

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE

Ciclo XXVI

Settore Concorsuale di afferenza: 05/H1

Settore Scientifico disciplinare: BIO/16

TITOLO TESI

**Caratterizzazione biomolecolare delle neoplasie
adipocitiche**

Presentata da: Dott.ssa Stefania Cocchi

**Coordinatore Dottorato
Chiar.mo Prof. Lucio Cocco**

**Relatore
Chiar.mo Prof. Lucio Cocco**

Esame finale anno 2014

INDICE

1 INTRODUZIONE	1
1.1 I sarcomi dei tessuti molli	1
1.1.1 Epidemiologia ed aspetti clinici	1
1.1.2 Presentazione clinica e diagnostica per immagini	2
1.1.3 Fattori di rischio ed eziologia	3
1.1.4 Grado e stadiazione	4
1.1.5 Terapia	5
1.1.6 Sarcomi del retroperitoneo	6
1.1.7 Follow-up	6
1.1.8 Classificazione molecolare dei sarcomi	7
1.2 Liposarcomi	8
1.2.1 Il tumore lipomatoso atipico	10
1.2.1.1 Epidemiologia ed aspetti clinici	11
1.2.1.2 Istopatologia	11
1.2.1.3 Caratteristiche immunofenotipiche	12
1.2.1.4 Caratteristiche citogenetiche	13
1.2.1.5 Prognosi	14
1.2.2 Il liposarcoma dedifferenziato	15
1.2.2.1 Epidemiologia e aspetti clinici	15
1.2.2.2 Istopatologia	15
1.2.2.3 Caratteristiche immunofenotipiche	17
1.2.2.4 Caratteristiche citogenetiche	17
1.2.2.5 Prognosi	18
1.3 Trattamento	18
1.4 Eziologia	19
1.5 Amplificazione genica	19
1.6 Il gene MDM2	20
1.7 Trasduzione del segnale nei sarcomi	22
1.8 Ruolo di AKT nei tumori	22
1.8.1 La serina/treonina chinasi	23

1.8.2 Distribuzione tissutale	23
1.8.3 Struttura di AKT	23
1.8.4 Attivazione di AKT	24
1.8.5 Attività anti-apoptotica di AKT	26
1.8.6 Ruolo di AKT nella proliferazione cellulare	27
1.8.7 Regolazione negativa del percorso PI3K/AKT/mTOR	28
2. SCOPO DELLA RICERCA	29
3. MATERIALI E METODI	31
3.1 Casi clinici in studio	31
3.2 Analisi FISH	35
3.2.1 Tessuti idonei alla valutazione	37
3.2.2 Conteggio dei segnali (scoring)	38
3.3 Estrazione RNA	39
3.4 Retrotrascrizione	40
3.5 Real- Time PCR	40
3.5.1 Metodo del Ct ($\Delta\Delta C_t$) comparativo	42
3.4 Analisi immunohistochimica	43
4. RISULTATI	48
4.1 Analisi dei dati clinici	48
4.2 Analisi FISH	48
4.3 Analisi immunohistochimica della espressione di MDM2	53
4.4 Analisi Real-Time PCR della espressione di AKT	55
4.5 Analisi immunohistochimica della espressione di pAKT	58
5. DISCUSSIONE	62
6. CONCLUSIONI	67
7. BIBLIOGRAFIA	68

1. INTRODUZIONE

1.1 I sarcomi dei tessuti molli

I sarcomi dei tessuti molli (STM) sono tumori di origine mesenchimale che insorgono dai muscoli, dai tendini, dal tessuto adiposo e dai tessuti connettivi in genere.

Questi tumori rappresentano l'1% di tutti i tumori maligni negli adulti ed il 7-10% dei tumori infantili. Sotto il termine di STM sono raggruppati più di 50 tipi istologici che mostrano una elevata variabilità per quanto riguarda la presentazione clinica, la morfologia, la genetica ed il comportamento (Guillou & Aurias, 2010).

Data l'elevata eterogeneità istologica, la classificazione dei STM è molto complessa; essa si basa su aspetti istologici, immunofenotipici e genetici (Campanacci, 1999; Edge SB, 2010; Jemal et al., 2010).

1.1.1 Epidemiologia e aspetti clinici

Sulla base delle rilevazioni dell'Associazione Italiana Registri Tumori (AIRTum), l'incidenza annuale in Italia è di circa 3/100.000 persone.

Nonostante le tecniche chirurgiche e le terapie siano migliorate, la mortalità per questi tumori resta elevata e la sopravvivenza globale a 5 anni non supera il 55%. La principale ragione di questo è da attribuire a una diagnosi tardiva per una sottostima delle neoformazioni dei tessuti molli e all'avanzamento della malattia al momento della presentazione.

Nei casi di tumore resecabile, la sopravvivenza a lungo termine è correlata al grado istologico, alla sede e alle dimensioni della neoplasia.

Possono essere colpite tutte le età, anche se il picco d'incidenza è intorno ai 50 anni. Colpiscono sia i maschi che le femmine, ma sembrano avere una leggera preferenza per il genere maschile. Date le particolari caratteristiche di questa patologia non esiste l'opportunità di un programma di *screening* (Fletcher CDM, 2013; Gustafson, 1994), (Fletcher CDM, 2013).

I STM possono insorgere in qualsiasi distretto anatomico, ma più frequentemente sono localizzati a livello degli arti (60%) e del retroperitoneo

(15%). Più rari sono quelli del tronco superficiale (10%) e del distretto testa/collo (5%). I sarcomi viscerali (esofago, stomaco, intestino, utero, ecc) rappresentano il restante 10%. Tra questi troviamo anche il sottogruppo dei tumori stromali gastro-intestinali (GIST).

Circa il 10% dei pazienti presenta metastasi rilevabili al momento della diagnosi del tumore primitivo. I polmoni rappresentano l'organo più comunemente interessato dalle metastasi (Fletcher CDM, 2013).

1.1.2 Presentazione clinica e diagnostica per immagini

I sintomi ed i segni attraverso i quali può manifestarsi un sarcoma variano in funzione della localizzazione e delle strutture coinvolte.

La maggior parte dei STM delle estremità e della parete del tronco si presenta come tumori indolenti che non influenzano le normali funzioni vitali. Tutte le lesioni superficiali di dimensioni superiori a 5 cm e tutte le lesioni profonde hanno un'elevata probabilità di essere sarcomi. I pazienti che presentano sarcomi addominali o retroperitoneali riferiscono sintomi di tipo gastrointestinale (Fletcher CDM, 2013).

La diagnosi di STM deve sempre essere radiologica e istologica. L'approccio diagnostico prevede inizialmente alcuni esami radiologici: la diagnostica per immagini è molto importante sia nella valutazione nelle fasi d'esordio della malattia che nella stadiazione.

La radiografia standard, l'ecografia, la tomografia computerizzata (TC) e la risonanza magnetica nucleare (RMN) possono essere utilizzate nello studio di una massa sospetta. L'ecografia consente di misurare le dimensioni della lesione ed i rapporti con le strutture anatomiche circostanti, tuttavia non è un esame specifico. La radiografia è utile per escludere l'invasione del tessuto osseo da parte dei tessuti molli.

La RMN, in virtù della sua maggiore risoluzione di contrasto, permette di definire in modo accurato la dimensione del tumore, di evidenziare il compartimento coinvolto e la relazione del tumore stesso con le strutture neuro-vascolari.

La CT è utilizzata per controllare le calcificazioni osservate durante la radiografia ed eventualmente per guidare un'agobiopsia.

Oltre a questi esami, possono essere necessarie la scintigrafia ossea o la tomografia ad emissione di positroni (PET) per valutare l'eventuale interessamento dello scheletro. Dal momento che il polmone è l'organo più frequentemente colpito da eventuali localizzazioni metastatiche, deve essere eseguita anche una TC del torace.

Indipendentemente dal sospetto clinico e/o radiologico, la diagnosi di STM deve sempre essere una diagnosi istopatologica pertanto, dopo le indagini radiologiche, è indispensabile procedere con il prelievo biotico della lesione (Roberge et al., 2012), (Vanel D. in WHO classification of tumours of soft tissue and bone 2013 Fletcher CDM, 2013).

1.1.3 Fattori di rischio ed eziologia

L'eziologia dei sarcomi delle parti molli è ancora poco chiara e non vi sono fattori di rischio accertati. Nonostante la maggior parte dei casi sia sporadica, è ben nota l'associazione di questi tumori con particolari sindromi familiari come la Neurofibromatosi di tipo I (malattia di von Recklinghausen), con specifici tumori maligni delle guaine nervose periferiche e la sindrome di Li-Fraumeni, una patologia caratterizzata da mutazioni nella linea germinale del gene oncosoppressore p53.

Tra le sostanze chimiche che sembrano essere associate a un aumento del rischio di sviluppare STM vi sono il cloruro di vinile (angiosarcomi) e i pesticidi (sarcomi muscolari). Inoltre, è stato descritto il rischio di sarcomi radioindotti (angiosarcomi) o associati a immunodeficienze (leiomiosarcomi) (Wibmer et al., 2010).

Si ritiene che i sarcomi si sviluppino in seguito a mutazioni che si verificano nelle cellule mesenchimali staminali, ma l'esatta origine cellulare di questi tumori resta ancora sconosciuta.

La maggior parte dei STM si sviluppa *de novo*, senza essere preceduta da una lesione a basso grado; tuttavia alcuni sarcomi ad alto grado possono svilupparsi da una lesione meno aggressiva. Un esempio è dato dalla progressione del liposarcoma ben differenziato a liposarcoma dedifferenziato (Guillou & Aurias, 2010).

1.1.4 Grado e stadiazione

Ad eccezione di alcuni sarcomi, il tipo istologico non fornisce informazioni sufficienti per predire l'evoluzione clinica della malattia; queste informazioni si ottengono definendo il grado e lo stadio del tumore.

Oltre alla definizione del tipo istologico, al patologo è richiesta la definizione del grado di malignità, in genere correlato a parametri quali l'attività mitotica, il grado di necrosi e il pleomorfismo cellulare/anaplasia. Il grado istologico correla con il comportamento biologico di un sarcoma ed è estremamente importante per valutare l'aggressività e la prognosi del tumore. Esso viene giudicato dal patologo in base alle caratteristiche istomorfologiche delle cellule della lesione (Eilber et al., 2004).

Il *grading* dei sarcomi fu inizialmente proposto da Broders nel 1939, ma il primo studio su larga scala risale al 1977 (Russell et al., 1977).

Attualmente, il sistema di classificazione del grado di malignità maggiormente utilizzato per i sarcomi dei tessuti molli nell'adulto è quello che fa riferimento alla Federazione Francese dei Centri per la Lotta Contro il Cancro (FNCLCC). Questo sistema prevede una classificazione in tre gradi dei tumori (grado 1: basso grado, grado 2: grado intermedio; grado 3: alto grado). Nel 2002 la WHO ha raccomandato lo schema FNCLCC; tale indicazione è stata mantenuta nella versione del 2013 (Deyrup & Weiss, 2006), (Fletcher CDM, 2013).

La stadiazione combinando i dati dell'*imaging* radiologico e della diagnosi istopatologica, valuta la crescita e la diffusione del tumore nell'organismo ed è quindi un significativo indicatore prognostico. La stadiazione è inoltre utile e necessaria per la scelta del trattamento terapeutico opportuno.

Vi sono più sistemi di stadiazione, ma quello generalmente adottato nei Sarcomi dei Tessuti è il sistema TNM dell'American Joint Committee on Cancer (AJCC) che incorpora il grado istologico, la dimensione e la profondità del tumore, il coinvolgimento linfonodale e la disseminazione metastatica (Edge SB, 2010).

1.1.5 Terapia

Il trattamento dei pazienti con sarcoma delle parti molli è assai complesso e richiede un approccio multidisciplinare integrato, che tenga conto di tutte le possibili modalità terapeutiche: chirurgia, radioterapia e chemioterapia.

La scelta della strategia terapeutica dipende dall'istotipo, dal grado, dalle dimensioni e dalla sede del tumore, nonché dall'età e dalle condizioni generali del paziente. Attualmente, la chirurgia rappresenta il trattamento standard nei sarcomi dei tessuti molli dell'adulto associata a radioterapia in caso di lesioni profonde e di dimensioni maggiori di 5 cm. Per ottenere tale risultato è di fondamentale importanza che l'intervento chirurgico sia effettuato con margini adeguati cercando, tuttavia, di minimizzare i danni funzionali.

La radioterapia ha come finalità il controllo locale della malattia e può essere praticata in fase preoperatoria o postoperatoria, tuttavia la modalità ottimale di associazione tra chirurgia e radioterapia non è ancora stata definita.

Il valore della chemioterapia dipende dal tipo istologico, dalla localizzazione del sarcoma e dal rischio di metastatizzazione.

La chemioterapia può avvalersi di pochi farmaci moderatamente attivi, anche se, negli ultimi anni, sono stati identificati nuovi farmaci dotati di attività su specifici istotipi. Convenzionalmente i farmaci ritenuti attivi nei STM sono le Antracicline (Adriamicina ed Epirubicina), l'Ifosfamida e la Dacarbazina.

Numerosi studi randomizzati sui STM hanno dimostrato che la chemioterapia aumenta la sopravvivenza libera da malattia e determina un incremento del controllo locale e loco regionale (Gronchi A, in in WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone 2013 Fletcher CDM, 2013), (Associazione Italiana di Oncologia medica AIOM, Linee guida Sarcomi dei tessuti molli e GIST, 2013).

Tra i farmaci che si sono dimostrati attivi nei confronti di particolari istotipi vi sono: la Gemcitabina e il Docetaxolo nel sarcoma pleomorfo indifferenziato e nel leiomiomasarcoma (Maki et al., 2007), la Trabectedina nel liposarcoma mixoide e nel leiomiomasarcoma (Grosso et al., 2007), Gemcitabina e Taxani nell'angiosarcoma (Stacchiotti et al., 2012), Ifosfamida nel liposarcoma pleomorfo e nel sarcoma sinoviale (Canter et al., 2008).

I sarcomi delle parti molli tendono a dare luogo a metastasi. Spesso la prima diffusione a distanza della malattia avviene a livello polmonare.

A seconda dei casi, anche le metastasi polmonari sono trattate con la chirurgia e/o con la chemioterapia. Le metastasi in altre sedi (come lo scheletro, il fegato, le parti molli a distanza) vengono in genere trattate con la chemioterapia. La radioterapia può essere utile in particolari casi (in particolare per le lesioni dello scheletro). Sempre più, oggi, il trattamento medico si differenzia in rapporto alla varietà istologica. Non mancano varietà istologiche che si giovano di terapie a bersaglio molecolare, cioè di farmaci che agiscono su recettori cellulari specifici.

1.1.6 Sarcomi del retroperitoneo

I STM a insorgenza retroperitoneale rappresentano lo 0,2 % di tutti i tumori e il 15 % dei STM. Il liposarcoma ben differenziato e dedifferenziato sono le forme più frequenti. La loro crescita è spesso indolente e pertanto sono caratterizzati da una diagnosi generalmente tardiva.

Per questi tumori, a causa della posizione anatomica e per la tendenza a invadere gli organi adiacenti è estremamente difficile ottenere una radicalità chirurgica e pertanto mostrano un'elevata percentuale di ricaduta (80%) e una peggior prognosi a lungo termine rispetto ai STM delle estremità.

Il liposarcoma ben differenziato ed il liposarcoma dedifferenziato rappresentano la maggior parte dei sarcomi retroperitoneali; questi tumori sono associati ad una elevata incidenza di recidive locali e multifocali (Singer et al., 2003).

Il principale fattore prognostico per questi tumori è dato dall'accuratezza dell'intervento chirurgico, dal grado e dal tipo/sottotipo istologico (Dalal et al., 2006).

1.1.7 Follow-up

Il follow-up consiste nell'effettuare controlli clinici e strumentali proseguiti nel tempo al fine di evidenziare precocemente recidive locali o metastasi a distanza. Altro scopo del follow-up è di diagnosticare effetti tossici o complicanze tardive delle terapie. Si ritiene che nei sarcomi ad alto grado il rischio di ricaduta sia massimo nei primi 2-3 anni dopo l'intervento, mentre nei sarcomi a basso grado sembra più prolungato nel tempo. Non esistono prove

conclusive sull'efficacia del follow-up nei STM, tuttavia vi è comunque l'evidenza che l'asportazione chirurgica radicale di recidive o metastasi polmonari può prolungare la sopravvivenza del paziente (Associazione Italiana di Oncologia medica AIOM, Linee guida Sarcomi dei tessuti molli e GIST, 2013).

1.1.8 Classificazione molecolare dei sarcomi

Sulla base di informazioni ottenute da analisi di citogenetica molecolare i sarcomi possono essere suddivisi in differenti categorie: a) sarcomi che presentano traslocazioni cromosomiche reciproche che danno origine a geni di fusione. Questo gruppo rappresenta il 15-20% dei casi e comprende il sarcoma sinoviale, il sarcoma di Ewing, il rhabdomyosarcoma alveolare, liposarcoma mixoide, *etc.* La maggior parte dei geni di fusione codifica per fattori di trascrizione chimerici che causano un'alterazione della trascrizione dei geni bersaglio, mentre altri codificano per protein-chinasi chimeriche o fattori di trascrizione autocrini.

b) sarcomi con specifiche mutazioni (tumori gastrointestinali stromali-GIST) o delezioni (tumori rabdoidi).

c) sarcomi con amplificazione genica come il liposarcoma ben differenziato ed il liposarcoma de differenziato.

d) sarcomi con un profilo genomico complesso ed aberrazioni genomiche multiple. Questo gruppo costituisce circa il 50% dei STS ed è principalmente composto da tumori a cellule fusate/pleomorfe come ad esempio il leiomyosarcoma, il mixofibrosarcoma, il liposarcoma pleomorfo, il rhabdomyosarcoma pleomorfo, il sarcoma indifferenziato pleomorfo ad alto grado e altri (Guillou & Aurias, 2010).

Tra i tumori delle parti molli, le neoplasie adipocitiche costituiscono il sottotipo più frequente .

In questa tesi saranno trattati il tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato ed il liposarcoma dedifferenziato in quanto costituiscono i più ampi gruppi biologici ed anche perchè condividono caratteristiche genetiche molto simili.

1.2 Liposarcomi

I liposarcomi (LPS) sono tumori derivati da cellule che vanno incontro a differenziazione adiposa.

Tra i sarcomi dei tessuti molli, i liposarcomi costituiscono il tipo istologico più frequente (24% dei tumori delle estremità, 45% dei tumori retroperitoneali) (Weiss & Goldblum, 2008).

Si tratta tipicamente di una patologia dell'adulto che mostra un picco di incidenza fra i 40 e i 60 anni ed una lieve prevalenza nel sesso maschile. Nei pazienti pediatrici i liposarcomi sono piuttosto rari e costituiscono il 3 % di tutti i sarcomi (Coffin et al., 1997), (Weiss & Goldblum, 2008), (Fletcher et al., 2013).

Usualmente si tratta di neoplasie di grandi dimensioni, localizzate a livello degli arti inferiori (fossa poplitea, coscia), nel retroperitoneo, nella regione perirenale e mesenterica e nell'area della spalla. Nel retroperitoneo, dove principalmente originano dal grasso perirenale costituiscono il più frequente sottotipo istologico. I liposarcomi di questa sede presentano una prognosi peggiore rispetto a quelli localizzati altrove probabilmente perché spesso, prima di dare segni e sintomi, raggiungono grosse dimensioni e frequentemente mostrano un coinvolgimento multi-viscerale. Macroscopicamente i liposarcomi si presentano generalmente come masse voluminose, ben circoscritte, ma non incapsulate (Dalal et al., 2008).

