarcatori con un significativo impatto clinico.

Partendo dal presupposto fondamentale che la patologia colpisce alcuni processi fisiopatologici, causando cambiamenti nei livelli di espressione proteica, gli studi proteomici sono essenziali per l'identificazione di molecole che controllano processi o pathway deregolati e che sono considerate marcatori dello stato di progressione della malattia. Lo scopo primario di questo lavoro è quello di individuare nuovi biomarcatori circolanti, ovvero proteine o frammenti proteici nel siero di pazienti affetti da sarcomi delle parti molli, che siano utili per diagnosi precoci, per la stratificazione dei pazienti ad alto rischio e per il monitoraggio della progressione o della risposta alla terapia. Per questo verrà utilizzata una nuova nanotecnologia, assolutamente non invasiva e che potrebbe individuare la presenza della patologia prima che questa sia conclamata: *core-shell hydrogel nanoparticles*. Le nanoparticelle, infatti, escludendo le proteine molto abbondanti come albumina, transferrina, immunoglobuline e lipoproteine, possono legare, proteggere dalla degradazione e concentrare frammenti peptidici o proteine a basso peso molecolare (< 15kDa), rilasciate dalle cellule tumorali e dai tessuti, presenti nel siero in così scarsa concentrazione da non essere rilevabili con le convenzionali tecniche immunologiche.

La validazione delle proteine identificate sarà effettuata con la stessa tecnica di nanoparticelle su un secondo gruppo di campioni con caratteristiche simili al primo e su un'altra serie di sieri da pazienti con sarcoma delle parti molli, applicando una tecnica immunologica tradizionale ed utilizzata nella maggior parte dei laboratori analisi: l'ELISA. Questo permetterà di valutare la potenzialità della nuova nanotecnologia nell'ambito di una applicazione traslazionale.

In una seconda fase di studio, data l'evidenza che le molecole circolanti derivano da frammenti proteici presenti nel microambiente tumorale, le proteine più significative saranno ricercate mediante analisi immunoistochimica su un numero più ampio di campioni tissutali di sarcomi delle parti molli che hanno sviluppato o meno metastasi, per individuare dei biomarcatori prognostici utili a stratificare i pazienti in base al rischio di metastatizzazione.

Infine l'espressione di 12 miRNA, correlati allo sviluppo e alla progressione dei tumori, e identificati in studi precedenti mediante analisi di microarray, sarà validata con TaqMan[®] Custom MicroRNA Array, al fine di individuare possibili connessioni con le proteine identificate e/o riconoscere pathway coinvolte nella trasformazione e nella progressione neoplastica.

Così, studi del network molecolare potrebbero aiutare ad identificare potenziali "bersagli" per future applicazioni clinico-terapeutiche sempre più specifiche ed efficaci.

3-MATERIALI E METODI

3.1 Casistica

Un totale di 278 pazienti (153 uomini e 125 donne), affetti da sarcomi delle parti molli ad alto grado secondo l'Union for International Cancer Control (UICC) TNM Classification of Malignant Tumors e assistiti nel reparto di Oncologia dell'Istituto Ortopedico Rizzoli (IOR) IRCCS di Bologna da ottobre 1991 ad aprile 2011, con completa documentazione clinica ed istologica, è stato incluso in questo studio. I tumori primari, localizzati in profondità e con un diametro > 5cm, erano localizzati nei tessuti molli delle estremità e della parete toracica. I criteri di selezione hanno escluso i pazienti precedentemente trattati con radio e/o chemioterapia e con recidive locali alla diagnosi.

La diagnosi, basata su criteri istologici, citogenetici ed immunoistochimici secondo la "Classificazione internazionale istologica" dell'Organizzazione Mondiale della Sanità [55], è stata confermata indipendentemente da più patologi. Il follow-up è stato calcolato dalla data della diagnosi al primo evento, ovvero la comparsa di metastasi, o all'ultimo follow-up, considerando un follow-up minimo di 3 anni per i pazienti non presentanti metastasi.

I pazienti sono stati sottoposti ad un'ampia escissione locale del tumore primario.

I campioni di sangue sono stati collezionati al momento della diagnosi, senza alcuna tipologia di additivo e conservati per 2h a temperatura ambiente per permettere loro di coagulare. Successivamente sono stati centrifugati a $3,000 \times g$ per 20 minuti a $4^{\circ}C$. I supernatanti sono stati prelevati e conservati a $-80^{\circ}C$. Nessun campione è stato scongelato più di due volte prima dell'analisi.

Inizialmente, 74 sieri sono stati suddivisi in discovery (34 sieri) e validation (40 sieri) set e sono stati analizzati mediante utilizzo di nanoparticelle ed analisi di cromatografia in fase liquida abbinata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS). 35 erano donne e 39 uomini con età media di 58 anni (range 18–92). 37 pazienti erano senza metastasi e 37 pazienti avevano sviluppato le metastasi, dei quali 12 alla diagnosi o nei primi 4 mesi dalla diagnosi. Il follow-up totale andava dai 5 ai 188 mesi con una mediana di 45 mesi. Il tempo alla metastasi variava da 0 a 153 mesi con una mediana di 7 mesi. 28 sieri provenienti da donatori sani sono stati utilizzati come controllo (Tabella 10).

Successivamente, la concentrazione delle proteine più significative all'analisi univariata (SERPINC1, CFHR5 e IGFBP7) è stata validata con tecnica ELISA in 59 (32 non metastatici e 27 metastatici) sieri e l'espressione tissutale di IGFBP7, a più significativo impatto traslazionale, è stata analizzata mediante analisi di immunoistochimica su Tissue Microarray (TMA) di 145 sezioni (66 non metastatici e 79

metastatici) di campioni di sarcomi delle parti molli ad alto grado inclusi in paraffina, di cui 59 appartenenti agli stessi pazienti con il siero (Tabella 11).

Per concludere, al fine di trovare un collegamento tra proteine identificate e i microRNA principalmente correlati allo sviluppo ed alla progressione dei tumori, trovati precedentemente down-regolati in un set di SPM [54], è stata condotta la validazione di 12 miRNA in 59 campioni di sarcomi delle parti molli ad alto grado con tessuto sia congelato che incluso in paraffina. 27 erano Leiomiomasarcomi e 32 Sarcomi Pleomorfi Indifferenziati, 32 uomini e 27 donne con età media di 63 anni. 33 pazienti svilupparono metastasi durante un periodo di follow-up minimo di 4 anni. Altri 10 tessuti non oncologici sono stati inclusi nello studio come controlli. L'analisi di espressione delle proteine MET e KIT, target di miR-152, che è risultato essere il più significativo, è stata valutata mediante immunohistochimica su TMA su una più ampia casistica di 86 SPM (Tabella 11).

	Discovery Set	Validation Set	Controllo
Campioni	No.	No.	No.
SPM maligni	34	40	
Donatori sani			28
Genere	No.	No.	No.
Maschi	21	18	14
Femmine	13	22	14
Età media – anni (range)	60 (33-92)	56 (18-92)	50 (32-73)
Follow-up totale mediano – mesi	45 (6-188)	45 (5-155)	51 (19-71)
Outcome	No.	No.	
Vivi	24	20	
Morti	10	20	
Decorso clinico	No.	No.	
SPM non metastatico	17	20	
SPM metastatico	17	20	

Tabella 10. Dati clinici dei pazienti con sarcoma delle parti molli (74) e donatori sani (28) analizzati mediante utilizzo di nanoparticle e spettrometria di massa (SPM = sarcomi delle parti molli).

Il protocollo di ricerca è stato approvato dal Comitato Etico dell'Istituto Ortopedico Rizzoli e tutti i pazienti hanno fornito l'appropriato consenso informato. Il lavoro è stato portato avanti in accordo con "The Code of Ethics" of the World Medical Association (Dichiarazione di Helsinki).

	ELISA, IHC (n = 59)	IHC (n = 86)
Genere	No.	No.
Maschi	32	50
Femmine	27	36
Età media – anni (range)	53 (18-83)	62 (19-92)
Sede	No.	No.
Arti superiori	7	15
Arti inferiori	48	65
Scheletro assile	4	6
Follow-up totale mediano – mesi	52 (5-239)	42 (3-204)
Tempo mediano alla metastasi – mesi	17 (0-187)	4 (0-98)
Outcome	No.	No.
Vivi	39	39
Morti	20	47
Decorso clinico	No.	No.
SPM non metastatico	32	34
SPM metastatico	27	52
Istotipo	No.	No.
Leiomiiosarcoma	8	32
Sarcoma Pleomorfo Indifferenziato	4	27
Sarcoma Sinoviale	16	10
Liposarcoma	25	10
Fibrosarcoma	6	7

Tabella 11. Dati clinici dei pazienti con sarcoma delle parti molli analizzati mediante utilizzo di saggio ELISA ed immunoistochimica (ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay; IHC = Immunohistochemistry; SPM = sarcomi delle parti molli).

3.2 Sintesi e caratterizzazione di *core-shell hydrogel nanoparticles*

La sintesi delle nanoparticelle con l'aggiunta di *bait* o delle esche è stata eseguita come fase di analisi preliminare, al fine di eliminare le proteine più abbondanti presenti in eccesso nel siero e concentrare le *low molecular weight proteins* e/o i peptidi derivanti da proteine più grandi e presenti in scarsa concentrazione (Figura 8) [42, 56].

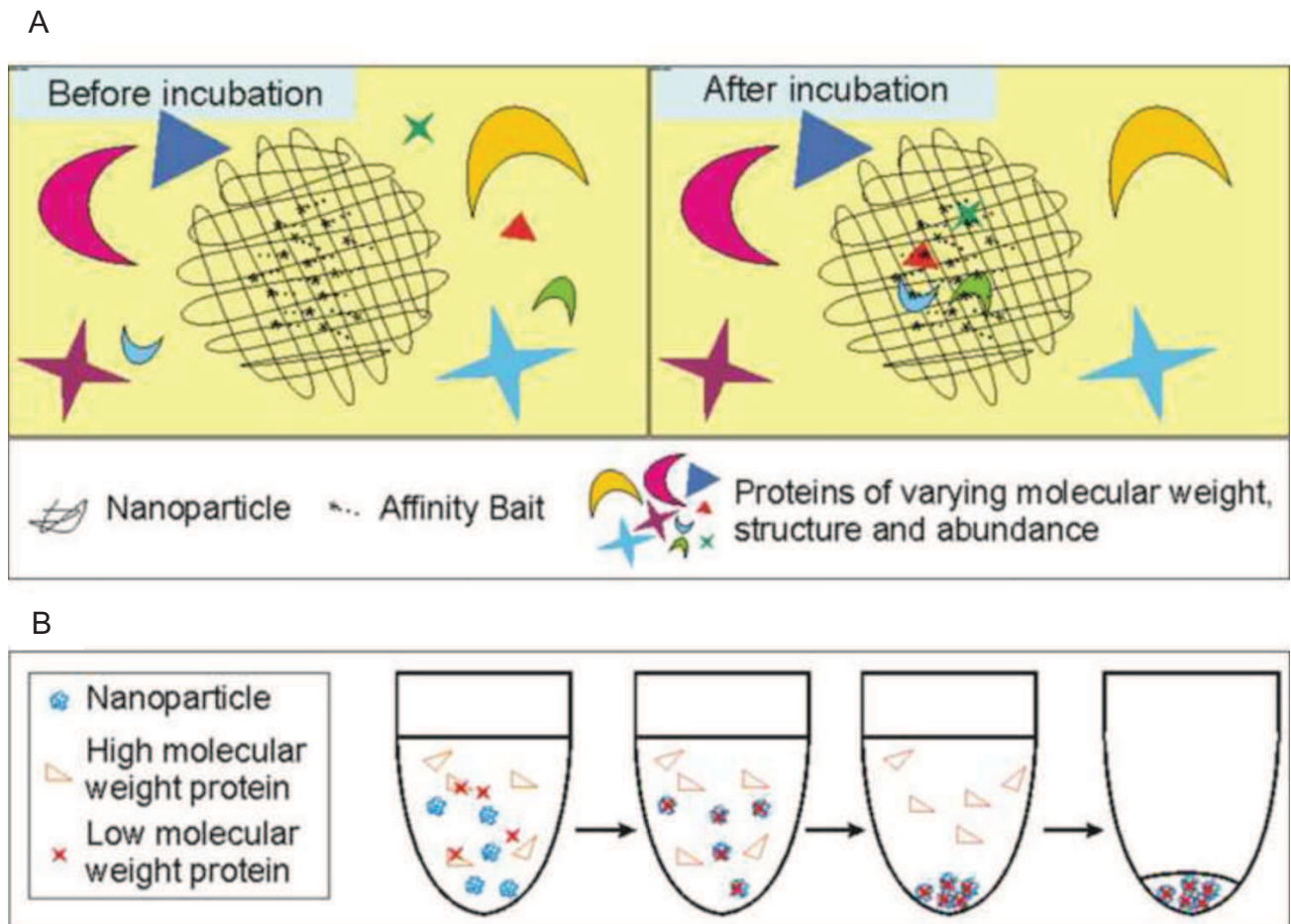


Figura 8. Meccanismo d'azione delle nanoparticle. A. Le esche o *bait* incorporate covalentemente nelle nanoparticelle legano le proteine con alta affinità di legame. Per le loro proprietà, solo le *low molecular weight proteins* possono entrare nelle nanoparticelle. B. Le proteine sono mischiate alle nanoparticle. Le *low molecular weight proteins* entrano nelle particelle. La soluzione è separata mediante centrifugazione. Le nanoparticelle contenenti le proteine a basso peso molecolare formano un pellet sul fondo della provetta. Il surnatante, contenente le proteine ad alto peso molecolare, è rimosso. (Douglas T: *The use of hydrogel microparticles to sequester and concentrate bacterial antigens in a urine test for lyme disease*. Biomaterials (2011), 32: 1157–1166).

Brevemente, le particelle sono state sintetizzate in due step: la prima fase prevede, con il metodo della polimerizzazione per precipitazione, la sintesi di particelle di allilammina (AA, Sigma-Aldrich Corp., The Woodlands, TX, USA), che grazie alla loro carica riescono a catturare peptidi e piccole molecole e sono costituite all'85% di monomero di N-isopropilacrilammide (NIPAm, Sigma-Aldrich), 5% di N,N'-metilenebisacrilammide come cross-linker (BIS, Sigma-Aldrich), 10% di monomero di allilammina e permanganato di potassio (KPS, Sigma-Aldrich) come iniziatore della reazione o polimerizzatore [57]. Dalla concentrazione di BIS utilizzata dipenderà la dimensione dei pori delle nanoparticelle.

Per sintetizzare 300ml di NIPAm/BIS/AA particles, 9.0 grammi di NIPAm e 0.280 grammi di BIS sono stati dissolti in 250ml di acqua Milli-Q. La soluzione è stata poi filtrata sotto vuoto con Millipore Type HAWP con pori da 0.45µm e trasferita in un pallone a fondo tondo con tre colli, il filtro è stato lavato con 100ml di acqua Milli-Q raccolta nello stesso pallone. Un condensatore di Allihn ed un termometro sono stati connessi al pallone e tutto il sistema è stato mantenuto in un'atmosfera di azoto a temperatura ambiente per circa 30 minuti. Successivamente sono stati aggiunti alla soluzione 676µl di allilammina e dopo altri 15 minuti la temperatura è stata innalzata fino a 70-80°C e lasciata stabilizzare per 30 minuti. 0.1 grammi di KPS sono stati dissolti in 5ml di acqua Milli-Q water e poi sono stati aggiunti alla soluzione nel pallone. La reazione è stata mantenuta così per 6 ore a 70-80°C. Successivamente è stato spento il becco Bunsen e la soluzione è stata lasciata in agitazione. Le particelle sono state lavate per centrifugazione a 19,000rpm per 50 minuti per 4-5 volte.

In un secondo momento, l'introduzione del Cibacron Blue F3GA (CB, Polysciences Inc., Warrington, PA, USA), *dye* o colorante che lega le proteine a basso peso molecolare proteggendole dalla degradazione enzimatica, ha permesso di ottenere particelle di NIPAm/Cibacron Blue F3GA con guscio di acido vinilsulfonico (VSA, Sigma-Aldrich) e con cuore di poly(NIPAm/CB) [58]. L'allilammina ha un doppio legame che si apre quando funziona da cross-linker, mentre il Cibacron Blue F3G4 si lega all'allilammina al posto del gruppo amminico, in corrispondenza dell'atomo di cloro, ed è in grado di legarsi alle tasche idrofobiche delle proteine, per cui cattura indiscriminatamente tutte le proteine a basso peso molecolare.

Nello specifico, per 250ml di NIPAm/AA/CB particles, 2.65g di Na₂CO₃ sono stati dissolti in circa 200ml di acqua MilliQ, alla quale poi sono stati aggiunti 12.5g di Cibacron Blue F3GA. 250ml di NIPAm/AA particles sono state aggiunte alla soluzione colorante e lasciate in agitazione per 48h. Le nanoparticelle sono state lavate per centrifugazione a 19,000rpm per 50 minuti per 4-5 volte.

