



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΩΝ
ΥΠΟΓΡΑΦΩΝ
ΕΚΦΡΑΣΗΣ MICRORNAS ΣΤΑ ΛΙΠΟΣΑΡΚΩΜΑΤΑ**

**ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**

**ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΣ – ΚΛΙΝΙΚΟΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΑΚΤΙΝΟΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΗΣ ΟΓΚΟΛΟΓΙΑΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟΣ ΤΟΜΕΑΣ
ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΗ ΚΛΙΝΙΚΗ**

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΩΝ
ΥΠΟΓΡΑΦΩΝ
ΕΚΦΡΑΣΗΣ MICRORNAS ΣΤΑ ΛΙΠΟΣΑΡΚΩΜΑΤΑ**

**ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ
ΠΑΘΟΛΟΓΟΣ ΟΓΚΟΛΟΓΟΣ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017

<<Η έγκριση της διδακτορικής μου διατριβής από την Ιατρική Σχολή του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν δηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν.5343/32, άρθρο 202 , παράγραφος 2 (νομική κατοχύρωση του Ιατρικού Τμήματος)

Ημερομηνία αίτησης του κ. Καποδίστρια Νικόλαου:12/2010

αρ.700α/21-12-2010 απόφασης γενικής συνέλευσης της Ιατρικής Σχολής

**Ημερομηνία ορισμού Τριμελούς Συμβουλευτικής επιτροπής:
10-01-2011**

Επιβλέπων

Ευάγγελος Μπριασούλης Καθηγητής Ογκολογίας Ιατρικής Σχολής
Ιωαννίνων

**Ημερομηνία αναπλήρωσης επιβλέποντα Τριμελούς Συμβουλευτικής
επιτροπής: 2/2017**

Τσέκερης Περικλής ,Καθηγητής Ακτινοθεραπείας του Τμήματος
Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Μέλη

Μπατιστάτου Άννα Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας Ιατρικής
Σχολής Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Καραβασίλης Βασίλης Επίκουρος Καθηγητής Ογκολογίας Ιατρικής
Σχολής Θεσσαλονίκης

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 6/2011

*«Διερεύνηση διαγνωστικών και προγνωστικών υπογραφών έκφρασης microRNAs
στα λιπτοσαρκώματα»*,

Διορισμός επταμελούς εξεταστικής επιτροπής :4358/07-06-2017

Μπατιστάτου Άννα, Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας του
Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Τσέκερης Περικλής, Καθηγητής Ακτινοθεραπείας του Τμήματος
Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Γούσια Άννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής
Ανατομίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Μήτσης Μιχαήλ, Αναπληρωτής Καθηγητής Χειρουργικής-
Μεταμοσχεύσεων του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου
Ιωαννίνων

Καραβασίλης Βασίλειος, Επίκουρος Καθηγητής Παθολογίας-Ογκολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης.

Καψάλη Ελένη, Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Πάκος Αιμίλιος, Επίκουρος Καθηγητής Ορθοπαιδικής-Βιολογικής Μηχανικής του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων

Ευχαριστίες

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον Καθηγητή Ογκολογίας Ευάγγελο Μπριασούλη , για την ευκαιρία και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε να πραγματοποιήσω την παρούσα διατριβή και με την βοήθειά του σε όλα τα επίπεδα , τόσο στο επιστημονικό όσο και μεθοδολογικό προσέγγισα την βαθειά γνώση της Ογκολογίας από το κλινικό έως το μοριακό επίπεδο. Επίσης ο κ.Μπριασούλης επηρέασε με την υψηλή επιστημονική του γνώση , το ήθος του , την καλή του προαίρεση και την επιστημονική του αυτοθυσία όσους συνεργάστηκαν μαζί του ,φυσικά και έμενα , και η συγκεκριμένη διατριβή είναι αφιερωμένη σε αυτόν. Μπορεί η απώλεια του να είναι δυσαναπλήρωτη αλλά το έργο του συνεχίζει να υπάρχει και να κατευθύνει εμάς τους νέους παθολόγους ογκολόγους .

Ευχαριστώ τον Καθηγητή Ακτινοθεραπείας κ.Περικλή Τσέκερη για την καθοδήγηση ,την βοήθεια του στην ολοκλήρωση , και την εξαιρετική συνεργασία στην περάτωση του δύσκολου αυτού θέματος μέσα από την σημαντική εμπειρία που έχει στον τομέα αυτό.

Επισής ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς επιτροπής Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομίας κα.Άννα Μπατιστάτου για την βοήθεια ,την εμπιστοσύνη και προθυμία σε όλα τα στάδια της διατριβής να συνδράμει στην αντιμετώπιση οποιασδήποτε δυσκολίας μου καθώς και τον Επίκουρο Καθ. Παθολογικής Ογκολογίας κ. Βασίλη Καραβασίλη για το συνεχές ενδιαφέρον του για την θετική εξέλιξη της Διατριβής μου.

Ακόμη ευχαριστώ τους Αναπληρωτή Καθηγητή Χειρουργικής-Μεταμοσχεύσεων Μιχάλη Μήτση , Επίκουρη Καθηγήτρια Αιματολογίας Ελένη Καψάλη ,Επίκουρο Καθηγητή Ορθοπαιδικής Αιμίλιο Πάκο και Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Παθολογικής Ανατομικής Άννα Γούσια για την τιμή που μου έκαναν να συμμετέχουν στην εξεταστική επιτροπή

Επισής τον Καθηγητή Κλινικής Βιοχημείας κ. Ανδρέα Σκορίλα για την τεχνική βοήθεια, την επιστοσύνη του και την πίστη για την θετική έκβαση και ολοκλήρωση ενός θέματος μοριακής ογκολογίας από κλινικό ογκολόγο ,αλλά ταυτόχρονα και τον εξαιρετικό βιολόγο κ.Κώστα Μαυρίδη για την επικοινωνία, στενή και αψόγη συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια , μέσα από την οποία κατάλαβα την γοητεία και σημασία του

εργαστηρίου στην σύγχρονη κλινική ογκολογία και χάριν στην οποία προήλθε ένα εντυπωσιακό αποτέλεσμα.

Τέλος , θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την στήριξη όλα αυτά τα χρόνια και την γυναίκα μου και την κόρη μου για την αγάπη τους ,την υπομονή τους και την βοήθεια τους ώστε να ολοκληρωθεί την συγκεκριμένη έρευνα .

Θα ήθελα να κλείσω με κάτι που συχνά μου έλεγε ο Βαγγέλης Μπριασούλης στις συναντήσεις στην Βιοτράπεζα και το οποίο κράτησα:

«Πάντα να ανοίγεις τους επιστημονικούς σου ορίζοντες »,

Στο Βαγγέλη Μπριασούλη

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΧΕΤΙΖΟΜΕΝΕΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΑ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά (πλήρη άρθρα)

1. Kapodistrias N, Mavridis K, Batistatou A, Gogou P, Karavasilis V, Sainis I, Briasoulis E, Scorilas A. Assessing the clinical value of microRNAs in formalin-fixed paraffin-embedded liposarcoma tissues: Overexpressed miR-155 is an indicator of poor prognosis. *Oncotarget*. 2016 Dec 28.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ MIRNA ΣΤΑ ΛΙΠΟΣΑΡΚΩΜΑΤΑ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	23
1.1Γενικά-σαρκώματα	23
1.2 Ιστοπαθολογικοί τύποι σαρκωμάτων μαλακών μορίων	23
2.ΛΙΠΟΣΑΡΚΩΜΑΤΑ	24
2.1.Γενικά	24
2.2 Επιδημιολογία	24
2.3 Ταξινόμηση λιποσαρκωμάτων κατά WHO	24
2.4 Ιστολογία των λιποσαρκωμάτων	26
2.5 Μοριακή διαγνωστική	28
2.6 Βαθμός κακοήθειας-grading	30
2.7 Αιτιολογία και παθογένεση	31
2.8 Κλινική εικόνα	32
2.9 Διάγνωση	34
2.10 Βιοψία	37
2.11 Σταδιοποίηση	37
2.12 Προγνωστικοί παράγοντες	39
2.13 Στα παιδιά	40
2.14 Θεραπεία λιποσαρκωμάτων	41
2.14.1Χειρουργική θεραπεία	41
2.14.2Ακτινοθεραπεία	42
2.14.3 χημειοθεραπεία	50
3.MICRORNAS ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ ΣΑΡΚΩΜΑΤΩΝ-ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΑ ΜΟΡΙΑ	
3.1 Εισαγωγή-σκοπός βιβλιογραφικής ανασκόπησης	55