I liposarcomi insorgono *de novo* piuttosto che da preesistenti lesioni benigne e nella maggior parte dei pazienti non sono state individuate le cause di insorgenza. Dal punto di vista anatomo-patologico possono essere suddivisi in quattro istotipi sulla base delle caratteristiche istologiche, cliniche e citogenetiche:

1. Liposarcoma ben differenziato (varianti adipocitica, sclerosante, infiammatorio e a cellule fusate).
2. Liposarcoma mixoide
3. Liposarcoma Dedifferenziato
4. Liposarcoma Pleomorfo

Tabella 1: Sottotipi Istologici Del Liposarcoma	
Tumore lipomatoso Atipico/liposarcoma Ben differenziato	Sottotipo più comune (50% dei liposarcomi) Basso grado (non metastatizza ma può recidivare localmente) Rischio di dedifferenziazione
Liposarcoma Mixoide	Grado intermedio Include la variante a cellule rotonde come sua controparte ad alto grado Istotipo più comune nelle popolazioni pediatriche Rischio metastatico, specialmente nella variante a cellule rotonde
Liposarcoma Dedifferenziato	Sarcoma ad alto grado che insorge in associazione ad un liposarcoma ben differenziato Più comune nelle lesioni retroperitoneali Rischio di metastasi
Liposarcoma Pleomorfo	Istotipo raro (5-10% di tutti i liposarcomi) Alto grado Può mimare un sarcoma indifferenziato pleomorfo Alto rischio di recidiva locale e metastasi

Da Peterson 2003, Dei Tos 2000, Coffin 1997, Enzinger 1995 and Weiss 1992

Tabella 2: Alterazioni Citogenetiche nei Liposarcomi		
Sottotipo Tumorale	Alterazione cromosomica	Evento molecolare
Liposarcoma Ben Differenziato	Cromosomi giganti/ad anello Amplificazione della regione 12q14-15	Amplificazione MDM2, CDK4, CPM, HMGA2
Liposarcoma Dedifferenziato	Cromosomi giganti/ad anello Amplificazioni della regione 12q14-15	Amplificazione MDM2, CDK4, CPM
Liposarcoma Mixoide	t (12;16) (q13;p11) t (12;22) (q13;p12)	FUS-DDIT3 EWSR1-DDIT3
Liposarcoma Pleomorfo	Aberrazioni cromosomiche complesse	Non conosciuto

Da Nishio, 2011.

1.2.1 Tumore Lipomatoso Atipico (TLA)/Liposarcoma Ben Differenziato (LPSBD)

Il Tumore Lipomatoso Atipico (TLA)/Liposarcoma ben differenziato (LPSBD) è una neoplasia mesenchimale localmente aggressiva composta da una proliferazione di adipociti maturi di dimensioni variabili e caratterizzata dalla presenza di focale atipia nucleare sia negli adipociti che nelle cellule stromali. La presenza di cellule stromali ipercromatiche, spesso multinucleate e la presenza di lipoblasti con citoplasma monovacuolare o multivacuolare può contribuire alla diagnosi morfologica di questi tumori.

I termini “Tumore lipomatoso atipico” e “Liposarcoma Ben Differenziato” sono sinonimi utilizzati per descrivere lesioni identiche sia per l’aspetto morfologico che per il profilo citogenetico (Dei Tos A.P, Pedoutour F, in World Health Organization Classification 2013).

Il termine “Tumore lipomatoso atipico” è stato introdotto nel 1970 per indicare quelle lesioni che insorgono negli arti e nel tronco e che sono trattabili chirurgicamente. Per indicare invece le lesioni localizzate nel retroperitoneo e nel mediastino, dove è difficile ottenere ampi margini di resezione, viene utilizzato il termine “Liposarcoma Ben differenziato”. La scelta della terminologia più appropriata dipende dalla comprensione reciproca tra il chirurgo ed il patologo per prevenire un trattamento inappropriato (Dei Tos, 2000; Evans et al., 1979).

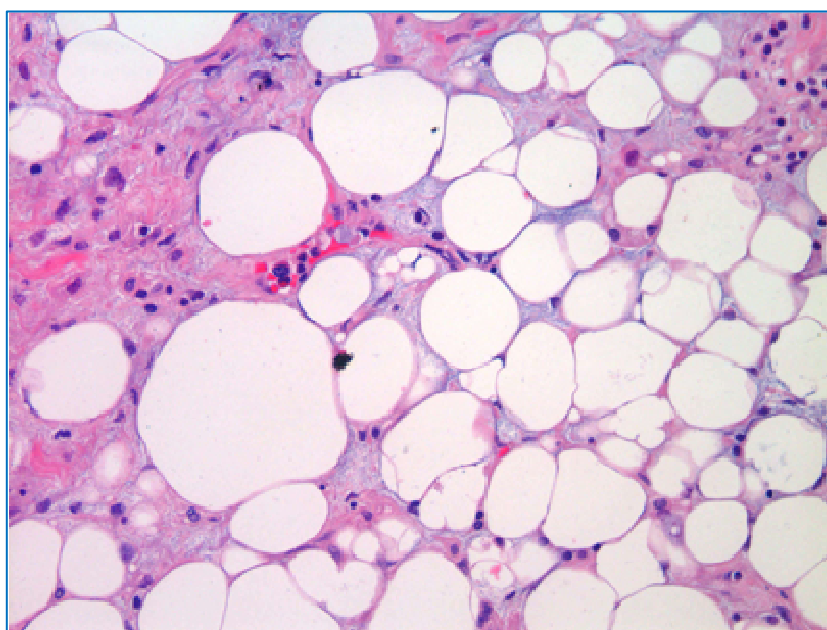


Figura 1. Tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato.

1.2.1.1 Epidemiologia ed aspetti clinici

Tra i liposarcomi, il TLA costituisce il sottotipo tumorale più frequente (40-50 %), presenta un picco di incidenza nella sesta decade ed è estremamente raro nei bambini. Nei pazienti pediatrici può essere associato alla sindrome di Li-Fraumeni. I maschi e le femmine sono ugualmente colpiti con la ovvia eccezione delle lesioni del funicolo spermatico (Weiss & Goldblum, 2008).

Il TLA insorge principalmente nelle parti molli profonde degli arti, nello spazio retroperitoneale, meno frequentemente si riscontra nella regione paratesticolare e nello spazio mediastinico; inoltre, può insorgere nei tessuti sottocutanei e raramente nella cute (Fletcher et al., 2013).

Il TLA presenta frequentemente recidive locali (10%), tuttavia, in assenza di dedifferenziazione è privo di potenziale metastatico (Singer et al., 2003).

Le recidive locali e/o la de-differenziazione sono più comuni nei tumori retroperitoneali, nel mediastino e nella regione paratesticolare; si riscontrano meno frequentemente nelle localizzazioni profonde degli arti e raramente nelle sedi superficiali (Weiss & Goldblum, 2008).

Il tumore si presenta come una massa profonda indolente, a crescita lenta; tuttavia può raggiungere dimensioni elevate soprattutto nel retroperitoneo. Le lesioni retroperitoneali risultano spesso indolenti fino a quando non raggiungono i 20 cm di diametro. A causa della sede anatomica di queste lesioni è spesso difficile ottenere margini chirurgici microscopicamente negativi; questo spiega l'elevata percentuale di recidive locali osservate nei liposarcomi ben differenziati (Fletcher CDM, 2013).

1.2.1.2 Istopatologia

Istologicamente il liposarcoma ben differenziato può essere suddiviso in tre principali sottotipi:

- a) Adipocitico (lipoma-simile)
- b) Sclerosante
- c) Infiammatorio

La presenza di più di una variante morfologica nella stessa lesione è abbastanza comune, in particolare nei tumori retroperitoneali.

La variante adipocitica è caratterizzata dalla presenza di adipociti maturi che, a differenza del lipoma, mostrano una significativa variabilità del diametro cellulare. Questo sottotipo si distingue anche per la presenza di lipoblasti con citoplasma monovacuolare o multivacuolare e per l'atipia nucleare degli adipociti e delle cellule stromali (Laurino et al., 2001).

L'aspetto istologico peculiare della variante sclerosante è dato dalla presenza di cellule stromali bizzarre caratterizzate da ipercromasia nucleare e dalla presenza di setti fibrosi che spesso suddividono il tumore in lobuli irregolari. Tale variante è più frequente nelle lesioni retroperitoneali e paratesticolari. La variante infiammatoria è il sottotipo più raro e si incontra quasi esclusivamente nel retroperitoneo dove presenta infiltrati flogistici che simulano un processo reattivo/infiammatorio e che, in alcuni casi, possono mascherare la natura adipocitica della neoplasia (Edge SB, 2010).

Spesso è difficile distinguere il TLA/LPSBD dal lipoma, tuttavia questa distinzione è importante in quanto, a differenza del lipoma, il liposarcoma ben differenziato mostra un comportamento aggressivo locale e richiede un follow-up a lungo termine.

Inoltre, entrambi i tumori vengono trattati chirurgicamente, ma il tipo di chirurgia differisce radicalmente.

1.2.1.3 Caratteristiche immunofenotipiche

Le cellule adipocitiche solitamente presentano immunoreattività per la proteina S100 che può evidenziare anche i lipoblasti (Dei Tos et al., 1994).

In linea con l'amplificazione genica, questi tumori presentano frequentemente una immunopositività per MDM2 e CDK4. La positività nucleare per MDM2 può essere osservata anche negli istiociti che possono essere numerosi nei lipomi che vanno incontro a steatonecrosi. La colorazione per MDM2 tende ad essere negativa nei liposarcomi a cellule fusate, suggerendo che questo liposarcoma possa essere considerato una entità separata (Mentzel et al., 2010).

1.2.1.4 Caratteristiche citogenetiche

Da un punto di vista citogenetico il TLA è caratterizzato dalla presenza di cromosomi soprannumerari giganti e cromosomi ad anello (Pedeutour et al., 1999).

Studi di biologia molecolare hanno dimostrato che questi cromosomi sono costituiti principalmente da sequenze amplificate della regione 12q13-15. In questa regione sono stati identificati più di 150 geni tra i quali, MDM2 (12q15), CDK4 (12q14.1), HMGA2 (12q14.3), CPM (12q15), SAS e GLI.

Tra questi, MDM2 e CDK4 sono i geni più frequentemente amplificati;

Il rilevamento dell'amplificazione di MDM2 mediante FISH (Sirvent et al., 2007), PCR (Hostein et al., 2004), o CGH array (Tap et al., 2011) può essere utilizzato per distinguere il TLA dai tumori adiposi benigni.

I cromosomi ad anello ed i cromosomi giganti sono strutture genomiche molto complesse; oltre a sequenze amplificate della regione 12q14-15, essi mostrano spesso la co-amplificazione di almeno un altro segmento cromosomico. Il più frequente è il segmento 1q21-25 (Kresse et al., 2005; Pedeutour et al., 1999).

Un'altra caratteristica importante di questi tumori è la presenza dei "neocentromeri", strutture funzionali che, a differenza dei normali cromosomi, non contengono le regioni α - satellite (Italiano et al., 2009).



Figura 2: cariotipo del tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato con cromosomi ad anello (Hameed, 2007).

1.2.1.5 Prognosi

Il principale fattore prognostico è la localizzazione anatomica.

Le lesioni localizzate in sedi trattabili chirurgicamente con margini adeguati non mostrano ricorrenza locale dopo la completa resezione, preferibilmente ampia (Bonvalot et al., 2010).

I TLA/LPSBD sono tumori che non metastatizzano e per i quali il tasso di recidiva locale dipende prevalentemente dalle sede del tumore.

Anche se la resezione chirurgica completa può essere curativa, il TLA/LPSBD si sviluppa spesso in posizioni anatomiche profonde, come il retroperitoneo od il mediastino,

Nei tumori localizzati nelle sedi profonde delle parti molli come il retroperitoneo, il funicolo spermatico o il mediastino tendono a recidivare ripetutamente. Infatti, in queste sedi, il tumore tende ad avvolgere le strutture vitali e ciò rende difficile o impossibile la completa resezione chirurgica (Edge SB, 2010; Mussi et al., 2008).

Il tasso di recidiva locale per i tumori retroperitoneali può raggiungere l'80% le metastasi a distanza si osservano nel 30% dei casi (Mussi et al., 2008; Singer et al., 2003).

Circa un quarto delle lesioni retroperitoneali va incontro a dedifferenziazione. Tale processo si manifesta con la comparsa di aree tumorali prive di caratteristiche lipomatose e che morfologicamente hanno l'aspetto di sarcomi ad alto grado, tipicamente a cellule fusate o pleomorfi (Weiss and Rao, 1992).

Questo fenomeno è solitamente indicativo di una prognosi peggiore a causa dell'acquisizione di un comportamento locale più aggressivo e della capacità di metastatizzare (Brennan, et al 2002).

La mortalità globale per questi tumori è compresa tra lo 0% per il TLA/LPSBD delle estremità e l'80% per le sedi retroperitoneali, se i pazienti sono seguiti per 10-20 anni. Mediamente, nel secondo caso, i pazienti muoiono dopo 6-11 anni (Fletcher CDM, 2013).

1.2.2 Liposarcoma Dedifferenziato (LPSDD)

Il termine liposarcoma dedifferenziato fu coniato da Evans nel 1979 per descrivere un liposarcoma costituito dalla compresenza di aree di liposarcoma ben differenziato e aree sarcomatose non lipogeniche costituite da cellule fusate o pleomorfe con elevata attività mitotica (Evans, 1979).

Tale neoplasia si presenta *ex novo* nel 90% dei casi mentre nel 10% dei casi trattasi di recidiva dovuta a dedifferenziazione di un preesistente liposarcoma ben differenziato (Henricks et al., 1997), (Weiss & Goldblum, 2008), (Coindre et al., 2010).

1.2.2.1 Epidemiologia ed aspetti clinici

Si tratta di una neoplasia aggressiva, infiltrante ed in grado di metastatizzare che insorge tipicamente nella sesta decade; è localizzato più comunemente a livello del retroperitoneo e degli arti inferiori, meno frequentemente si osserva nel cordone spermatico e più raramente nella regione testa-collo e nel tronco. Le localizzazioni sub-cutanee sono estremamente rare. (Fletcher et al., 2013)

Il LPSDD manifesta un comportamento più aggressivo rispetto al TLA/LPSBD con una stima di sopravvivenza malattia specifica a 5 anni pari al 44% contro il 93% del TLA/LPSBD (Coindre et al., 2010; Dalal et al., 2006).

1.2.2.2 Istopatologia

Secondo la classificazione WHO (Classification of Soft Tissue and Bone Tumors 2013) il liposarcoma dedifferenziato viene definito come un sarcoma privo di aree lipogeniche nella componente dedifferenziata.

La caratteristica morfologica peculiare del LPSDD è la transizione da un liposarcoma ben differenziato ad un sarcoma non lipogenico che nella maggior parte è ad alto grado.

Questa transizione di solito è improvvisa, ma in alcuni casi è più graduale cosicchè le due aree rispettivamente a basso grado ed ad alto grado possono coesistere. (Fletcher CDM, 2013).

Nel 90% dei casi le aree dedifferenziate si presentano come aree sarcomatose ad alto grado e possono presentare un pattern a cellule fusate, un pattern pleomorfo, etc.

Nel 10 % dei casi osserva invece una dedifferenziazione a basso grado.

Nel 5-10 % dei casi, il LPSDD può andare incontro ad una dedifferenziazione eterologa (rabbomiosarcomatosa, osteo/condrosarcomatosa, angiosarcomatosa) mentre in alcuni casi, il liposarcoma dedifferenziato può andare incontro ad una dedifferenziazione omologa (adipocitica), risultando così morfologicamente identico ad un liposarcoma pleomorfo (Boland et al., 2009; Henricks et al., 1997; Marino-Enriquez et al., 2010).

Ad oggi non è ancora chiaro se TLA/LPSBD ed il LPSDD costituiscano il *continuum* di una stessa patologia dove la dedifferenziazione è un fenomeno dipendente dal tempo. In alternativa, questi tumori potrebbero costituire entità distinte e separate derivanti da differenti cellule a lignaggio adipogenico, che condividono aberrazioni molecolari comuni.

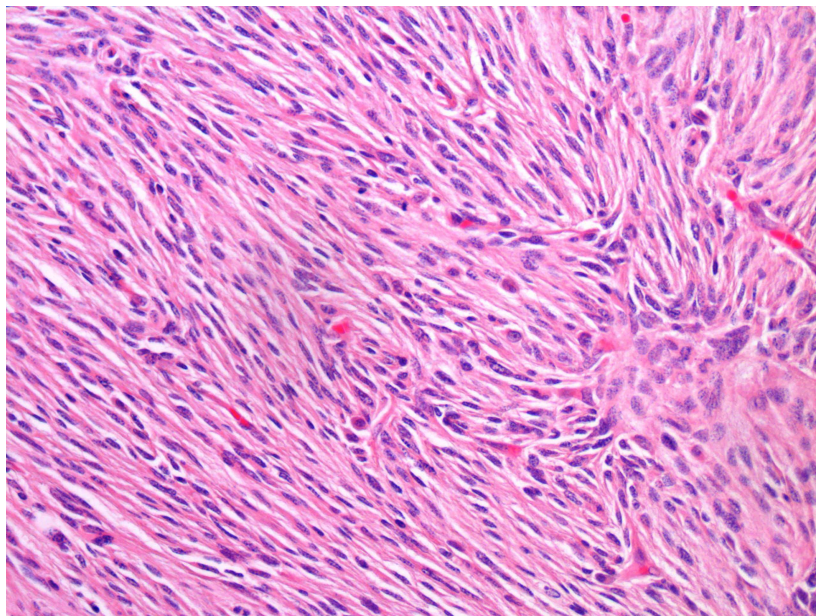


Figura 3. Liposarcoma dedifferenziato

1.2.2.3 Caratteristiche immunofenotipiche

Il principale ruolo dell'immunoistochimica è il riconoscimento della differenziazione e l'esclusione di altri tipi tumorali. L'espressione nucleare diffusa di MDM2 e CDK4 permette la distinzione del LPSDD a differenziazione omologa (LPSDD "omologo" dal liposarcoma pleomorfo che ha una prognosi peggiore (Marino-Enriquez et al., 2010; Sirvent et al., 2007).

1.2.2.4 Caratteristiche citogenetiche

Allo stesso modo del TLA/LPSBD, il LPSDD è caratterizzato dalla presenza di cromosomi ad anello o giganti dove il gene MDM2 (12q15) è costantemente amplificato è overespresso (Sirvent et al., 2007; Sirvent et al., 2000).

La presenza di queste alterazioni molecolari sia nel TLA/LPSBD che nel LPSDD indica che presumibilmente, queste aberrazioni possano costituire un evento precoce e/o critico nella genesi di questi liposarcomi.