20ml di NIPAm/AA/CB particles sono state messe in un pallone a fondo tondo con tre colli con un

condensatore di Allihn ed un termometro e lasciate a 75°C in un'atmosfera di azoto per 1 ora. 0.156g di NIPAm, 0.020g di BIS, 26µl di VSA e 0.092g di KPS sono stati dissolti in 20ml di acqua, filtrati e conservati in un pallone a parte. Aliquote di 3ml di quest'ultima soluzione sono state aggiunte alle NIPAm/AA/CB particle ogni 45 minuti. La reazione è stata mantenuta per 3 ore a 70-80°C. Successivamente il becco Bunsen è stato spento e la soluzione è stata lasciata in agitazione. Infine le nanoparticelle sono state lavate per centrifugazione a 19,000rpm per 50 minuti per 4-5 volte.

La dimensione delle particelle, dipendente dalla temperatura e dal pH, è stata determinata tramite spettroscopia a correlazione di fotoni (N5 Submicron microparticelle Size Analyzer, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) [59].

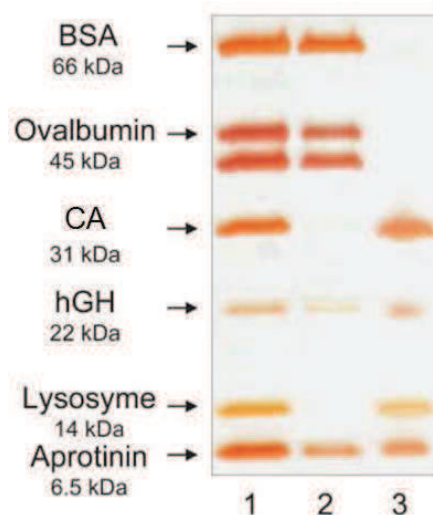


Figura 9. Valutazione delle proprietà delle NIPAm/AA/CB core-VSA shell particles mediante SDS-PAGE. Al fine di valutare le loro proprietà, le particle sono state incubate con una miscela di proteine con peso molecolare dai 6.5kDa ai 66kDa. Linea 1: miscela di proteine. Linea 2: proteine presenti nel surnatante. Linea 3: proteine catturate dalle nanoparticelle. Solo le proteine con peso molecolare basso sono state intrappolate dalle particelle. L'ovoalbumina e la BSA erano completamente escluse. (BSA = Bovine Serum Albumin; hGH = human Growth Hormone; CA = Carbonic Anhydrase).

Dopo la loro sintesi, la qualità delle nanoparticelle sintetizzate, ovvero la loro proprietà di legare le proteine piccole e scarsamente concentrate e di setacciare, così da escludere, le molecole che rimangono sulla superficie esterna delle particelle, è stata valutata incubandole in una soluzione proteica di una combinazione di marcatori con differente peso molecolare: aprotinina (6.5kDa), lisozima (14kDa), human Growth Hormone (22kDa), anidrasi carbonica (31kDa), ovoalbumina (45kDa), Bovine Serum Albumin (66kDa) [42]. Sono state, così, escluse dall'esperimento quelle che

legavano proteine ad alto peso molecolare come l'albumina e sono state utilizzate esclusivamente le particelle in grado di legare le proteine a basso peso molecolare.

La miscela di proteine, il surnatante e le nanoparticelle sono state poi analizzate mediante corsa elettroforetica a 200V su un gel a gradiente SDS-PAGE colorato con silver stain. L'analisi d'immagine di ciascun gel è stata eseguita catturando l'immagine di ogni gel con uno scanner PC (HP ScanJet 5400c, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) e salvando il file in formato JPEG. L'analisi densitometrica è stata eseguita ed ha dimostrato che l'insulina e la mioglobina erano state intrappolate dalle particelle, mentre l'albumina di siero bovino BSA era stata completamente esclusa (Figura 9).

3.3 Incubazione dei campioni con le nanoparticle

Aliquote da 500 μ l di campioni di siero sono state centrifugate a 16,100rcf per 5 minuti a 4°C e diluite 1:2 con Tris-HCl 50mM a pH 7.0. Il fattore di crescita Insulin-like growth factor 1 (IGF1) con peso molecolare di 7.6kDa (Antigenix America Inc., NY, USA) e la chemochina C-X-C motif chemokine 12 (CXCL12, Antigenix America), anche nota come Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) con peso molecolare di 11kDa, sono state aggiunte ai campioni di siero come standard interni di controllo. Ad ogni aliquota da 500 μ l di campione tumorale sono stati aggiunti CXCL12/SDF-1 β a concentrazione di 0.01 μ g/ μ l, mentre l'SDF-1 β è stato aggiunto ai sieri dei donatori sani utilizzati come controllo a concentrazione di 0.1 μ g/ μ l. [59] L'aggiunta nei campioni degli standard interni in una specifica proporzione tra i casi ed i controlli ha permesso di verificare l'efficienza del flusso di lavoro durante tutta l'analisi. Successivamente le nanoparticelle sono state incubate con ciascun siero diluito per 30' a temperatura ambiente in agitazione per inversione. Dopo l'incubazione e la cattura delle *low molecular weight proteins*, le particelle sono state separate per centrifugazione a 16,100rcf per 20' a 25°C, il surnatante è stato scartato e le particelle sono state lavate due volte risospesendo il pellet in 1mL di washing buffer (20% acetonitrile/0.5X PBS) e centrifugate di nuovo a 16,100rcf per 10' a 25°C. Il pellet è stato agitato meccanicamente con 500 μ l di buffer di eluizione (70% acetonitrile/10% idrossilammina) a temperatura ambiente e sonicato tre volte per 10''. La fase di eluizione è stata ripetuta due volte e gli eluati sono stati lasciati asciugare sotto un flusso di azoto (Organomation,

Berlin, MA, USA). I campioni asciugati sono stati conservati a -20°C fino al loro utilizzo. Le proteine eluite dalle nanoparticelle sono state ricostituite in urea 8M (Sigma-Aldrich), ridotte da DTT 10mM (Sigma-Aldrich), alchilate da iodacetammide 50mM (Sigma-Aldrich) e digerite da 500ng di tripsina (Promega Corp., Madison, WI, USA) overnight a 37°C. Cinque microlitri di acido acetico glaciale 100% (Fisher Scientific, Pittsburg, PA, USA) è stato aggiunto per porre fine alla digestione. I peptidi triptici sono stati inoltre purificati mediante Zip-Tip (Millipore, Darmstadt, Germany). [59]

3.4 Preparazione dei campioni ed analisi di spettrometria di massa delle proteine sieriche

I peptidi provenienti da ogni campione sono stati analizzati mediante cromatografia liquida in fase inversa/spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) utilizzando uno spettrometro di massa a trappola ionica lineare quadrupolare (LTQ)-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). I dati dell'analisi di spettrometria di massa hanno confermato la presenza degli standard interni, avvalorando la riproducibilità e la buona resa dell'analisi. La colonna a fase inversa C18 (0.5mm id × 50mm lunghezza) della Michrom BioResources (Michrom BioResources Inc., Auburn, CA, USA) è stata lavata per 2 minuti con la fase mobile A (0.1% acido formico) ed i peptidi sono stati eluiti usando un gradiente lineare dallo 0% al 50% della fase mobile B (0.1% acido formico, 80% acetonitrile) in 50 minuti a 2µl/min, e dopo fino al 100% di fase mobile B per altri 2 minuti.

La spettrometria di massa è stata eseguita in modo dipendente dai dati: ciascuna scansione completa è stata seguita da cinque scansioni nelle quali i cinque più abbondanti ioni molecolari sono stati selezionati dinamicamente e frammentati per dissociazione indotta da una collisione usando energia di collisione normalizzata del 30%. Un campione bianco è stato analizzato utilizzando un *double high-performance liquid chromatograph* (HPLC) ovvero un cromatografo liquido doppio ad alte prestazioni dopo aver analizzato un campione. Per verificare la riproducibilità dell'HPLC, due campioni standard di enolasi di lievito (Michrom BioResources) sono stati analizzati ogni 15 campioni di siero esaminati.

3.5 Identificazione delle proteine differenzialmente abbondanti dagli Spectral Index (SpI) ed analisi bioinformatica

Per l'identificazione delle proteine, gli spettri acquisiti mediante analisi di spettrometria di massa sono stati cercati nel database delle proteine umane del National Center for Biotechnology Information utilizzando il programma SEQUEST (ThermoElectron Corp, Madison, WI, USA). L'analisi del conteggio degli spettri è stata realizzata utilizzando Scaffold (Proteome Software, Inc. Portland, OR, USA). I livelli di proteina sono stati prontamente stimati sulla conta del peptide o sulla somma cumulativa dello spettro del peptide registrato che può essere sovrapposto in modo affidabile ad una data proteina [60]. Ciò che infatti legge lo spettrometro di massa è un valore numerico discreto che prende nome di *peptide hits*, o una misura semi-quantitativa della concentrazione della proteina, ovvero il numero di volte che il peptide ionizzato viene misurato dal detector dello spettrometro di massa. Più alta è la concentrazione della proteina e più volte il detector rileva il peptide ionizzato. La conta del peptide ridondante permette la stima dell'abbondanza relativa di una proteina. Per determinare le proteine del siero con abbondanza statisticamente differenziale, lo Spectral Index (SpI) è stato calcolato dalle conte normalizzate degli spettri [61].

3.6 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

I livelli circolanti delle tre proteine che all'analisi di Kaplan-Meier presentavano una differenza significativa nel siero dei pazienti metastatici rispetto ai non metastatici, Serpina C1 (SERPINC1), Complement factor H-related 5 (CFHR5) e Insulin-like growth factor-binding protein 7 (IGFBP7), sono stati misurati, mediante saggio ELISA, in 59 sieri di pazienti con sarcoma delle parti molli ad alto grado ed in ulteriori 10 controlli sani (ELISA kit from Boster Biological Technology Co., Fremont, CA, USA).

Brevemente, i campioni di sangue sono stati centrifugati a 3,000g per 20' a 4°C ed i surnatanti sono stati raccolti, stoccati in aliquote e conservati a -80°C fino al loro utilizzo. L'intervallo di tempo tra il

loro processamento ed il congelamento è stato inferiore a 2h per ogni campione. Nessuno dei campioni è stato scongelato più di due volte prima dell'analisi. 50µl di ogni singolo campione di siero sono stati aggiunti a 450µl di buffer di diluizione. La curva standard è stata allestita per ogni esperimento. Sia la curva standard che ogni singolo campione sono stati letti in doppio.

Brevemente, 100µl di standard e di campione sono stati aggiunti ad ogni pozzetto e la piastra è stata incubata a 37°C per 90 minuti. Eliminato il contenuto senza lavare, sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 100µl di anticorpo biotinilato e la piastra è stata incubata a 37°C per 60 minuti. La piastra è stata poi lavata tre volte con PBS 0.01M e 100µl di soluzione ABC sono stati aggiunti in ogni pozzetto. La piastra è stata incubata a 37°C per 30 minuti. Successivamente la piastra è stata lavata 5 volte con PBS 0.01M. Il contenuto di ogni pozzetto è stato eliminato e 90µl di TMB color developing agent sono stati aggiunti ad ogni pozzetto. La piastra è stata incubata a 37°C al buio per 15-20 minuti. 100µl di TMB stop solution sono stati aggiunti ad ogni pozzetto. La piastra è stata letta a 450nm in un lettore di piastre (Promega, Milan, Italy) entro 30 minuti dall'aggiunta della stop solution. La sensibilità del saggio era < 20pg/ml.

3.7 Tissue Microarray e analisi immunoistochimica

In accordo con l'ipotesi che un aumento dei livelli di proteine circolanti è probabilmente attribuibile ai processi proteolitici tissutali e/o alla sovrapproduzione da parte delle cellule tumorali, su sezioni di Tissue Microarray (TMA), la proteina IGFBP7, con differenza più significativa tra i valori mediani nel siero dei pazienti con SPM rispetto ai controlli sani, è stata studiata su 145 pazienti con SPM primario ad alto grado (40 Leiomioidi sarcomi, 35 Liposarcomi, 31 Sarcomi Pleomorfi Indifferenziati, 26 Sarcomi Sinoviali, 13 Fibrosarcomi), tra i quali 59 corrispondenti ai sieri precedentemente analizzati con saggio ELISA, ottenuti da campioni chirurgici dei pazienti, fissati in formalina al 10%, processati e inclusi in paraffina. Dei 145 campioni analizzati, 79 erano metastatici e 66 non metastatici.

Successivamente, anche l'espressione delle proteine MET e KIT, ipotetici target del miR-152, è stata valutata su 59 campioni di SPM.

Le sezioni di tutti i campioni, colorate con ematossilina-eosina, sono state riviste dai patologi per scegliere le aree più rappresentative per la costruzione del TMA. Il TMA è stato realizzato nel Laboratorio di Anatomia Patologica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna utilizzando TMA Master System (Euroclone SpA, Milano, Italy). Spot di tessuto di 4µm di diametro sono stati disposti sui vetri in triplicato.

L'espressione proteica è stata valutata mediante analisi di immunohistochimica.

Le sezioni tissutali sono state disposte in stufa per 1-2 ore, al fine di far sciogliere la paraffina. Successivamente, si sono tenute per 30 minuti, per 2 volte, in xilolo, poi in alcool al 100% per 5 minuti, in alcool al 90% per 5 minuti, in alcool al 75% per 5 minuti ed infine per altri 5 minuti in acqua distillata. I campioni sono, poi, stati ricoperti con la Peroxidase Block (Dako LSAB+System-HRP, Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) per 5 minuti, e poi in Universal Block (catalog no. 71-00-61; KPL, Gaithersburg, MD, USA) per 20 minuti a temperatura ambiente.

Come da protocollo sono stati utilizzati come anticorpi primari goat policlonale anti-IGFBP7 (Cat. #AF1334, 5µg/ml; R&D Systems, Abingdon, UK), rabbit policlonale anti-MET C-28 (Cat. # sc-161, 1:300; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e rabbit monoclonale anti-KIT D13A2 (1:50; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) a 4°C overnight.

I campioni sono stati lavati, poi, per 3 volte con una soluzione di PBS 1X per 5 minuti e poi sono stati ricoperti con Biotinylated link (kit Dako) per 30 minuti a temperatura ambiente. Sono seguiti altri 3 lavaggi in PBS 1X e poi un'altra incubazione per 30 minuti a temperatura ambiente con Streptavidin-HRP (kit Dako). I campioni sono stati poi rilavati 3 volte con PBS 1X e poi sono stati incubati con una soluzione DAB + Substrate buffer (kit Dako) al massimo per 3 minuti, a temperatura ambiente. I vetri sono poi stati immersi in ematossilina di Meyer per 20 secondi. Sono seguiti diversi lavaggi: in acqua distillata per eliminare l'ematossilina in eccesso, la disidratazione in etanolo al 95% per 2 minuti, in etanolo assoluto per 5 minuti, in xilolo per 2 minuti. I vetri sono stati montati con una soluzione a base non acquosa.

I risultati della colorazione sono stati interpretati dai patologi. A seconda della percentuale delle cellule tumorali positive, i campioni sono stati valutati come 0 (cellule positive ≤ 10%); 1 (cellule positive tra 11% e 25%); 2 (cellule positive tra 26% e 49%); 3 (cellule positive ≥ 50%). L'intensità di colorazione era: 0 = negativa; 1 = debole; 2 = moderata; 3 = forte.

I livelli di cut-off determinati dalla somma dei punteggi erano: 0-1 per i casi negativi; 2-4 per i casi debolmente o moderatamente positivi in meno del 50% delle cellule tumorali; 5-6 per forte e moderata espressione in più del 50% delle cellule tumorali.

3.8 Estrazione di RNA

L'RNA totale è stato estratto da 59 campioni di pazienti affetti da sarcoma delle parti molli e 10 tessuti normali mediante TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), una soluzione monofasica contenente fenolo e guanidina tiocianato. I tessuti sono stati immersi in un opportuno volume di TRIzol Reagent. Mediante centrifugazione tutto il materiale insolubile è stato separato dalla soluzione ed il surnatante è stato trasferito in una provetta pulita. 200µl di cloroformio per ogni ml di TRIzol sono stati aggiunti a ciascun campione. Dopo agitazione meccanica, l'emulsione è stata incubata brevemente a temperatura ambiente. I campioni sono stati centrifugati a 12,000rpm per 15' a 4°C e la fase inorganica con l'RNA è stata recuperata. L'RNA è stato fatto precipitare con 500µl di etanolo per ogni ml di TRIzol Reagent usato. I campioni sono stati lasciati a temperatura ambiente per 10' e poi centrifugati a 12,000rpm per 15' a 4°C. Dopo aver eliminato il surnatante, il sedimento di RNA è stato lavato con 800µl di etanolo al 75% per ml di TRIzol, agitato meccanicamente per pochi secondi e centrifugato a 10,000rpm per 5' a 4°C. Infine, l'etanolo è stato rimosso, il sedimento di RNA è stato fatto asciugare all'aria sotto cappa chimica e risospeso in un opportuno volume di RNaseq reagent (Ambion, Inc., Austin, TX, USA). Gli estratti sono stati conservati a -80°C. La concentrazione degli RNA totali è stata misurata utilizzando uno spettrofotometro e misurando l'assorbanza a 260nm. Per la successiva analisi quantitativa si sono scelti campioni caratterizzati da un rapporto $A_{260}/A_{280} \cong 1.6$. Per verificare l'assenza di eventuali contaminazioni da DNA genomico e l'integrità dell'RNA è stata eseguita un'elettroforesi su gel di agarosio all'1% in TBE 1X.