3.2 Λιποσάρκωμα	57
3.3 Ινοσάρκωμα	60
3.4 Επιθηλιοειδές σάρκωμα	61
3.5 Λειομυοσάρκωμα	62
3.6 Ραβδομυοσάρκωμα (RMS)(εμβρυικό, κυψελιδικό,πλειόμορφο)	65
3.7 Αγγειοσάρκωμα	69
3.8 Οι κακοήθεις όγκοι των ελύτρων των περιφερικών νεύρων	70
3.9 Οστεοσάρκωμα	72
3.9.1 Mirnas σε συσχέτιση με την ολική επιβίωση σε οστεοσάρκωμα	72
3.9.2 MiRnas σε αυξημένη ρύθμιση σχετιζόμενα με κακή έκβαση νόσου σε οστεοσάρκωμα	76
3.9.3 MiRna σε μειωμένη ρύθμιση σχετιζόμενα με κακή έκβαση νόσου σε οστεοσάρκωμα.	77
3.9.4 Mirnas με στόχευση σε μοριακούς παράγοντες	79
I.Γενικά	79
II.Ογκοκατασταλτικά miRNAs	79
α.Επίδραση σε παράγοντες του διάμεσου ιστού	79
β.Επίδραση σε πρωτείνες και υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης	80
γ.Επίδραση στον κυτταροσκελετό/κυτταροκίνηση	82
δ.Επίδραση στην ακετυλίωση /απακετυλίωση	83
ε.Επίδραση στην απόπτωση	83
στ.Επίδραση σε μοριακούς παράγοντες και οδούς σήματος	84
ζ.Επίδραση σε ενζύμα μεταβολισμού λιπιδίων	86
η.Επίδραση στη διαφοροποίηση	87
θ.Σχέση με πρωτείνες σύντηξης	88
ι.Η δράση του Let 7	88
κ.Επίδραση στο ογκογονίδιο Cmyc	89
λ.Επίδραση στο ογκογονίδιο MET	89
μ.Επίδραση σε κινάσες/GTPάσες	90
ν.Επίδραση σε μεταγραφικούς παράγοντες	92
ξ.Επίδραση στη βλαστική ικανότητα των CSCs	94
ο.Επίδραση στην μεθυλίωση	95
π.Mirnas με ρόλο στο σχήμα και κινητικότητα των κυττάρων	95
ρ.Σχέση με την αγγειογένεση	95
σ.Σχέση με αυτοφαγία	96

III.Ογκογεννή miRnas	97
α.Γενικά	97
β.Μείωση της απόπτωσης	98
γ.MiRnas που καταστέλουν ογκοκατασταλτικά γονίδια	100
3.9.5 MiRnas σχετιζόμενα με θεραπευτική δράση σε οστεοσάρκωμα	102
I.LNA and mimics	102
II.Mirnas σχετιζόμενα με καλή ανταπόκριση στη θεραπεία	103
III.Mirnas σχετιζόμενα με κακή ανταπόκριση στη θεραπεία	105
IV.Επαγωγή έκφρασης miRnas με τη θεραπεία	107
3.9.6 MiRnas σχετιζόμενα με σηματοδοτικά μονοπάτια	107
3.9.7 Μεταφορά των miRnas, συσχέτιση με μετάσταση , διαφορική διάγνωση,κλωνικότητα , σύγκριση των όγκων.	109
3.10 Συνοβιακό σαρκωμα	111
3.11 Πρωτογενείς νευροεκτοδερμικοί όγκοι(PNET) / εξωσκελετικός ewing όγκος	113
3.12 Στρωματικοί όγκοι γαστρεντερικού (gist)	118

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	123
4.1Εισαγωγή-σκοπός	114
4.2 Υλικά και μέθοδοι	126
4.2.1 Δείγματα ιστού λιποσαρκωμάτων και λιπωμάτων: Κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά	126
4.2.2 Ομογενοποίηση των δειγμάτων ιστού FFPE και συνολική εκχύλιση του RNA	129
4.2.3 Πολυαδενυλίωση του ολικού RNA και την αντίστροφη μεταγραφή	130
4.2.4 Ποσοτική PCR για την ανάλυση της έκφρασης των miRNAs υποψηφίου αναφοράς και miRNAs στόχου	130
4.2.5 Εξετάζοντας κατάλληλα μόρια για κανονικοποίηση της έκφρασης των miRNAs σε λιποσάρκωμα μέσω συνδιασμένης Genorm και NormFinder προσέγγισης	132
4.2.6 Έλεγχος ποιότητας	133
4.2.7 Βιοστατιστικές αναλύσεις	135

4.3 Αποτελέσματα	136
4.3.1 Ο συνδυασμός των miR-103 και miR-191 επίπεδων είναι κατάλληλος για κανονικοποίηση της έκφρασης των miRNAs στο λιποσάρκωμα	136
4.3.2 Τα miRNAs -155,-21,-145, -143 και -451 εκφράζονται διαφορετικά μεταξύ των δειγμάτων λιποσαρκωμάτων και λιπωμάτων	140
4.3.3 Τα miR-155 και miR-21 παρουσιάζουν διακριτά πρότυπα έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών υποτύπων των όγκων LPS, και επίσης το miR-155 υπερεκφράζεται σε όγκους grade III	143
4.3.4 MiR-155 συνδέεται με δυσμενή ογκολογική έκβαση σε ασθενείς με λιποσάρκωμα	145
4.3.5 MiR-155 αντιπροσωπεύει ένα νέο ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα δυσμενούς πρόγνωσης σε LPS	153
4.4 Συμπεράσματα	157
5.ΣΥΝΟΨΗ	160
6.ΠΕΡΙΛΗΨΗ	161
7.ABSTRACT	163
8.BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	165

ΚΥΡΙΟΤΕΡΕΣ ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ :

STS: σαρκώματα μαλακών μορίων

LPS: λιποσαρκώματα

ALT: άτυπος λυπωματώδης όγκος

LPM: λίπωμα

WDLPS: καλά διαφοροποιημένο λιποσάρκωμα

DDLPS: αποδιαφοροποιημένο λιποσάρκωμα

MLPS: μυξοειδές λιποσάρκωμα

PLPS: πλειόμορφο λιποσάρκωμα

MPNST: κακοήθεις όγκοι των ελύτρων των περιφερικών νεύρων

OSS: Οστεοσάρκωμα

SS: Συνοβιακό σαρκωμα

PNET: Πρωτογενείς νευροεκτοδερμικοί όγκοι

ES: όγκος ewing

GIST: Στρωματικοί όγκοι γαστρεντερικού

OS: ολική επιβίωση

RFS: ελεύθερη υποτροπής επιβίωση

PFS: ελεύθερη προόδου νόσου επιβίωση

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1Γενικά-σαρκώματα

Τα σαρκώματα είναι μια σπάνια και ετερογενή ομάδα κακοήθων όγκων μεσεγχυματικής προέλευσης που περιλαμβάνουν λιγότερο από το 1% τοις εκατό όλων των κακοηθειών των ενήλικων και το 12% τοις εκατό των παιδιατρικών καρκίνων [1-3]. Περίπου το 80 % των σαρκωμάτων προέρχονται από μαλακό ιστό και τα υπόλοιπα από οστίτη ιστό ,ενώ περίπου 12.500 νέες περιπτώσεις σάρκωμάτων μαλακών μορίων διαγιγνώσκονται κάθε χρόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες, με 5000 περιπτώσεις θανάτων [3].