Tuttavia, a differenza del TLA/LPSBD, il LPSDD è caratterizzato da coamplificazioni che coinvolgono principalmente le regioni 1p32 e 6q23 (Chibon et al., 2002) e che includono rispettivamente il gene JUN (Mariani et al., 2007) e la sua chinasi attivante ASK1 (Chibon et al., 2004) suggerendo che il percorso c-Jun possa essere coinvolto nella progressione da TLA/LPSBD a LPSDD (Mariani et al., 2007).

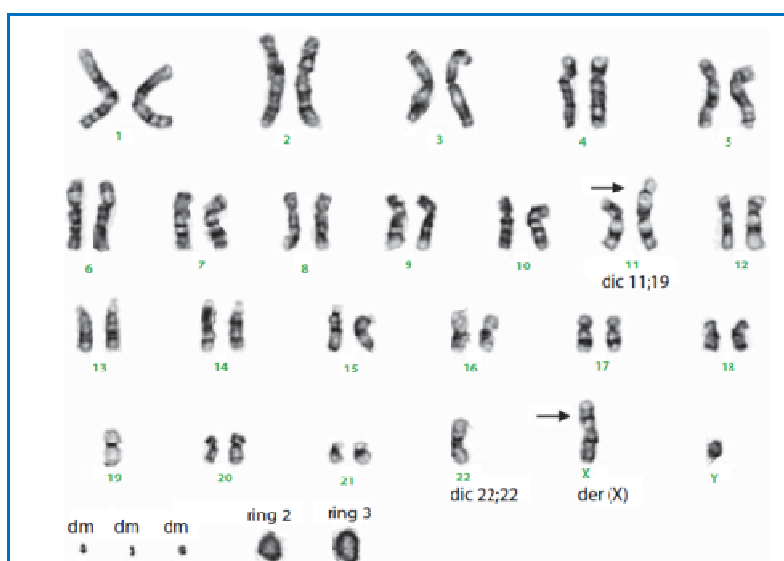


Figura 4. Cariotipo del liposarcoma dedifferenziato dove si osservano cromosomi ad anello e double minutes (dm) (da Hameed M., 2007)

1.2.2.5 Prognosi

Anche per il LPSDD la localizzazione anatomica costituisce il principale fattore prognostico e le lesioni retroperitoneali mostrano un corso clinico peggiore. In generale, le recidive locali si osservano in almeno il 40 % dei casi, tuttavia quasi tutti i pazienti affetti da LPSDD retroperitoneale mostrano recidive.

Le metastasi a distanza si osservano nel 15-20 % dei casi e la mortalità globale dopo 5 anni di follow-up è compresa tra il 28 ed il 30% (Weiss & Goldblum, 2008).

Nonostante la morfologia ad alto grado, il LPSDD mostra un comportamento clinico meno aggressivo rispetto a quello riscontrato in altri tipi di sarcomi pleomorfi ad alto grado. Tuttavia, le basi di questa differenza non sono note; l'assenza di aberrazioni cariotipiche complesse e la rarità di mutazioni del gene TP53 (che invece si osserva nei sarcomi pleomorfi ad alto grado) potrebbe spiegare, almeno in parte, questa discrepanza tra la morfologia ed l'esito clinico (Cordon-Cardo et al., 1994; Dei Tos et al., 1997).

Le resezioni multi-viscerali sembrano aumentare la sopravvivenza libera da recidive (Bonvalot et al., 2009).

1.3 Trattamento del tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato e del liposarcoma dedifferenziato

La terapia di questi tumori si basa essenzialmente sulla rimozione chirurgica completa del tumore.

Praticamente tutti i TLA/LPSBD delle estremità restano tali e possono essere controllati con il trattamento chirurgico mentre, per le localizzazioni retroperitoneali ed i tumori che si sviluppano in sedi profonde, come le pelvi e l'addome, il trattamento chirurgico è quasi sempre insufficiente ed il tumore tende a recidivare (Hoffman et al., 2011).

La radioterapia adiuvante viene selettivamente utilizzata nei pazienti affetti da LPSDD localizzato alle estremità e non è raccomandato nel trattamento dei TLA/LPSBD in quanto non sono radiosensibili (Conyers et al., 2011).

Ad oggi non esiste un regime chemioterapico adiuvante/neoadiuvante in grado di migliorare la sopravvivenza quando la resezione chirurgica completa non è possibile.

Questi tumori sono spesso resistenti ai chemioterapici standard e non vi sono dati relativi ad un miglioramento della sopravvivenza nei pazienti trattati con chemioterapia adiuvante.

Per i pazienti che si presentano con malattia avanzata, non resecabile o metastatica, regimi chemioterapici basati sull'impiego di adriamicina, docetaxolo e gemcitabina possono essere utilizzati come terapie palliative, ma raramente determinano un prolungamento della sopravvivenza.

Per i pazienti che presentano un numero limitato di metastasi (da 1 a 5), si può optare per la resezione chirurgica delle lesioni distali (Crago & Singer, 2011).

1.4 Eziologia del tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato e del liposarcoma de differenziato.

L'eziologia di questi tumori non è nota, inoltre gli eventi molecolari che determinano la trasformazione da uno stato differenziato ad uno stato non differenziato non sono ancora stati chiariti.

Tuttavia il fatto che la caratteristica amplificazione della regione 12q13-15 osservata nel liposarcoma ben differenziato sia mantenuta nel liposarcoma dedifferenziato suggerisce che il processo di dedifferenziazione possa rappresentare una forma di progressione tumorale clonale.

1.5 Amplificazione genica

Amplificazione genica è un processo cellulare caratterizzato da un aumento selettivo di una particolare regione genomica senza un aumento proporzionale dell'intero genoma. L'aumento selettivo accompagna la sovraespressione di un gene particolare all'interno della regione genomica che conferisce un vantaggio di crescita alla cellula. Il vantaggio di crescita derivato da amplificazione genica è da tempo riconosciuta come un problema importante per i pazienti oncologici (Schwab, 1999), (Hastings et al., 2009).

1.6 Il gene MDM2

Il gene MDM2 (mouse double minute 2), localizzato nella regione 12q14.3-12q15 codifica per una E3 ubiquitina ligasi ed agisce come principale regolatore negativo dell'oncosoppressore p53. L'oncogene MDM2 risulta amplificato in molti tumori umani tra cui gliomi, osteosarcomi, sarcomi dei tessuti molli, carcinomi gastrici e della mammella.

Il gene MDM2 è amplificato nel 100% dei casi di liposarcoma ben differenziato e dedifferenziato e quindi costituisce un ottimo marcatore molecolare per distinguere i liposarcomi ben differenziati dai lipomi ed il liposarcoma dedifferenziato dagli altri sarcomi ad alto grado.

La sovraespressione della proteina MDM2 derivante dall'amplificazione genica, promuove la sopravvivenza cellulare e la progressione nelle varie fasi del ciclo cellulare mediante l'inibizione dell'oncosoppressore p53.

Tale inibizione avviene mediante diversi meccanismi:

- 1) Legame diretto di MDM2 a p53 con conseguente inibizione della attività trascrizionale di p53.
- 2) Ubiquitinazione di p53 e successiva degradazione via proteosoma.

Per modulare l'attività di p53, MDM2 richiede la funzione del cosiddetto *RING domain* che si lega a p53.

Oltre a costituire un utile marcatore diagnostico, l'amplificazione di MDM2 può essere considerata come un predittore di sensibilità agli attuali antagonisti di MDM2 (Muller et al., 2007).

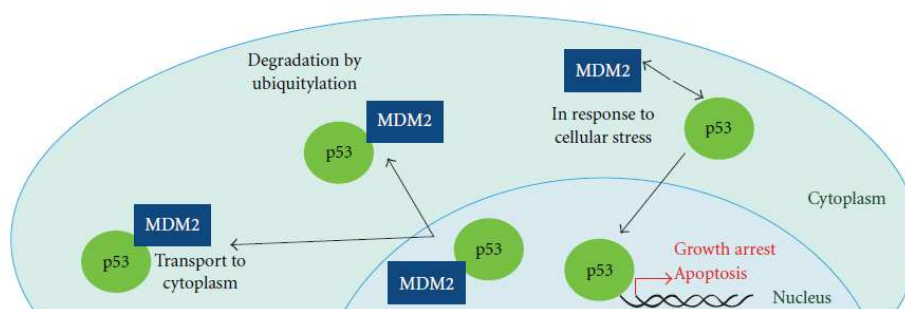


Figura 5. MDM2 si lega al dominio di attivazione trascrizionale di p53 bloccando la trascrizione. MDM2 agisce come ubiquitina-ligasi e facilita la degradazione di p53 via proteosoma (Conyers et al., 2011).

Una delle strategie che si è sviluppata in questi ultimi anni è quella di ripristinare la capacità di p53 e di modulare l'omeostasi cellulare attraverso la progettazione e sintesi di farmaci selettivi che possano inibire la formazione del complesso p53-MDM2 (Fang et al., 2000).

Recentemente sono state introdotte in fase clinica piccole molecole sintetiche chiamate Nutline (molecole derivate da composti di cis-imidazolina) che legandosi al sito per p53 presente nella proteina MDM2, impediscono la formazione del complesso MDM2-p53. Di conseguenza, p53 non essendo più inibito da MDM2 può esercitare la sua funzione di soppressore tumorale. L'uso di queste molecole sintetiche è risultato efficace nel riattivare la funzione di p53 in vari tipi di cancro, sia in studi in vitro che in vivo.

In linee cellulari di LPSDD il trattamento con le Nutline aumenta il livello di p53 e stimola l'induzione di apoptosi (Singer et al., 2007; Vassilev et al., 2004; Vu & Vassilev, 2011). In seguito a questi risultati, al momento sono in corso studi clinici con gli inibitori di MDM2 in pazienti con TLA/LPSBD e LPSDD (Ray-Coquard et al., 2012).

Terapia	Meccanismo d'Azione	Sottotipo istologico	Tipo di studio clinico	Bibliografia
Erilubina	Inibitore dei microtubuli	LPSDD	Fase II	Schoffski, 2011.
RG7112	Antagonista di mdm2	LPSBD/LPSDD	Fase I (neoadiuvante)	Ray-Coquard, 2011.
Flavopiridolo	inibitore delle CDK (chinasi dipendenti dalle cicline)	LPSBD/LPSDD	Fase I	Luke, 2012.
PD 0332991	Inibitore di CDK4/6	LPSBD/LPSDD	Fase I	Schwartz,2012.
Troglitazone, Rosiglitazone, Efatutazone	PPAr-gamma agonisti	LPSBD/LPSDD	Fase I, II	Pishvaian, 2012.
Pazopanib, Sorafenib, Sunitinib	Inibitori dei recettori tirosin-chinasici	LPSBD/LPSDD	Fase II	Mehren, 2011.

Tabella 3: Panoramica degli studi clinici per terapie innovative sistemiche nei liposarcomi ben differenziati e dedifferenziati (LPSBD=liposarcoma ben differenziato; LPSDD=liposarcoma dedifferenziato).

1.7 Trasduzione del segnale nei sarcomi

Un importante punto di convergenza di molti percorsi di trasduzione del segnale nei sarcomi è costituito da PI3K/AKT/mTOR.

La via di trasduzione del segnale della PI3K/AKT/mTOR svolge una funzione critica in molte funzioni cellulari come la trascrizione, la traduzione, la proliferazione, la crescita, l'apoptosi ed il metabolismo. L'alterazione di questo percorso è stata associata allo sviluppo di patologie come il cancro, il diabete mellito e l'autoimmunità (Testa & Bellacosa, 2001; Vivanco & Sawyers, 2002).

L'attivazione del percorso PI3K/AKT è iniziata da stimoli mitogeni che si legano a recettori della membrana cellulare. Questi recettori sono IGFR (Insulin-like Growth Factor Receptor), PDGFR (Platelet-Derived Growth Factor Receptor), l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), e la sua famiglia.

Il segnale proveniente dai recettori attivati viene trasferito direttamente alla via PI3K/AKT.

1.8 Ruolo di AKT nei tumori

Il ruolo di AKT è stato studiato in tumori epiteliali di varia origine (mammella, prostata, polmone, fegato, colon-retto, ovaio, endometrio) ed è stato osservato che, in seguito a fosforilazione, attiva numerosi percorsi (downstream) in grado di promuovere la tumorigenicità, il potenziale metastatico, la progressione tumorale e la chemioresistenza.

Questi studi hanno portato all'identificazione di vari inibitori specifici di AKT per i quali sono in corso trials clinici per neoplasie epiteliali.

Per quanto riguarda i tumori muscoloscheletrici è stato ipotizzato un potenziale coinvolgimento del percorso AKT/PI3K nello sviluppo e nella progressione di questi tumori (Zhu et al., 2008).

1.8.1 La serina/treonina chinasi

AKT (nota anche come protein chinasi B) è una serina/treonina chinasi di 57 kD multifunzionale che fu inizialmente identificata nel 1991 da tre gruppi indipendenti sulla base della omologia di sequenza con le protein chinasi A (PKA) e C (PKC) e come omologo umano dell'oncogene virale Akt (v-Akt). (Bellacosa et al., 1991; Coffey & Woodgett, 1991).

Attualmente, nell'uomo, si conoscono tre isoforme strettamente correlate tra loro Akt1/PKB α , Akt2/PKB β e Akt3/PKB γ (Brazil et al., 2004). Esse mappano su regioni cromosomiche differenti, rispettivamente 14q32, 19q13, 1q44 (Coffey & Woodgett, 1991), (Song et al., 2005).

AKT/PKB appartiene alla superfamiglia delle protein chinasi A, G e C (AGC) e condivide con esse una elevata omologia di sequenza (circa l'80%) all'interno del sito catalitico.

1.8.2 Distribuzione tissutale di AKT

AKT1 presenta un'ampia distribuzione tissutale; essa è espressa principalmente nel cervello, nel cuore e nei polmoni ed è coinvolta nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare, mentre AKT2 è espressa a livelli elevati nel tessuto muscolare e negli adipociti dove contribuisce alla omeostasi del glucosio mediata dall'insulina. La distribuzione di AKT3 è più specifica ed è ristretta principalmente ai testicoli, ai reni ed al cervello (Chen et al., 2001), (Garofalo et al., 2003), (Hers et al., 2011).

1.8.3 Struttura di AKT

Strutturalmente, ciascuna delle tre isoforme di Akt è costituita da tre domini funzionali conservati: un dominio PH (pleckstrin homology) N-terminale, un dominio catalitico localizzato nella regione centrale della molecola ed un dominio di regolazione (RD) C-terminale.

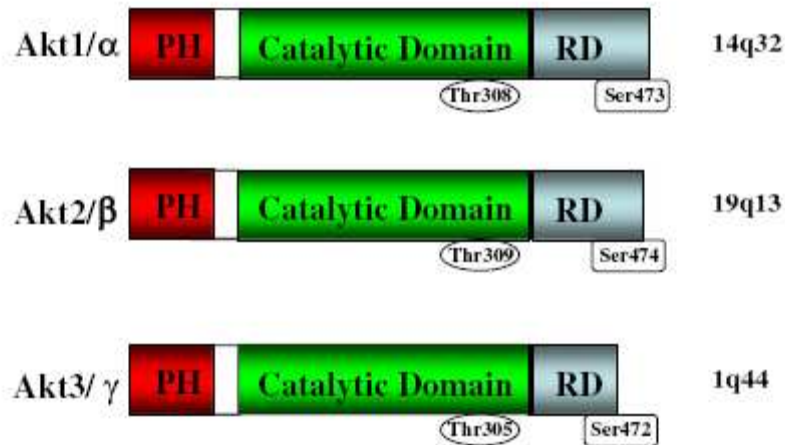


Figura 6. Isoforme di AKT; da (Martelli et al., 2012)

1.8.4 Attivazione di AKT

In assenza di stimoli, AKT è mantenuta in uno stato inattivo per mezzo di una interazione molecolare tra il dominio PH ed il dominio catalitico. L'attivazione è mediata da PI3K (phosphatidilinositol 3-kinase), che a sua volta viene attivata da una moltitudine di recettori di membrana ed altre molecole correlate. L'attivazione di AKT1 avviene in più fasi:

In risposta a fattori di crescita o insulina si verifica il reclutamento della PI3K a livello di membrana plasmatica dove vengono generati i secondi messaggeri fosfatidilinositolo-3,4,- bisfosfato (PIP2) e fosfatidilinositolo-3,4,5- tris fosfato (PIP3) (Hers et al., 2011).

L'interazione del dominio PH di AKT con i fosfoinositidi PIP2 e PIP3 determina la migrazione di AKT a livello della membrana plasmatica. Tale interazione non attiva AKT direttamente, ma provoca una modificazione conformazionale nella proteina che determina l'esposizione del residuo Thr308 localizzata nel loop di attivazione del dominio catalitico consentendo così la fosforilazione da parte della chinasi fosfoinositide dipendente (3-Phosphoinositide-dependent kinase 1-PDK1) (Alessi et al., 1996). Questa fosforilazione è necessaria per l'attivazione della molecola tuttavia, l'attivazione completa richiede una seconda fosforilazione sul residuo (Ser 473) localizzato nella porzione C-terminale della proteina (Persad et al., 2000). La seconda attivazione è mediata principalmente dal complesso proteico mTORC2 sebbene siano state identificate altre chinasi come ILK (*integrine*

linked kinasi), PDK1, protein chinasi DNA-dipendenti (DNA-PK), ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) (Feng et al., 2004a; Martelli et al., 2006).

In seguito alla sua attivazione, AKT si dissocia dalla membrana per poter migrare nel citosol e nel nucleo dove fosforilare i suoi bersagli ed attivare numerose vie di segnalazione.

I substrati di Akt spesso contengono il *consensus motif* (R-X-R-X-X-S/T) dove R indica un residuo di Arginina, X indica un aminoacido qualsiasi e pS/pT indicano rispettivamente fosfoserina e fosfotreonina (Manning & Cantley, 2007). AKT può regolare sia positivamente che negativamente le funzioni dei substrati che contengono questo motivo, inoltre può alterare la localizzazione cellulare o modificare la stabilità del substrato stesso.

Il principale effettore a valle di AKT è il complesso mTORC1: esso è capace di integrare segnali provenienti dall'esterno e dall'interno della cellula (ad esempio segnali legati allo stato energetico, alla presenza di nutrienti e di fattori di crescita).

Questo percorso di segnalazione determina la fosforilazione di differenti bersagli molecolari tra cui MDM2.

Attualmente è in corso lo sviluppo clinico di molti composti che hanno come bersaglio l'asse di sopravvivenza di PI3K/AKT/mTOR; in particolare sono state sviluppate molecole che vanno ad inibire PI3K, AKT ed inibitori di mTOR (Engelman, 2009).

tale fosforilazione, MDM2 migra nel nucleo e destabilizza p53 (Feng et al., 2004b)

1.8.6 Ruolo di AKT nella proliferazione cellulare

Il ciclo cellulare è un processo strettamente controllato, costituito da una serie di eventi coordinati e dipendenti tra loro, dai quali dipende la corretta proliferazione delle cellule eucariotiche. Studi recenti hanno dimostrato che per il percorso PI3K/AKT è coinvolto nella regolazione del ciclo cellulare.

AKT, dopo essere stata attivata, interviene nella regolazione della proliferazione cellulare, modulando la funzione di numerosi substrati coinvolti nel controllo del ciclo cellulare. Tra questi vi sono gli inibitori delle CDK (cyclin-dependent kinase) p21^{Cip1} e p27^{Kip2}.