3.9 Analisi di espressione dei miRNA nei campioni di sarcoma delle parti molli

L'analisi è stata effettuata utilizzando TaqMan[®] Custom MicroRNA Array, contenenti i primer e le sonde specifiche per i miRNA di interesse. La piastra conteneva 12 miRNA selezionati (miR-137, miR-21.5p, miR-100.5p, miR-409.5p, mir-152, miR-376a.3p, miR-487a, miR-1305, miR-212.3p, miR-892b, miR-223.3p, miR-138.5p) e 2 RNA nucleolari (snRNAs) come controllo endogeno per la

normalizzazione dei dati (RNU48 e RNU44).

Il cDNA a singolo filamento è stato generato dall'RNA totale mediante retrotrascrizione, utilizzando l'Applied Biosystems TaqMan MicroRNA Multi Reverse Transcription Human RT Primer pool (cod. 4384791; Applied Biosystems, Life Technologies, Foster City, CA, USA).

Il volume totale della reazione era di 15µl, di cui 3µl di RNA campione e 12µl di mix così composta:

- Custom RT Primer Pool: 6.00µl;
- dNTPs con dTTP (100mM): 0.30µl;
- MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/µl): 3.00µl;
- 10X RT Buffer: 1.50µl;
- RNase Inhibitor (20U/µl): 0.19µl;
- Nuclease-free water: 1.01µl.

Il programma di retrotrascrizione impostato nel termociclatore era il seguente:

Step Type	Time (minutes)	Temperature (°C)
HOLD	30	16
HOLD	30	42
HOLD	5	85
HOLD	∞	4

Il cDNA è stato amplificato con PCR utilizzando il kit TaqMan® PreAmp Master Mix (cod. 4384267; Applied Biosystems) con una macchina Applied Biosystems 7900 Real-Time PCR system.

Il volume totale della reazione era di 25µl, di cui 2.5µl di cDNA e 22.50µl di mix composta da:

- TaqMan PreAmp Master Mix, 2X: 12.50µl;
- Custom PreAmp Primer Pool: 3.75µl;
- Nuclease-free water: 6.25µl.

I campioni sono stati incubati a 50°C per 2 minuti ed a 94.5°C per 10 minuti, seguiti da 40 cicli a 97°C per 30 secondi ed a 59.7°C per 1 minuto. Gli array sono stati fatti correre in doppio per ogni campione per permettere l'assestamento della variabilità tecnica e la quantificazione relativa è stata fatta utilizzando il metodo del $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Applied Biosystems, User Bulletin No. 2, P/N 4303859). I dati degli array dei miRNA sono stati analizzati utilizzando l'SDS 2.3 software tool (Applied Biosystems). I

livelli di espressione dei miRNA sono stati normalizzati rispetto ai valori mediani di RNU44 e RNU48 ed il Δ CT mediano dei tessuti normali è stato usato come calibratore. I valori dei Δ CT sono stati sottoposti al test di Mann-Whitney e corretti con False Discovery Rate (FDR) per i test multipli.

3.10 Analisi di espressione di mRNA di MET e KIT nei campioni di tumore primario

I campioni di RNA ottenuti precedentemente sono stati retrotrascritti nel filamento di DNA complementare (cDNA) utilizzando il kit High capacity cDNA archive (cod. 4322169; Applied Biosystems) e sono stati amplificati mediante Real-Time PCR per validare l'espressione dei putativi target del miRNA. Per ogni campione sono stati utilizzati 4 μ l di RNA (100ng/ μ l) e sono stati aggiunti 68 μ l di RNasi-free water, 10 μ l di Reverse Transcription buffer 10X, 4 μ l di dNTPs 25X, 10 μ l di random primers 10X e 4 μ l di Multiscribe Reverse Transcriptase 50U/ μ l per arrivare ad un volume finale di 100 μ l.

La reazione di retrotrascrizione è avvenuta mediante termociclatore Applied 2400 alle seguenti condizioni:

- 10 minuti a 25°C;
- 120 minuti a 37°C;
- ∞ a 4°C.

Per ogni gene la reazione di amplificazione è stata condotta in duplicato in un volume totale di 25 μ l costituito da 1.25 μ l di Assay 20X, 11.25 μ l di cDNA e 12.5 μ l di TaqMan Universal Master Mix 2X (Ampli Taq Gold DNA polimerasi, AmpErase UNG, desossinucleotidi trifosfato, fluorocromo di riferimento passivo, tampone di PCR ottimizzato) (Applied Biosystems). La reazione è avvenuta impostando 40 cicli di reazione nelle seguenti condizioni:

- fase di attivazione dell'enzima UNG (*Uracil-N-glicosilasi*): 2 minuti a 50°C;
- fase di denaturazione: 10 minuti a 95°C;
- fase di annealing e di sintesi: 1 minuto a 60°C.

I livelli di espressione del MET e del KIT sono stati quantificati utilizzando TaqMan Expression Assays (rispettivamente Hs01565584_m1 e Hs00174029_m1; Applied Biosystems) seguendo il protocollo (Applied Biosystems). I livelli di espressione del MET e del KIT sono stati calcolati utilizzando il metodo del $2^{-\Delta\Delta CT}$ e normalizzati rispetto al gene housekeeping ACTB (Hs99999903_m1; TaqMan Expression Assays; Applied Biosystems) [62]. Un pool di linfociti normali è stato usato come calibratore.

3.11 Analisi dei dati

I peptidi circolanti differenzialmente abbondanti sono stati valutati da una ispezione manuale dei dati della spettrometria di massa, per confermare la loro identificazione, e le differenze delle loro abbondanze relative sono state determinate applicando l'analisi statistica alla conta degli spettri [59].

Il test di correlazione per ranghi di Spearman è stato utilizzato per valutare le correlazioni tra i frammenti.

L'analisi univariata di Cox è stata utilizzata per valutare l'influenza delle variabili continue sullo sviluppo delle metastasi. Il valore mediano delle variabili nell'intera popolazione dei pazienti affetti da sarcoma delle parti molli è stato impostato come valore di cut-off.

L'analisi di sopravvivenza di Kaplan-Meier è stata utilizzata per stabilire la probabilità di sopravvivenza libera da malattia e per valutare l'influenza delle variabili nominali sullo sviluppo delle metastasi.

L'analisi multivariata di Cox è stata utilizzata per selezionare le variabili in grado di predire in modo indipendente lo sviluppo metastatico.

Il test di Mann-Whitney non parametrico è stato utilizzato per confrontare l'abbondanza delle proteine ed i livelli di espressione dei miRNA nei campioni non appaiati. Il test del χ^2 o test esatto di Fisher è stato usato per la distribuzione di frequenza delle variabili. Il test di correlazione per ranghi di Spearman è stato utilizzato per valutare la correlazione tra microRNA e target.

Per tutti i test, $p \leq 0.05$ è stato considerato significativo.

L'analisi statistica è stata effettuata utilizzando il software SPSS v.19.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

4-RISULTATI

4.1 Identificazione di candidati biomarcatori mediante *core-shell hydrogel nanoparticles* e spettrometria di massa

Per identificare le *low molecular weight proteins* ed i frammenti delle proteine presenti nel siero di pazienti affetti da sarcoma delle parti molli ad alto grado, sono state utilizzate nanoparticelle e successivamente analisi di cromatografia in fase liquida abbinata alla spettrometria di massa tandem (LC-MS/MS) sia in un discovery set di 34 sieri provenienti da pazienti con SPM ad alto grado, sia in un altro set di validazione indipendente costituito da sieri di 40 pazienti con caratteristiche cliniche ed istologiche sovrapponibili.

L'analisi del conteggio degli spettri dei dati di spettrometria di massa utilizzando Scaffold, a seguito della cattura delle proteine ad opera delle nanoparticelle, ha permesso l'identificazione rispettivamente di 1313 e 502 analiti nei due set di campioni analizzati. I campioni provenienti da donatori sani sono stati utilizzati come controllo.

Confronti multipli di spettri normalizzati hanno permesso di selezionare 23 frammenti proteici/peptidi comuni ai due gruppi di campioni (Tabella 12), con una differenza relativa in abbondanza superiore al 50% quando paragonati al controllo sano (Tabella 13), intendendo per differenza relativa la differenza tra la concentrazione della proteina nei sieri dei pazienti malati e nei sieri dei sani rispetto alla loro concentrazione media percentuale. Sorprendentemente, la proteina di matrice GLA (MGP), la proteina prionica (PRNP) e la proteina C reattiva (CRP) erano completamente assenti nei campioni normali e presenti in quantità scarsissima nei SPM. Delle 23 proteine, 17 presentavano differenze statisticamente significative all'analisi di Mann-Whitney rispetto al controllo (Tabella 13).

La correlazione non parametrica Rho di Spearman (ρ) è stata calcolata per ogni coppia di proteine identificate nei campioni di SPM per trovare le pathway di interconnessione coinvolte nella progressione maligna. Sono state considerate solo le correlazioni con $\rho > 0.4$ o $\rho < -0.4$ (Tabella 14). I dati erano significativi per 39 coppie di endpoint e 9 erano più fortemente correlate, mostrando valori di $\rho > 0.7$. In particolare, i precursori dei frammenti di proteine coinvolte nella risposta immunologica ed infiammatoria (proteina del complemento 4A (C4A), ceruloplasmina (CP), alfa-1-B glicoproteina (A1BG), paraoxonasi sierica/arilesterasi 1 (PON1), proteina legante la vitamina D (GC)) erano fortemente correlate l'una all'altra ed ai fattori di coagulazione del sangue (Serpina C1) (Tabella 14).

Al contrario, una correlazione inversa considerevole è stata vista tra C4A, CP e A1BG con MGP,

che appartiene alla famiglia delle proteine leganti il calcio ed è stata trovata in scarsissima concentrazione nel siero dei pazienti con SPM ad alto grado e quasi completamente assente nei soggetti sani.

PROTEIN ID	DESCRIZIONE DEI FRAMMENTI PROTEICI	CATEGORIE FUNZIONALI	MW (kDa)*
gi 105990532 ref NP_000375.2	apolipoprotein B precursor (APOB)	Lipoproteina	516
gi 116292750 ref NP_005568.2	lipoprotein Lp(a) precursor (LPA)	Lipoproteina	501
gi 4504619 ref NP_001544.1	pregnancy-zone protein (PZP)	Proteina della risposta infiammatoria	360
gi 4503647 ref NP_000123.1	coagulation factor VIII isoform a precursor (F8)	Proteina della risposta infiammatoria	280
gi 67190748 ref NP_009224.2	complement component 4A preproprotein (C4A)	Proteina della risposta infiammatoria	193
gi 67190163 ref NP_005798.2	proteoglycan 4 isoform A (PRG4)	Proteina della matrice extracellulare	151
gi 4557485 ref NP_000087.1	ceruloplasmin precursor (CP)	Proteina della risposta infiammatoria	122
gi 55770842 ref NP_000558.2	C-reactive protein, pentraxin-related (CRP)	Proteina della risposta infiammatoria	114
gi 54607120 ref NP_002334.2	lactotransferrin precursor (LTF)	Proteina antimicrobica	78
gi 4507467 ref NP_000349.1	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa precursor (TGF-β1)	Fattore di crescita	75
gi 162809334 ref NP_002855.2	keratin 1 (KRT1)	Proteina dell'epidermide	66
gi 13540563 ref NP_110414.1	complement factor H-related 5 (CFHR5)	Proteina della risposta immunitaria	64
gi 195972866 ref NP_000412.3	keratin 10 (KRT10)	Proteina dell'epidermide	60
gi 21071030 ref NP_570602.2	alpha 1B-glycoprotein precursor (A1BG)	Proteina della risposta infiammatoria	54
gi 4502261 ref NP_000479.1	serpin peptidase inhibitor, clade C, member 1 (SERPINC1)	Proteina regolatoria della coagulazione del sangue	53
gi 32483410 ref NP_000574.2	vitamin D-binding protein precursor (GC)	Carrier della Vitamina D	53
gi 19923106 ref NP_000437.3	paraoxonase 1 precursor (PON1)	Proteina idrolizzante	40
gi 4502101 ref NP_000691.1	annexin I (ANXA1)	Proteina calcio-dipendente legata ai fosfolipidi	39
gi 4504619 ref NP_001544.1	insulin-like growth factor binding protein 7 (IGFBP7)	Growth factor binder	31
gi 4502505 ref NP_000707.1	complement component 4 binding protein, beta chain isoform 1 precursor (C4BPB)	Proteina della risposta infiammatoria	28
gi 4506113 ref NP_000302.1	prion protein preproprotein (PRNP)	Proteina prionica	28
gi 4507065 ref NP_003055.1	secretory leukocyte peptidase inhibitor precursor (SLPI)	Proteina della risposta infiammatoria	14
gi 49574514 ref NP_000891.2	matrix Gla protein (MGP)	Proteina legante il calcio	12

Tabella 12. Lista dei 23 frammenti circolanti/peptidi identificati sia nel discovery che nel validation set di pazienti affetti da sarcoma delle parti molli. Per l'identificazione delle proteine, gli spettri acquisiti mediante analisi di spettrometria di massa sono stati cercati nel database delle proteine umane del National Center for Biotechnology Information (MW* = Molecular Weight o peso molecolare delle proteine intere identificate mediante analisi di spettrometria di massa).

Proteina	Tumore^a	Controllo sano^b	Differenza relativa (%)^c	Mann-Whitney (p value)
APOB	3695.09	101.49	189	0.032
IGFBP7	716.05	1.83	199	<0.0005
KRT1	126.40	2.32	193	ns
SERPINC1	637.98	30.05	182	<0.0005
LTF	162.55	7.34	183	0.003
C4BPB	77.93	2.38	188	0.01
MGP	24.00	0.07	199	0.05
PZP	110.22	3.78	187	ns
PRG4	76.45	3.18	184	0.002
CFHR5	32.17	1.50	182	0.002
PRNP	11.67	0.00	200	0.05
KRT10	60.00	1.13	193	ns
F8	9.00	0.00	200	ns
LPA	72.84	4.54	177	0.003
SLPI	7.00	0.73	162	0.006
ANXA1	9.00	0.07	197	ns
C4A	1951.70	117.64	177	<0.0005
CRP	23.00	0.00	200	ns
CP	81.96	4.40	180	0.001
A1BG	117.72	4.51	185	0.003
PON1	48.10	4.15	168	<0.0005
GC	47.23	3.21	175	<0.0005
TGF-β1	24.03	1.46	177	0.006

Tabella 13. Analisi del conteggio degli spettri degli analiti differenzialmente abbondanti nel siero dei pazienti affetti da sarcoma delle parti molli rispetto ai controlli sani. 17 proteine erano statisticamente significative per l'analisi di Mann-Whitney (^asomma degli spettri identificati nei campioni di tumore; ^bsomma degli spettri identificati nei controlli sani; ^ctumore - controllo sano / media del numero di spettri per tumore e controllo sano x 100).

Proteina	Proteina	Spearman's ρ	p value
MGP	C4A	-0.50	<0.0005
MGP	CP	-0.45	<0.0005
MGP	A1BG	-0.43	<0.0005
C4BPB	SERPINC1	0.42	<0.0005
PRG4	SERPINC1	0.65	<0.0005
CFHR5	SERPINC1	0.40	<0.0005
PRG4	C4BPB	0.43	<0.0005
CFHR5	C4BPB	0.46	<0.0005
APOB	LPA	0.47	<0.0005
C4A	SERPINC1	0.77	<0.0005
C4BPB	C4A	0.55	<0.0005
PRG4	C4A	0.62	<0.0005
CFHR5	C4A	0.48	<0.0005
APOB	A1BG	0.41	<0.0005
SERPINC1	CP	0.74	<0.0005
SERPINC1	A1BG	0.70	<0.0005
PRG4	CP	0.60	<0.0005
PRG4	A1BG	0.60	<0.0005
APOB	PON1	0.49	<0.0005
APOB	GC	0.42	<0.0005
APOB	TGFB1	0.42	<0.0005
SERPINC1	PON1	0.68	<0.0005
SERPINC1	GC	0.69	<0.0005
C4BPB	PON1	0.41	<0.0005
PRG4	PON1	0.52	<0.0005
PRG4	GC	0.45	<0.0005
CFHR5	GC	0.44	<0.0005
PON1	CFHR5	0.44	<0.0005
C4A	CP	0.73	<0.0005
C4A	A1BG	0.73	<0.0005
C4A	PON1	0.73	<0.0005
C4A	GC	0.63	<0.0005
CP	A1BG	0.79	<0.0005
CP	PON1	0.64	<0.0005
A1BG	PON1	0.67	<0.0005
CP	GC	0.81	<0.0005
A1BG	GC	0.75	<0.0005
C4A	TGFB1	0.41	<0.0005
PON1	GC	0.67	<0.0005

Tabella 14. Analiti correlati direttamente ed inversamente secondo la correlazione ρ di Spearman. Solo le correlazioni con $\rho > 0.4$ o $\rho < -0.4$ sono state riportate. Le correlazioni molto forti ($\rho > 0.7$) sono sottolineate.