Το ιστοπαθολογικό φάσμα των σαρκωμάτων είναι ευρύ, προφανώς επειδή τα εμβρυϊκά μεσεγχυματικά κύτταρα από τα οποία προέρχονται έχουν την ικανότητα να ωριμάζουν προς γραμμωτό σκελετικό και λείο μυϊκό ιστό , σε λιπώδη και στον ινώδη ιστό, των οστών, και των χόνδρων. Περιλαμβάνονται επίσης οι κακοήθεις όγκοι των περιφερικών νεύρων, παρά το γεγονός ότι είναι εξωδερμικής προέλευσης, λόγω των ομοιοτήτων τους στην κλινική συμπεριφορά, την αντιμετώπιση, και στο αποτέλεσμα. Οι γαστρεντερικοί στρωματικοί όγκοι (GIST), περιλαμβάνονται επίσης .

1.2 Ιστοπαθολογικοί τύποι σαρκωμάτων μαλακών μορίων (STS)

Όπως έχει χαρακτηριστεί από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (ΠΟΥ), η ομάδα των σαρκωμάτων μαλακών μορίων περιλαμβάνει περισσότερους από 100 διαφορετικούς ιστολογικούς υποτύπους [2]. Οι πιο κοινοί υποτύποι στους ενήλικες περιγράφονται στον πίνακα [πίνακας 1].Ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας κατατάσσει τα σαρκώματα των μαλακών ιστών , σύμφωνα με τον κατά τεκμήριο ιστό προέλευσης [2]. Παραδείγματα περιλαμβάνουν το λιποσάρκωμα (LPS), συνοβιακό σάρκωμα (SS), λειομυοσάρκωμα (LMS), ραβδομυοσάρκωμα (RMS), ινοσάρκωμα (FS) και αγγειοσάρκωμα(AGS). Σε ορισμένες περιπτώσεις, η ιστογένεση είναι αβέβαιη και η ονομασία αντανακλά την μορφολογική εμφάνιση ή το αρχιτεκτονικό σχέδιο των κυττάρων (π.χ. κυψελιδικό σάρκωμα μαλακών μορίων , επιθηλιοειδές σάρκωμα, σάρκωμα Ewing).

Πίνακας 1.Οι πιο κοινοί ιστολογικοί υπότυποι σαρκωμάτων μαλακών μορίων στους ενήλικες

Undifferentiated unclassified sarcoma (with pleomorphic, round cell, and spindle cell variants)
Liposarcoma
Leiomyosarcoma
Synovial sarcoma
Malignant peripheral nerve sheath tumor
Rhabdomyosarcoma
Fibrosarcoma
Primitive neuroectodermal tumor/extraskkeletal Ewing tumor
Angiosarcoma
Epithelioid sarcoma
Clear cell sarcoma
Alveolar soft part sarcoma
Malignant mesenchymoma

2.ΛΙΠΟΣΑΡΚΩΜΑΤΑ

2.1.Γενικά

Το λιποσάρκωμα είναι ένα σάρκωμα που αναπτύσσεται σε λιποκύτταρα των εν βάθυ μαλακών ιστών, όπως αυτών στο εσωτερικό του μηρού ή στο οπισθοπεριτόναϊο[4]. Είναι συνήθως μεγάλοι ογκώδεις όγκοι, και τείνουν να έχουν πολλαπλούς μικρότερους δορυφόρους όγκους. Τα λιποσαρκώματα, όπως και όλα τα σαρκώματα, είναι σπάνια [5].

2.2 Επιδημιολογία

Στις Ηνωμένες Πολιτείες τα λιποσαρκώματα εμφανίζονται σε περίπου 4.000 ασθενείς ανά έτος, και η μέση ηλικία των ασθενών στην εμφανισή τους είναι τα 50 έτη. Ωστόσο, στα παιδιά, τα λιποσαρκώματα αντιπροσωπεύουν λιγότερο από το 5% του συνόλου των σαρκώματων μαλακών μορίων και έχουν αναφερθεί λιγότερες από 60 περιπτώσεις. Η ετήσια επίπτωση είναι 2,5 περιπτώσεις ανά εκατομμύριο πληθυσμού, κάνοντας το λιποσάρκωμα να είναι το πιο κοινό σάρκωμα μαλακών ιστών. Το λιποσάρκωμα αντιπροσωπεύει περίπου το 17-20% όλων των σαρκωμάτων μαλακών μορίων με τον κορμό και τα κάτω άκρα να είναι οι πιο πιθανές τοποθεσίες της ανάπτυξης του όγκου αυτού. Μόνο το 3% όλων των λιποσαρκωμάτων εμφανίζονται στην περιοχή της κεφαλής και του τραχήλου [6], με την στοματική εντόπιση να είναι αρκετά σπάνια, μιας και από το έτος 2000, λιγότερες από 50 περιπτώσεις έχουν αναφερθεί. Καμία συσχέτιση με τη φυλή ή τη γεωγραφία δεν είναι γνωστή. Ανάλογα με το φύλο τα λιποσαρκώματα είναι ελαφρώς πιο συχνά στους άνδρες από ό, τι στις γυναίκες. Περιπτώσεις λιποσαρκωμάτων έχουν επίσης αναφερθεί σε νεαρούς ενήλικες και εφήβους [7].

2.3 Ταξινόμηση λιποσαρκωμάτων κατά WHO

Η πιο πρόσφατη ταξινόμηση του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας των όγκων μαλακών ιστών αναγνωρίζει 5 κατηγορίες λιποσαρκωμάτων [8]: 1. Τον άτυπο λιποματώδη όγκο/καλά διαφοροποιημένο λιποσάρκωμα-ενδιάμεσης κακοήθειας (τοπικά επιθετικός όγκος) 2. Το αποδιαφοροποιημένο λιποσάρκωμα 3. Το μυξοειδές λιποσάρκωμα 4. Το πλειόμορφο λιποσάρκωμα και 5. Το μη καθορισμένο, λιποσάρκωμα.

Η τρέχουσα ταξινόμηση δεν περιλαμβάνει πλέον το μικτού τύπου λιποσάρκωμα. Ο άτυπος λιποματώδης όγκος (ALT) είναι χωρισμένος σε 3 κύριες υποομάδες: το λιποκυτταρικό, το σκληρυντικό και το φλεγμονώδη υπότυπο. Η περιγραφή έως ατρακτοκυτταρικό λιποσάρκωμα εξακολουθεί να εμφανίζεται. Η έλλειψη MDM2 ανοσοθετικότητας ή 12q15 ενίσχυσης σε αυτόν τον υπότυπο του όγκου προτείνει ότι το ατρακτοκυτταρικό λιποσάρκωμα αντιπροσωπεύει μια ξεχωριστή ομάδα. Το ατρακτοκυτταρικό λιποσάρκωμα, θα πρέπει να διακρίνεται από ένα αποδιαφοροποιημένο λιποσάρκωμα με μεταστατικό δυναμικό και από ένα καλοήθες ατρακτοκυτταρικό λίπωμα.