AKT fosforila p21^{Cip1} e p27^{Kip2} ed inibisce la loro attività antiproliferativa trattenendole nel citoplasma ed impedendo così che possano inibire l'attivazione dei complessi Ciclina/Cdk, in particolar modo il complesso CyclinD1/Cdk4 (Zhou et al., 2001).

Sempre in relazione al ciclo cellulare, un'altro bersaglio di AKT è la chinasi GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β), un enzima originariamente conosciuto per il suo ruolo nella regolazione della sintesi del glicogeno in risposta all'insulina nei tessuti (Cross et al., 1995).

Successivamente è stato osservato che GSK3 β è coinvolta anche in altri importanti processi cellulari come il differenziamento, la proliferazione e trasformazione neoplastica.

GSK3 β , infatti, fosforila direttamente le ciclina D1 ed E ed i fattori di trascrizione c-jun e c-myc, avviandone la degradazione da parte del sistema ubiquitina-proteosoma (Gregory et al., 2003). L'inibizione di GSK3 β da parte di AKT facilita la progressione delle cellule nella fase G1/S del ciclo cellulare.

1.8.7 Regolazione negativa del percorso PI3K/AKT/mTOR

Lo stato di attivazione di AKT dipende dal bilancio tra segnali attivatori e segnali inibitori.

La regolazione negativa di AKT è mediata dall'oncosoppressore PTEN (*Phosphatase and TENsin homologue deleted on chromosome 10*) e da SHIP 1/2 (*Src homology 2 domain-containing inositol 5-phosphatase1/2*) (Kisseleva et al., 2002; Trotman et al., 2006).

PTEN è una fosfatasi dotata di una duplice funzione in quanto è in grado di rimuovere gruppi fosfato in posizione 3 sia da molecole proteiche che da molecole lipidiche. Il principale substrato di PTEN è PIP3, il quale viene defosforilato in posizione 3' dell'anello inositico e convertito in PIP2.

SHIP1 e SHIP2 sono invece delle fosfatasi che defosforilano PIP3 rimuovendo il gruppo fosforico in posizione 5.

Dal momento che PTEN defosforila i fosfoinositidi prodotti da PI3K e che determinano l'attivazione di AKT, le mutazioni inattivanti di PTEN o la perdita della espressione di PTEN determina un aumento dei livelli cellulari dei prodotti di PI3K; questo ha come conseguenza un aumento della proliferazione cellulare e la resistenza all'apoptosi.

La perdita di attività di PTEN porta quindi alla attivazione permanente del percorso PI3K/AKT.

L'attivazione di AKT può anche essere interrotta mediante defosforilazione su Thr308 e Ser 473 rispettivamente dall'azione delle fosfatasi PP2 (*protein phosphatase 2*) e PHLPP (*PH domain leucine-rich repeat phosphatase*) (Brognard et al., 2007).

2. SCOPO DELLA RICERCA

La ricerca qui presentata è stata effettuata al fine di caratterizzare le neoplasie adipocitiche dal punto di vista biomolecolare. Tale caratterizzazione è importante ai fini diagnostici e terapeutici di queste neoplasie.

Fra le neoplasie mesenchimali, quelle adipocitiche costituiscono il più ampio gruppo e sono classificate sulla base di caratteristiche morfologiche e aberrazioni citogenetiche tuttavia, per questi tumori, si pongono spesso problemi di diagnosi differenziale.

Il gene MDM2 (mouse double minute 2), localizzato nella regione 12q14.3-15, risulta amplificato in quasi il 100% dei casi di liposarcoma ben differenziato e de differenziato (Weaver et al., 2008)

La prima parte di questa ricerca ha avuto come scopo quello di analizzare il ruolo dell'analisi FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) per la valutazione dello status del gene MDM2 in una serie di neoplasie adipocitiche benigne e maligne. Mediante tecniche d'immunoistochimica è stata valutata l'espressione della proteina MDM2. Queste analisi sono state effettuate su sezioni di tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina ("*Formalin Fixed Paraffin Embedded Tissue*", FFPET).

Il rilevamento dell'amplificazione di MDM2 e della sua espressione può costituire un ausilio nella diagnosi differenziale di queste neoplasie.

Una seconda parte di questa ricerca ha avuto come obiettivo quello di studiare l'eventuale coinvolgimento del gene AKT nella malignità del tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato e dedifferenziato.

Secondo dati recenti, un importante punto di convergenza di molti percorsi di trasduzione del segnale nei sarcomi è costituito dal percorso PI3K/AKT. Anche se il ruolo della molecola AKT non è ancora stato ampiamente esplorato nei sarcomi delle parti molli, vi sono studi che evidenziano come tale molecola possa essere coinvolta nello sviluppo e nella progressione di tali tumori (Zhu et al., 2008).

Pertanto, per quanto riguarda le neoplasie adipocitiche, ho voluto valutare:

a) Il pattern di espressione di AKT nelle neoplasie adipocitiche, b) l'eventuale correlazione dell'espressione di AKT con il sottotipo tumorale, c) l'espressione della forma fosforilata e quindi attiva della proteina AKT (pAKT).

Sui campioni di RNA estratti da neoplasie adipocitiche e poi retrotrascritti a cDNA, è stata ricercata l'espressione del gene AKT mediante la metodica *Real-Time* PCR, mentre per lo studio della forma fosforilata della proteina sono state utilizzate tecniche di immunohistochimica su sezioni di tessuto FFPE.

Questa ricerca è stata possibile grazie all'ampia casistica di tessuto congelato ed incluso in paraffina di cui dispone il Laboratorio di Anatomia Patologica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli; per i pazienti di questa casistica è presente anche la completa documentazione clinica e istologica.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Casi clinici in studio

Lo studio è stato condotto su una casistica di pazienti afferenti all'Istituto Ortopedico Rizzoli.

Le sezioni istologiche sono state allestite presso l'SSD di Anatomia ed Istologia Patologica mentre i tessuti freschi sono stati raccolti e stoccati nel laboratorio di biologia molecolare.

I campioni necessari per gli studi di espressione sono stati congelati a -80°C subito dopo il prelievo e mantenuti in azoto liquido fino al momento dell'analisi.

La diagnosi è stata effettuata da anatomopatologi esperti nella diagnosi dei sarcomi in accordo con i criteri istopatologici del WHO 2002 (Dei Tos AP; Pedeutour F. Atypical lipomatous tumour/Well differentiated liposarcoma, In Fletcher CDM, WHO Pathology and genetics of soft tissue and bone, 2002).

L'idoneità dei campioni di tessuto è stata valutata tramite l'osservazione del preparato colorato con ematossilina-eosina e sono stati scelti i casi con cellularità adeguata per le analisi molecolari.

Le caratteristiche clinico-patologiche dei pazienti sono riassunte nelle Tabelle 1-4.

Neoplasie adipocitiche benigne				
Caso	Età	Genere	Sede	Tipo
1	64	M	Coscia	PRI
2	73	F	Coscia	REC
3	55	F	Spalla	PRI
4	49	M	Scapola	PRI
5	34	M	Braccio	PRI
6	61	F	Coscia	PRI
7	55	M	Coscia	PRI
8	66	F	Inguine	PRI
9	38	F	Braccio	PRI
10	64	F	Coscia	PRI-AB

Tabella 1. Caratteristiche clinico-patologiche delle neoplasie adipocitiche benigne; (M: maschio; F: femmina; PRI: pezzo operatorio del tumore primitivo; REC: recidiva)

Tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato				
Caso	Età	Genere	Sede	Tipo
1	58	M	Coscia	PRI
2	63	M	Bacino	PRI
3	51	F	Coscia	REC
4	43	F	Coscia	PRI-B
5	70	M	Coscia	N.D
6	72	F	Coscia	PRI
7	61	M	Coscia	PRI
8	61	M	Coscia	PRI
9	49	M	Coscia	PRI
10	45	F	Braccio	PRI
11	45	M	Rene	PRI
12	43	F	Coscia	PRI
13	50	F	Coscia	PRI
14	55	M	Braccio	PRI
15	69	F	Coscia	PRI-AB
16	57	M	Coscia	PRI-AB
17	58	M	Braccio	N.D
18	63	M	Testicolo	N.D
19	73	F	Cavo popliteo	PRI-AB
20	59	M	Coscia	PRI
21	79	M	Coscia	PRI
22	71	F	Coscia	REC
23	50	M	Coscia	REC
24	56	F	Clavicola	PRI
25	78	M	Coscia	PRI-B
26	60	F	Coscia	PRI-B
27	44	F	Addome	REC
28	70	M	Retroperitoneo	N.D
29	51	M	Coscia	REC
30	40	F	Coscia	PRI-AB
31	62	F	Coscia	N.D
32	35	M	Testicolo	N.D
33	84	M	Coscia	PRI-AB
34	34	M	Coscia	PRI
35	68	M	Coscia	PRI
36	51	F	Coscia (intam)	N.D

37	78	M	Coscia	PRI-AB
38	71	M	Gamba	REC
39	70	M	Gamba	PRI
40	61	F	Coscia	PRI-AB
41	61	M	Coscia	PRI-AB
42	52	M	Coscia	PRI-AB
43	74	F	Coscia	PRI-AB
44	77	M	Coscia	PRI-AB
45	49	M	Coscia	PRI
46	48	M	Scapola	N.D
47	55	M	Torace	PRI
48	43	M	Addome	PRI
49	50	M	Coscia	PRI-AB
50	76	M	Coscia	PRI
51	46	F	Coscia	N.D
52	72	M	Avambraccio	REC
53	47	M	Coscia	PRI
54	63	F	Rene	N.D
55	72	M	Avambraccio	REC
56	69	M	Coscia	PRI
57	37	F	Coscia	PRI
58	58	F	Coscia	PRI
59	57	F	Coscia	PRI
60	78	F	Coscia	PRI-AB
61	65	F	Coscia	PRI-AB
62	68	M	Coscia	PRI
63	33	M	Coscia	PRI-AB
64	65	F	Gluteo	PRI-AB

Tabella 2. Caratteristiche clinico-patologiche dei campioni di Tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato (M: maschio; F: femmina; PRI: pezzo operatorio del tumore primitivo; PRI-B: biopsia chirurgica; PRI-AB: agobiopsia; REC: recidiva; ND: non disponibile).

Liposarcoma dedifferenziato				
Caso	Età	Genere	Sede	Tipo
1	61	F	Coscia	
2	46	F	Retroperitoneo	
3	56	F	Clavicola	REC
4	59	M	Torace	PRI
5	46	F	Coscia	PRI
6	61	M	Cavo ascellare	REC
7	81	F	Coscia	PRI
8	45	M	Coscia	PRI
9	67	F	Braccio	ND
10	42	F	Coscia	ND
11	72	F	Coscia	PRI
12	53	F	Retroperitoneo	ND
13	65	F	Coscia	PRI
14	80	M	Addome	ND
15	34	M	Torace	PRI
16	56	M	Torace	PRI

Tabella 3. Caratteristiche clinico-patologiche dei campioni di liposarcoma dedifferenziato (M: maschio; F: femmina; PRI: pezzo operatorio del tumore primitivo; PRI-B: biopsia chirurgica; PRI-AB: agobiopsia; REC: recidiva; ND: non disponibile).

Sarcomi a cellule fusate				
Caso	Età	Genere	Sede	Tipo
1	70	M	Avambraccio	N.D
2	92	M	Braccio	N.D
3	41	F	Coscia	REC
4	59	F	Mammella	N.D
5	78	M	Coscia	PRI
6	62	F	Coscia	PRI-AB
7	52	M	Bacino	PRI-AB
8	82	F	Gomito	PRI-B
9	62	F	Gluteo	PRI-AB
10	32	M	Coscia	PRI
11	64	M	Gamba	N.D

Tabella 4. Caratteristiche clinico-patologiche dei campioni di sarcoma a cellule fusate (M: maschio; F: femmina; PRI: pezzo operatorio del tumore primitivo; PRI-B: biopsia chirurgica; PRI-AB: agobiopsia; REC: recidiva; ND: non disponibile).

3.2 Analisi FISH

L'ibridazione *in situ* fluorescente (FISH) è stata effettuata per la rilevazione dell'amplificazione del gene MDM2 sulle sezioni istologiche dei casi selezionati.

Sono stati selezionati 64 casi di liposarcoma ben differenziato, 16 casi di liposarcoma dedifferenziato e 9 casi di neoplasie lipomatose benigne, 1 caso di liposarcoma pleomorfo, 11 casi di sarcomi a cellule fusate, 1 caso di sarcoma indifferenziato pleomorfo ad alto grado.

La presenza di determinate sequenze di acido nucleico nelle cellule o nei tessuti può essere rilevata attraverso ibridazione *in situ* con l'utilizzo di sonde a DNA marcate con specifici fluorocromi. L'ibridazione induce la formazione di una struttura a doppio filamento (ibrido duplex) tra le sequenze presenti nel campione in analisi e la sonda.

La metodica è stata condotta su nuclei interfascici di sezioni di tessuto fissato in formalina ed incluso in paraffina (FFPET) dello spessore di 4 µm che sono state montate su vetrini carichi positivamente (Dako, Glostrup, Danimarca). Per ogni campione è stata preparata una sezione colorata con ematossilina-eosina da utilizzare per la scelta della sezione di tessuto da analizzare. La scelta dell'area tumorale è stata effettuata da un anatomo-patologo.

Questa analisi è stata effettuata utilizzando il kit ZytoLight SPEC MDM2/CEN12 Dual Color Probe kit (ZytoVision GmbH, Bremerhaven, Germany). Si tratta di un kit, approvato per l'uso diagnostico *in vitro*, per la rilevazione del regione cromosomica del gene umano MDM2 e degli alfa-satelliti del cromosoma 12 mediante ibridazione *in situ* fluorescente (FISH).

La sonda SPEC MDM2/CEN 12 Dual Color Probe è progettata per rilevare la regione cromosomica del gene umano MDM2 situato sul braccio lungo del cromosoma 12 (12q14.3-q15) e le sequenze alfa-satellite del cromosoma 12 e pertanto permette di rilevare sia la l'aumento del numero di copie (*copy number gain*) del cromosoma 12 che l'amplificazione del gene MDM2.

Tale sonda contiene polinucleotidi marcati con il fluorocromo verde (ZyGreen) che riconoscono le sequenze adiacenti al gene MDM2 e polinucleotidi marcati con il fluorocromo arancione (ZyOrange) che riconoscono le sequenze alfa-satellite centromeriche specifiche del cromosoma 12.

Fluorocromo	λ Eccitazione	λ Emissione
ZyGreen (analogo FITC)	503 nm	528
ZyOrange (analogo rodamina)	547 nm	572 nm,

Tabella 4. Fluorocromi

I polinucleotidi contenuti nella sonda ZytoLight SPEC MDM2/CEN 12 Dual Color Probe fungono anche da controllo interno per certificare che l'ibridazione è riuscita e dimostrano anche l'integrità del DNA.

Il centromero del cromosoma 12 viene rilevato come un intenso segnale rosso, mentre le regioni alfa satellite 12 situati in corrispondenza dei cromosomi ad anello e dei cromosomi giganti vengono rilevati come segnali deboli rispetto a quelli del centromero (Sirvent et al., 2000).

Tutti i passaggi sono stati eseguiti seguendo le istruzioni del kit. Brevemente, le sezioni sono state deparaffinate in xilene e reidratate mediante successivi passaggi in etanolo 100%, 95% e 70%, ed infine in acqua distillata.

Successivamente è prevista un'incubazione in una soluzione di pretrattamento a base di acido citrico mantenuta a 98°C per 15 minuti seguita da un risciacquo in acqua distillata.

La digestione con pepsina è stata effettuata mantenendo i vetrini in camera umida a 37 °C per 5-10 minuti in base al tipo di tessuto. I vetrini, infine, sono stati disidratati in etanolo (96%), essiccati all'aria e la sonda è stata applicata sull'area bersaglio dei campioni.

Per la denaturazione e l'ibridizzazione è stato utilizzato l'ibridizzatore "Dako Hybridizer" (Dako, Glostrup, Danimarca) impostato con un programma specifico che prevede una fase di denaturazione a 75 °C per 10 minuti ed una fase di incubazione overnight a 37°C.

Al termine della reazione di ibridazione sono stati effettuati dei lavaggi di stringenza per assicurare la rimozione delle sonde FISH non legate o che si sono legate in modo aspecifico.

Infine è stato eseguito il montaggio dei vetrini con il mezzo di montaggio contenente il controcolorante fluorescente blu DAPI (4,6 diamino-2-fenilindolo) (Vectashield antifade solution with DAPI, Vector Laboratories, Burlingame CA).

I risultati sono stati valutati con un microscopio a fluorescenza Olympus BX41 (Olympus, Hamburg Germany) dotato di filtri specifici per i fluorocromi utilizzati, SpectruGreen™, SpectrumOrange™ e DAPI (Abbott). L'acquisizione dei risultati è stata effettuata con il sistema di analisi Cytovision (Leica).

I segnali di ibridazione della regione cromosomiale del gene MDM2 appaiono verdi mentre i segnali di ibridazione degli alfa-satelliti del centromero 12 appaiono rossi. In interfase, nelle cellule normali o nelle cellule senza aberrazioni del cromosoma 12 si distingueranno due segnali verdi e due segnali rossi distinti tra loro.

Al contrario, nelle cellule che presentano amplificazione del gene MDM2 si osserva un aumento del numero di segnali di colore verde o la formazione di *cluster* di segnali. Al fine di valutare la specificità del segnale, ogni ibridazione deve essere effettuata assieme ad un controllo positivo, mentre la strutture normali (vasi sanguigni, epidermide), evidenziabili dal confronto con il vetrino colorato con ematossilina - eosina, serviranno come controllo negativo interno.



Figura 1: Rappresentazione schematica della regione di ibridazione della sonda Spec MDM2/Cen12.

3.2.1. Tessuti idonei alla valutazione

Prima di procedere all'analisi del preparato è utile effettuare un controllo della qualità complessiva dell'ibridazione ottenuta. Devono essere evitati i nuclei con intensità di segnale debole e con fondo aspecifico o elevato. Nei campioni con cellularità elevata si deve prestare attenzione nella valutazione di cellule sovrapposte onde evitare falsi risultati.

3.2.2 Conteggio dei segnali (*scoring*)

Basandosi sull'area tumorale selezionata sul vetrino colorato con ematossilina-eosina, si inizia l'analisi a partire dal quadrante in alto a sinistra del vetrino. Procedendo da sinistra verso destra si contano i segnali all'interno di ciascun nucleo secondo i seguenti principi:

- Per ogni caso analizzato contare almeno 100 nuclei.
- Occorre variare la profondità di fuoco per rilevare tutti i segnali presenti nel nucleo.
- Nella valutazione dei risultati dell'analisi FISH solo i nuclei che presentano almeno due segnali per il centromero devono essere inclusi nella valutazione.
- I nuclei che mostrano segnali di un unico colore non devono essere inclusi nel conteggio.
- Anche i nuclei che mostrano una eccessiva digestione non devono essere inclusi nel conteggio.
- Per ogni nucleo calcolare il rapporto MDM2/CEN12 dividendo il numero totale di segnali MDM2 per il numero totale di segnali CEN12.
- Due segnali della stessa dimensione separati da una distanza \leq il diametro di un segnale devono essere considerati come un unico segnale.
- Nei nuclei con elevati livelli di amplificazione del gene MDM2, i segnali MDM2 possono essere molto vicini e formare piccoli raggruppamenti detti *cluster* di amplificazione. In questo caso il numero di segnali MDM2 non può essere contato ma deve essere stimato.
- Se il rapporto risulta \geq di 2 in almeno il 10 % dei nuclei osservati, il tumore viene considerato positivo per l'amplificazione del gene MDM2.
- La presenza di un aumento del numero di segnali sia per MDM2 che per CEN12 è stata valutata come *copy number gain* sia per MDM2 che per CEN 12.
- In caso dubbio (rapporto MDM2/CEN12 compreso tra 1.8-2.2) il vetrino deve essere sottoposto ad una nuova lettura da parte di un secondo operatore (Sirvent et al., 2007; Weaver et al., 2008).