Il potere discriminatorio di malignità di ciascun probabile marcatore selezionato è stato valutato mediante analisi delle curve ROC e 12 con l'area sotto la curva (AUC) > 0.7 ($p \leq 0.001$) sono stati inseriti in un'analisi di regressione multipla (Tabella 15).

RANK	PROTEIN	AUC	95% CI	p value
1	APOB	0.722	0.616-0.827	0.001
2	IGFBP7	0.828	0.734-0.921	<0.0005
4	SERPINC1	0.851	0.768-0.935	<0.0005
6	C4BPB	0.753	0.644-0.861	<0.0005
9	PRG4	0.790	0.694-0.887	<0.0005
10	CFHR5	0.754	0.648-0.859	<0.0005
17	C4A	0.928	0.877-0.979	<0.0005
19	CP	0.816	0.727-0.904	<0.0005
20	A1BG	0.794	0.700-0.888	<0.0005
21	PON1	0.860	0.776-0.944	<0.0005
22	GC	0.792	0.694-0.890	<0.0005
23	TGFB1	0.770	0.662-0.877	<0.0005

Tabella 15. Potenziali predittori di malignità selezionati dall'analisi della curva ROC

Il migliore modello per discriminare i SPM maligni includeva IGFBP7, che mostrava un aumento del rischio metastatico di 1.336 (95% CI 1.132-1.578; $p = 0.001$), TGFB1 (HR 0.397 (95% CI 0.189-0.835; $p = 0.015$)) e C4A (HR 0.944 (95% CI 0.908-0.981; $p = 0.003$)).

4.2 Ruolo prognostico delle proteine selezionate

Quando i pazienti sono stati suddivisi a seconda del follow-up clinico, le 17 proteine presentavano, all'analisi del conteggio degli spettri dei dati di spettrometria di massa, una differenza relativa superiore al 50% nei pazienti metastatici rispetto ai non metastatici (Tabella 16).

Proteina	Non metastatico ^a	Metastatico ^b	Differenza relativa (%) ^c
APOB	1267.17	2427.92	63
IGFBP7	180.80	535.25	99
SERPINC1	141.77	496.21	111
LTF	52.12	110.43	72
C4BPB	26.66	51.27	63
MGP	9.00	15.00	50
PRG4	26.76	49.69	60
CFHR5	6.03	26.14	125
PRNP	3.50	8.17	80
LPA	1.73	71.11	190
SLPI	2.00	5.00	86
C4A	557.63	1394.07	86
CP	11.71	70.25	143
A1BG	11.77	105.95	160
PON1	18.04	30.06	50
GC	11.81	35.42	100
TGF-β1	5.06	18.97	116

Tabella 16. Analisi del conteggio degli spettri degli analiti differenzialmente abbondanti nel siero dei pazienti affetti da sarcoma delle parti molli (^asomma degli spettri identificati nei campioni di SPM non metastatici; ^bsomma degli spettri identificati nei campioni di SPM metastatici; ^cmetastatici – non metastatici / media del numero di spettri per metastatici e non metastatici x 100).

Dall'analisi di regressione univariata di Cox, l'abbondanza di IGFBP7 (HR 1.050 (95% CI 1.016-1.085; p = 0.004)), Lactotransferrin (LTF) (HR 1.065 (95% CI 1.001–1.133; p = 0.046)) e di Complement factor H-related 5 (CFHR5) (HR 1.654 (95% CI 1.152–2.377; p = 0.006)) era fortemente associata con il rischio di metastasi, mentre SERPINC1 (HR 1.024 (95% CI 0.998–1.050; p = 0.068)) aveva una influenza moderata sullo sviluppo di metastasi, presentando solo una tendenza alla significatività statistica.

Tutto il gruppo dei pazienti è stato poi dicotomizzato in base ai valori mediani di SERPINC1, LTF, CFHR5 e IGFBP7, calcolati sull'intera popolazione affetta da sarcoma delle parti molli ad alto grado. I cut-off sono stati fissati pari ad 1 per LTF, a 5 per SERPINC1 e a 11 per IGFBP7. CFHR5 è stata dicotomizzata in base alla sua presenza o assenza come positiva o negativa. L'espressione positiva di CFHR5 così come i livelli di SERPINC1 e IGFBP7 superiori ai valori di cut-off risultano essere associati ad una più alta probabilità di sviluppare metastasi con una differenza statisticamente significativa tra le curve di Kaplan-Meier (log rank = 19.2 per IGFBP7, log rank = 4.16 per SERPINC1 e log rank = 10.69 per CFHR5) (Figura 10).

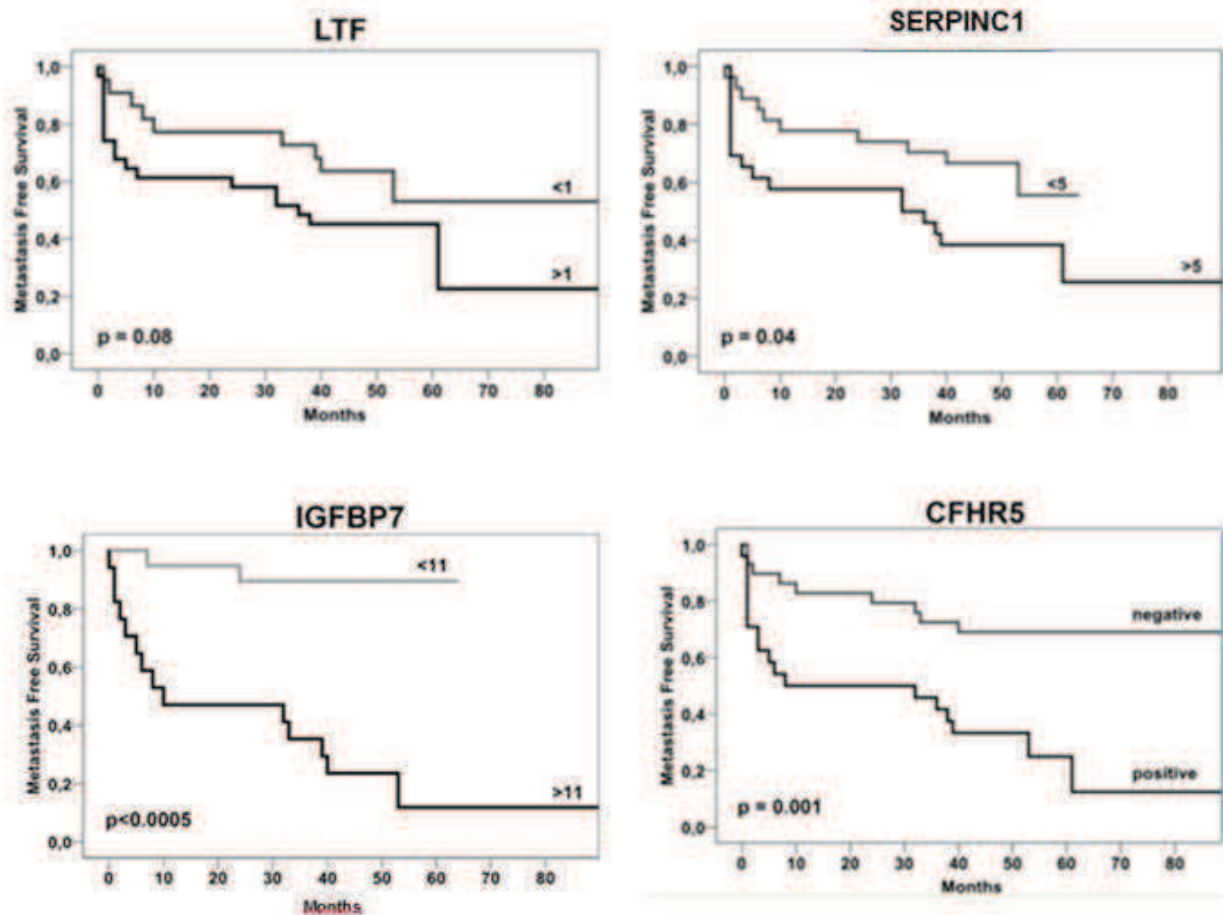


Figura 10. Candidati biomarcatori prognostici in pazienti affetti da sarcoma delle parti molli. Curve di Kaplan-Meier per la sopravvivenza libera da metastasi in base al livello nel siero di LTF, SERPINC1, IGFBP7 e CFHR5.

Nel dettaglio, la sopravvivenza libera da metastasi a 5 anni era dell'11% nei pazienti con valori di IGFBP7 > 11 e dell'88% nei pazienti con valori inferiori, del 12% per pazienti con presenza di CFHR5 circolante verso il 69% per pazienti negativi e del 25% nei pazienti con SERPINC1 > 5 verso il 55% nei pazienti con valori inferiori a 5.

Infine, l'analisi di regressione multivariata di Cox ha dimostrato che le proteine IGFBP7 (HR 1.035 (95% CI 0.999-1.073; p = 0.05)) e CFHR5 (HR 3.409 (95% CI 1.534–7.534; p = 0.0039)) erano fattori prognostici indipendenti significativamente associati con il rischio di metastasi.

4.3 Saggi ELISA

Al fine di validare, con una tecnica di più semplice utilizzo clinico, la presenza delle proteine più significative identificate nella precedente analisi (Figura 10), la concentrazione plasmatica di SERPINC1, CFHR5 e IGFBP7, era analizzata con saggio ELISA in 59 sieri di pazienti affetti da sarcomi delle parti molli ad alto grado, con anche un corrispondente prelievo tissutale chirurgico, conservato presso la Biobanca del Laboratorio di Oncologia Sperimentale dell'Istituto Ortopedico Rizzoli per ulteriori analisi. 32 dei 59 pazienti erano non metastatici e 27 svilupparono le metastasi. Quattro pazienti avevano metastasi alla diagnosi o entro i primi 4 mesi. 10 sieri provenienti da donatori sani sono stati utilizzati come controllo.

La sopravvivenza libera da metastasi era dell'80.6% \pm 5.3% ad 1 anno, 77% \pm 5.6% a 2 anni, 59% \pm 6.9% a 5 anni e 44.4% \pm 8.3% a 10 anni (Figura 11). La sopravvivenza libera da metastasi media era di 103 mesi (95% CI = 79-126) con una mediana di 69 mesi (95% CI = 35-102).

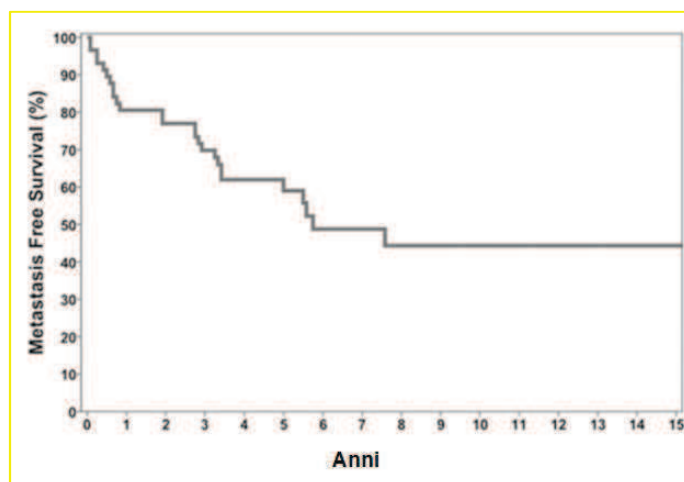


Figura 11. Curva di sopravvivenza. A. Sopravvivenza libera da metastasi di 59 pazienti affetti da sarcoma delle parti molli ad alto grado dei quali è stato analizzato il siero.

I dati clinici dei pazienti quali età, genere e sede del tumore primario, non influivano significativamente sul rischio di sviluppare metastasi ($p \geq 0.05$).

Dai test ELISA delle tre proteine analizzate, una differenza significativa è stata vista tra i valori mediani di IGFBP7 nel siero dei pazienti con SPM (37.5ng/ml; 14.58-114.44) ed il controllo (18.83ng/ml; 4.69-32.14) ($p < 0.0005$ per il test di Mann-Whitney) (Figura 12A).

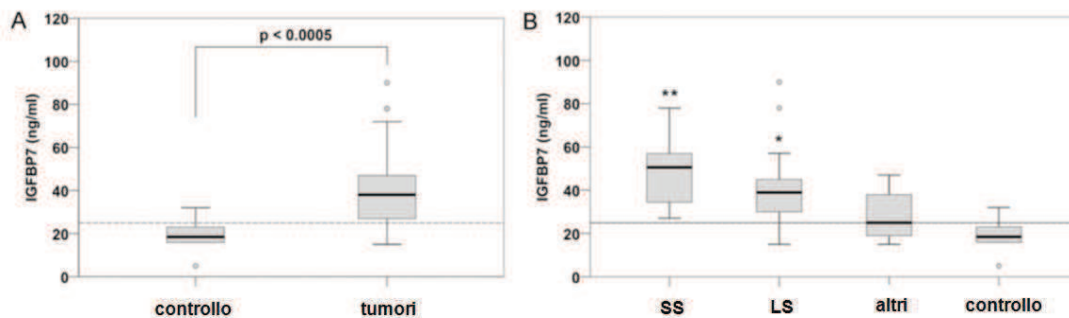


Figura 12. Livelli sierici di IGFBP7 in pazienti affetti da sarcoma delle parti molli. **A.** Il test di Mann-Whitney ha dimostrato che i livelli nel siero di pazienti con SPM erano significativamente più alti rispetto al controllo, rivelando un livello di soglia di 25ng/ml. **B.** L'analisi di Kruskal-Wallis seguita dal test di Dunnett ha dimostrato che il Sarcoma Sinoviale (SS) ed il Liposarcoma (LS) avevano un livello di IGFBP7 nel siero significativamente più alto quando paragonato sia al controllo che agli altri istotipi tumorali (** $p < 0.0005$ e * $p = 0.001$ rispettivamente).

Esaminando la distribuzione di IGFBP7 nei campioni si è dimostrato che il 75% dei controlli sani aveva livelli di IGFBP7 nel siero ≤ 23 ng/ml, mentre il 75% dei pazienti con SPM aveva concentrazione ≥ 27 ng/ml (Figura 12A), ipotizzando così una possibile soglia di 25ng/ml per distinguere i pazienti oncologici dai non oncologici. L'affidabilità del test è stata valutata da una sensibilità ed una specificità rispettivamente del 79.7% e dell'80%. I valori predittivi positivo e negativo erano rispettivamente del 95.9% e del 40% con un coefficiente kappa di Cohen di 0.422.

Quando i sieri sono stati suddivisi in gruppi a seconda dell'istotipo del tumore primario, l'analisi di Kruskal-Wallis seguita dal test di Dunnett ha dimostrato che la proteina IGFBP7 aveva livelli significativamente più alti nei Sarcomi Sinoviali (48.69 ± 15.37 ng/ml) e nei Liposarcomi (42.48 ± 22.6 ng/ml) piuttosto che negli altri sarcomi delle parti molli quali Leiomiomasarcomi, Sarcomi Pleomorfi Indifferenziati e Fibrosarcomi, che tutti insieme presentavano un valore mediano di 27.8 ± 10.2 ng/ml ($p = 0.001$ per i Sarcomi Sinoviali e $p = 0.04$ per i Liposarcomi rispettivamente) (Figura 12B). Nonostante il livelli di IGFBP7 fossero lievemente più elevati nei pazienti metastatici rispetto ai non metastatici, in questo caso la differenza non raggiungeva la significatività statistica.

4.4 Analisi immunoistochimica

La proteina IGFBP7, che nel siero aveva differenza più significativa tra i valori mediani dei pazienti con SPM rispetto ai controlli sani, è stata analizzata successivamente anche con tecnica di immunoistochimica su 145 lesioni primarie di sarcomi delle parti molli allestite su Tissue Microarray (TMA), di cui 59 corrispondenti ai sieri precedentemente analizzati con ELISA. Dei 145 campioni, 79 erano metastatici e 66 non metastatici.

I risultati della colorazione sono stati interpretati dal patologo. Nello specifico, l'81% dei SPM metastatici presentava una colorazione di IGFBP7 da moderata a forte in più del 25% di cellule tumorali, con distribuzione intracellulare sia citoplasmatica che nucleare più intensa e uniforme (Figura 13).

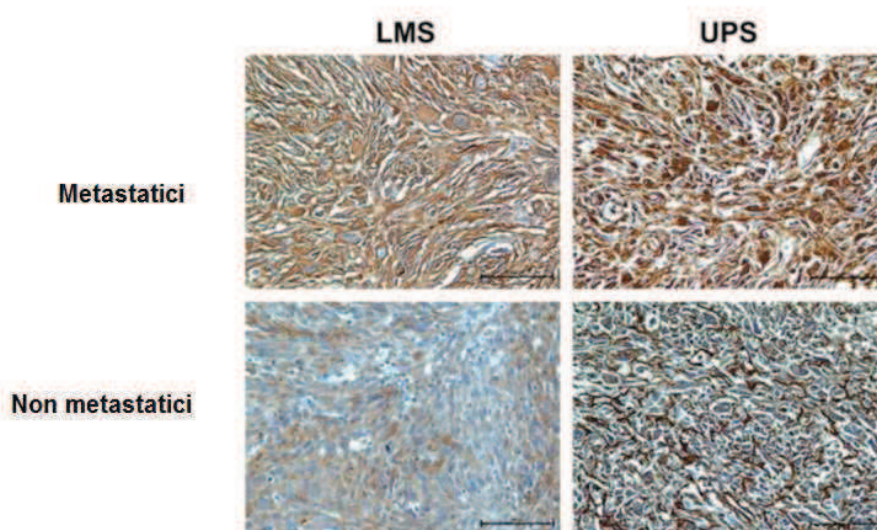


Figura 13. Espressione della proteina IGFBP7. Immunocolorazione rappresentativa di IGFBP7 in Leiomiosarcoma (LMS) ed in Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma (UPS) o Sarcoma Pleomorfo Indifferenziato. Una più forte espressione è evidente nei pazienti metastatici, con distribuzione citoplasmatica predominante (IHC 20 ×).