Στα αποδιαφοροποιημένα λιποσάρκωμα η νέα προσθήκη σε αυτό το είδος λιποσαρκώματος είναι η αναγνώριση της σπάνιας κατάστασης στην οποία τα υψηλού βαθμού κακοήθειας στοιχεία (των αποδιαφοροποιημένων) παρουσιάζουν λιποβλαστική διαφοροποίηση και μοιάζουν στο πλειόμορφο λιποσάρκωμα. Αυτό το φαινόμενο αναφέρεται ως "ομόλογη λιποβλαστική διαφοροποίηση" ή «πλειομορφικό λιποσάρκωμα. Τα στρογγυλοκυτταρικά λιποσάρκωμα αντιπροσωπεύουν το υψηλής κακοήθειας ομόλογο του μυξοειδούς λιποσάρκωματος ,το οποίο δεν χρησιμοποιείται πλέον ως όρος .Η πρόοδος της κυτταρογενετικής και μοριακής έρευνας συμβάλουν στην καλύτερη κατηγοριοποίηση αυτού του υποσυνόλου των μεσεγχυματικών νεοπλασμάτων. [9, 10, 11]

Τέλος η ανατομική κατανομή των λιποσάρκωμάτων φαίνεται να σχετίζεται εν μέρει με τον ιστολογικό τύπο. Το καλά διαφοροποιημένο λιποσάρκωμα τείνει να εμφανίζεται σε εν τω βαθυ μαλακούς ιστούς τόσο των άκρων όσο και του οπισθοπεριτοναϊκού χώρου. Το μυξοειδές (ή και στρογγυλοκυτταρικό) και το πλειόμορφο λιποσαρκώμα εμφανίζονται κυρίως στα άκρα, ενώ το αποδιαφοροποιημένα λιποσάρκωμα κυρίως στην οπισθοπεριτοναϊκό χώρο.

2.4 Ιστολογία των λιποσαρκωμάτων

Γενικά

Η διάγνωση στα σαρκώματα μαλακών μορίων γενικά γίνεται με βάση το μορφολογικό πρότυπο . Η ανοσοϊστοχημική χρώση (IHC) βοηθά συχνά στην ταυτοποίηση του υποθετικού ιστού προέλευσης. Μερικοί από τους ανοσοϊστοχημικούς δείκτες είναι περισσότερο χαρακτηριστικοί από άλλους , και το φάσμα των δεικτών που εξετάζονται είναι αυτό που προσδιορίζει την ιστολογική του υποτύπου:

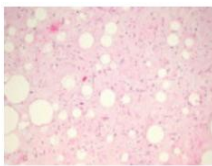
- Η δεσμίνη είναι ιδιαίτερα πολύτιμη στον προσδιορισμό της μυογονικής διαφοροποίησης(στο ραβδομυοσάρκωμα και, σε μικρότερο βαθμό, στο λειομυοσάρκωμα).
- Η παρουσία του αντιγόνου S100 και νευρονημάτια υποδεικνύουν κύτταρα που προκύπτουν από νευρωνική θήκη.
- Οι κυτοκερατίνες μπορεί να βοηθήσουν στη διάκριση μεταξύ συνοβιακού ή επιθηλιοειδούς σάρκωματος τα οποία περιέχουν κυτοκερατίνη και των ινοσαρκωμάτων που δεν περιέχουν .

- Το αντιγόνο σχετιζόμενο με τον παράγοντα VIII εντοπίζει όγκους ενδοθηλιακής προέλευσης.

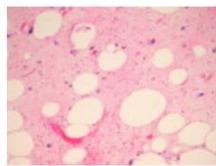
Ιστολογία του λιποσάρκωματος

Το λιποσάρκωμα είναι όγκοι παραγόμενοι από λιπώδη ιστό που έχουν ένα ευρύ φάσμα μορφολογίας. Το καλά διαφοροποιημένο λιποσάρκωμα δείχνει χαρακτηριστικά παρόμοια με λίπωματος, με ένα μίγμα φυσιολογικού ιστού όπου εμφανίζονται λιποκύτταρα αναμεμειγμένα με άτυπα λιποκύτταρα (Εικόνα 1.1, 1.2). Τα άτυπα κύτταρα είναι υπερχρωματικά, πλειομορφά και ακανόνιστα. Επιπλέον, οι λιποβλάστες που βρίσκονται συνήθως, έχουν ένα πολυκενοτοπιώδες κυτταρόπλασμα στο οποίο τα κενοτόπια παραμορφώνουν τον άτυπο πυρήνα (Εικόνα 1.3, 1.4). Υπάρχει λιγότερο συχνά στο καλά διαφοροποιημένο λιποσάρκωμα, μια παραλλαγή σκληρυντικού τύπου (Εικόνα 1.5).

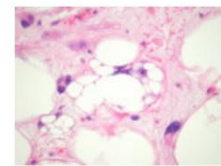
Εικόνα 1. Παθολογοανατομία του λιποσαρκώματος



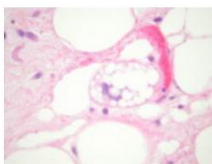
Εικόνα 1.1



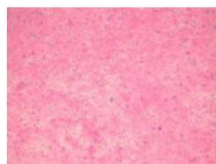
Εικόνα 1.2



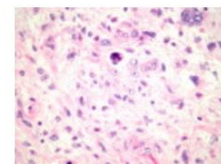
Εικόνα 1.3



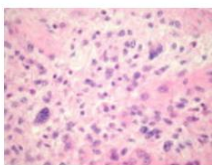
Εικόνα 1.4



Εικόνα 1.5



Εικόνα 1.6



Εικόνα 1.7

Τα πλειόμορφα λιποσάρκωματα μπορεί να είναι δύσκολο να αναγνωριστούν ως λιπωματώδους προέλευσης (σχήματα 1.6, 1.7). Αυτά αποτελούνται από ανοικτά άτυπα μεσεγχυματικά κυτταρά συχνά με πολυάριθμες μιτώσεις και νέκρωσεις. Τα αποδιαφοροποιημένα

λιποσάρκωματα ορίζονται ως ένα καλά διαφοροποιημένο λιποσάρκωμα με αποδιαφοροποίηση σε ένα σάρκωμα με μια διαφορετική μορφολογία. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η εξεύρεση των καλά διαφοροποιημένων περιοχών είναι κρίσιμη για τη διάγνωση. Στο μυξοειδές λιποσάρκωμα το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του όγκου είναι ότι αποτελείται από άφθονη εναπόθεση βλέννης και δικτυωτό τριχοειδές δικτύο [12].

Ειδικές μελέτες για λιποσάρκωμα

Οι ανοσοϊστοχημικές χρώσεις για MDM2 και, σε μικρότερο βαθμό, CDK2 είναι θετικές σε λιποσάρκωμα. Μοριακές τεχνικές (συνήθως FISH ή PCR) χρησιμοποιούνται επίσης ευρέως.

Διαφορική διάγνωση του λιποσάρκωματος

Η διάκριση μεταξύ λιπώματος και καλά διαφοροποιημένου λιποσάρκωματος μπορεί να είναι εξαιρετικά δύσκολη. Οι λιποβλάστες, οι μιτώσεις και βοηθητικές μελέτες για MDM2 και CDK2 μπορεί να είναι πολύ χρήσιμες στη διαφοροδιάγνωση. Επίσης η πρωτογενής δερματική εντόπιση ή το επιφανειακό υποδόριο λιποσάρκωμα είναι πολύ σπάνια [13]. Στα άλλα σαρκώματα ο προσδιορισμός των λιπώδους διαφοροποίησης είναι χρήσιμη για τη διάκριση λιποσάρκωματος από άλλα σαρκώματα. Εκτεταμένες τομές στα αδιαφοροποίητα σαρκώματα συνιστάται για τον αποκλείσιμο εστιακών περιοχών λιπώδους διαφοροποίησης.

2.5 Μοριακή διαγνωστική

Ένας αριθμός ιστολογικών υποτύπων στα σαρκώματα σχετίζονται με ειδικές χρωμοσωμικές μετατοπίσεις, και μοριακές τεχνικές συμπεριλαμβανομένων, *in situ* υβριδοποίηση φθορισμού [FISH] και αντίστροφη μεταγραφή και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης [RT-PCR] για την ανίχνευση των πρωτεϊνικών προϊόντων σύντηξης των γονιδίων μπορούν να βοηθήσουν στη διάγνωση αυτών των όγκων. Βάσει αυτών των μοριακών μεθόδων μπορούν να τροποποιηθούν ειδικές ιστολογικές διαγνώσεις [14], λαμβάνοντας ωστόσο υπόψη τις κλινικές πληροφορίες που παρέχονται. Η δοκιμή FISH μπορεί να είναι καθοριστική στη διάγνωση ενός συγκεκριμένου τύπου σαρκώματος, σε ορισμένες περιπτώσεις, όταν η ιστολογία και ανοσοϊστοχημεία παραμένουν διαφορούμενες (π.χ., συνοβιακό σάρκωμα). Όταν μια μετατόπιση που σχετίζεται με όγκο είναι εξαιρετικά ύποπτη με βάση την

κλινική εικόνα (π.χ., σάρκωμα Ewing), απαιτείται φρέσκος ιστός για κυτταρογενετική ανάλυση κατά τη στιγμή της βιοψίας σε συνεννόηση με τον παθολόγοανατομο.