<i>Rapporto MDM2/CEN12</i>	<i>Stato del gene MDM2</i>	<i>Risultato</i>
< 2	Non - Amplificato	Negativo
≥ 2	Amplificato	Positivo

Tabella 5. Principi dello scoring (CEN 12 = centromero 12).

3.3 Estrazione di RNA

L'RNA cellulare totale è stato estratto da campioni di tessuto congelato utilizzando il TRIzol Reagent (Invitrogen), una soluzione monofasica costituita da fenolo e guanidina tiocianato, ed il kit di estrazione RNeasy kit (Qiagen). Il tessuto congelato è stato sminuzzato mediante bisturi sterile ed il tessuto così ottenuto è stato trasferito in 1 ml di TRIzol Reagent ed omogeneizzato con un omogeneizzatore (Omni TH International).

Ad ogni campione sono stati aggiunti 200 µl di cloroformio e dopo agitazione meccanica, l'emulsione è stata incubata brevemente a temperatura ambiente. I campioni sono stati poi centrifugati a 11000 rpm per 10 min a 4°C e la fase inorganica contenente l'RNA è stata recuperata.

La precipitazione dell'RNA è stata ottenuta aggiungendo 600 µl di etanolo 70 %, trasferendo poi i campioni in una mini colonna RNAeasy posta in un tubo da 2 ml e centrifugando a 11000 rpm per 15 sec a 4°C. Grazie a questo passaggio l'RNA rimane adeso al filtro della colonna, mentre l'eluato viene scartato.

Un primo lavaggio della colonna è stato effettuato con 700 µl di Buffer RW1 con centrifugazione a 11000 rpm per 15 sec a 4°C. In seguito sono stati effettuati altri due lavaggi con 500 µl di Buffer RPE, seguiti da centrifugazione a 12000 rpm per 2 min a 4°C. Quest'ultima centrifugazione è necessaria per asciugare la membrana delle colonne e per eliminare tutti i residui di etanolo. A questo punto alle colonne sono stati aggiunti 30µl di Rnase-free-H₂O direttamente sulle membrane e sono state centrifugate a 12000 rpm per un minuto a 4°C. In tale maniera l'RNA di ciascun campione, grazie all'H₂O di eluizione si stacca dalla membrana e finisce sul fondo del tubo, in soluzione.

La concentrazione dell'RNA è stata determinata misurando l'assorbanza (A) allo spettrofotometro e l'idoneità dei campioni è stata valutata dal rapporto tra l'assorbanza a 260 nm e quella a 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀).

Per la retrotrascrizione sono stati scelti campioni caratterizzati da un rapporto A260/A280 compreso tra 1.6 e 1.8.

3.4 Retrotrascrizione

Il cDNA è stato sintetizzato a partire da 2 µg di RNA. La retrotrascrizione dei campioni è stata condotta utilizzando il reagente SuperScript VILO MasterMix (Life Technologies), un reagente pronto per l'uso che contiene:

- MgCl₂
- dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- Recombinant Rnase inhibitor protein
- Reverse transcriptase
- Random primers
- Oligo(dT) primers and stabilizers

La reazione avviene in un termociclatore Eppendorf con le seguenti condizioni:

- 5 minuti a 25°C
- 30 minuti a 42°C
- 5 minuti a 85°C

Alla fine della reazione il termociclatore si mantiene ad una temperatura di 4°C per ∞.

Il cDNA ottenuto è stato trasferito in un tubo da 1.5 ml e diluito con di *RNase free water* (Quiagen) e poi conservato a -20°C.

3.5 Real -Time PCR

Misura l'amplificazione in tempo reale durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale "end point".

La PCR Real-Time è stata eseguita utilizzando lo strumento Applied Biosystems Step One™ Real-Time PCR. Lo strumento combina un

termociclatore che ospita una piastra da 48 pozzetti, un laser per l'eccitazione della fluorescenza ed un programma che acquisisce automaticamente il segnale e calcola la specifica fluorescenza rilasciata durante la fase esponenziale.

Nella tabella 6 sono riportate le sequenze dei primers specifiche per i geni analizzati.

Target	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (3'-5')	Amplicone	Bibliog.
Mitochondrial ribosomal protein L19	GGAAGAGGACTTGGAGCTACT	TCCTGGACCCGAGGATTAT	95 bp	Lewis Mod Pathol 2007
AKT 1 (ex 2)	AGTGTGCGTGGCTCTCACCA	AGCCTCACGTTGGTCCACAT	140bp	Setsu N Cancer 2012.

Tabella 6. Primers utilizzati per le reazioni di Real-Time PCR

La concentrazione dei primers è stata scelta in modo tale da minimizzare le amplificazioni aspecifiche.

L'espressione del gene AKT è stata normalizzata rispetto alla espressione di un gene di riferimento detto *reference*. Come *reference* è stato scelto il gene L19 la cui espressione si manteneva costante nei campioni di tessuto; l'utilizzo del gene di riferimento garantisce di compensare le possibili variazioni di efficienza della reazione di retrotrascrizione.

L'espressione del gene AKT in ogni campione di tessuto tumorale è stata confrontata con la sua espressione nel tessuto sano corrispondente che viene detto calibratore.

Per ogni campione, la reazione di amplificazione è stata condotta in triplicato, in un volume totale di 12 µl. La mix di reazione conteneva:

- 20 ng di cDNA diluito in *RNase free water* (Quiagen),
- Fast SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems), (*AmpliTaQ Gold* DNA polimerasi, *AmpErase* UNG, deossinucleotidi trifosfato, fluorocromo di riferimento passivo, tampone di PCR ottimizzato)
- Forward e Reverse primers 0,3 µM finale.

La reazione è avvenuta con le seguenti condizioni sperimentali:

- 20 sec a 95°C, attivazione dell'enzima polimerasi
- 3 sec a 95°C, denaturazione
- 30 sec a 60°C appaiamento ed estensione

sono stati impostati 40 cicli di reazione.

Per verificare la specificità del prodotto di reazione è stata sempre effettuata una curva di *melting*.

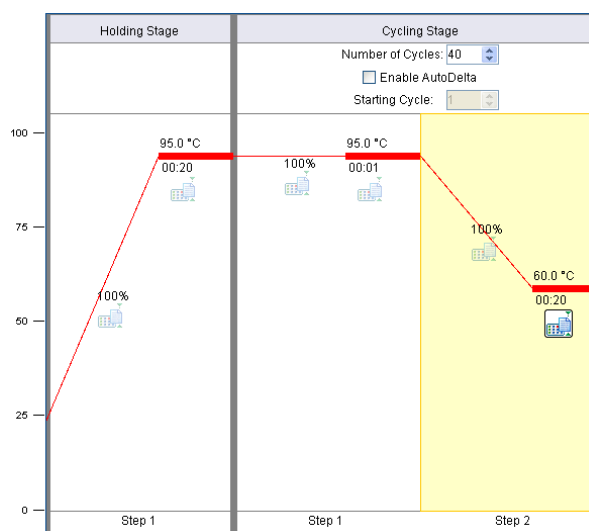


Figura 2. Run Method utilizzato

3.5.1 Metodo del Ct ($\Delta\Delta Ct$) comparativo

I dati sono stati collezionati ed analizzati utilizzando il software StepOne™ il quale calcola il livello di espressione relativo del gene in ogni campione utilizzando il modello matematico del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ che si basa sul valore del ciclo soglia (Ct) a cui viene rilevata la fluorescenza.

Brevemente il valore del ΔCt per ciascun campione si ottiene sottraendo al valore del Ct del gene target il valore del Ct ottenuto per il gene di riferimento (*reference*) L19; il valore del $\Delta\Delta Ct$ è la differenza tra il ΔCt del campione e il ΔCt del calibratore.

$$\begin{aligned}\Delta Ct_{\text{campione}} &= Ct_{(\text{gene})} - Ct_{(\text{reference})} \\ \Delta Ct_{\text{calibratore}} &= Ct_{(\text{gene})} - Ct_{(\text{reference})} \\ \Delta\Delta Ct &= \Delta Ct_{(\text{campione})} - \Delta Ct_{(\text{calibratore})}\end{aligned}$$

Ogni gene è stato considerato più espresso nei casi in cui il valore di emissione luminosa calcolato con il metodo del $2^{-\Delta\Delta CT}$ risulta superiore al valore $1+SD$ e meno espresso in tutti quei casi in cui il valore si mostra inferiore al valore $1-SD$. Il livello di espressione normale uguale a 1, corrisponde al valore di emissione luminosa per ogni reazione di amplificazione della sequenza bersaglio e di riferimento nei campioni di tessuto sano.

3.6 Immunoistochimica

Le indagini immunoistochimiche sono state condotte su tessuti fissati in formalina ed inclusi in paraffina per valutare l'espressione degli antigeni pAKT ed MDM2.

L'immunoistochimica è un metodo altamente specifico per la rilevazione di determinati antigeni presenti in tessuti normali o patologici. Su una sezione di tessuto si pone l'anticorpo specifico per l'antigene che stiamo cercando. Avremo, in questo modo, una reazione immunitaria antigene-anticorpo che sarà successivamente rivelata da un anticorpo secondario coniugato ad un enzima catalizzatore (ad es. perossidasi) che reagisce con un substrato (cromogeno, ad es. DAB, FAST RED-TR) formando un prodotto colorato visibile al microscopio ottico.

Il metodo utilizzato per localizzare l'antigene è quello indiretto; in questo caso è stato utilizzato il kit UltraView Universal DAB Detection Kit di Ventana Medical System (Ventana Roche), che è un sistema indiretto per il rilevamento di antigeni specifici mediante l'uso di anticorpi primari specifici di topo e di coniglio (Figura 3). L'anticorpo primario specifico si lega all'antigene e viene successivamente localizzato da un cocktail di anticorpi secondari marcati con enzima. Il complesso viene quindi visualizzato con substrato di perossido di idrogeno (H_2O_2) e cromogeno 3,3'-diaminobenzidina tetraidrocloruro (DAB), che produce un precipitato marrone, facilmente osservabile al microscopio in campo chiaro. L'enzima che catalizza la reazione di ossidoriduzione è l'immunoperossidasi, che ha come substrati H_2O_2 e DAB: nella reazione il H_2O_2 dona ossigeno alla DAB riducendola. Nella sua forma ridotta, la DAB ridotta precipita nel sito della reazione sotto forma di un polimero insolubile di colore bruno.

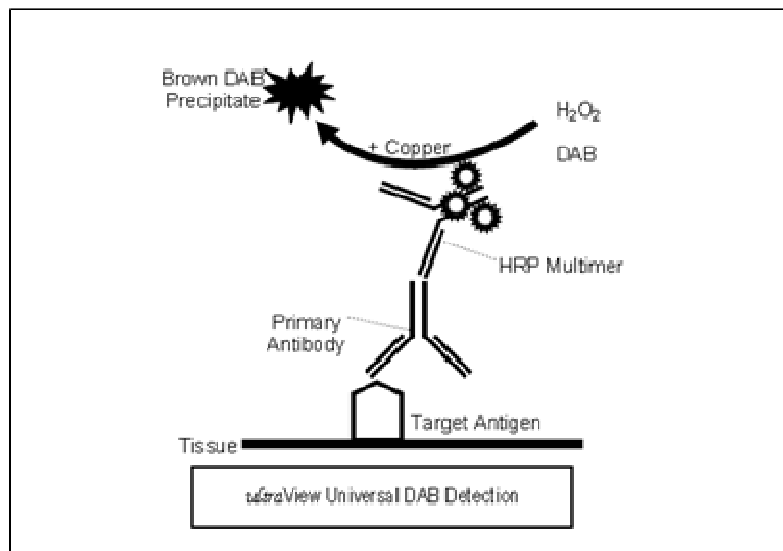


Figura 3. Metodo di rilevamento indiretto con Kit UltraVew DAB (Ventana Roche).

Per le analisi immunoistochimiche, dai campioni fissati in formalina ed inclusi in paraffina sono state tagliate sezioni di 3 μ utilizzando un microtomo manuale; sono state poi raccolte su vetrini trattati con carica positiva (Super Frost Plus, Menzel-Gläser) per aumentare l'aderenza dei preparati istologici onde evitare il distacco del tessuto durante le tecniche effettuate. I vetrini vengono lasciati in stufa ad asciugare a 37° C per tutta la notte oppure a 58° C per almeno 2 ore. Dopo il passaggio in stufa è stato seguito metodo manuale per la valutazione di pAkt ed il metodo automatico per MDM2.

Passaggi manuali:

- Sparaffinatura

Le sezioni sono state sparaffinate in xilolo e reidratate mediante successivi passaggi in etanolo 100%, 95% e 70 % ed infine in acqua distillata.

- Inibizione delle perossidasi endogene

Dopo l'idratazione, i campioni trattati con il kit DAB devono prevedere un passaggio in acqua ossigenata con "UltraView (UV) Universal DAB Inhibitor" per 5 minuti per inibire le perossidasi presenti nel tessuto stesso in grado di provocare una colorazione di fondo aspecifica nei metodi di marcatura con enzima.

- Recupero dell'antigenicità

In questo passaggio le sezioni devono subire un trattamento per il recupero dell'antigenicità, detto anche “smascheramento antigenico” (Antigen retrieval). Questo trattamento viene eseguito a causa del fatto che il processo di fissazione con formalina forma una reticolazione proteica, che determina l'occultamento dei siti antigenici per generazione di legami crociati tra il liquido fissativo e i gruppi attivi delle proteine. Per il recupero dell'antigenicità sono disponibili due metodi di smascheramento:

- digestione enzimatica (solitamente effettuata con Proteinasi K);
- riattivazione al calore (smascheramento termindotto).

Per eseguire lo smascheramento degli antigeni con calore è stato utilizzato un tampone basico (CC1 pH 8) alla temperatura di 95°C per 20 minuti.

- Blocco proteico

Questa fase prevede un'incubazione dei campioni con il reagente ProteinBlock (Protein Block Serum-Free, Dako) per 8 minuti prima dell'incubazione con anticorpo primario.

Il Protein Block è una soluzione composta da 0,25% di caseina in PBS, che serve ad eliminare le reazioni aspecifiche che interferiscono con la rilevazione del segnale.

- Anticorpo primario

In questa fase, si procede all'incubazione delle sezioni con l'anticorpo primario specifico. In Tabella 7 sono riportati i protocolli relativi agli anticorpi utilizzati.

- Fase di rivelazione

Questa fase prevede:

- Incubazione con cocktail di anticorpi secondari “UV Universal HRP Multimer” per 15 minuti a temperatura ambiente.
- Incubazione con soluzione con substrato “UV DAB H₂O₂” e cromogeno “UV DAB Chromogen” per 10 minuti.

- Incubazione con “UV Copper” per 5 minuti.

- Controcolorazione

In questo passaggio i nuclei vengono colorati con ematossilina, per valutare la colorazione specifica nel contesto morfologico.

- disidratazione del campione,

Vengono eseguiti una serie di passaggi, prima in alcool 95%, poi in alcool 100% ed infine in xilolo;

- montaggio del vetrino con il balsamo e il vetrino coprioggetto, eseguito con un monta-vevtrini automatico.

Metodo automatico:

L’indagine immunoistochimica di MDM2 è stata eseguita mediante l’utilizzo di un immunocoloratore automatizzato BenchMark (Ventana/Roche), un sistema in grado di eseguire in modo automatico la processazione dei vetrini dalla sparaffinatura alla controcolorazione nucleare. Le fasi non eseguite dallo strumento sono la disidratazione del campione ed il montaggio del vetrino.

Anticorpo	Origine	Ditta	Diluizione	Smascheramento Antigenico	Temperatura incubazione	Tempo incubazione
<i>pAKT</i>	Rabbit Monoclonal Antibody	Cell Signalling	1:100	CC1(pH 8) 20 min 95°C	4 °C	Overnight
<i>MDM2</i>	Mouse Monoclonal Antybody	Invitrogen	1:50	CC1(pH 8) 20 min 95°C	T ambiente	44 min

Tabella 7. Anticorpo primario utilizzato.

- Valutazione al microscopio ottico

Per ogni esperimento è stata inserita una sezione di tessuto come controllo negativo, che non riceve nessun anticorpo, e una sezione di controllo positivo. Tale controllo serve a valutare che gli anticorpi siano diluiti in modo adeguato

e a controllare che i diversi passaggi dell'operatore siano stati eseguiti correttamente.

In accordo con la percentuale di cellule positive i campioni sono stati valutati come negativo (nessuna cellula positiva), rara presenza di cellule positive (25 % di cellule positive), focalmente positivo (dal 25 al 75 % di cellule positive), positivo (più del 75 % di cellule positive).

% di cellule positive	Interpretazione del risultato
Nessuna (0 %)	Negativo (Neg)
25 %	Rare +
25-75 %	Focalmente positivo (Foc +)
> 75 %	Positivo (Pos)

Tabella 8. Valutazione immunohistochimica in base alla percentuale di cellule positive.

Per quanto riguarda pAKT, oltre alla percentuale di cellule positive è stato valutato anche il livello di intensità della colorazione osservata nei diversi secondo il criterio riportato in Tabella 9.

Livello di intensità	Interpretazione del risultato
0	<i>Assenza di reattività</i>
1+	<i>Positività debole</i>
2+	<i>Positività intermedia</i>
3+	<i>Positività intensa</i>

Tabella 9. livello di intensità della colorazione.

Come controllo positivo per pAKT sono state utilizzate sezioni di carcinoma della prostata per il quale è stata dimostrata la reattività degli anticorpi testati.

4 RISULTATI

4.1 Analisi dei dati clinici

Dati clinici	Neoplasie adipocitiche benigne	Liposarcoma Ben Differenziato	Liposarcoma Dedifferenziato	Liposarcoma Pleomorfo	Sarcoma a Cellule Fusate	Sarcoma Indifferenziato Pleomorfo ad Alto Grado
<i>Età</i>	56 (range38-73)	59 (range34-79)	58 (range34-81)	85	63 (range32-92)	34
<i>Genere</i>						
M	4	39	6	1	7	
F	6	25	10		5	1
<i>Sede</i>						
Estremità inf	6	48	7		6	1
Estremità sup	4	7	3		2	
Retroperitoneo		1	2		0	
Torace		1	3		1	
Bacino		1			1	
Testicolo		2				
Addome		4	1	1	0	
Totale casi	10	64	16	1	11	1

Tabella 1. Analisi dei dati clinici.

4.2 Analisi FISH

L'analisi FISH è stata eseguita su:

- 8 casi di lipoma
- 1 caso di ibernoma
- 1 caso di lipoma pleomorfo
- 64 casi di tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato (TLA/LPSBD)
- 16 casi di liposarcoma dedifferenziato (LPSDD)
- 13 casi di altri sarcomi ad alto grado (1 liposarcoma pleomorfo, 11 sarcomi a cellule fusate, 1 sarcoma indifferenziato pleomorfo).