Nel 76% dei campioni non metastatici l'intensità di colorazione variava da negativa a moderata in meno del 25% delle cellule tumorali, con distribuzione intracellulare citoplasmatica e/o nucleare (Figura 13). In base alla colorazione citoplasmatica di IGFBP7, l'intensità variava da 1 a 6. L'analisi univariata di Cox ha dimostrato che il rischio di metastasi aumentava del 78.4% (95% CI = 1.32-2.41; $p < 0.0005$) per ogni aumento di intensità di colorazione di un punto. Di conseguenza, il test di Mann-Whitney ha rilevato livelli di colorazione di IGFBP7 significativamente più alti nei campioni metastatici quando paragonati ai non metastatici ($p = 0.01$) (Figura 14A).

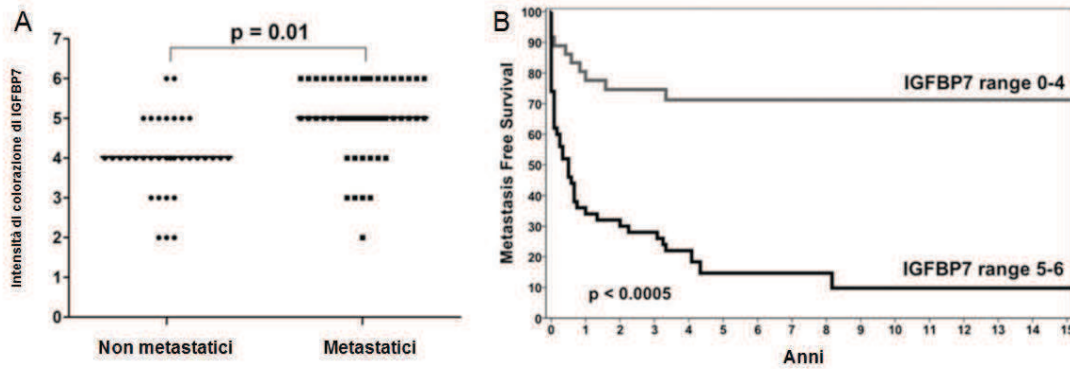


Figura 14. Espressione della proteina IGFBP7. **A.** Il test di Mann-Whitney ha rilevato livelli di colorazione di IGFBP7 significativamente più alti nei pazienti metastatici rispetto ai non metastatici. **B.** Le curve di sopravvivenza di Kaplan-Meier mostravano una più alta probabilità di evento metastatico nei pazienti con alta espressione di IGFBP7 (score 5-6).

Nessuna intensità di espressione significativamente differente è stata notata nei diversi sottotipi istologici.

Quando il decorso clinico dei pazienti con overespressione di IGFBP7 (score 5-6) è stato abbinato a quello degli altri pazienti (score ≤ 4), si è visto che la probabilità di sopravvivenza libera da metastasi era del 16% contro il 72% rispettivamente e che la differenza delle curve di Kaplan-Meier era statisticamente significativa (log rank = 25.811; $p < 0.0005$) (Figura 14B). Nessuna differenza significativa è stata vista per la sopravvivenza totale.

L'analisi di regressione multivariata di Cox comprendente le variabili dei pazienti, l'intensità di colorazione di IGFBP7 (score 1-6), l'overespressione di IGFBP7 (score 5-6) e l'istotipo mostrava che l'overespressione citoplasmatica di IGFBP7 aveva il più forte valore predittivo (HR 6.358 (95% CI 2.946-13.721; $p < 0.0005$)).

4.5 Identificazione di MET come ipotetico target del miR-125 nei sarcomi delle parti molli

Sulla base di un precedente studio effettuato dal Laboratorio di Oncologia Sperimentale dell'Istituto Ortopedico Rizzoli di Bologna, che ha identificato 20 miRNA deregolati comuni sia al

Leiomioma che al Sarcoma Pleomorfo Indifferenziato [54] (Tabella 17), è stata effettuata un'analisi dei geni target dei miRNA utilizzando vari strumenti bioinformatici (i.e.: Targetscan Vert release 5.2, <http://www.targetscan.org/>, Pictar-Vert <http://pictar.mdcberlin.de/> e PITA, <http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/index.html>).

	LMS		UPS	
	p value	FC	p value	FC
hsa-miR-1274a	0	-4.15	$9e^{-06}$	-4.24
hsa-miR-137	$4e^{-06}$	-2.09	$3e^{-06}$	-2.43
hsa-miR-1260	$5.2e^{-05}$	-3.30	0.0001	-3.13
hsa-miR-487a	$5.2e^{-05}$	-0.44	0.015	-0.49
hsa-miR-138.5p	$6.4e^{-05}$	-0.42	$7.2e^{-0.5}$	-0.59
hsa-miR-1288	0.000186	-0.49	$3e^{-06}$	-0.73
hsa-miR-212.3p	0.0003	-0.59	0.003	-0.72
hsa-miR-409.5p	0.0003	-0.44	0.013	-0.49
hsa-miR-892b	0.0003	-0.35	0.001	-0.48
hsa-miR-493	0.0003	-1.01	0.049	-1.05
hsa-miR-21.5p	0.0004	-1.65	$4.1e^{-05}$	-2.16
hsa-miR-100.5p	0.000556	-3.84	$7.5e^{-0.5}$	-0.49
hsa-miR-1274b	0.0008	-4.05	0.021	-4.32
hsa-miR-337.5p	0.0008	-1.41	0.046	-1.40
hsa-miR-432	0.002	-0.70	0.039	-0.72
hsa-miR-376a.3p	0.005	-0.51	0.016	-0.58
hsa-miR-376b	0.006	-0.83	0.028	-0.89
hsa-miR-152	0.016	-1.05	0.016	-1.05
hsa-miR-1305	0.016	-0.84	$1.1e^{-05}$	-1.27
hsa-miR-223.3p	0.044	1.26	0.035	2.72

Tabella 17. miRNA comuni in Leiomiomi e Sarcomi Pleomorfi Indifferenziati, differenzialmente espressi rispetto alle cellule mesenchimali (LMS = Leiomioma; UPS = Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma o Sarcoma Pleomorfo Indifferenziato; FC= Fold Change).

Tra i 20 miRNA selezionati, mediante utilizzo del database DAVID (<http://www.david.niaid.nih.gov>) sono stati riconosciuti 12 miRNA (miR-137, miR-21.5p, miR-

100.5p, miR-152, miR-1305, miR-223.3p, miR-138.5p, miR-892b, miR409.5p, miR-376a.3p, miR-487a e miR-212.3p) principalmente coinvolti nell'oncogenesi e nella regolazione delle proteine della famiglia degli argonauti (AGO) (Tabella 18).

miRNA	Geni
miR-137	KLF12, MITF, ESRRG , EPHA7 , NCOA3 , NEUROD1, PPARGC1A, SNRK , SLC12A2, ESRRRA, PTGFRN, ALS2CR13 , FMNL2, ZNF295, METTL9, DR1, RAVR2, KIAA1409, FAM134C, SNX25, PRDM1 , HLF , PTPNA, UBE2G1, SS18 , C3orf58, CUL3, PLCB1, EIF2C4 , SNF1LK , NXT2, FBXL11, ZBTB7A, PTPN2 , PPM1E, SLC43A2, ADCY1, ABHD6, CHST9, C9orf150, CTTNBP2NL, SLC17A6, CSDA, ARID4B , PDLIM3, APBA2BP, YBX1, TLE4 , FNDC5, DUSP4 , RNF4, PRR16, MAPKAPK2 , HNRPDL, MSI1 , C5orf13, QKI, RSBN1, INPP5A, SLC25A5, NBEA , LEMD3, CHD7, CADPS, TCF12, CC2D1A, C5orf21, TJP1, SYTI
miR-21.5p	GATAD2B, ACVR2A, SATB1, CCL1 , C17orf39, C5orf41, TIMP3 , PELI1, ZNF367, THRB, CPEB3, RECK , NFIB , SOX5, CNTFR, YAPI , TGFB , JAG1, CASKIN1, TAGAP, ZCCHC3, TRPM7, CREBL2 , ALX1, SOX2, ZADH2, LEMD3, NTF3, XKR6, MPRIP, ZDHHC17, WWP1, EIF2C2 , SOX7 , DLX2, KBTBD6, ACBD5, STAT3 , TAF5, EHD1, SSFA2, CDC25A , CADM2, PAG1, TNS1, RNF111 , SPG20 , PPARA , SCRNI, SMARCD1, ASPN, E2F3 , SLC9A6, FBXO11 , RHOB, CRIM1, BRD1, NAT13, CNOT6 , ABCD2, STK40, ATRN, BOLL
miR-100.5p	TRIB2 , ZZEF1, FRAP1 , EIF2C2 , HS3ST2, SMARCA5, EPDR1
miR-409.5p	ZBTB34, MAP3K2 , IGF1R , USP53, KLC2, APLP2, SUV420H1, TSHZ3, KIF1B , DYRK1A, EIF2C1 , OPCML, CPSF6, GPM6A , FAM19A2, ZNF148, MKRNP6, PHF17 , PPARGC1A, CDV3
mir-152	ELF5, C5orf30, NARG1 , MARCH3, KIT , POU3F2 , ELF5, MET , EMX2
miR-376a.3p	PLEKHA5, BEND4, PCDH17 , BRWD1, PPP1R3F, GRAMD3, MBD5, BRUNOL4, EIF2C2 , CHD9, FAM175B, ZMYND11, FOXJ3, SSFA2, DSCAML1, LPAL2, TSPAN9, WDR22 , VPS54 , SMARCA2 , CSNK1G3 , CTBP2, KHDRBS3 , NRP1 , INA, CRISPLD2, DYRK2 , FBXO11
miR-487a	TRIB2 , ZBTB41, TNPO1, CHL1, JPH1, C20orf174, BM11 , EIF2C4 , MRPL19, ZMYM4, SEMA3C, NUP160, FAM44A, ASAP2, CNR1, ANKS1B , DOCK4 , PUM2, ABTB2, ZBTB10, SP3, C6orf152, CDC73, CALB2, GDA, RNF220 , UBE2Q1, TMEM184B , FGF9, NUDCD1, PDZD2, SIRT1 , STIM2
miR-1305	SOX11, ATBF1, PPM1E , C20orf133, ACVR2A, ATXN1, TARDBP, CITED2 , JMJD1C , ZFHX4, PRKG1, ATRX, FOXP2 , DYRK1A, LARP5, CLASP2 , C5orf, MIPOL1, LIN28B , STXBP5, KLF12, AGTPBP1, HIPK1 , ERBB4 , LARP4, JAG1, FAM102B, BCL2 , HOOK1, ZEB2, SALL1, NFIB , CBFB , IGF1 , C1orf21, TMEM167B , C1orf96, PRM1, KIAA1370, SLTM, MARK1, ARHGFE7, PAIP1, IGSF3, PLCB4 , ATP2B1, PAN3 , RBM47, CUGBP2 , KIAA1712, SP8, PLOD2, KBTBD8, AC005921.3.1, NPAL1, ZNRF2, PAIP2, ZNF148, SLC17A8, ONECUT2, PANK1 , ATRNL1, MFSO6, UTRN, C6orf174, REEP3, SLC44A1, PHLDA1, COL21A1
miR-212.3p	CDC2L6, SIRT1 , ZNF238, NOVA1 , SLC6A1, PRICKLE2, KCNK2, PAIP2, FKBP2, ZEB2, FOXN3 , SOX5, STX16, OSBPL8, RASA1 , MMP16 , LSM11 , EIF4A2 , DAZAP2 , MEX3C, SPRED1 , CSDE1 , H2AFZ, LIN28B , CALU, PCDH10 , ADCY3, HIC2 , DACH1 , KIT , SEMA4G, GNB1
miR-223.3p	FBXW7 , NFIA, RHOB, PRDM1 , CALML4 , CRIM1, HLF , SLC37A3, PDS5B, PTBP2, ACVR2A, OTUD4, RNF145, WDR62, EPB41L3, FBXO8, MEF2C, SFRS12, SCN3A, CBFB, SPRED1, ALCAM , SEPT6 , SP3, LMO2, FOXO3 , STK39, PCTK2, SLC26A7, RBM16, SMARCD1, MAFB, F3, MTPN, DAG1 , MYH10, PDE4D, SRGAP3, HHEX, ATL2, SLC8A1, PKNOX1, COPS2 , ATP2B1, FAM5C
miR-138.5p	MACF1 , C20orf117, RARA , C6orf47, JOSD1, ROCK2 , FOXP4 , RELN , PAPP, SOX12 , PHF2, JMJD1C, ANK1, SOX4 , C20orf102, DTX1 , ZEB2 , RLBPL1, PHOX2B , BHLHE41, EZH2, ATP11C, EIF4EBP1, TRPS1, USP47, CCDC109A, RSF1, ZBTB4, MINK1 , AHCYL2, UNC5D, BNIP3L , SORBS2 , GIT1, GPR3, THAP11, PTP4A1, SEMA4C , RPS6KA1 , SIRT1 , ARHGFE3, EID1, NBEA , PLEKHC1, SLC20A1, HNT , LSM14A , PDE7B, ADAMTSL3 , TCEAL8, MOCS1, CDR2L, BCL11A , CCNE1 , SOBP, CTDSP1, SLC17A7, SENP1, ARL4C, SUV420H1, PFN2
miR-892b	YWHAZ , LIN54 , ESRRG , UBAP2, RUNX2 , HS6ST2, HMGCR, HEMK1, NSUN4, MAP3K1 , MLLT3 , AGPAT1, DLL1 , FBXL11, CLCN6, NUFIP2, PCDHA13, HISPPD2A, SLC11A2, SFRS14, CACNA1E , RALY, ARHGAP19 , JMJD1B, SOCS6, C18orf4, LONRF1, ABCE1, IGF2BP1 , B4GALNT1, NNAT, TBC1D22B, ZBTB4, PCDHA6, PCDHA4, PCDHA11, PCDHA12, PCDHA2, ETV6 , PPP3R1, TRIB2 , CDV3, KIAA0317, KIAA1755, CDC2L6, MAMLD1, ATBF1, ZBTB34, ANXA11 , CSNK1A1 , EPHA4 , RYR2, PXX, IRF1 , USP10 , FKBP1B, KIAA1033, PPARGC1A, CLASP2 , TNRC6B, AMMECR1, FAM84A, AFF2, SP1 , PCTK2, PGGT1B, DMRTA2, KIAA0430 , TOP1 , NFIB , CADM2, SNN, XPO4, CBFB

Tabella 18. Analisi dei geni target dei 12 miRNA down-regolati nei sarcomi delle parti molli (in grassetto sono elencati i geni target coinvolti nella biogenesi dei miRNA o relativi alla progressione tumorale).

Dall'analisi bioinformatica nessuna proteina precedentemente identificata sembra essere direttamente regolata dai miRNA selezionati. L'analisi dei profili di espressione dei 12 microRNA, nei 59 campioni di tumore primario di SPM e dei loro corrispondenti tessuti adiacenti sani, ha potuto confermare una più bassa espressione nei campioni tumorali di SPM di miR-100.5p, miR-152, miR-376a.3p, miR-212.3p, miR-892b e miR-223.3p (Figura 15A-F), oltre ad una minima espressione di miR-1305, con una differenza statisticamente significativa del miR-152 ($p = 0.028$ per il test di Mann-Whitney).