Στα λιποσαρκώματα οι τρεις κύριες μορφολογικές υποομάδες είναι το καλά διαφοροποιημένο/αποδιαφοροποιημένο, το μυξοειδές/στρογγυλοκυτταρικό, και το πλειόμορφο [15,16]. Υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία από βιολογικής συμπεριφοράς μεταξύ αυτών των υποτύπων, που εκτείνονται από το καλά διαφοροποιημένο λιποσαρκώμα με χαμηλό μεταστατικό δυναμικό και το στρογγυλοκυτταρικό υψηλού κινδύνου ή πλειόμορφο, τα οποία συνδέονται με ένα υψηλό ποσοστό απομακρυσμένων μεταστάσεων [17].

Τα καλά διαφοροποιημένα λιποσαρκώματα των άκρων η του κορμού αναφέρονται συχνά ως «άτυπα λιπώματα" στα οποία η εκτομή είναι συνήθως θεραπευτική και η πιθανότητα για μεταστάσεις είναι πολύ μικρή , σε σύγκριση με τα αντίστοιχα του οπισθοπεριτοναίου, μεσοθωρακίου, και σπερματικού τόνου [18]. Η μεταστατική τάση των διαφόρων υποτύπων των λιποσαρκωμάτων είναι επίσης ιδιαίτερη , με το μυξοειδές / στρογγυλοκυτταρικό και αποδιαφοροποιημένο λιποσάρκωμα να δίνει μεταστάσεις πιο συχνά σε λιπώδεις περιοχές των ακρών , ενώ το πλειόμορφο λιποσάρκωμα ή αδιαφοροποίητα λιποσαρκώματα να εμφανίζουν μεταστάσεις στο ήπαρ ή στους πνεύμονες .

Η κλινική αυτή συμπεριφορά αντανακλάται σε μοριακό και σε κυτταρογενετικό επίπεδο. Το μυξοειδές και στρογγυλοκύτταρο λιποσαρκώμα μοιράζονται την ίδια αμοιβαία αντιμετάθεση t(12;16)(q13;p11), στην οποία το γονίδιο CHOP (DDIT3 , ή GADD153) εισάγεται πλησίον ενός νέου γονιδίου που ονομάζεται FUS ή TLS ,μετατρέπόμενο σε λιποσάρκωμα. Ενώ συγκεκριμένες χρωμοσωμικές αντιμεταθέσεις δεν έχουν εντοπιστεί σε καλά διαφοροποιημένα ή αποδιαφοροποιημένα λιποσαρκώματα, αντίθετα η ενίσχυση MDM2 και CDK4 είναι πολύ συχνή σε αυτούς τους υποτύπους, και η αναγνώρισή τους μπορεί να είναι χρήσιμη διαγνωστικά. Επιπλέον, η υπερέκφραση του MDM2 και CDK4 είναι επίσης αντικείμενο εκμετάλλευσης για θεραπευτικούς σκοπούς [16],[19]. Τα πλειόμορφα λιποσαρκώματα γενετικά μοιάζουν περισσότερο με τις πλειομορφικές παραλλαγές των αδιαφοροποίητων / αταξινόμητων σαρκώματων.

2.6 Βαθμός κακοήθειας-grading

Πολλά συστήματα ταξινόμησης έχουν αναπτυχθεί για να αυξηθεί η προγνωστική αξία της ιστολογικής αξιολόγησης, μερικά από τα οποία χρησιμοποιούν ένα σύστημα τριών βαθμίδων (δηλαδή, grade 1 [καλής διαφοροποίησης, χαμηλού βαθμού], grade 2 [μετρίου διαφοροποίησης] ή grade 3 [χαμηλής διαφοροποίησης, υψηλού βαθμού]), και άλλα ένα σύστημα τεσσάρων βαθμίδων. Το τριών βαθμίδων σύστημα έχει ενσωματωθεί στο σύστημα σταδιοποίησης AJCC TNM για τα σαρκώματα μαλακών μορίων και προτιμάται [20,21].

Το σύστημα ταξινόμησης της Γαλλικής Ομοσπονδίας Καρκινικών Κέντρων των Ομάδων Σαρκώματος (FNCLCC) προτιμάται από το Σύστημα του Κολεγίου των Αμερικανών (AJCC) Παθολογοανατόμων, η οποία βασίζεται σε τρεις παραμέτρους: τη διαφοροποίηση, μιτωτική δραστηριότητα, και τη νέκρωση [22,23]. Η ταξινόμηση θα πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο για το μη θεραπευμένο πρωτοπαθές λιποσαρκώμα μαλακών μορίων. Η ιστολογική βαθμίδα δεν κάνει διάκριση μεταξύ καλοήθων και κακοήθων όγκων των μαλακών μορίων και δεν αποτελεί υποκατάστατο της μορφολογικής διάγνωσης [πίνακας 2].

Η ταξινόμηση δεν είναι εφαρμόσιμη σε όλα τα σαρκώματα των μαλακών ιστών. Έχει μικρή προγνωστική αξία για το MPNST (η πλειοψηφία των οποίων θεωρούνται υψηλής κακοήθειας [24]), και δεν συνιστάται για την ταξινόμηση στο αγγειοσάρκωμα, το κυψελιδικό σαρκώμα, εξωσκελετικό μυξοειδές χονδροσάρκωμα, διαυγοκυτταρικό σάρκωμα, και επιθηλιοειδές σάρκωμα [20, 21].

[Πίνακας 2]

Comparison of the NCI and FNCLCC systems for the histological grading of liposarcoma		
Histological type	NCI grading system	FNCLCC grading system
Well differentiated liposarcoma	1+(*)	1
Myxoid liposarcoma	1+	2
High grade myxoid liposarcoma 2-(**) 3 (round cell liposarcoma)	2-(**)	3
Pleomorphic liposarcoma	3	3
Dedifferentiated liposarcoma	3	3
(*) + grade is attributed by a combination of histological type, cellularity, pleomorphism and mitotic rate		
(**)- grade is attributed according to the extent of tumour necrosis (< or > 15%)		

2.7 Αιτιολογία και παθογένεση

Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις, τα σαρκώματα φαίνεται να προκύπτουν de novo και όχι από κάποια προϋπάρχουσα καλοήγη βλάβη το ίδιο ισχύει και για τα λιποσαρκώματα. Στις περισσότερες περιπτώσεις δεν έχει καθοριστεί καμία σαφής αιτιολογία, αλλά μια σειρά από συναφείς ή προδιαθεσικούς παράγοντες. Λόγω της σπανιότητας των σαρκωμάτων μαλακών μορίων (STS) περισσότερες μελέτες ασχολούνται με όλη την ομάδα των STS. Τα αίτια των STS είναι μόνο ελάχιστα κατανοητά και η παθογένεση βασίζεται σε διάφορους κληρονομικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες καθώς επίσης, σε προϋπάρχουσες συνθήκες [25, 26, 27]. Μεταξύ των περιβαλλοντικών παραγόντων η έκθεση σε ιοντίζουσα ακτινοβολία, συμπεριλαμβανομένων το thorotrast, αλκυλιωτικοί παράγοντες, τα φυτοφάρμακα και τα φάρμακα αρσενικού, το βινυλοχλωρίδιο, ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, λοίμωξη από τον ιό της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV), τον ιό έρπητα τύπου 8 και αναβολικά. Τα στεροειδή επίσης περιγράφονται ως παράγοντες κινδύνου. Άλλες χημικές ουσίες όπως ζιζανιοκτόνα φενοξιδίων, διοξίνες και

χλωροφαινόλη είναι πιθανοί παράγοντες κινδύνου[28, 29]. Κληρονομικές παθήσεις που σχετίζονται με STS είναι το σύνδρομο Li-Fraumeni, νευροϊνωμάτωση Type1, σύνδρομο του Gardner, ρετινοβλάστωμα, το σύνδρομο Werner και σύνδρομο σπίλου βασικοκυτταρικό καρκίνωμα (Gorlin του σύνδρομο). Προϋπάρχουσες ιατρικές καταστάσεις όπως μακροχρόνιο λεμφοειδήμα (σύνδρομο Stewart-Treves) μπορούν επίσης να προκαλέσουν σάρκωμα [25]. Αρκετές περιπτώσεις με τραύμα που προηγείται της ανάπτυξης STS έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, αλλά δεν υπάρχει καμία απόδειξη αιτιώδους σχέσης [30].