L'età dei pazienti al momento della diagnosi era compresa tra i 32 ei 92 anni.

La linea cellulare utilizzata come controllo positivo mostrava un elevato livello di amplificazione (Figura 1).

Applicando la definizione data per l'identificazione dei tumori con amplificazione di MDM2, tutte le 10 neoplasie lipomatose benigne (8 casi di

lipoma, 1 caso di lipoma pleomorfo ed 1 caso di ibernoma) sono risultate negative per l'amplificazione; nessun nucleo mostrava un aumento del numero di segnali MDM2. E' stato interessante notare che, a differenza dei casi di lipoma ordinario, il caso di lipoma pleomorfo mostrava alcuni nuclei dismorfici caratterizzati da un aumento del numero di segnali MDM2. Tuttavia, anche in questi nuclei, il rapporto tra i segnali MDM2 ed i segnali del centromero 12 (CEN 12) risultava bilanciato, pertanto il caso è stato valutato come negativo per l'amplificazione (Figura 2).

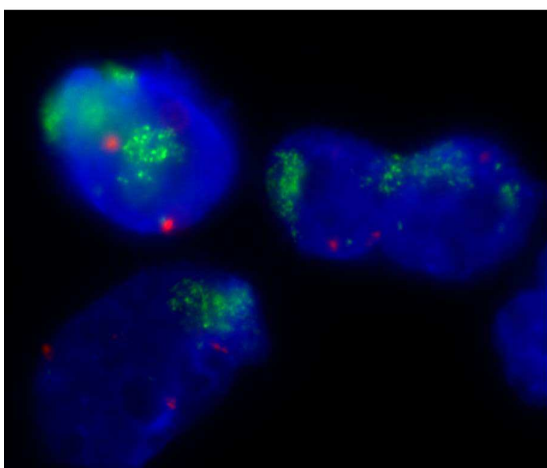


Figura 1. Analisi FISH dell'amplificazione del gene MDM2 nella linea cellulare di liposarcoma T778 (Pedeutour et al., 1999) utilizzata come controllo positivo.

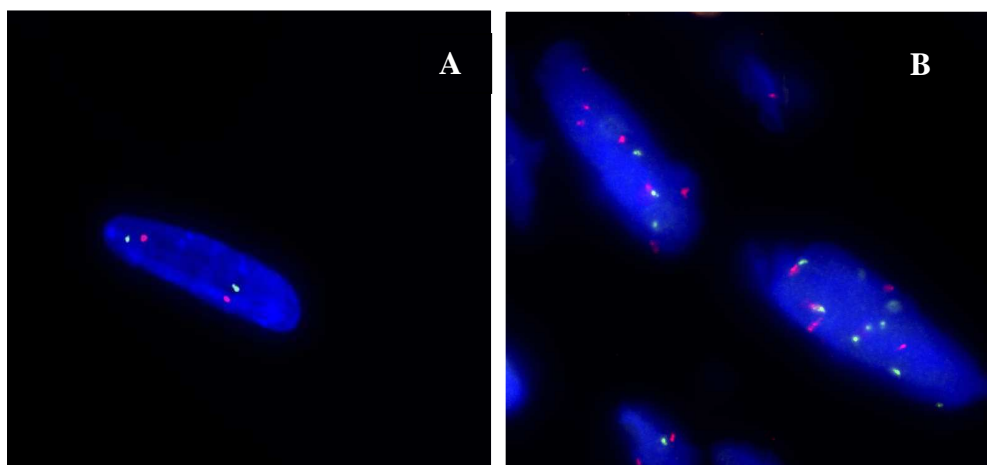


Figura 2. Analisi FISH dell'amplificazione del gene MDM2 nel lipoma (A) e nel lipoma pleomorfo (B). Nel lipoma si osservano due segnali verdi e due segnali rossi distinti tra loro, mentre nel lipoma pleomorfo l'analisi evidenzia la compresenza di numerosi segnali MDM2 (segnali verdi) e segnali per il centromero 12 (segnali rossi).

Tra i tumori diagnosticati come tumori lipomatosi atipici/liposarcomi ben differenziati 63 su 64 casi (98,5%) sono risultati positivi per amplificazione di MDM2 (Figura 3 e Tabella 2). L'unico caso che è risultato negativo è stato classificato come liposarcoma a cellule fusate.

Durante l'analisi è stato osservato che il livello di amplificazione può variare da un tumore all'altro e fra le differenti cellule nell'ambito dello stesso tumore.

	Neg	Pos
TLA/LPSBD	1	63
Tumori lipomatosi benigni	10	0

Tabella 2: Analisi FISH per l'amplificazione di MDM2 nel TLA/LPSBD (tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato) e nei tumori lipomatosi benigni.

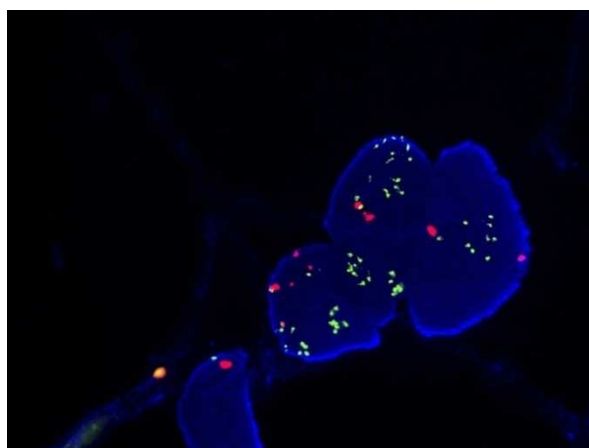


Figura 3. Analisi FISH per l'amplificazione del gene MDM2 in un tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato; i segnali sono numerabili.

Tutti i casi di liposarcoma dedifferenziato sono risultati positivi all'amplificazione di MDM2. Tale amplificazione si presentava sempre elevata e sotto forma di raggruppamenti (*cluster*) di segnali di fluorescenza nucleari (Figura 4).

Fra i tumori morfologicamente simili al liposarcoma dedifferenziato, il liposarcoma pleomorfo, il sarcoma indifferenziato pleomorfo ad alto grado e il 4 casi su 11 degli altri sarcomi ad alto grado mostravano numerosi nuclei giganti caratterizzati da un aumento del numero di copie geniche per MDM2 (10 o più segnali); tuttavia, in questi nuclei ciascun segnale MDM2 era

accoppiato ad un segnale del centromero (CEN12) indicando che questi tumori sono in realtà negativi per l'amplificazione di MDM2. Anche in questi casi, l'aumento di copie del gene MDM2 (*copy number gain*) è probabilmente da associare ad una polisomia del cromosoma 12 (Tabelle 3 e 4; Figura 5).

	Neg	Pos
LPSDD	0	13
Altri Sarcomi ad alto grado	13	0

Tabella 3: Analisi FISH per l'amplificazione del gene MDM2 nel liposarcoma dedifferenziato (LPSDD) e in altri sarcomi ad alto grado (sarcomi a cellule fusate, liposarcoma pleomorfo, sarcoma indifferenziato pleomorfo ad alto grado)

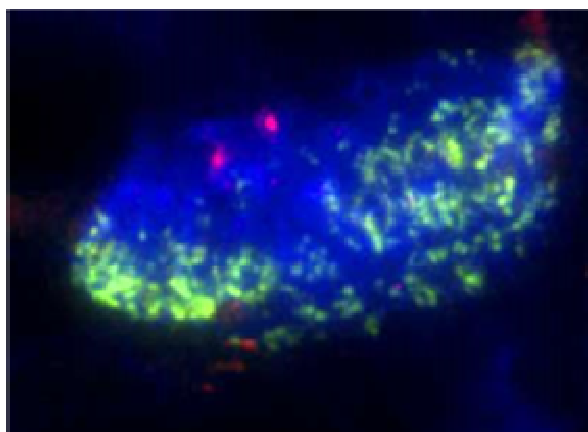


Figura 4. Analisi FISH dell'amplificazione del gene MDM2 in un liposarcoma dedifferenziato; i segnali non sono numerabili e sono disposti in cluster.

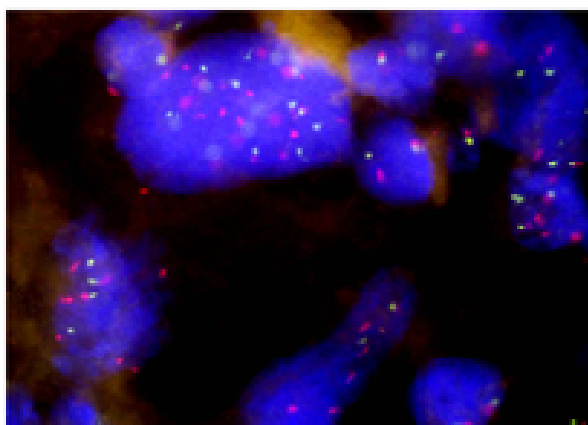


Figura 5. Sarcoma indifferenziato pleomorfo ad alto grado

Neoplasie non adipocitiche			
Caso	Diagnosi	Status MDM2	Status CEN 12
1	Sarcoma a cellule fusate	copy number gain	copy number gain
2	Sarcoma a cellule fusate con aree mixoidi	normale	normale
3	Sarcoma a cellule fusate e polimorfe	normale	normale
4	Sarcoma a pattern storiforme	normale	normale
5	Sarcoma a cellule fusate e polimorfe	normale	normale
6	Sarcoma a differenziazione miogenica	normale	normale
7	Sarcoma a cellule fusate e polimorfe	normale	normale
8	Sarcoma a cellule fusate	copy number gain	copy number gain
9	Sarcoma a cellule fusate e polimorfe	normale	normale
10	Sarcoma a cellule fusate e polimorfe	copy number gain	copy number gain
11	Sarcoma a cellule fusate e polimorfe	copy number gain	copy number gain
12	Liposarcoma pleomorfo	copy number gain	copy number gain
13	Sarcoma indifferenziato pleomorfo ad alto grado	copy number gain	copy number gain

Tabella 4. Analisi FISH per l'amplificazione del gene MDM2 in neoplasie non adipocitiche che entrano in diagnosi differenziale con il liposarcoma dedifferenziato.

4.3 Analisi immunoistochimica della espressione di MDM2

L'analisi della espressione di MDM2 mediante immunoistochimica è stata effettuata su

- 3 casi di lipoma
- 12 casi di tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato
- 9 casi di liposarcoma dedifferenziato

I risultati dell'indagine immunoistochimica di MDM2 sono mostrati nella tabella 5.

L'analisi ha mostrato la presenza della proteina nel 16% (2/12) casi di tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato e nel 100% (9/9) dei casi di liposarcoma dedifferenziato. Le neoplasie benigne sono risultate negative all'antigene.

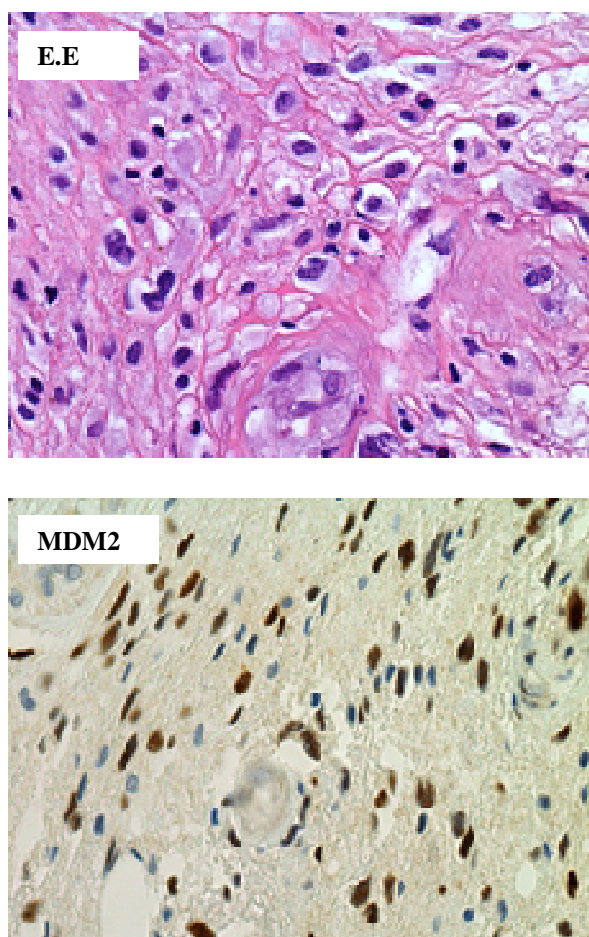


Figura 6. Analisi immunoistochimica della espressione di MDM2 in un caso di liposarcoma dedifferenziato (40 X).

Caso	MDM2
L 1	Neg
L 2	Neg
L 3	Neg
TLA/LPSBD 1	Neg
TLA/LPSBD 2	Pos
TLA/LPSBD 3	Neg
TLA/LPSBD 4	Neg
TLA/LPSBD 5	Neg
TLA/LPSBD 6	Neg
TLA/LPSBD 7	Neg
TLA/LPSBD 8	Neg
TLA/LPSBD 9	Pos
TLA/LPSBD 10	Pos
TLA/LPSBD 11	Pos
TLA/LPSBD 12	Neg
TLA/LPSBD 13	Neg
LPSDD 1	Pos
LPSDD 2	Pos
LPSDD 3	Pos
LPSDD 4	Pos
LPSDD 5	Pos
LPSDD 6	Pos
LPSDD 7	Pos
LPSDD 8	Pos
LPSDD 9	Pos

Tabella 5: Risultati dell'analisi immunohistochemica dell'espressione di MDM2 (L:lipoma; TLA/LPSBD:tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato; LPSDD:liposarcoma dedifferenziato).

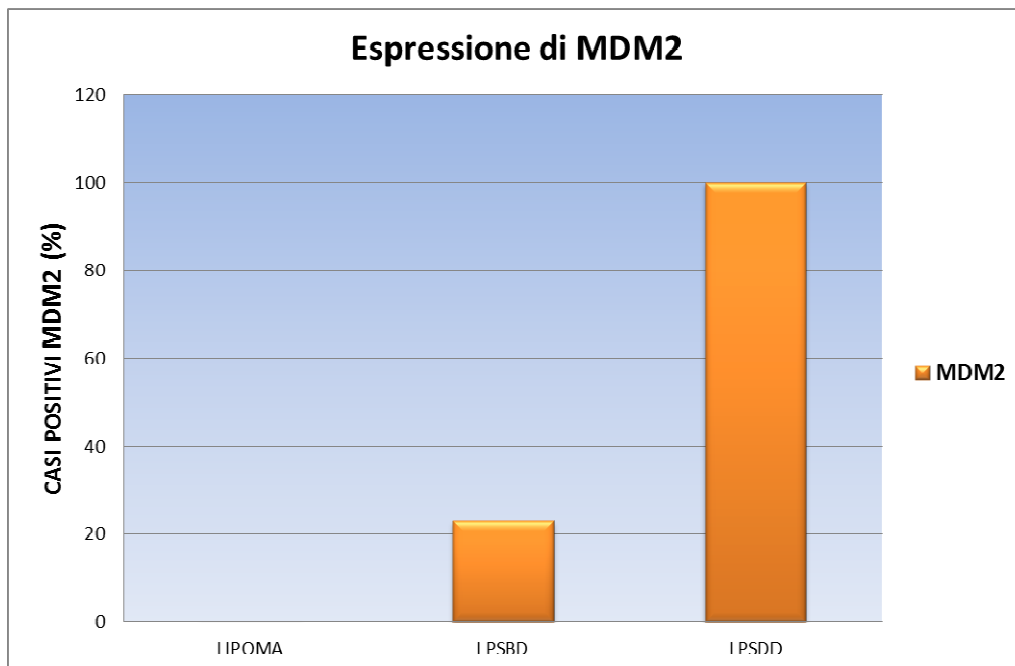


Figura 7. Immunoreattività per MDM2 nelle neoplasie lipomatose valutata come percentuale di casi positivi.

4.4 Analisi Real-Time PCR della espressione di AKT

L'espressione del gene AKT mediante *Real-Time* PCR è stata studiata in 5 casi di lipoma, 1 caso di ibernoma, 13 casi di TLA/LPSBD e 9 casi di LPSDD.

Dato che l'amplificazione è stata condotta con metodica SYBR Green, un intercalante aspecifico del DNA, la specificità dei prodotti di PCR per ogni campione è stata verificata mediante curva di *melting* (Figura 8).

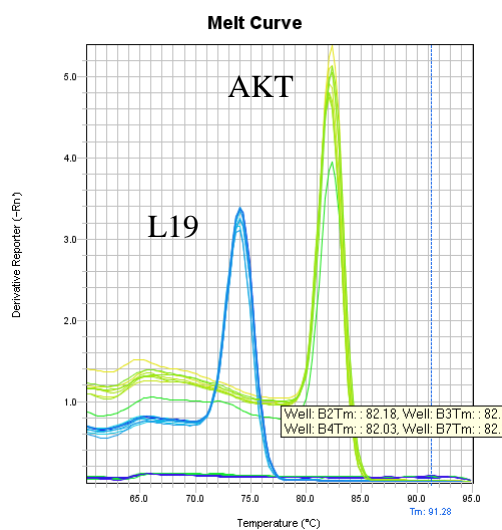


Figura 8. Specificità della reazione di amplificazione dei geni AKT1 ed L19, esempio di curva melting.

Nelle neoplasie lipomatose benigne, l'espressione del gene AKT è risultata leggermente superiore al tessuto normale con valori compresi tra 1 e 1.5 nel 100 % dei casi (Tabella 6).

Nei 13 casi di tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato, l'espressione del gene AKT è risultata > 2 nel 75 % dei casi, mentre nei liposarcomi dedifferenziati è risultata > 2 nel 100 % dei casi analizzati.

Complessivamente, l'analisi dimostra che i livelli di espressione del gene AKT1 sono più elevati nei liposarcomi (LPSBD e LPSDD) sia rispetto al lipoma che al corrispondente tessuto sano (Figura 9). L'espressione del gene AKT si è mostrata più elevata in tutti i casi che presentano amplificazione di MDM2 con un'elevata variabilità di valori compresi fra 0,9 e 23 (Tabella 7); tra i liposarcomi, solo 2 casi su 21 esibiscono un valore di 2-DDCT superiore a 10.

Neoplasie adipocitiche benigne	
Caso	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
1	1,511
2	4,872
3	0,947
4	1,685
5	1,697
6	1,529
7	1,324
8	1,213
9	1,460

Tabella 6. Risultati dell'analisi Real-Time PCR relativi alla espressione del gene AKT in campioni di neoplasie adipocitiche benigne

Tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato	
Caso	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
1	2,173
2	14,372
3	7,653
4	23,454
5	9,426
6	6,266
7	1,878
8	2,128
9	2,902
10	1,039
11	0,938
12	1,183
13	7,602

Liposarcoma dedifferenziato	
Caso	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
1	9,345
2	4,248
3	4,039
4	10,6
5	8,2
6	9,102
7	8,013
8	11,321
9	9,623

Tabella 7. Risultati dell'analisi Real-Time PCR relativi alla espressione del gene AKT in campioni di tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato e liposarcoma dedifferenziato.