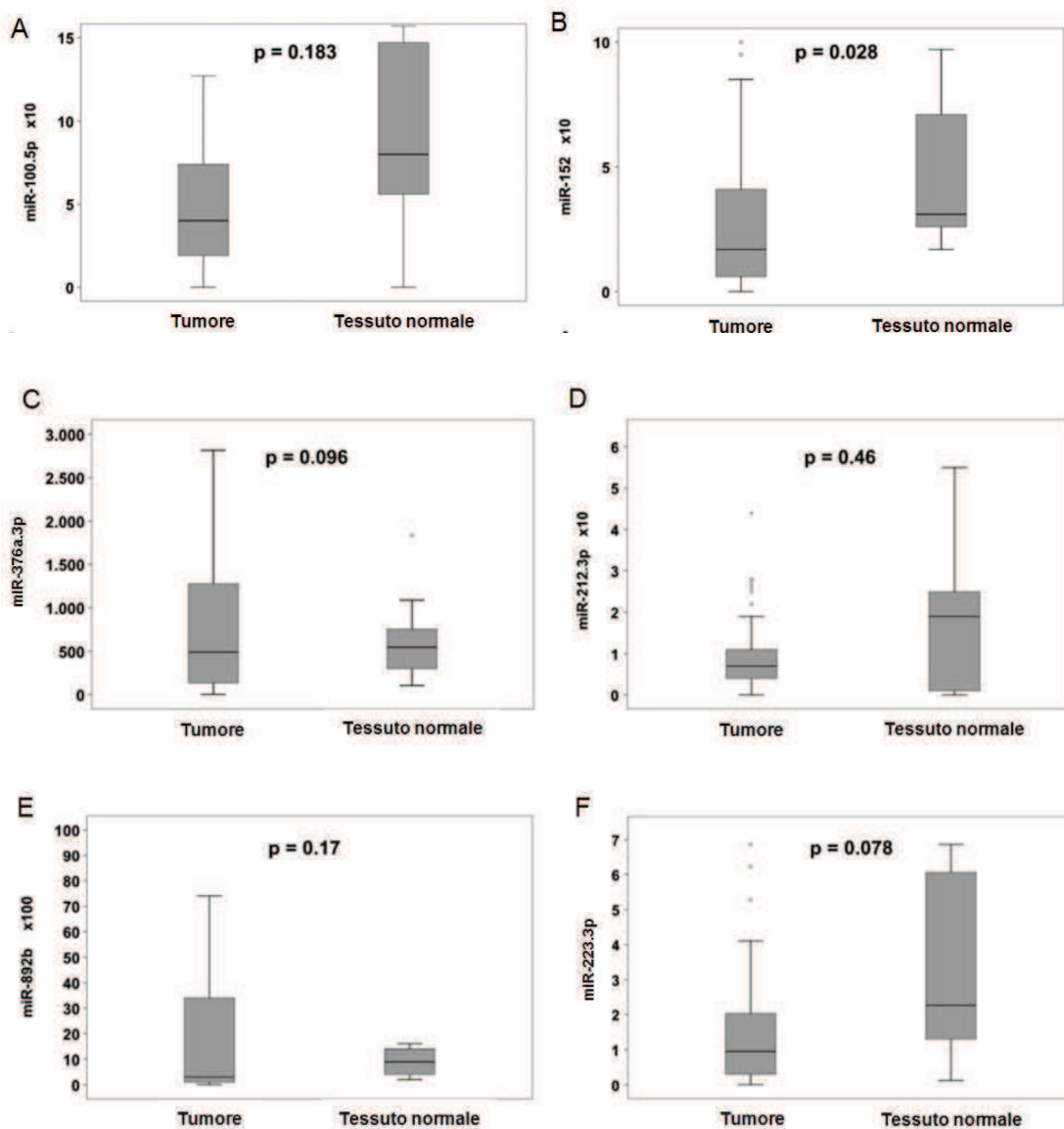


Figura 15. Distribuzione non gaussiana mostrante che i valori di mRNA dei miR-100.5p (A), miR-152 (B), miR-376a.3p (C), miR-212.3p (D), miR-892b (E) e miR-223.3p (F) erano più bassi nei tumori primari di SPM piuttosto che nei loro corrispondenti tessuti adiacenti sani. Il test di Mann-Whitney ha rilevato una differenza statisticamente significativa tra i due gruppi per il miR-152.

Nella Tabella 19 sono elencati tutti i risultati dei microRNA. Solo il miR-21.5 mostrava dei livelli più alti nei campioni di tumore di SPM piuttosto che nei campioni di tessuto normale, mentre dei livelli non rilevabili sono stati visti per miR-137, miR-409.5p, miR-487a e miR-138.5p.

miRNA		50° percentile	25° percentile	75° percentile	p value
miR-21.5p	tumore normale	0.74 0.1	1.54 0.6	4.12 4.23	0.163
miR-100.5p	tumore normale	0.18 0.56	0.41 0.8	0.79 1.47	0.183
miR-152	tumore normale	0.063 0.26	0.19 0.31	0.45 0.71	0.028
miR-376a.3p	tumore normale	164.52 298.17	516.35 544.95	1224.57 754.83	0.096
miR-1305	tumore normale	0.008 0.01	0.027 0.02	0.084 0.05	0.43
miR-212.3p	tumore normale	0.04 0.01	0.07 0.19	0.15 0.25	0.46
miR-892b	tumore normale	0.001 0	0.0035 0.008	0.031 0.01	0.17
miR-223.3p	tumore normale	0.31 1.3	1.09 2.26	2.26 6.06	0.078
miR-409.5p	tumore normale	NA NA			
miR-137	tumore normale	NA NA			
miR-487a	tumore normale	NA NA			
miR-138.5p	tumore normale	NA NA			

Tabella 19. Distribuzione percentile dell'espressione dei miRNA (NA = not available o non disponibile).

In base all'analisi dei geni target (Tabella 18), il KIT ed il MET sono stati selezionati come ipotetici bersagli del miR-152 e, successivamente, la loro espressione è stata verificata tramite qRT-PCR. Livelli più alti di mRNA sono stati trovati nei campioni di tumore di SPM piuttosto che nei campioni di tessuto normale (rispettivamente 0.43 e 0.16 per il KIT, $p = 0.09$; 6082.82 e 374.80 per il MET; $p = 0.05$) (Figura 16). Inoltre, nel set di campioni tumorali, la correlazione non parametrica di Spearman indicava una correlazione inversa tra espressione di miR-152 e MET ($\rho = -0.5$, $p = 0.003$).

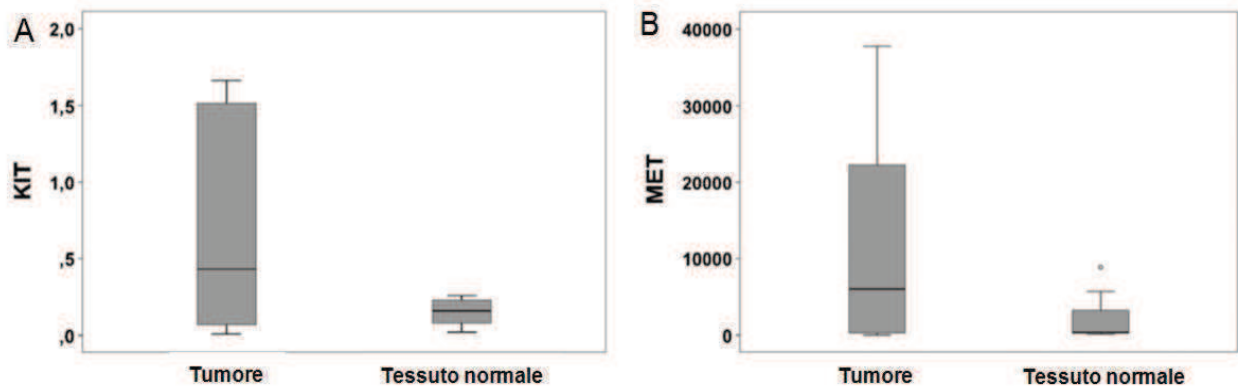


Figura 16. Distribuzione non gaussiana dell'espressione di mRNA di KIT (A) e di MET (B) nei tumori di SPM e nei loro corrispondenti tessuti adiacenti sani. Il test di Mann-Whitney ha rilevato livelli di mRNA più alti nei tumori di SPM rispetto ai tessuti normali.

Nessuna differenza significativa è stata trovata tra gli istotipi di Leiomioma e Sarcoma Pleomorfo Indifferenziato, ma quando i pazienti sono stati suddivisi in sottogruppi in base alla prognosi, i livelli di mRNA del MET sono stati trovati essere significativamente più alti nei pazienti metastatici rispetto ai non metastatici ($p = 0.05$ per il test di Mann-Whitney) (Tabella 20).

MET	50° percentile	25° percentile	75° percentile	p value
tumore	6,082.82	12.38	24,600.23	0.09
normale	374.80	93.37	5,752.60	
LMS	11,307.56	12.38	26,987.43	0.4
UPS	754.82	39.39	39,187.17	
metastatico	6,122.15	188.70	35,474.49	0.07
non metastatico	5,789.54	12.38	21,591.48	
KIT	50° percentile	25° percentile	75° percentile	p value
tumore	0.43	0.07	1.58	0.09
normale	0.16	0.03	0.24	
LMS	0.10	0.02	1.37	0.26
UPS	0.52	0.08	6.06	
metastatico	0.53	0.10	15.67	0.13
non metastatico	0.07	0.02	12.33	

Tabella 20. Distribuzione percentile dei valori dell'espressione dei geni (LMS = Leiomioma; UPS = Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma o Sarcoma Pleomorfo Indifferenziato).

4.6 L'espressione della proteina Met nei campioni di sarcomi delle parti molli corrisponde ai parametri clinici

Utilizzando l'analisi immunohistochimica è stato dimostrato che la proteina Met, che presentava valori di RNA significativamente più alti nei campioni metastatici e quindi di maggior impatto traslazionale che non il Kit, era espressa predominantemente nel citoplasma delle cellule tumorali di SPM (Figura 17), con l'overespressione corrispondente ad una immunoreattività uniforme (cellule positive > 50%), da moderata a forte (score = 5-6) nel 79% dei pazienti metastatici e nel 25% dei non metastatici ($\chi^2 = 11.5$; $p = 0.001$).

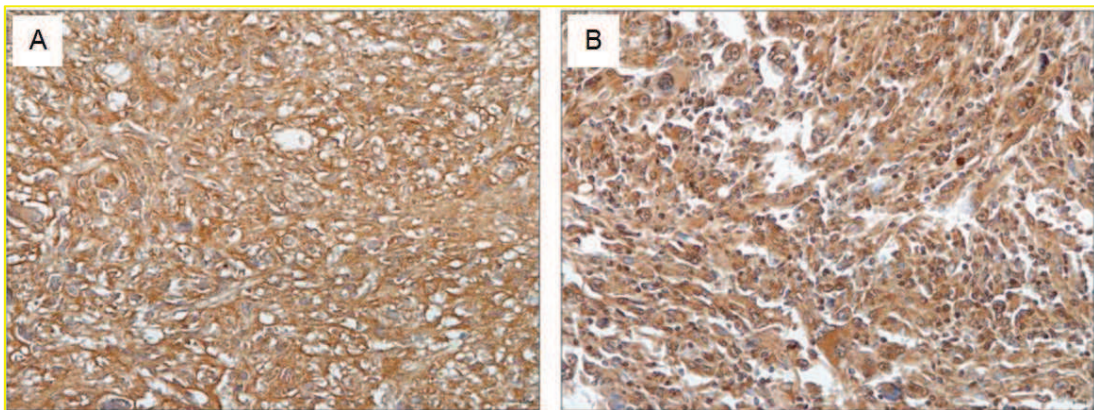


Figura 17. Immunocolorazione rappresentativa di Met in Leiomiosarcoma (A) ed in Sarcoma Pleomorfo Indifferenziato primario (B)

Nel corrispettivo tessuto adiacente sano il Met è stato trovato essere espresso focalmente e debolmente (score = 2). Basandosi sull'intensità di colorazione del citoplasma (score 1–6), l'analisi univariata di Cox ha mostrato che il rischio di metastasi aumentava del 39.5% per ogni punto di aumento di score (95% CI = 0.985–1.977; $p = 0.06$). Quando il decorso clinico dei pazienti con overespressione di Met (score = 5-6) era abbinato a quelli con un basso score (< 5), il tasso di sopravvivenza a 4 anni libero da metastasi era trovato essere del 21% e del 70% rispettivamente ($p = 0.01$ per il test esatto di Fisher). La proteina Kit è stata trovata essere focalmente espressa nella maggior parte dei campioni tumorali di SPM con una intensità di colorazione da debole a moderata in meno del 50% di cellule tumorali (score = 2–3). Nessuna espressione, o minima, è stata vista in corrispondenza dei tessuti normali.

5-DISCUSSIONE

La rarità dei tumori delle parti molli ha sempre causato problemi nella diagnosi, nella stadiazione e nell'approccio terapeutico al paziente anche se, durante gli ultimi decenni, diversi sviluppi nel campo della radiologia, patologia e chirurgia, hanno comportato cambiamenti significativi nella diagnosi e nel trattamento di tali tumori, migliorando la prognosi e la qualità della vita dei pazienti affetti da tali malattie rare. Nonostante tali sforzi, la mortalità oggi associata ai sarcomi è circa del 50% a causa della loro particolare propensione a sviluppare metastasi polmonari, nella maggior parte dei casi, o ossee. In particolare, oggi è fondamentale cercare di identificare i tumori primari che svilupperanno metastasi, al fine di riconoscere i pazienti a maggior rischio di malattia metastatica e poter, così, selezionare strategie terapeutiche mirate o cercare di sviluppare nuovi farmaci in grado di contrastare gli effetti delle proteine correlate al processo della cancerogenesi.

L'identificazione e la quantificazione dei peptidi circolanti nel siero in scarsa quantità, ovvero le *low molecular weight proteins* o i frammenti di proteine rilasciati dalle cellule tumorali e dai tessuti, possono dare informazioni riguardo la presenza, la progressione e la risposta biologica alla malattia [63]. Questi frammenti, rappresentanti oggi la più importante fonte di biomarcatori, possono non essere rilevati poichè mascherati nel siero dalla presenza di proteine più abbondanti e/o perchè soggette a degradazione enzimatica. Per ovviare a tale inconveniente, in questo studio il siero di due gruppi di pazienti (discovery e validation set), rispettivamente costituiti da 34 e 40 campioni affetti da SPM ad alto grado, è stato analizzato mediante una nuova tecnologia proteomica che ha visto prima l'utilizzo di *core-shell hydrogel nanoparticles* di poly(N-isopropylacrylamide-co-vinylsulfonic acid), con incorporato il Cibacron Blue F3G-A, e poi l'impiego dell'Electrospray Ionisation Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry (ESI-LC-MS/MS) analysis. Il principio delle *hydrogel nanoparticles* è quello di catturare solo le *low molecular weight proteins*, grazie alla presenza sulla superficie delle nanoparticelle di maglie di determinate dimensioni fungenti da setaccio.

La successiva analisi di spettrometria di massa, eseguita sui due gruppi di pazienti, aveva identificato un pannello di 23 proteine comuni, coinvolte in diversi processi biologici, presentanti una maggiore concentrazione nei sieri dei pazienti affetti da sarcoma delle parti molli rispetto ai controlli sani e mettendo in evidenza il loro possibile ruolo come biomarcatori per i SPM ad alto grado. Delle 23 proteine, 17 presentavano differenze statisticamente significative all'analisi di Mann-Whitney rispetto al controllo e, tra queste, 12 presentavano all'analisi della curva ROC un forte potere discriminatorio tra malati e sani. La maggior parte degli analiti coinvolti nella risposta immunologica ed infiammatoria erano fortemente e positivamente correlati gli uni agli altri ed alla Serpina C1, che è un regolatore della coagulazione del sangue. Il sistema emostatico così come gli

effetti dell'infiammazione e del sistema immunitario sullo sviluppo del tumore sono stati ampiamente discussi [63–66] e sembrano essere interconnessi in molteplici modi con la biologia del tumore [67].

E' da sottolineare che alcuni frammenti proteici, quali la proteina della matrice GLA (MGP), la proteina prionica (PRNP) e la proteina C reattiva (CRP), erano minimamente rilevabili nei sieri provenienti da pazienti con SPM ma completamente assenti nei donatori sani, sottolineando l'importanza di questa tecnica nel rilevare anche minime quantità di frammenti circolanti che potrebbero avere un ruolo nella diagnosi e/o prognosi precoce.

Il marcatore tumorale ideale sierologico, infatti, deve essere prodotto dalle cellule tumorali ed entrare in circolo, essere facilmente quantificabile con un'analisi poco costosa ed avere alta sensibilità (pochi falsi negativi) e specificità (pochi falsi positivi) diagnostica [68].

Sebbene tali peptidi siano a così bassa concentrazione nel siero da rendere la loro rilevazione difficile senza l'uso della tecnologia delle nanoparticelle, queste molecole al contempo possono essere considerate importanti marcatori di attività delle pathway fornendo informazioni sui processi che guidano le cellule tumorali alla progressione maligna.

In particolare MGP aumenta inoltre l'espressione del VEGF, amplificando l'attività di signalling del TGF- β 1 attraverso l'Activin like kinase receptor 1 (ALK1) e mediante la pathway SMAD1/5/8 [69].

PRNP è stato recentemente dimostrato essere coinvolta nella resistenza alla apoptosi, tumorigenesi, proliferazione e sviluppo di metastasi e la sua aumentata espressione, associata con altri oncogeni, sembra essere coinvolta nello sviluppo dell'osteosarcoma [70].

CRP è un marcatore della risposta infiammatoria sistemica non specifico del sangue che è stato associato con la diminuzione della sopravvivenza in diversi tipi di tumore. I suoi livelli, come confermato in studi precedenti, sono statisticamente più alti nei pazienti con SPM rispetto ai controlli, suggerendo il suo utilizzo come marcatore addizionale per la diagnosi differenziale dei sarcomi delle parti molli [71, 72].