2.8 Κλινική εικόνα

Εντόπιση

Γενικά τα σαρκώματα μαλακών μορίων εμφανίζονται σε όλα τα ανατομικά σημεία του σώματος, αλλά η πλειοψηφία αυτών παρουσιάζεται στα άκρα. Η ανατομική κατανομή των σαρκωμάτων μαλακών μορίων σε 4550 ενήλικες που αναλύθηκαν από το Αμερικανικό Κολλέγιο της Χειρουργικής είχε ως εξής [31]:

- 46% στους μηρούς, γλουτούς και βουβωνική χώρα
- 13% στα άνω άκρα
- 18% στον κορμό
- 13% στο Οπισθοπεριτόναιο
- 9% στην κεφαλή και τραχήλο

Ορισμένοι ιστολογικοί τύποι σαρκώματος μαλακών μορίων έχουν μια προδιάθεση να εντοπίζονται σε ορισμένες ανατομικές θέσεις[32,33].

Η ανατομική κατανομή των ιστολογικών υποτύπων των σαρκωμάτων δεν σχετίζονται με την εντόπιση του ιστού απο τον οποίο προέρχονται. Τα λιποσαρκώματα δεν εντοπίζονται συχνά στο κοιλιακό τοιχώμα όπου ο λίπωδης ιστός αφθονεί ,αντίθετα εμφανίζονται στο μηρό, μια συχνή τους τοποθεσία, προκύπτοντας στην εν τω βάθου μυϊκή μάζα, και όχι στο υποδόριο λίπος. Η κλινική εικόνα των λιποσαρκωμάτων εξαρτάται από την εντόπιση του όγκου. Τα λιποσαρκώματα παρουσιάζονται στα άκρα και στην επιφάνεια του κορμού σαν μια εν τω βάθου μάζα, συχνά μεγάλου μεγέθους, ανώδυνη ή με ήπιο ή μέτριο πόνο και λειτουργικές διαταραχές. Τα οπισθοπεριτοναϊκά λιποσαρκώματα τείνουν να διαγιγνώσκονται αργότερα, λόγω σοβαρών εντερικών

συμπτωμάτων όπως προοδευτική κοιλιακή διάταση, άλγος, ανορεξία, εμετό και εντερική ή ουρική απόφραξη.

Πρότυπο ανάπτυξης

Τα λιποσαρκώματα αναπτύσσονται με ταχύτητα ανάλογα με την επιθετικότητα του όγκου. Οι όγκοι τείνουν να αυξάνονται κατά μήκος των επιπέδων του ιστού τους και σπάνια διασχίζουν ή παραβιάζουν τα επίπεδα της περιτονίας ή των οστών. Ο αυξανόμενος όγκος συμπιέζει τον περιβάλλοντα φυσιολογικό ιστό και οδηγεί στο σχηματισμό ψευδοκάψας που αποτελείται από συμπιεσμένο φυσιολογικό ιστό με σαφώς καθορισμένο περιθώριο και στενόμακρες προεξοχές όγκου οι οποίες διηθούν παρακείμενους ιστούς. Η εκτομή κατά μήκος του επιπέδου της ψευδοκάψας θα αφήσει πάντα υπολειμματική νόσο και πρέπει να αποφεύγεται.

Πρότυπο εξάπλωσης

Η πιο συχνή μορφή εξάπλωση είναι η αιματογενής διασπορά , κυρίως στον πνεύμονα. Η παρουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων κατά τα στιγμής της αρχικής διάγνωσης είναι ασυνήθιστο αλλά πιθανό σε μεγάλα, εν τω βαθύ , υψηλής κακοήθειας λιποσαρκώματα, με συγκεκριμένες ιστολογίες (πχ. στρογγυλοκυτταρικό) [34]. Γενικά στα σαρκώματα παρατηρείται:

- Η συχνότητα εμφάνισης απομακρυσμένης μεταστατικής νόσου κατά τον χρόνο της διάγνωσης είναι 10%, και το 83% αυτών των μεταστάσεων βρίσκονταν στους πνεύμονες.
- Υψηλότερος κίνδυνος μεταστάσεων στον πνεύμονα σε όγκους που ήταν βαθιά στην περιτονία (9% έναντι 4%).
- Ο κίνδυνος πνευμονικών μεταστάσεων κατά τη διάγνωση αυξάνεται επίσης σε σαρκώματα υψηλού βαθμού ιστολογικής κακοήθειας (12%, 7%, και 1,2 % για υψηλής κακοήθειας, ενδιάμεσης, και χαμηλής αντίστοιχα).

Προσβολή λεμφαδένων

Μεταστάσεις στους λεμφαδένες είναι σπάνιες στα λιποσάρκωματα σε σχέση με αλλά σαρκώματα (ραβδομυοσάρκωμα, αρθρικό σάρκωμα, επιθηλιοειδής σάρκωμα, αγγειοσαρκώμα) [36]. Οι

λεμφαδενικές μεταστάσεις φέρουν κακή πρόγνωση, αλλά λιγότερο από όταν εμφανίζονται οι αιματογενείς μεταστάσεις σε STS [35,36].

Μοτίβο της υποτροπής

Συνολικά, περίπου το 25% των ασθενών με σάρκωμα θα αναπτύξουν απομακρυσμένη μεταστατική νόσο μετά από επιτυχή θεραπεία του πρωτογενούς τους όγκου και η επίπτωση αυξάνει σε 40 % έως 50% σε όγκους που είναι > 5 cm σε μέγεθος, βαθιά στην περιτονία, και στους ενδιάμεσου ή υψηλού βαθμού κακοήθειας [37]. Στο 70% έως 80% τοις εκατό των περιπτώσεων, η μεταστατική νόσος είναι στους πνεύμονες [38]. Σπάνιες θέσεις μεταστατικής εξάπλωσης περιλαμβάνουν το δέρμα, μαλακά μόρια, οστά, ήπαρ και εγκεφάλος [39,40,41,42]. Εξαιρεση αποτελεί το στρογγύλοκυτταρικό/μυξοειδές λιποσάρκωμα όπου εξωπνευμονικές μεταστάσεις στο οπισθοπεριτόναιο, κοιλιά, οστά (κυρίως τη σπονδυλική στήλη), και στα παρασπονδυλικά μαλακά μορια είναι κοινές [43,44]. Αντίθετα, οπισθοπεριτοναϊκά λιποσαρκώματα, σχεδόν όλα τα καλά διαφοροποιημένα και τα αποδιαφοροποιημένα, θα υποτροπιάσουν τοποπεριοχικά αντί με μεταστατική εξάπλωση.