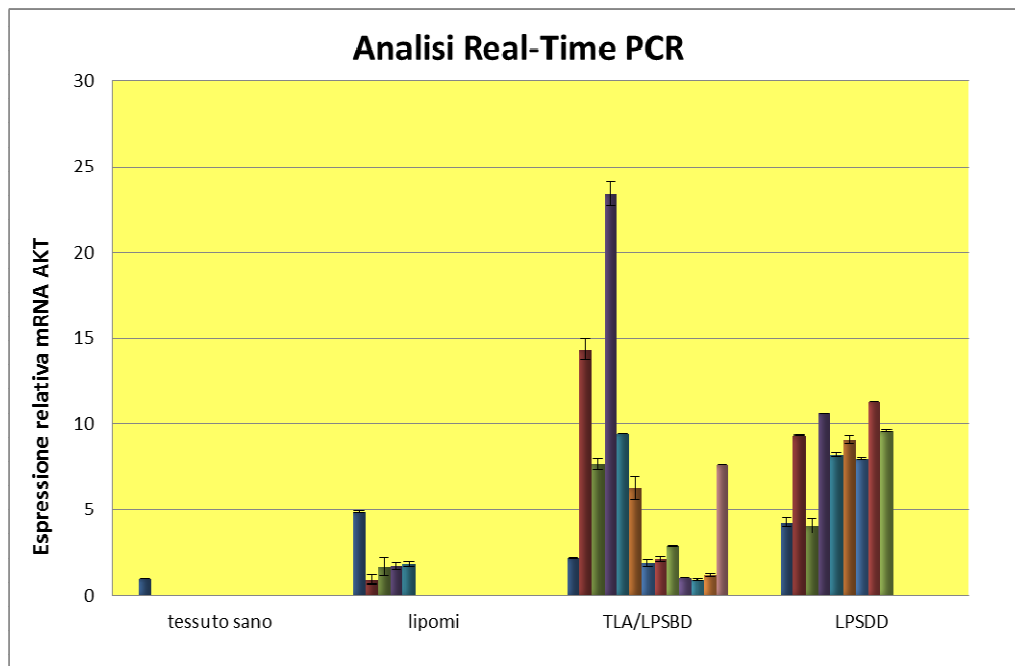


Figura 9. Livelli di espressione dell' mRNA di AKT relativi al corrispettivo tessuto sano utilizzato come calibratore.

4.5 Analisi immunohistochemica della espressione di pAKT

Per verificare se l'attivazione di AKT fosse coinvolta nella patogenesi del TLA/LPSBD e del LPSDD, ho effettuato l'analisi immunohistochemica per fosfo AKT (pAkt-Ser473) sugli stessi campioni clinici sui quali avevo effettuato l'indagine immunohistochemica per MDM2.

L'attivazione di AKT, ossia la presenza della forma fosforilata di AKT è stata osservata nel 100% dei casi (13/13) di tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato e nel 99% (8/9) dei casi di liposarcoma dedifferenziato. Tale espressione è risultata assente nei lipomi ad esclusione dello stesso caso che mostrava una più elevata espressione del gene AKT mediante Real-Time PCR. Nei TLA/LPSBD l'intensità della colorazione è stata valutata come intermedia ed era evidente soprattutto a livello dei setti fibrosi sia nel nucleo che nel citoplasma.

In relazione all'intensità, in 4 casi di liposarcoma dedifferenziato è stata osservata un'espressione intensa della proteina (3+), mentre nei rimanenti casi l'espressione è risultata moderata (2+).

Un solo caso di liposarcoma dedifferenziato è risultato negativo all'antigene pAKT, ma è probabile che questo derivi da un problema di instabilità della forma fosforilata della proteina dovuta al processo di fissazione ed inclusione.

Se consideriamo solo la frazione di cellule risultate positive all'antigene, e non consideriamo l'intensità della colorazione, possiamo osservare che nei liposarcomi dedifferenziati tale frazione è maggiore rispetto a quella osservata nei tumori lipomatosi atipici/liposarcomi ben differenziati (Figura 11).

I risultati dell'indagine immunohistochimica di pAKT sono riassunti nella Tabella 7.

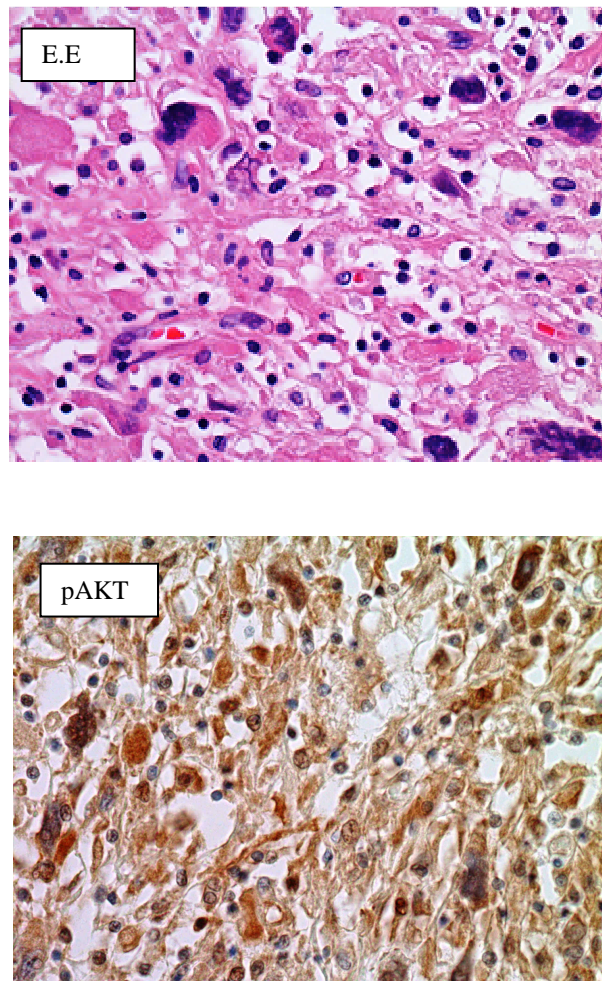


Figura 10. Intensa positività per pAKT in un caso di liposarcoma dedifferenziato (40 X).

Caso	pAKT	Intensità
L 1	Neg	0
L 2	Rare +	2 +
L 3	Neg	0
TLA/LPSBD 1	Rare +	2 +
TLA/LPSBD 2	Rare +	2 +
TLA/LPSBD 3	Rare +	2 +
TLA/LPSBD 4	Rare +	2 +
TLA/LPSBD 5	Rare +	2 +
TLA/LPSBD 6	Rare +	2 +
TLA/LPSBD 7	Rare +	2 +
TLA/LPSBD 8	Rare +	2 +
TLA/LPSBD 9	Rare +	2 +
TLA/LPSBD 10	Rare +	2 +
TLA/LPSBD 11	Rare +	2 +
TLA/LPSBD 12	Rare +	2 +
TLA/LPSBD 13	Rare +	2 +
LPSDD 1	Foc +	2 +
LPSDD 2	Foc +	3 +
LPSDD 3	Pos	3 +
LPSDD 4	Foc +	3 +
LPSDD 5	Foc +	3 +
LPSDD 6	Foc +	2 +
LPSDD 7	Foc +	2 +
LPSDD 8	Foc +	2 +
LPSDD 9	Neg	0

Tabella 7: Risultati dell'analisi immunohistochemica dell'espressione di pAKT nelle neoplasie analizzate (L: lipoma; TLA/LPSBD: tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato; LPSDD: liposarcoma de differenziato).

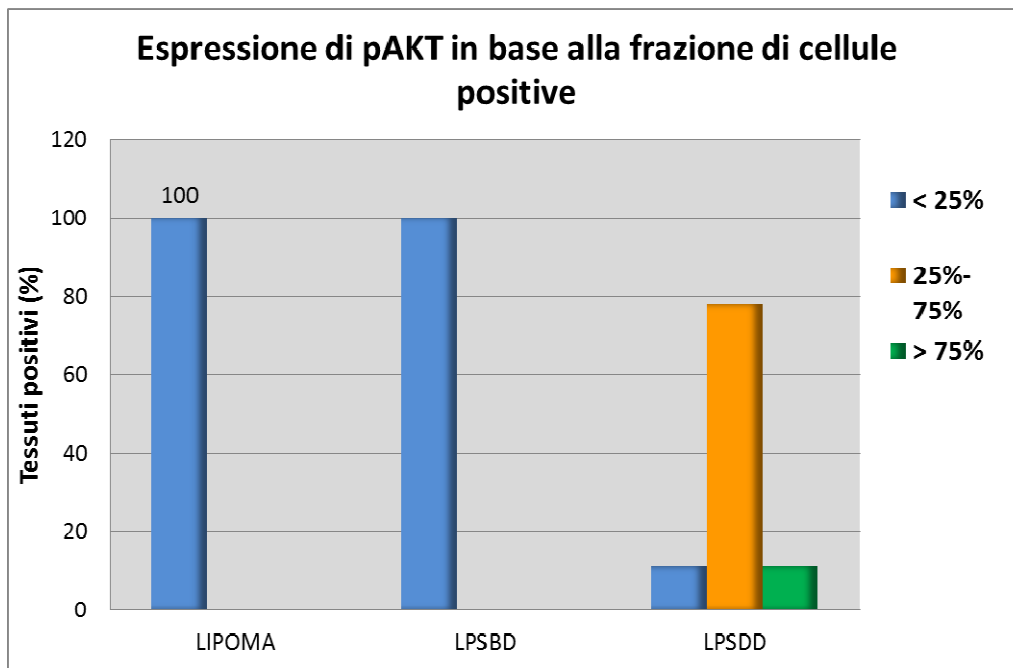


Figura 11. Espressione di pAKT in base alla frazione di cellule positive.

	LIPOMA	LPSBD	LPSDD
< 25%	100 %	100%	11%
25%-75%	0 %	0%	78%
> 75%	0 %	0%	11%

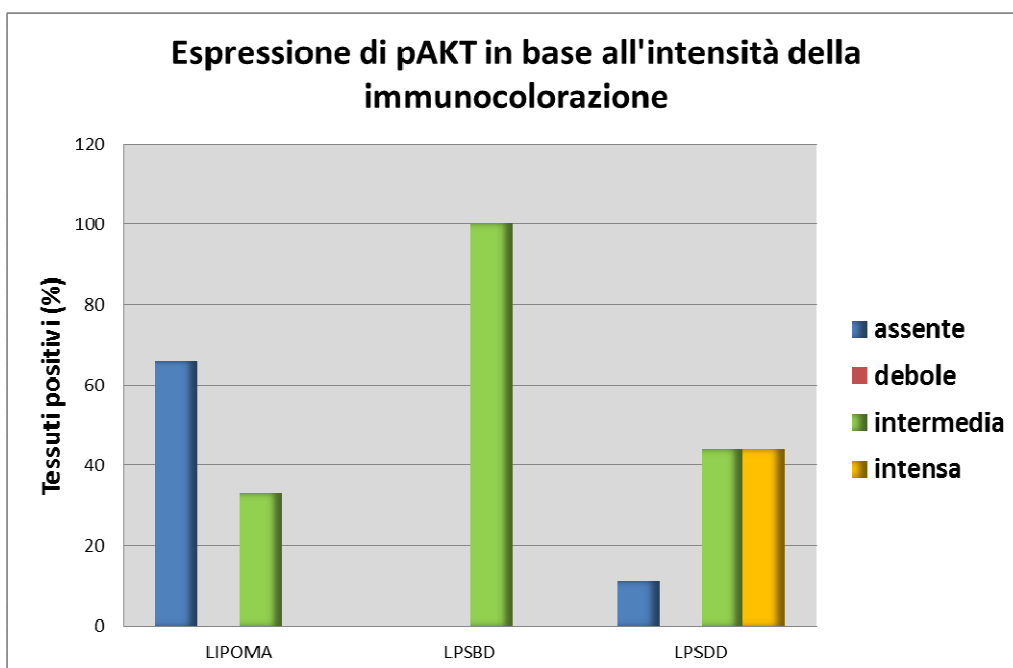


Figura 11. Espressione di pAKT in base alla frazione di cellule positive.

6. DISCUSSIONE

I sarcomi dei tessuti molli (STM) costituiscono un gruppo eterogeneo di tumori di origine mesenchimale. Rappresentano l'1% dei tumori totali dell'adulto, hanno un'ampia varietà cellulare, sono poco differenziati e di difficile classificazione.

Le neoplasie adipocitiche sono le più comuni tra i STM a causa della elevata prevalenza dei lipomi, essendo il rapporto tra i lipomi ed i liposarcomi pari a 100:1 (Clark et al., 2005).

Il tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato (TLA/LPSBD) ed il liposarcoma dedifferenziato (LPSDD) costituiscono un ampio gruppo di liposarcomi e si distinguono sia morfologicamente che geneticamente dagli altri due sottotipi di liposarcoma, il liposarcoma mixoide ed il liposarcoma pleomorfo.

L'aspetto istologico del TLA/LPSBD, soprattutto il sottotipo lipoma-simile, appare spesso molto simile al tessuto adiposo normale e al tessuto adiposo maturo del lipoma e in alcuni casi può essere difficile distinguere i due tumori basandosi esclusivamente sull'istologia. Tuttavia, la distinzione del TLA/LPSBD dal lipoma è di fondamentale importanza poiché il primo rappresenta una neoplasia maligna a basso grado localmente aggressiva che può dedifferenziare e acquisire la capacità di metastatizzare.

Il LPSDD è una neoplasia maligna adipocitica costituita dalla compresenza di aree tumore lipomatoso atipico/liposarcoma ben differenziato con una componente sarcomatosa non lipogenica usualmente di alto grado, meno spesso di basso grado (Evans, 1979)

Questa neoplasia può presentare differenti aspetti morfologici e spesso si presenta come un sarcoma indifferenziato pleomorfo. Nel contesto di altre neoplasie adipocitiche, ad esempio, può essere difficile distinguere il LPSDD dal liposarcoma pleomorfo in quanto, pur essendo una neoplasia non lipogenica, può occasionalmente mostrare la presenza di lipoblasti. La distinzione dal liposarcoma pleomorfo è importante poiché esso presenta un comportamento più aggressivo ed una prognosi peggiore.

Il LPSDD può anche presentare un aspetto mixofibrosarcomatoso pertanto, in alcuni casi, può essere confuso con il liposarcoma mixoide che presenta una propensione più elevata a sviluppare metastasi.

In anni recenti, grazie a studi di citogenetica, sono stati fatti diversi progressi per quanto riguarda lo studio dei liposarcomi. Ora sappiamo che il profilo genomico del TLA/LPSBD e del LPSDD è caratterizzato dalla presenza di cromosomi ad anello o cromosomi giganti comprendenti sequenze amplificate della regione cromosomica 12q14-15. In questa regione mappano numerosi geni tra cui il gene MDM2 (murine double minute-2).

L'amplificazione di questi geni o la sovraespressione delle relative proteine, non essendo ritrovabile né in lipomi né nella maggior parte di altre neoplasie delle parti molli, risulta molto utile in fase diagnostica.

L'ibridazione fluorescente in situ costituisce il metodo migliore per rilevare queste alterazioni citogenetiche nelle singole cellule. L'amplificazione di MDM2 può essere determinata paragonando il numero di segnali per MDM2 rispetto al numero di segnali per il centromero 12 (Tanas & Goldblum, 2009).

L'analisi FISH ha evidenziato che il gene MDM2 è amplificato in quasi tutti i LPSBD ma in nessuna delle neoplasie adipocitiche benigne analizzate. Nei nuclei dismorfici del lipoma pleomorfo è stato osservato un incremento del numero di copie geniche probabilmente dovuto a un aumento di numero di copie del cromosoma 12 e pertanto tale alterazione non deve essere considerata un'amplificazione. Tutti i LPSDD sono risultati amplificati e con un livello di amplificazione elevato che si manifestava sempre sotto forma di *cluster* di segnali.

Fra i tumori morfologicamente simili al LPSDD, il 46% mostrava un aumento del numero di copie del gene MDM2 non disposte in *cluster*, tuttavia tale aumento era sempre bilanciato da un aumento del numero di segnali centromerici CEN12 indicando che tali tumori sono negativi per l'amplificazione di MDM2.

Dai dati in letteratura sappiamo che l'amplificazione di MDM2 provoca la sovraespressione della proteina da esso codificata, di conseguenza l'immunoistochimica (IHC) può costituire un metodo utile per rilevare indirettamente amplificazione genica rilevando espressione proteica (Pilotti et al., 2000).

Tuttavia, non è stato ancora del tutto chiarito se le copie amplificate di MDM2 sono costantemente trascritte e se l'immunoistochimica può essere utilizzata con successo per determinare la sovraespressione della proteina.

Studi recenti dimostrano una notevole discordanza tra i risultati dell'analisi IHC e quelli dell'analisi molecolare (Sirvent et al., 2007; Weaver et al., 2008).

In accordo con i risultati in letteratura, in questo studio, l'espressione costante di MDM2 è stata osservata solo nei casi di LPSDD.

Tra i TLA/LPSBD che mostravano l'amplificazione genica di MDM2, solo 2 casi su 9 (22%) mostravano l'espressione della proteina mentre, tra i LPSDD in 9 casi su 9 (100%) era presente sia l'amplificazione del gene MDM2 che l'espressione della proteina. E' probabile che in questi tumori l'elevato livello di amplificazione di MDM2 porti a una maggiore espressione della proteina.

La proteina MDM2 è una E3 ubiquitina ligasi che oltre ad indirizzare l'oncosoppressore p53 verso la degradazione via proteosoma, ne inibisce l'attività trascrizionale.

Recentemente sono state introdotte delle molecole sintetiche che, legandosi al sito per p53 presente nella proteina MDM2, impediscono la formazione del complesso MDM2-p53. Di conseguenza, p53 non essendo più inibito da MDM2 può esercitare la sua funzione di soppressore tumorale. L'uso di queste molecole sintetiche è risultato efficace nel riattivare la funzione di p53 in vari tipi di cancro, sia in studi *in vitro* che *in vivo*. Molecole sintetiche chiamate Nutline sono state le prime a essere state introdotte (Vassilev et al., 2004).

In particolare, studi *in vitro* hanno dimostrato che il trattamento con Nutlina-3, un antagonista di MDM2, induce l'apoptosi in linee cellulari di TLA/LPSBD e LPSDD che sono risultate positive per l'amplificazione di MDM2 (Muller et al., 2007).

I risultati di questo studio dimostrano l'utilità diagnostica dell'analisi FISH per la valutazione dell'amplificazione di MDM2 nella diagnosi differenziale tra TLA/LPSBD e neoplasie adipocitiche benigne e tra LPSDD e altri sarcomi con morfologia simile. Inoltre da questo studio emerge che, nel caso della diagnosi differenziale tra TLA/LPSBD e neoplasie adipocitiche benigne il ruolo della metodica FISH non può essere sostituito dall'uso dell'immunoistochimica.

Questi dati, inoltre, suggeriscono che la determinazione dell'amplificazione di MDM2 potrà essere utile per la selezione dei pazienti affetti da liposarcoma che potranno beneficiare di trattamenti con inibitori selettivi di MDM2.

Negli ultimi anni la delucidazione degli eventi molecolari che si trovano alla base della progressione tumorale ha suscitato un notevole interesse per lo sviluppo di terapie molecolari mirate. Tra questi vi è il *pathway* molecolare che vede coinvolta la molecola AKT.