Quando si è confrontata l'abbondanza degli analiti tra sieri non metastatici e sieri metastatici, le 17 proteine selezionate sono risultate più abbondanti con una differenza relativa superiore al 50% nei campioni metastatici. Le analisi univariate hanno evidenziato una forte associazione tra alcune proteine (LTF, SERPINC1, IGFBP7 e CFHR5) e l'evento metastatico, mentre l'analisi multivariata di Cox ha dimostrato che IGFBP7 e CFHR5 erano fattori prognostici indipendenti.

Precedenti studi sperimentali hanno dimostrato che la Serpina C1, o antitrombina, può proteggere le cellule tumorali dallo "shear stress" vascolare, aumenta l'invasività delle cellule tumorali, protegge

le cellule tumorali dall'attacco immunitario delle cellule NK e modula significativamente la funzione del sistema immunitario [67, 73, 74].

IGFBP7, una glicoproteina di adesione cellulare di circa 30kDa nota anche come IGFBP7-related Protein 1 (IGFBP-rP1) o fattore di adesione tumore-derivato/angiomodulina, è un membro della superfamiglia delle IGFBP che, modulando le funzioni cellulari attraverso meccanismi dipendenti ed indipendenti da IGF, può essere un biomarcatore prognostico utile [75, 76]. L'espressione sia aumentata che diminuita di IGFBP7 è stata riportata in diversi tumori, suggerendo un ruolo complesso nelle cellule tumorali [77-79]. Dati recenti hanno riconosciuto IGFBP7 come un antigene tumorale nei tumori di derivazione mesenchimale agendo nella pathway di segnalazione di TGF β [80]. Inoltre, IGFBP7 interagisce in vitro con varie proteine di matrice extracellulari per stimolare l'adesione, la migrazione e l'invasività [81, 82]. Sebbene IGFBP7 sia rilevabile anche nei fluidi del corpo umano, pochissimi studi hanno esaminato la relazione tra i livelli di IGFBP circolanti e lo stadio del tumore [83].

CFHR5, conosciuto anche come Complement factor H-related 5, è una glicoproteina del plasma di 65kDa prodotta nel fegato ed espressa in diverse patologie tumorali [84-86]. Questo appartiene ad un gruppo di proteine meglio note come "bladder tumor antigen" (BTA) o antigene del carcinoma della vescica, un marcatore sensibile utilizzato nella diagnosi e nel follow-up dei pazienti affetti da tale tumore [87-91]. Oggi sappiamo che nei fluidi del corpo umano ci sono cinque FHR noti. CFHR5 lega il C5, ma i ruoli fisiologici di queste interazioni e le funzioni degli FHR in vivo sono sconosciute. Il più abbondante FHR nel plasma è FHR-1, seguito da FHR-2 e FHR-4. Gli altri sono presenti solo in piccole tracce [92, 93]. Csincsì [94] ha dimostrato che CFHR5 promuove l'attivazione del complemento ed il danno/l'infiammazione mediata dal complemento attraverso diversi meccanismi.

Nell'ultimo decennio si è visto che l'infiammazione ha un ruolo molto importante nello sviluppo del tumore [65, 66, 95] tanto da essere chiamata "the seventh hallmark of cancer" [96]. Nell'ambiente tumorale, i marcatori dell'infiammazione sono responsabili della proliferazione cellulare, dell'invasività tumorale, dell'angiogenesi e della soppressione di alcune funzioni immunitarie [97].

In una seconda fase dello studio, la concentrazione di SERPINC1, IGFBP7 e CFHR5 è stata validata su una casistica più ampia di sieri di pazienti affetti da SPM, con una tecnica di più semplice utilizzo clinico, ovvero con un saggio facilmente quantificabile. Livelli mediani di IGFBP7 significativamente più alti sono stati trovati nei SPM quando paragonati ai controlli, fornendo un valore soglia di 25ng/ml per distinguere i pazienti oncologici dai non oncologici.

Tuttavia, a differenza dei dati ottenuti dall'analisi del conteggio degli spettri, non è stata trovata una differenza significativa tra sieri metastatici e non metastatici, confermando la maggiore sensibilità della spettrometria di massa, dopo utilizzo di nanoparticelle, nel rilevare anche minime differenze di abbondanza degli analiti.

In accordo con le ipotesi che aumentati livelli di peptidi circolanti sono probabilmente attribuibili ai processi proteolitici tissutali e/o alla sovrapproduzione da parte delle cellule tumorali, è stata analizzata la presenza di IGFBP7 nei tessuti. L'intensità di colorazione e la distribuzione della proteina IGFBP7 era significativamente più alta e più omogenea nei tumori metastatici piuttosto che nei non metastatici. L'analisi di regressione aveva dimostrato che il rischio di sviluppare metastasi aumentava significativamente con l'incremento dell'intensità di colorazione ed indicava l'overespressione tissutale di IGFBP7 come biomarcatore indipendente di cattiva prognosi.

Data l'evidenza che le proteine sono espressione dell'attività dei geni, anche la caratterizzazione del profilo di espressione genica può essere utile nel riconoscere marcatori prognostici. Uno studio recente ha identificato un set di 67 geni associati allo sviluppo di metastasi in SPM [98]. Negli ultimi anni grande importanza ha avuto la scoperta dei microRNA (miRNA), cioè di RNA non codificanti coinvolti nella regolazione dell'espressione genica post-trascrizionale. La deregolazione della loro espressione è stata riportata in una varietà di tumori umani [99-101] ed alcuni studi hanno indicato i miRNA come marcatori anche per la diagnosi e la prognosi dei sarcomi [102-105]. Essi possono controllare importanti processi come differenziazione, crescita cellulare e trasmissione del segnale [106-109] tanto che l'integrazione del profilo molecolare (genomica e proteomica) risulta essere indispensabile nel riconoscimento dei nuovi bersagli terapeutici.

Sulla base di un precedente lavoro svolto dal Laboratorio di Oncologia Sperimentale dell'Istituto Ortopedico Rizzoli [54], sono stati selezionati 12 miRNA correlati ai tumori e deregolati nei sarcomi, quali Leiomioma e Sarcoma Pleomorfo Indifferenziato, per cercare comuni marcatori coinvolti nello sviluppo dei SPM. Sebbene le analisi effettuate con TaqMan® Custom MicroRNA Array confermassero una down-regolazione di questi miRNA nei SPM rispetto ai tessuti normali, questa differenza è rimasta statisticamente significativa solo per il miR-152.

E' noto che il mir-152 può essere coinvolto nella proliferazione, nell'invasività e nell'angiogenesi e la sua down-regolazione è stata osservata nel carcinoma ovarico [110], della prostata [111], della vescica [112], dell'endometrio [113, 114], del pancreas [115] e gastrointestinale [116, 117]. Al contrario, nelle cellule di neuroblastoma il miR-152 è stato trovato essere overespresso rispetto ai neuroni normali maturi [118], mentre pochi dati sono disponibili sul miR-152 nei sarcomi umani. Uno studio recente ha indicato che i tessuti tumorali ed il plasma di pazienti con osteosarcoma possono presentare più bassi livelli di espressione di miR-152 rispetto ai controlli sani, suggerendo

l'utilizzo del miR-152 come biomarcatore per la rilevazione precoce del tumore [119]. I target oggi noti del miR-152 includono TNFRF6B, coinvolto nell'epatocarcinogenesi [120], DNMT1, implicato nel tumore dell'endometrio [114], ADAM17, una metalloproteinasi, FGF2, un fattore di crescita dei fibroblasti, E2F3, un fattore di trascrizione, e MET e KIT [114, 121, 122].

MET e KIT sono principalmente coinvolti nello sviluppo e nella progressione dei sarcomi [123, 124]. Met è un recettore tirosin-chinasico che lega il fattore di crescita (Hepatocyte Growth Factor) e guida la progressione maligna mediante attivazione delle pathway di signalling che promuovono la motilità cellulare, la sopravvivenza e la proliferazione [125]. Anche Kit è un recettore tirosin-chinasico che opera nella trasduzione del segnale cellulare [126]. Diverse pathway agiscono a valle del Kit per influenzare la sopravvivenza cellulare e la proliferazione, e le sue forme mutanti sono implicate in diversi tumori, incluso i tumori stromali gastrointestinali o GIST [127], la leucemia mieloide acuta, il melanoma, ed il suo stato di mutazione può essere predittivo di risposta all'inibitore tirosin-chinasico Imatinib [128].

In questo studio l'espressione del MET era up-regolata nei SPM, inversamente correlata in modo significativo con l'espressione del miR-152, mentre l'up-regolazione dell'espressione del KIT era meno evidente. Inoltre, è stato trovato che i livelli di espressione di MET erano significativamente più alti nei pazienti che avevano sviluppato metastasi durante il follow-up rispetto a quelli che non ne presentavano. Questi dati, in aggiunta ad una espressione forte ed uniforme di MET nella maggior parte dei pazienti metastatici, sottolineano la rilevanza clinica di MET nello sviluppo dei sarcomi e nella prognosi [124, 129].

In conclusione, nel presente lavoro sono state effettuate differenti analisi per individuare un pannello di biomarcatori candidati con ruolo prognostico utile a differenziare pazienti con un maggiore rischio di sviluppare metastasi da sottoporre a controlli più ravvicinati e a differenti strategie terapeutiche.

I dati ottenuti hanno permesso la rilevazione di molecole o frammenti a basso peso molecolare nel siero di pazienti con SPM, che potranno essere utili sia per una diagnosi precoce che per monitorare l'eventuale progressione o la risposta alla terapia con un metodo non invasivo.

In seguito, la validazione dei biomarcatori più significativi a livello tissutale ha focalizzato l'attenzione sulla proteina IGFBP7, che appare avere un ruolo prognostico predominante nei SPM ad alto grado indipendentemente dal sottotipo istologico, così confermando precedenti studi [130].

In parallelo, la concentrazione nel siero di IGFBP7 potrebbe essere utile nel dare un valore soglia di 25ng/ml per discriminare i pazienti oncologici dai non oncologici. Esperimenti successivi saranno cruciali per capire la rilevanza clinica di IGFBP7 ed il suo ruolo nel fornire informazioni riguardo la presenza e la progressione della malattia.

Infine, l'analisi di espressione di miRNA, con la validazione della sottoregolazione di miR-152 e la conseguente overespressione dei suoi target MET e KIT, apre la strada a futuri studi di integrazione del profilo molecolare alla ricerca di potenziali specifici "bersagli" per future applicazioni clinico-terapeutiche sempre più selettive e personalizzate, inclusa la scelta di appropriati farmaci biologici. Dal punto di vista farmacologico, infatti, la definizione di una possibile terapia atta ad ostacolare la sopravvivenza delle cellule tumorali, bersagliando ed inibendo l'attività di specifiche molecole e determinate pathway, risulterebbe un valido strumento nelle mani della medicina.

6-BIBLIOGRAFIA

1. Berrino F, I Sarcomi; *Pavia, Edizioni medico scientifiche* (1994).
2. Wu JS, Hochman MG, Soft-tissue tumors and tumor-like lesions: a systematic imaging approach; *Radiology* (2009) Nov; 253(2): 297-316.
3. Kind M, Stock N, Coindre JM, Histology and imaging of soft tissue sarcomas; *Eur. J. Radiol.* (2009) Oct; 72(1): 6-15.
4. van Vliet M, Kliffen M, Krestin GP, et al., Soft tissue sarcomas at a glance: clinical, histological, and MR imaging features of malignant extremity soft tissue tumors; *Eur. J. Radiol.* (2009) Jun; 19(6): 1499-1511.
5. Murphey MD, World Health Organization classification of bone and soft tissue tumors: modifications and implications for radiologists; *Semin. Musculoskelet Radiol.* (2007) Sep; 11(3): 201-214.
6. Frassica FJ, Khanna JA, McCarthy EF, The role of MR imaging in soft tissue tumor evaluation: perspective of the orthopedic oncologist and musculoskeletal pathologist; *Magn. Reson. Imaging Clin. N. Am.* (2000) Nov; 8(4): 915-927.
7. Campanacci M, Bone and soft tissue tumors: clinical features, imaging, pathology and treatment; *Padova, 2nd ed., Piccin Nuova Libreria Editore* (1999).
8. Thway K, Pathology of soft tissue sarcomas; *Clin. Oncol.* (2009) Nov; 21(9): 695-705.
9. Wu JM, Montgomery E, Classification and Pathology; *Surg. Clin. North Am.* (2008) Jun; 88(3): 483-520.
10. Fletcher CD, The evolving classification of soft tissue tumours: an update based on the new WHO classification; *Histopathology* (2006) Jan; 48(1): 3-12.
11. Mankind HJ, Hornicek FJ, Diagnosis, classification, and management of soft tissue sarcomas; *Cancer Control* (2005) Jan-Feb; 12(1): 5-21.
12. Bovée JV, Hogendoorn PC, Pitfalls in pathology of soft tissue sarcomas; *Cancer Treat. Res.* (2004); 120: 81-97.
13. Coindre JM, Immunohistochemistry in the diagnosis of soft tissue tumours; *Histopathology* (2003) Jul; 43(1): 1-16.
14. Coindre JM, Molecular biology of soft-tissue sarcomas; *Bull Cancer* (2010) Nov 1; 97(11): 1337-1345.
15. Jain S, Xu R, Prieto VG, et al., Molecular classification of soft tissue sarcomas and its clinical applications; *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* (2010) Apr 23; 3(4): 416-428.

16. Davies CE, Davies AM, Kindblom LG, et al., Soft tissue tumors with muscle differentiation; *Semin. Musculoskelet Radiol.* (2010) Jun; 14(2): 245-256.
17. Ordóñez JL, Osuna D, Garcia-Dominguez DJ, et al., The clinical relevance of molecular genetics in soft tissue sarcomas; *Adv. Anat. Pathol.* (2010) May; 17(3): 162-181.
18. Miettinen M, From morphological to molecular diagnosis of soft tissue tumors; *Adv. Exp. Med. Biol.* (2006); 587: 99-113.
19. Helman LJ, Meltzer P, Mechanisms of sarcoma development; *Nat. Rev. Cancer* (2003) Sep; 3(9): 685-694.
20. Cormier JN, Pollock RE, Soft Tissue Sarcomas; *CA Cancer J. Clin.* (2004); 54: 94-109.
21. Campanacci M, Soft Tissue Tumors; *Padova, Piccin Nuova Libreria Editore* (1999), pp. 909-1199.
22. Lee YF, John M, Falconer A, et al., A Gene Expression Signature Associated With Metastatic Outcome in Human Leiomyosarcomas; *Cancer Res.* (2004); 64: 7201-7204.
23. Kotilingam D, Lev DC, Lazar AJ, et al., Staging soft tissue sarcoma: evolution and change; *CA Cancer J. Clin.* (2006); 56: 282-291.
24. Wunder JS, Healey JH, Davis AM, et al., A comparison of staging systems for localized extremity soft tissue sarcoma; *Cancer* (2000); 88: 2721-2730.
25. Wolf RE, Enneking WF, The staging and surgery of musculoskeletal neoplasms; *Orthop. Clin. North Am.* (1996); 27: 473-481.
26. Saddegh MK, Lindholm J, Lundberg A, et al., Staging of soft-tissue sarcomas. Prognostic analysis of clinical and pathological features; *J. Bone Joint Surg. Br.* (1992); 74: 495-500.
27. Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA, A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma; *Clin. Orthop. Relat. Res.* (1980); 153: 106-120.
28. Deyrup AT, Weiss SW, Grading of soft tissue sarcomas: the challenge of providing precise information in an imprecise world; *Histopathology* (2006); Jan; 48(1): 42-50.
29. Hynes RO, . Metastatic potential: generic predisposition of the primary tumor or rare, metastatic variants-or both? *Cell* (2003) Jun 27; 113(7): 821-823.
30. Fidler IJ, The pathogenesis of cancer metastasis: “the seed and soil” hypothesis revisited; *Nat. Rev. Cancer* (2003); 3: 453.
31. Price JP, Bonovich MT, Kohn EC, The biochemistry of cancer dissemination; *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* (1997); 32: 175-253.
32. Pandey A, Mann M, Proteomics to study genes and genomes; *Nature* (2000); 405: 837-846.
33. Mapelli V, La proteomica per risolvere la complessità dei sistemi; *Prometeus ANBI magazine* (2005).