2.9 Διάγνωση

Η αρχική αξιολόγηση ξεκινά από το κλινικό ιστορικό, το χρόνο που η μάζα παρατηρήθηκε για πρώτη φορά, το ρυθμό αύξησης της, και αν υπάρχουν συμπτώματα που να υποδηλώνουν νευροαγγειακή διήθηση. Η φυσική εξέταση θα πρέπει να επικεντρωθεί στο μέγεθος και το βάθος της μάζας, τη διήθηση παρακείμενων δομών ύπαρξη οίδηματος ή σημεία νευρολογικού υπολείμματος. Η καθυστέρηση στη διάγνωση του σαρκώματος μαλακών μορίων είναι κοινή. Οι ασθενείς συχνά δεν αναζητούν άμεση ιατρική φροντίδα λόγω της ανώδυνης φύσης του όγκου.

Διαφορική διάγνωση

Η διαφορική διάγνωση μιας μάζας μαλακών ιστών περιλαμβάνουν καλοήθεις όγκους των μαλακών ιστών, όπως ένα λίπωμα, καθώς και κακοήθεις όγκους, συμπεριλαμβανομένων σαρκωμάτων, μεταστατικό καρκίνωμα, μελάνωμα ή λέμφωμα. Το Υπουργείο Υγείας του Ηνωμένου Βασιλείου έχει δημοσιεύσει κριτήρια για την επείγουσα παραπομπή ενός ασθενούς με ύποπτη αλλοίωση μαλακών μορίων [45]:

- μαλακή μάζα ιστού > 5cm (μέγεθος μπάλας του γκολφ ή μεγαλύτερο)
- Επώδυνη μάζα
- Μάζα που αυξάνεται σε μέγεθος
- Μάζα οποιουδήποτε μεγέθους που είναι βαθιά στην μυική περιτονία
- Επανεμφάνιση μάζας μετά από προηγούμενη εκτομή

Σε μια προοπτική μελέτη 365 ασθενών με επιβεβαιωμένο σάρκωμα μαλακών μορίων, το βάθος του όγκου βρέθηκε να είναι ο πιο ευαίσθητος δείκτης κακοήθειας, όπου ακολουθείται από το μέγεθος > 5 cm, και με το ιστορικό ταχείας ανάπτυξης [46].

Επειδή η διάγνωση του σαρκόματος μαλακών μορίων είναι συχνά απρόβλεπτη και απρογραμματίστη, ακατάλληλες εκτομές των όγκων συμβαίνουν συχνά πριν γίνει σωστά η παθολογοανατομική διάγνωση [47]. Υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης μεταστατικής νόσου έχει αναφερθεί σε ασθενείς με αρχικά μερική εκτομή του όγκου πριν από την παραπομπή σε τριτοβάθμια κέντρο [48], και επαναληπτική εκτομή μπορεί να συνεπάγεται μια μεγαλύτερη διαδικασία. Μελέτες έχουν δείξει βελτίωση των αποτελεσμάτων σε ασθενείς που έλαβαν θεραπεία σε ένα κέντρο εξειδικευμένο για σάρκωμα [49].

Απεικονιστική μελέτη

Διάφορες τεχνικές απεικόνισης χρησιμοποιούνται για να βοηθήσουν στον καθορισμό της αιτιολογίας μιας μάζας μαλακών μορίων, τον καθορισμό του βαθμού επέκτασης ενός πρωτοπαθούς όγκου για τον χειρουργικό σχεδιασμό, και της παρουσίας ή απουσίας μεταστατικής νόσου.

Απλή ακτινογραφία. Η απλή ακτινογραφία της πρωτογενούς θέσης μπορεί να είναι χρήσιμη για να αποκλείσει μάζες μαλακών μορίων που προκύπτουν από τα οστά και την ανίχνευση ενδοογκικών αποτιτανώσεων, όπως αυτές που εμφανίζονται εντός των μαλακών ιστών (εξωσκελετικά) σε οστεοσαρκώματα και συνοβιακά σαρκώματα.

MRI και CT. Η MRI είναι η προτιμώμενη μέθοδος απεικόνισης για την αξιολόγηση μαλακών μαζών των άκρων, του κορμού, της κεφαλής και του τραχηλού, ενώ η CT είναι η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική απεικόνισης για οπισθοπεριτοναϊκά σαρκώματα. Η MRI υπερέχει για την οριοθέτηση της έκτασης του νεοπλασματος και τη σχέση με τις γύρω δομές [50,51]. Ωστόσο, σε μια

πολυκεντρική προοπτική μελέτη που συνέκρινε τις δυο μεθόδους σε σαρκώματα μαλακών μορίων διαφόρων περιοχών, δε βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο όσον αφορά τον καθορισμό της συμμετοχής του όγκου στους μύες, στα οστά, τις αρθρώσεις, ή νευροαγγειακές δομές [52].

PET και PET / CT. Μια σειρά από μελέτες αναφέρουν ότι PET και PET/CT χρησιμοποιώντας φθοροδεοξυγλυκόζη (FDG) μπορούν να διακρίνουν καλοήθεις όγκους μαλακών μορίων από σαρκώματα, με την μεγαλύτερη ευαισθησία για τα υψηλής κακοήθειας σαρκώματα [53]. Ωστόσο, η ικανότητα να διαφοροποιηθούν οι καλοήθεις όγκοι μαλακών μορίων από τα χαμηλής ή ενδιάμεσης κακοήθειας σαρκώματα είναι περιορισμένη [54]. Το NCCN προτείνει ότι PET scan μπορεί να είναι χρήσιμο στην πρόγνωση, σταδιοποίηση και τον προσδιορισμό της απάντησης στην εισαγωγική χημειοθεραπεία σε ασθενείς με σάρκωμα μαλακών μορίων κυρίως υψηλής κακοήθειας [55]. Η MRI ωστόσο θεωρείται πιο χρήσιμη για την ανίχνευση τοπικών υποτροπών [56].

Αξιολόγηση για μεταστατικής νόσου

Τοσο η αξονική τομογραφία (CT) όσο και ακτινογραφία θώρακος (CXR) θεωρούνται το ίδιο κατάλληλες απεικονιστικές μέθοδοι για την ανίχνευση μεταστάσεων στον πνεύμονα σύμφωνα το Αμερικανικό Κολέγιο Ακτινολογίας [57], με μικρή μόνο διαφορά στην ευαισθησία. Η αξονική τομογραφία κοιλιάς και πυέλου, συνιστάται για την αξιολόγηση μεταστατικής νόσου σε στρογγυλοκυτταρικό/μυξοειδές λιποσαρκώμα λόγω εμφάνισης συχνά εξωπνευμονικών μεταστάσεων στην κοιλιακή χώρα και οπισθοπεριτοναϊκό χώρο. Σπινθηρογράφημα οστών είναι χρήσιμο για την αρχική σταδιοποίηση σε ενήλικες ασθενείς με στρογγυλόκυτταρικό / μυξοειδές λιποσαρκώμα εξαιτίας των συχνών οστικών μεταστάσεων ενώ η MRI είναι η συνιστώμενη μέθοδος απεικόνισης για τους συμπτωματικούς ασθενείς [58]. Στη μεταστατική νόσο το PET είναι λιγότερο ευαίσθητο ,σε αρκετές αναφορές, από ότι η CT θώρακος για την ανίχνευση πνευμονικών μεταστάσεων σε ασθενείς με σάρκωμα [59] και κυρίως για βλάβες κάτω του ενός εκατοστού με αρνητικό το PET [60]. Το όφελος του PET είναι η ικανότητά του να ανιχνεύει πρόσθετες εστίες εξωπνευμονικής μεταστατικής νόσου [61]. Ωστόσο, ο κίνδυνος εξωπνευμονικών μεταστάσεων είναι τόσο χαμηλός, ώστε το PET ή PET/CT δεν συνιστάται στην αρχική σταδιοποίηση του

σαρκώματος των μαλακών μορίων για την αξιολόγηση είτε πνευμονικής ή εξωπνευμονικής μεταστατικής νόσου.