AKT/PKB è una molecola di segnalazione che svolge un ruolo centrale nella stimolazione della proliferazione cellulare e nell'inibizione dell'apoptosi. L'alterazione della espressione e della funzione di AKT svolge un importante ruolo nello sviluppo e nella progressione tumorale.

La sovraespressione di AKT è stata descritta in numerosi carcinomi tuttavia in letteratura sono scarsi i dati riguardanti l'espressione di questo gene nelle neoplasie adipocitiche.

Studi recenti hanno indicato un possibile ruolo di questo gene nella progressione del liposarcoma mixoide ossia nel passaggio a liposarcoma mixoide a cellule rotonde. Inoltre vi sono studi che indicano come la proteina MDM2 costituisca un bersaglio di AKT. Da questi studi è emerso che AKT aumenta l'attività di ubiquitinazione di MDM2 riducendo i livelli di p53.

Un apporto significativo alla clinica di questi tumori potrebbe sicuramente derivare dall'identificazione di nuovi bersagli terapeutici coinvolti nel percorso di trasduzione del segnale PI3K/AKT. In quest'ottica ho voluto studiare se l'espressione di AKT in termini di mRNA fosse alterata nelle neoplasie adipocitiche e se vi fossero differenze di espressione tra neoplasie adipocitiche benigne e maligne.

A questo scopo ho effettuato esperimenti di *Real-Time* PCR.

I campioni di tessuto di TLA/LPSBD e LPSDD collezionati nella Banca dei Tessuti del Laboratorio di Anatomia Patologica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli mi hanno permesso di analizzare l'espressione del gene AKT *ex vivo*, utilizzando come controllo il tessuto sano adiacente al tumore.

La *Real-Time* PCR ha dimostrato che i livelli di espressione di dell'mRNA di AKT sono più elevati nei liposarcomi sia rispetto al lipoma che al tessuto adiposo normale.

Questi dati suggeriscono un possibile ruolo di questa molecola nella malignità del TLA/LPSBD e nel LPSDD e indicano che l'analisi d'espressione di AKT mediante *Real-Time* PCR può contribuire nel caratterizzare queste neoplasie.

I dati ottenuti dall'analisi di *Real-Time* PCR hanno suggerito di proseguire lo studio mediante l'indagine immunohistochimica della presenza di pAKT, cioè la forma fosforilata e quindi attiva della proteina AKT.

L'analisi ha dimostrato che indipendentemente dai livelli di espressione dell'mRNA, pAKT era presente in tutti i casi di TLA/LPSBD; tra i casi di LPSDD solo uno non mostrava la presenza della forma fosforilata ma è possibile che ciò sia dovuto al fatto che la fosforilazione può essere mascherata dalla fissazione in formalina.

7. CONCLUSIONI

Complessivamente, il presente studio dimostra che l'analisi FISH costituisce un test affidabile per la valutazione dell'amplificazione del gene MDM2 e del numero di copie del centromero del cromosoma 12 e che rappresenta un ausilio importante nella diagnosi differenziale delle neoplasie adipocitiche.

Inoltre apre una finestra su una nuova molecola bersaglio che in futuro potrebbe risultare utile nell'approccio clinico delle neoplasie adipocitiche.

Al momento non vi sono regimi terapeutici sistemici noti per migliorare la sopravvivenza dei pazienti affetti da TLA/LPSBD e LPSDD quando la resezione chirurgica completa non è fattibile, sottolineando la necessità di una migliore comprensione molecolare per queste neoplasie.

E' ormai chiaro che l'introduzione di composti antitumorali mirati su bersagli genici in combinazione con le terapie convenzionali rende necessaria una più appropriata selezione dei pazienti da indirizzare ai vari trattamenti innovativi.

Per tale motivo la conoscenza delle caratteristiche molecolari e biologiche delle neoplasie adipocitiche fornirà indicazioni utili sia alla diagnosi che alla sperimentazione di nuovi approcci terapeutici.

BIBLIOGRAFIA

- Alessi, D.R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P. & Hemmings, B.A. (1996). *Embo J*, **15**, 6541-51.
- Bellacosa, A., Testa, J.R., Staal, S.P. & Tsichlis, P.N. (1991). *Science*, **254**, 274-7.
- Boland, J.M., Weiss, S.W., Oliveira, A.M., Erickson-Johnson, M.L. & Folpe, A.L. (2009). *Am J Surg Pathol*, **34**, 837-43.
- Bonvalot, S., Miceli, R., Berselli, M., Causeret, S., Colombo, C., Mariani, L., Bouzaïene, H., Le Pechoux, C., Casali, P.G., Le Cesne, A., Fiore, M. & Gronchi, A. (2009). *Ann Surg Oncol*, **17**, 1507-14.
- Bonvalot, S., Miceli, R., Berselli, M., Causeret, S., Colombo, C., Mariani, L., Bouzaïene, H., Le Pechoux, C., Casali, P.G., Le Cesne, A., Fiore, M. & Gronchi, A. (2010). *Ann Surg Oncol*, **17**, 1507-14.
- Brazil, D.P., Yang, Z.Z. & Hemmings, B.A. (2004). *Trends Biochem Sci*, **29**, 233-42.
- Brognard, J., Sierrecki, E., Gao, T. & Newton, A.C. (2007). *Mol Cell*, **25**, 917-31.
- Campanacci, M. *Soft Tissue Tumours*, Padova edn. Piccin Nuova Libreria.
- Canter, R.J., Qin, L.X., Maki, R.G., Brennan, M.F., Ladanyi, M. & Singer, S. (2008). *Clin Cancer Res*, **14**, 8191-7.
- Chen, W.S., Xu, P.Z., Gottlob, K., Chen, M.L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., Kadowaki, T. & Hay, N. (2001). *Genes Dev*, **15**, 2203-8.
- Chibon, F., Mariani, O., Derre, J., Mairal, A., Coindre, J.M., Guillou, L., Sastre, X., Pedeutour, F. & Aurias, A. (2004). *Genes Chromosomes Cancer*, **40**, 32-7.
- Chibon, F., Mariani, O., Derre, J., Malinge, S., Coindre, J.M., Guillou, L., Lagace, R. & Aurias, A. (2002). *Cancer Genet Cytogenet*, **139**, 24-9.
- Clark, M.A., Fisher, C., Judson, I. & Thomas, J.M. (2005). *N Engl J Med*, **353**, 701-11.
- Coffer, P.J. & Woodgett, J.R. (1991). *Eur J Biochem*, **201**, 475-81.
- Coffin, C., Dehner, L. & O'Shea, P. *Pediatric Soft Tissue Tumours: A Clinical, Pathological and Therapeutic Approach*. Williams & Wilkins.: Baltimore.
- Coindre, J.M., Pedeutour, F. & Aurias, A. (2010). *Virchows Arch*, **456**, 167-79.
- Conyers, R., Young, S. & Thomas, D.M. (2011). *Sarcoma*, **2011**, 483154.
- Cordon-Cardo, C., Latres, E., Drobnjak, M., Oliva, M.R., Pollack, D., Woodruff, J.M., Marechal, V., Chen, J., Brennan, M.F. & Levine, A.J. (1994). *Cancer Res*, **54**, 794-9.
- Crago, A.M. & Singer, S. (2011). *Curr Opin Oncol*, **23**, 373-8.
- Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B.A. (1995). *Nature*, **378**, 785-9.
- Dalal, K.M., Antonescu, C.R. & Singer, S. (2008). *J Surg Oncol*, **97**, 298-313.
- Dalal, K.M., Kattan, M.W., Antonescu, C.R., Brennan, M.F. & Singer, S. (2006). *Ann Surg*, **244**, 381-91.
- Datta, S.R., Dudek, H., Tao, X., Masters, S., Fu, H., Gotoh, Y. & Greenberg, M.E. (1997). *Cell*, **91**, 231-41.

- Dei Tos, A.P. (2000). *Ann Diagn Pathol*, **4**, 252-66.
- Dei Tos, A.P., Doglioni, C., Piccinin, S., Maestro, R., Mentzel, T., Barbareschi, M., Boiocchi, M. & Fletcher, C.D. (1997). *J Pathol*, **181**, 8-13.
- Dei Tos, A.P., Mentzel, T., Newman, P.L. & Fletcher, C.D. (1994). *Am J Surg Pathol*, **18**, 913-21.
- Deyrup, A.T. & Weiss, S.W. (2006). *Histopathology*, **48**, 42-50.
- Edge SB, B.D., Compton CC et al. *AJCC cancer staging manual.*, 7th Edition edn: New York.
- Eilber, F.C., Brennan, M.F., Eilber, F.R., Dry, S.M., Singer, S. & Kattan, M.W. (2004). *Cancer*, **101**, 2270-5.
- Engelman, J.A. (2009). *Nat Rev Cancer*, **9**, 550-62.
- Evans, H.L. (1979). *Am J Surg Pathol*, **3**, 507-23.
- Evans, H.L., Soule, E.H. & Winkelmann, R.K. (1979). *Cancer*, **43**, 574-84.
- Fang, S., Jensen, J.P., Ludwig, R.L., Vousden, K.H. & Weissman, A.M. (2000). *J Biol Chem*, **275**, 8945-51.
- Feng, J., Park, J., Cron, P., Hess, D. & Hemmings, B.A. (2004a). *J Biol Chem*, **279**, 41189-96.
- Feng, J., Tamaskovic, R., Yang, Z., Brazil, D.P., Merlo, A., Hess, D. & Hemmings, B.A. (2004b). *J Biol Chem*, **279**, 35510-7.
- Fletcher CDM, B.J., Hogendoorn P, Mertens F. *WHO Classification of tumours of soft tissue and bone*, 4th edition, edn: Lyon.
- Fletcher, C.D.M., Bridge, J.A., Hogendoorn, P.C.W. & Mertens, F. *WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone*, 4th edition edn. International Agency for Research of Cancer: Lyon.
- Garofalo, R.S., Orena, S.J., Rafidi, K., Torchia, A.J., Stock, J.L., Hildebrandt, A.L., Coskran, T., Black, S.C., Brees, D.J., Wicks, J.R., McNeish, J.D. & Coleman, K.G. (2003). *J Clin Invest*, **112**, 197-208.
- Gregory, M.A., Qi, Y. & Hann, S.R. (2003). *J Biol Chem*, **278**, 51606-12.
- Grosso, F., Jones, R.L., Demetri, G.D., Judson, I.R., Blay, J.Y., Le Cesne, A., Sanfilippo, R., Casieri, P., Collini, P., Dileo, P., Spreafico, C., Stacchiotti, S., Tamborini, E., Tercero, J.C., Jimeno, J., D'Incalci, M., Gronchi, A., Fletcher, J.A., Pilotti, S. & Casali, P.G. (2007). *Lancet Oncol*, **8**, 595-602.
- Guillou, L. & Aurias, A. (2010). *Virchows Arch*, **456**, 201-17.
- Gustafson, P. (1994). *Acta Orthop Scand Suppl*, **259**, 1-31.
- Hameed, M. (2007). *Cytogenet Genome Res*, **118**, 138-47.
- Hastings, P.J., Lupski, J.R., Rosenberg, S.M. & Ira, G. (2009). *Nat Rev Genet*, **10**, 551-64.
- Henricks, W.H., Chu, Y.C., Goldblum, J.R. & Weiss, S.W. (1997). *Am J Surg Pathol*, **21**, 271-81.
- Hers, I., Vincent, E.E. & Tavaré, J.M. (2011). *Cell Signal*, **23**, 1515-27.
- Hoffman, A., Lazar, A.J., Pollock, R.E. & Lev, D. (2011). *Drug Resist Updat*, **14**, 52-66.
- Hostein, I., Pelmus, M., Aurias, A., Pedeutour, F., Mathoulin-Pelissier, S. & Coindre, J.M. (2004). *J Pathol*, **202**, 95-102.
- Italiano, A., Maire, G., Sirvent, N., Nuin, P.A., Keslair, F., Foa, C., Louis, C., Aurias, A. & Pedeutour, F. (2009). *Cancer Lett*, **273**, 323-30.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. & Ward, E. (2010). *CA Cancer J Clin*, **60**, 277-300.
- Kisseleva, M.V., Cao, L. & Majerus, P.W. (2002). *J Biol Chem*, **277**, 6266-72.

- Kresse, S.H., Berner, J.M., Meza-Zepeda, L.A., Gregory, S.G., Kuo, W.L., Gray, J.W., Forus, A. & Myklebost, O. (2005). *Mol Cancer*, **4**, 39.
- Laurino, L., Furlanetto, A., Orvieto, E. & Dei Tos, A.P. (2001). *Semin Diagn Pathol*, **18**, 258-62.
- Maki, R.G., Wathen, J.K., Patel, S.R., Priebat, D.A., Okuno, S.H., Samuels, B., Fanucchi, M., Harmon, D.C., Schuetze, S.M., Reinke, D., Thall, P.F., Benjamin, R.S., Baker, L.H. & Hensley, M.L. (2007). *J Clin Oncol*, **25**, 2755-63.
- Manning, B.D. & Cantley, L.C. (2007). *Cell*, **129**, 1261-74.
- Mariani, O., Brennetot, C., Coindre, J.M., Gruel, N., Ganem, C., Delattre, O., Stern, M.H. & Aurias, A. (2007). *Cancer Cell*, **11**, 361-74.
- Marino-Enriquez, A., Fletcher, C.D., Dal Cin, P. & Hornick, J.L. (2010). *Am J Surg Pathol*, **34**, 1122-31.
- Martelli, A.M., Nyakern, M., Tabellini, G., Bortul, R., Tazzari, P.L., Evangelisti, C. & Cocco, L. (2006). *Leukemia*, **20**, 911-28.
- Martelli, A.M., Tabellini, G., Bressanin, D., Ognibene, A., Goto, K., Cocco, L. & Evangelisti, C. (2012). *Biochim Biophys Acta*, **1823**, 2168-78.
- Mentzel, T., Palmedo, G. & Kuhnen, C. (2010). *Mod Pathol*, **23**, 729-36.
- Muller, C.R., Paulsen, E.B., Noordhuis, P., Pedetour, F., Saeter, G. & Myklebost, O. (2007). *Int J Cancer*, **121**, 199-205.
- Mussi, C., Collini, P., Miceli, R., Barisella, M., Mariani, L., Fiore, M., Casali, P.G. & Gronchi, A. (2008). *Cancer*, **113**, 1657-65.
- Pedetour, F., Forus, A., Coindre, J.M., Berner, J.M., Nicolo, G., Michiels, J.F., Terrier, P., Ranchere-Vince, D., Collin, F., Myklebost, O. & Turc-Carel, C. (1999). *Genes Chromosomes Cancer*, **24**, 30-41.
- Persad, S., Attwell, S., Gray, V., Delcommenne, M., Troussard, A., Sanghera, J. & Dedhar, S. (2000). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 3207-12.
- Pilotti, S., Della Torre, G., Mezzelani, A., Tamborini, E., Azzarelli, A., Sozzi, G. & Pierotti, M.A. (2000). *Br J Cancer*, **82**, 1271-5.
- Ray-Coquard, I., Blay, J.Y., Italiano, A., Le Cesne, A., Penel, N., Zhi, J., Heil, F., Rueger, R., Graves, B., Ding, M., Geho, D., Middleton, S.A., Vassilev, L.T., Nichols, G.L. & Bui, B.N. (2012). *Lancet Oncol*, **13**, 1133-40.
- Roberge, D., Vakilian, S., Alabed, Y.Z., Turcotte, R.E., Freeman, C.R. & Hickeson, M. (2012). *Sarcoma*, **2012**, 960194.
- Russell, W.O., Cohen, J., Enzinger, F., Hajdu, S.I., Heise, H., Martin, R.G., Meissner, W., Miller, W.T., Schmitz, R.L. & Suit, H.D. (1977). *Cancer*, **40**, 1562-70.
- Schwab, M. (1999). *Semin Cancer Biol*, **9**, 319-25.
- Singer, S., Antonescu, C.R., Riedel, E. & Brennan, M.F. (2003). *Ann Surg*, **238**, 358-70; discussion 370-1.
- Singer, S., Socci, N.D., Ambrosini, G., Sambol, E., Decarolis, P., Wu, Y., O'Connor, R., Maki, R., Viale, A., Sander, C., Schwartz, G.K. & Antonescu, C.R. (2007). *Cancer Res*, **67**, 6626-36.
- Sirvent, N., Coindre, J.M., Maire, G., Hostein, I., Keslair, F., Guillou, L., Ranchere-Vince, D., Terrier, P. & Pedetour, F. (2007). *Am J Surg Pathol*, **31**, 1476-89.
- Sirvent, N., Forus, A., Lescaut, W., Burel, F., Benzaken, S., Chazal, M., Bourgeon, A., Vermeesch, J.R., Myklebost, O., Turc-Carel, C., Ayraud, N., Coindre, J.M. & Pedetour, F. (2000). *Genes Chromosomes Cancer*, **29**, 117-29.
- Song, G., Ouyang, G. & Bao, S. (2005). *J Cell Mol Med*, **9**, 59-71.

- Stacchiotti, S., Palassini, E., Sanfilippo, R., Vincenzi, B., Arena, M.G., Bochicchio, A.M., De Rosa, P., Nuzzo, A., Turano, S., Morosi, C., Dei Tos, A.P., Pilotti, S. & Casali, P.G. (2012). *Ann Oncol*, **23**, 501-8.
- Tanas, M.R. & Goldblum, J.R. (2009). *Adv Anat Pathol*, **16**, 383-91.
- Tap, W.D., Eilber, F.C., Ginther, C., Dry, S.M., Reese, N., Barzan-Smith, K., Chen, H.W., Wu, H., Eilber, F.R., Slamon, D.J. & Anderson, L. (2011). *Genes Chromosomes Cancer*, **50**, 95-112.
- Testa, J.R. & Bellacosa, A. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10983-5.
- Trotman, L.C., Alimonti, A., Scaglioni, P.P., Koutcher, J.A., Cordon-Cardo, C. & Pandolfi, P.P. (2006). *Nature*, **441**, 523-7.
- Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., Fotouhi, N. & Liu, E.A. (2004). *Science*, **303**, 844-8.
- Vivanco, I. & Sawyers, C.L. (2002). *Nat Rev Cancer*, **2**, 489-501.
- Vu, B.T. & Vassilev, L. (2011). *Curr Top Microbiol Immunol*, **348**, 151-72.
- Weaver, J., Downs-Kelly, E., Goldblum, J.R., Turner, S., Kulkarni, S., Tubbs, R.R., Rubin, B.P. & Skacel, M. (2008). *Mod Pathol*, **21**, 943-9.
- Weiss, S.W. & Goldblum, J.R. *Enzinger and Weiss' Soft Tissue Tumors*, 5th edn. Mosby Elsevier.
- Wibmer, C., Leithner, A., Zielonke, N., Sperl, M. & Windhager, R. (2010). *Ann Oncol*, **21**, 1106-11.
- Zhou, B.P., Liao, Y., Xia, W., Spohn, B., Lee, M.H. & Hung, M.C. (2001). *Nat Cell Biol*, **3**, 245-52.
- Zhu, Q.S., Ren, W., Korchin, B., Lahat, G., Dicker, A., Lu, Y., Mills, G., Pollock, R.E. & Lev, D. (2008). *Cancer Res*, **68**, 2895-903.