34. Posadas EM, Simpkins F, Liotta LA, et al., Proteomic analysis for the early detection and rational treatment of cancer – realistic hope? *Annals of oncology* (2005); 16: 16-22.
35. Petricoin EF III, Bichsel VE, Calvert VS, et al., Mapping molecular networks using proteomics: a vision for patient-tailored combination therapy; *J. Clin. Oncol.* (2005); 23: 3614–3621.
36. Liotta LA, Espina V, Mehta AI, et al., Protein microarrays: meeting analytical challenges for clinical applications; *Cancer Cell* (2003); 3: 317–325.
37. Sheehan KM, Calvert VS, Kay EW, et al., Use of reverse phase protein microarrays and reference standard development for molecular network analysis of metastatic ovarian carcinoma; *Mol. Cell Proteomics* (2005); 4: 346–355.
38. Parmiani G, Gli antigeni tumorali e la risposta immune cellulomediata contro i tumori: dagli studi sperimentali alle possibili applicazioni terapeutiche nell'uomo; *Edizioni Minerva Medica* (1987).
39. Bonadonna G, Robustelli della Cuna G, Manuale di Oncologia Medica; *Masson Italia Editori*, 3^a edizione (1987).
40. Kulasingam V1, Diamandis EP, Strategies for discovering novel cancers biomarkers trough utilization of emerging technologies; *Nature Clinical Practice Oncology* (2008) Oct; 5(10): 588-99.
41. Tamburro D, Fredolini C, Espina V, et al., Multifunctional core–shell nanoparticles: discovery of previously invisible biomarkers; *J. Am. Chem. Soc.* (2011); 133(47): 19178-19188.
42. Fredolini C, Meani F, Reeder KA, et al., Concentration and preservation of very low abundance biomarkers in urine, such as human Growth Hormone (hGH), by Cibacron Blue F3G-A loaded hydrogel particles; *Nano Res.* (2008); 1(6): 502-518.
43. Luchini A, Fredolini C, Espina BH, et al., Nanoparticle technology: addressing the fundamental roadblocks to protein biomarker discovery; *Curr. Mol Med.* (2010); 10(2): 133-141.
44. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*; *Cell* (1993); 75: 843-854.
45. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al., Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia; *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (2002); 99: 15524-15529.
46. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al., Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers; *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (2004) Mar 2; 101(9): 2999-3004.

47. Acunzo M, Romano G, Wernicke D, et al., MicroRNA and cancer. A brief overview; *Advances in Biological Regulation* (2015); 57: 1-9.
48. Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, et al., MicroRNA-34b and microRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth; *Cancer Res.* (2007); 67: 8433-8438.
49. Zhu X, Li H, Long L, et al., miR-126 enhances the sensitivity of non-small cell lung cancer cells to anticancer agents by targeting vascular endothelial growth factor A; *Acta Biochim. Biophys. Sin.* (2012); 44: 519-526.
50. Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al., A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets; *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* (2006); 103: 2257-2261.
51. Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, et al., MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin; *Nat. Biotechnol.* (2008); 26: 462-469.
52. Scholl V, Hassan R, Zalcborg IR, miRNA-451: a putative predictor marker of Imatinib therapy response in chronic myeloid leukemia; *Leuk. Res.* (2012); 36: 119-121.
53. Wang Z, The guideline of the design and validation of MiRNA mimics; *Methods Mol. Biol.* (2011); 676: 211-223.
54. Guled M, Pazzaglia L, Borze I, et al., Differentiating soft tissue Leiomyosarcoma and Undifferentiated Pleomorphic Sarcoma: a miRNA analysis; *Gene Chromosome Cancer* (2014); 53: 693-702.
55. Fletcher CDM, Unni KK and Mertens F, WHO classification of tumours of soft tissue and bone. In: Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone; *Lyon, IARC Press*, (2013).
56. Luchini A, Geho DH, Bishop B, et al., Smart hydrogel particles: biomarker harvesting: one-step affinity purification, size exclusion, and protection against degradation; *Nano Lett.* (2008); 8: 350-361.
57. Jones CD, Lyon LA, Synthesis and characterization of multiresponsive core-shell microgels; *Macromolecules* (2000); 33: 8301-8306.
58. Douglas T, Tamburro D, Fredolini C, et al., The use of hydrogel microparticles to sequester and concentrate bacterial antigens in a urine test for lyme disease; *Biomaterials* (2011); 32: 1157-1166.
59. Fredolini C, Meani F, Luchini A, et al., Investigation of the ovarian and prostate cancer peptidome for candidate early detection markers using a novel nanoparticle biomarker capture technology; *AAPS J.* (2010); 12: 504-518.

60. Liu H, Sadygov RG, Yates JR III, A model for random sampling and estimation of relative protein abundance in shotgun proteomics. *Anal. Chem.* (2004), 76: 4193–4201.
61. Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, et al., Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics; *Mol. Cell. Proteomics* (2005); 4: 1487–1502.
62. Winer J, Jung CK, Shackel I, et al., Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro; *Anal. Biochem.* (1999); 270: 41–49.
63. Liotta LA, Petricoin EF 3rd, Serum peptidome for cancer detection: spinning biologic trash into diagnostic gold; *J. Clin. Invest.* (2006); 116: 26–30.
64. Charbonneau B, Maurer MJ, Fredericksen ZS, et al., Germline variation in complement genes and event-free survival in follicular and diffuse large B-cell lymphoma; *Am. J. Hematol.* (2012); 87: 880–885.
65. Coussens LM, Werb Z, Inflammation and cancer; *Nature* (2002); 420: 860–867.
66. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M, Immunity, inflammation, and cancer; *Cell* (2010); 140: 883–899.
67. Falanga A, Marchetti M, Vignoli A, Coagulation and cancer: biological and clinical aspects; *J. Thromb. Haemost.* (2013); 11: 223–233.
68. Shen Y, Kim J, Strittmatter EF, et al., Characterization of the human blood plasma proteome; *Proteomics* (2005); 5: 4034–4045.
69. Bostrom K, Zebboudj AF, Yao Y, et al., Matrix GLA protein stimulates VEGF expression through increased transforming growth factor-beta1 activity in endothelial cells; *J. Biol. Chem.* (2004); 279: 52904–52913.
70. Sollazzo V, Galasso M, Volinia S, et al., Prion proteins (PRNP and PRND) are over-expressed in osteosarcoma; *J. Orthop. Res.* (2012); 30: 1004–1012.
71. Nakamura T, Matsumine A, Iino T, et al., Role of high-sensitivity C-reactive protein in the differentiation of benign and malignant soft tissue tumors; *Anticancer Res.* (2014); 34: 933–936.
72. Szkandera J, Gerger A, Liegl-Atzwanger B, et al., Validation of the prognostic relevance of plasma C reactive protein levels in soft-tissue sarcoma patients; *Br. J. Cancer* (2013); 109: 2316–2322.

73. Gil-Barnabe AM, Lucotti S, Muschel RJ, Coagulation and metastasis: what does the experimental literature tell us? *Br. J. Haematol.* (2013); 162: 433–441.
74. Deskur A, Sałata D, Budkowska M, et al., Selected hemostatic parameters in patients with pancreatic tumors; *Am. J. Transl. Res.* (2014); 6: 768–776.
75. Baxter RC, IGF binding proteins in cancer: mechanistic and clinical insight; *Nat. Rev. Cancer* (2014); 14: 329-341.
76. Komiya E, Sato H, Watanabe N, et al. Angiomodulin, a marker of cancer vasculature, is upregulated by vascular endothelial growth factor and increases vascular permeability as a ligand of integrin $\alpha\beta 3$; *Cancer Med.* (2014); 3: 537-549.
77. Burger AM, Leyland-Jones B, Banerjee K, et al. Essential roles of IGFBP-3 and IGFBP-rP1 in breast cancer; *Eur. J. Cancer* (2005); 41: 1515–1527.
78. Degeorges A, Wang F, Frierson HF Jr, et al. Human prostate cancer expresses the low affinity insulin-like growth factor binding protein IGFBP-rP1; *Cancer Res.* (1999); 59: 2787-2790.
79. Wang Z, Wang Z, Liang Z, et al. Expression and clinical significance of IGF-1, IGFBP-3, and IGFBP-7 in serum and lung cancer tissues from patients with non-small cell lung cancer; *Oncotargets Ther.* (2013); 6: 1437-1444.
80. Sato J, Hasegawa S, Akaogi K, et al. Identification of cell-binding site of angiomodulin (AGM/TAF/Mac25) that interacts with heparin sulfates on cell surface; *J. Cell. Biochem.* (1999); 75: 187-195.
81. Kishibe J, Yamada S, Okada Y, et al. Structural requirements of heparan sulfate for the binding to the tumor-derived adhesion factor/angiomodulin that induces cord-like structures to ECV-304 human carcinoma cells; *J. Biol. Chem.* (2000); 275: 15321-15329.
82. Pen A, Moreno MJ, Durocher Y, et al. Glioblastoma secreted factors induce IGFBP-7 and angiogenesis by modulating Smad-2-dependent TGF- β signaling; *Oncogene* (2008); 27: 6834-6844.
83. Sepiashvili L, Hui A, Ignatchenko V, et al. Potentially novel candidate biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma identified using an integrated cell line-based discovery strategy; *MCP.* (2012); 11: 1404-1415.
84. Fishelson Z, Donin N, Zell S, et al., Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors; *Mol. Immunol.* (2003), 40: 109–123.
85. Junnikkala S, Hakulinen J, Jarva H, et al., Secretion of soluble complement inhibitors factor H and factor H-like protein (FHL-1) by ovarian tumour cells; *Br. J. Cancer* (2002); 87: 1119–1127.

86. Okroj M, Hsu YF, Ajona D, et al., Non-small cell lung cancer cells produce a functional set of complement factor I and its soluble cofactors; *Mol. Immunol.* (2008); 45: 169–179.
87. Raitanen MP, Marttila T, Kaasinen E, et al., Sensitivity of human complement factor H related protein (BTA stat) test and voided urine cytology in the diagnosis of bladder cancer; *J. Urol.* (2000); 163: 1689–1692.
88. Raitanen MP, Tammela TL, Specificity of human complement factor H-related protein test (Bard BTA stat Test); *Scand. J. Urol. Nephrol.* (1999); 33: 234–236.
89. Thomas L, Leyh H, Marberger M, et al., Multicenter trial of the quantitative BTA TRAK assay in the detection of bladder cancer; *Clin. Chem.* (1999); 45: 472–477.
90. Pode D, Shapiro A, Wald M, et al., Noninvasive detection of bladder cancer with the BTA stat test; *J. Urol.* (1999); 161: 443–446.
91. Sarosdy MF, Hudson MA, Ellis WJ, et al., Improved detection of recurrent bladder cancer using the Bard BTA stat Test; *Urology* (1997); 50: 349–353.
92. McRae JL, Cowan PJ, Power DA, et al., Human factor H-related protein 5 (FHR-5). A new complement-associated protein; *J. Biol. Chem.* (2001); 276: 6747–6754.
93. Cheng ZZ, Corey MJ, Parepalo M, et al., Complement factor H as a marker for detection of bladder cancer; *Clin. Chem.* (2005); 51: 856–863.
94. Csincsi AI, Kopp A, Zoldi M, et al., Factor H-Related Protein 5 interacts with Pentraxin 3 and the extracellular matrix and modulates complement activation; *J. Immunol.* (2015); 194: 4963–4973.
95. Balkwill F, Mantovani A, Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* (2001); 357: 539–545.
96. Colotta F, Allavena P, Sica A, et al., Cancer related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability; *Carcinogenesis* (2009); 30: 1073–1081.
97. Larghi CPP, Riboldi E, Allavena P, et al., The Inflammatory Milieu of Tumors: Cytokines and Chemokines that Affect Tumor Growth and Metastasis; *Tel Aviv, Bentham ebooks*, (2012), pp. 14–28.
98. Chibon F, Lagarde P, Salas S, et al., Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity; *Nat. Med.* (2010); 16: 781–787.
99. Nuovo GJ, Schmittgen TD, Benign metastasizing leiomyoma of the lung: clinicopathologic, immunohistochemical, and microRNA analyses; *Diagn. Mol. Pathol.* (2008); 17: 145–150.
100. Esquela-Kerscher A, Slack FJ, Oncomirs - microRNAs with a role in cancer; *Nat. Rev. Cancer* (2006); 6: 259–269.

101. Iorio MV, Croce CM, Causes and consequences of microRNA dysregulation; *Cancer J.* (2012); 8: 215–222.
102. Greither T, Würl P, Grochola L, et al., Expression of microRNA 210 associates with poor survival and age of tumor onset of soft-tissue sarcoma patients; *Int. J. Cancer* (2012); 130: 1230–1235.
103. Subramanian S, Lui WO, Lee CH, et al., MicroRNA expression signature of human sarcomas; *Oncogene* (2008); 27: 2015–2026.
104. Danielson LS, Menendez S, Attolini CS, et al., A differentiation-based microRNA signature identifies leiomyosarcoma as a mesenchymal stem cell-related malignancy; *Am. J. Pathol.* (2010); 177: 908–917.
105. Zhou C, Tan W, Lv H, et al., Hypoxia-inducible microRNA-488 regulates apoptosis by targeting Bim in osteosarcoma; *Cell. Oncol.* (2016); 39: 463–471.
106. Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rodriguez-Dorantes M, et al., miRNA biogenesis: biological impact in the development of cancer; *Cancer Biol. Ther.* (2014); 15: 1444–1455.
107. Vitiello M, Tuccoli A, Poliseno L, Long non-coding RNAs in cancer: implications for personalized therapy; *Cell. Oncol.* (2015); 38: 17–28.
108. Ferraro A, Altered primary chromatin structures and their implications in cancer development; *Cell. Oncol.* (2016); 39: 195–210.
109. Taucher V, Mangge H, Haybaeck J, Non coding RNAs in pancreatic cancer: challenges and opportunities for clinical application; *Cell. Oncol.* (2016); 39: 295–318.
110. Zhou X, Zhao F, Wang ZN, et al., Altered expression of miR-152 and miR-148a in ovarian cancer is related to cell proliferation; *Oncol. Rep.* (2012); 27: 447–454.
111. Lichner Z, Fendler A, Saleh C, et al., MicroRNA signature helps distinguish early from late biochemical failure in prostate cancer; *Clin. Chem.* (2013); 59: 1595–1603.
112. Köhler CU, Bryk O, Meier S, et al., Analyses in human urothelial cells identify methylation of miR-152, miR-200b and miR-10a genes as candidate bladder cancer biomarkers; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2013); 438: 48–53.
113. Hiroki E, Akahira J, Suzuki F, et al., Changes in microRNA expression levels correlate with clinicopathological features and prognoses in endometrial serous adenocarcinomas; *Cancer Sci.* (2010); 101: 241–249.
114. Tsuruta T, Kozaki K, Uesugi A, et al., miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer; *Cancer Res.* (2011); 71: 6450–6462.

115. Azizi M, Teimoori-Toolabi L, Arzanani MK, et al., MicroRNA-148b and microRNA-152 reactivate tumor suppressor genes through suppression of DNA methyltransferase-1 gene in pancreatic cancer cell lines; *Cancer Biol. Ther.* (2014); 15: 419–427.
116. Chen Y, Song Y, Wang Z, et al., Altered expression of MiR-148a and MiR-152 in gastrointestinal cancers and its clinical significance; *J. Gastrointest. Surg.* (2010); 14: 1170–1179 .
117. Song YX, Yue ZY, Wang ZN, et al., MicroRNA-148b is frequently down-regulated in gastric cancer and acts as a tumor suppressor by inhibiting cell proliferation; *Mol. Cancer* (2011); 10: 1.
118. Liu DZ, Ander BP, Tian Y, et al., Integrated analysis of mRNA and microRNA expression in mature neurons, neural progenitor cells and neuroblastoma cells; *Gene* (2012); 495: 120–127.
119. Wang NG, Wang DC, Tan BY, et al., Downregulation of microRNA152 is associated with the diagnosis and prognosis of patients with osteosarcoma; *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* (2015); 8: 9314–9319.
120. Dang YW, Zeng J, He RQ, et al., Effects of miR-152 on cell growth inhibition, motility suppression and apoptosis induction in hepatocellular carcinoma cells; *Asian Pac. J. Cancer Prev.* (2014); 15: 4969–4976.
121. Li L, Chen YY, Li SQ, et al., Expression of miR-148/152 family as potential biomarkers in non-small-cell lung cancer; *Med. Sci. Monit.* (2015); 23: 1155–1161.
122. Huang H, Hu M, Li P, et al., Mir-152 inhibits cell proliferation and colony formation of CD133+ liver cancer stem cells by targeting KIT; *Tumor Biol.* (2014); 36: 921–928.
123. Fukuda T, Ichimura E, Shinozaki T, et al., Coexpression of HGF and cmet/HGF receptor in human bone and soft tissue tumors; *Pathol. Int.* (1998); 48: 757–762.
124. Lahat G, Zhang P, Zhu QS, et al., The expression of c-met pathway components in unclassified pleomorphic sarcoma/malignant miR-152 down-regulation is associated with MET up-regulation fibrous histiocytoma (UPS/MFH): a tissue microarray study; *Histopathology* (2011); 59: 556–561.
125. Trusolino L, Bertotti A, Comoglio PM, MET signalling: principles and functions in development, organ regeneration and cancer; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2010); 11: 834–848.
126. Miettinen M, Lasota J, KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation; *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* (2005); 13: 205–220.
127. Ashman LK, Griffith R, Therapeutic targeting of c-KIT in cancer; *Expert Opin. Investig. Drugs* (2013); 22: 103–115.

128. Noujaim J, Gonzalez D, Thway K, et al., P.(L576P)-KIT mutation in GIST: favourable prognosis and sensitive to imatinib? *Cancer Biol. Ther.* (2016); 17: 543–555.
129. Fleuren ED, Roeffen MH, Leenders WP, et al., Expression and clinical relevance of MET and ALK in Ewing sarcomas; *Int. J. Cancer* (2013); 133: 427–436.
130. Adachi Y, Itoh F, Yamamoto H, et al. Expression of angiomodulin (tumor-derived adhesion factor/mac25) in invading tumor cells correlates with poor prognosis in human colorectal cancer; *Int. J. Cancer* (2001); 95: 216-222.