2.10 Βιοψία

Η ιστολογική εξέταση μιας μάζας μαλακών μορίων είναι απαραίτητη για τη διάγνωση και το σχεδιασμό της θεραπείας. Η βιοψία πρέπει να γίνεται αφού έχει πραγματοποιηθεί μαγνητική τομογραφία .

Βιοψία τομής (incizional). Η βιοψία τομής ήταν η κοινή διαδικασία για τη λήψη ιστού σε μια ύποπτη μάζα μαλακών μορίων για τη διάγνωση, ενώ η βιοψία πυρήνα δια βελόνης (core biopsy) χρησιμοποιείται τα τελευταία χρόνια. Η βιοψία που περιέχει αρκετό υλικό για να εξακριβωθεί ο ιστολογικός υπότυπος και βαθμός του όγκου είναι απαραίτητη πριν από την έναρξη της θεραπείας [62]. Εάν η οριστική διάγνωση μπορεί να απαιτήσει κυτταρογενετική, ή μοριακή ανάλυση για χρωμοσωμικές μετατοπίσεις η βιοψία τομής μπορεί να προτιμάται. Η επαρκής αιμόσταση είναι σημαντικό να αποφευχθεί η διάδοση των καρκινικών κυττάρων.

Βιοψία πυρήνα (Core needle) δια βελόνης .Η βιοψία πυρήνα δια βελόνης θεωρείται η προτιμώμενη μέθοδος για να επιτευχθεί μια αρχική βιοψία, λόγω της χαμηλής επίπτωσης στις επιπλοκές και την υψηλή διαγνωστική ακρίβεια [63].Υπο αξονικό ή υπερηχογραφική καθοδήγηση μπορεί να βοηθήσει στη βιοψία των βλαβών βαθιά, [64].

Αναρρόφηση με λεπτή βελόνα . Η FNA δεν συνιστάται κατά την αρχική διαγνωστική αξιολόγηση μιας ύποπτης μάζας μαλακών μορίων, καθώς έχει χαμηλότερη διαγνωστική ακρίβεια από βιοψία πυρήνα δια βελόνης [65].

2.11 Σταδιοποίηση

Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο σύστημα σταδιοποίησης για τα σαρκώματα μαλακών μορίων είναι το σύστημα TNM που αναπτύχθηκε από τη Διεθνή Ένωση κατά του Καρκίνου (UICC) και του Συνδέσμου της Αμερικανικής Επιτροπής για τον Καρκίνο (AJCC). Το σύστημα χρησιμοποιεί το μέγεθος του όγκου (T), το βάθος (επιπολής ή εν τω βαθύ), τη προσβολή ή όχι λεμφαδένων (N), παρουσία ή απουσία απομακρυσμένων μεταστάσεων (M), και τον ιστολογικό βαθμό

διαφοροποίησης (G) για τον προσδιορισμό του σταδίου των σαρκώματων μαλακών μορίων [πίνακας 3] [66].

Πίνακας 3

ΣΤΑΔΙΟΠΟΙΗΣΗ	
Πρωτοπαθής όγκος (T)	
TX	Πρωτοπαθής όγκος δεν μπορεί να εκτιμηθεί
T0	Χωρίς στοιχεία πρωτοπαθούς όγκου
T1	Όγκος 5 cm ή λιγότερο στη μεγαλύτερη του διάμετρο
T 1a	επιπολής όγκος
T 1b	Εν τω βάθει όγκος
T2	Όγκος πάνω από 5 εκ στη μεγαλύτερη του διάμετρο
T 2a	επιπολής όγκος
T 2b	Εν τω βάθει ογκος
Επιχώριοι λεμφαδένες (N)	
NX	Επιχώριοι λεμφαδένες δεν μπορούν να εκτιμηθούν
N0	Χωρίς μετάσταση σε επιχώριους λεμφαδένες
N1¶	Με μετάσταση σε επιχώριους λεμφαδένες
Απομακρυσμένες μεταστάσεις(M)	
M0	χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις
M1	Με απομακρυσμένες μεταστάσεις
Ιστολογικός βαθμός διαφοροποίησης (G)Δ	

GX	Ο βαθμός διαφοροποίησης δεν μπορεί να εκτιμηθεί
G1	Καλής διαφοροποίησης
G2	Μέτριας διαφοροποίησης
G3	Πτωχής διαφοροποίησης

Ανατομικό στάδιο/προγνωστικές ομάδες				
Stage	T1a	N0	M0	G1, GX
IA	T1b	N0	M0	G1, GX
Stage	T2a	N0	M0	G1, GX
IB	T2b	N0	M0	G1, GX
Stage	T1a	N0	M0	G2, G3
IIA	T1b	N0	M0	G2, G3
Stage	T2a	N0	M0	G2
IIB	T2b	N0	M0	G2
Stage	T2a, T2b	N0	M0	G3
III	Any T	N1	M0	Any G
Stage		Any		
IV	Any T	N	M1	Any G

Ένα πρόβλημα αυτής της σταδιοποίησης στο μέγεθος του όγκου είναι η διαβάθμιση μόνο σε ≤ 5 ή > 5 εκατοστά, ενώ τα στοιχεία δείχνουν ότι πολύ μεγάλοι όγκοι (> 10 cm) έχουν χειρότερη πρόγνωση από εκείνους που είναι 5 έως 10 cm [67]. Το σύστημα σταδιοποίησης AJCC δεν χρησιμοποιείται ευρέως σε σαρκώματα εκτός των άκρων . Επίσης δεν λαμβάνει υπόψιν την εντόπιση της νόσου ή τον ιστολογικό υπότυπο , δύο σημαντικούς προγνωστικούς δείκτες για τα λιποσαρκώματα .

2.12 Προγνωστικοί παράγοντες

Ένας αριθμός προγνωστικών παραγόντων έχει συσχετιστεί με ασθενείς με σάρκωμα μαλακών μορίων, από τα οποία το πιο σημαντικό είναι το παθολογοανατομικό στάδιο κατά το χρόνο της διάγνωσης [66]. Επίσης ο ιστολογικός βαθμός κακοήθειας (grade) και το μέγεθος του όγκου έχουν βρεθεί ως σταθεροί ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες [68].

Διάφοροι δυσμενείς προγνωστικοί παράγοντες για την τοπική υποτροπή και τον σχετιζόμενο με την νόσο θάνατο έχουν εντοπιστεί. Ο υψηλός βαθμός κακοήθειας και τα θετικά μικροσκοπικά όρια έχουν αναγνωρισθεί ως προφανείς δυσμενείς προγνωστικοί παράγοντες τοπικής υποτροπής στο λιποσάρκωμα [69,70]. Παράγοντες που σχετίζονται με τον όγκο, όπως η εντόπιση (χειρότερη πρόγνωση για οπισθοπεριτοναϊκό λιποσάρκωμα), το μέγεθος και το βάθος, το βαθμός κακοήθειας (grading), η παρουσία νέκρωσης στον όγκο, ο ιστολογικός υπότυπος, η εμφάνιση τοπικής υποτροπής, καθώς και παράγοντες που σχετίζονται με τη θεραπεία, όπως η μη ευρεία εκτομή, προσδιορίζονται ως δυσμενείς προγνωστικοί παράγοντες για θάνατο σχετιζόμενο από την νόσο [71, 72, 73, 74, 52, 56]. Οι προγνωστικοί παράγοντες της αγγειακής προσβολής και το διηθητικό πρότυπο ανάπτυξης, που αναγνωρίζονται ως παράγοντες κινδύνου για μεταστάσεις σε STS, δεν βρέθηκαν να είναι ανεξάρτητοι προγνωστικοί δείκτες του κλινικού αποτελέσματος σε μια μελέτη σχετικά με λιποσαρκώματα [12].

Επίσης η επικουρική ακτινοθεραπεία φαίνεται να προσδίδει όφελος επιβίωσης σε χαμηλής κακοήθειας όγκους, ενώ το πλειόμορφο λιποσάρκωμα και το στογγυλοκυτταρικό φαίνεται να έχουν την χειρότερη πρόγνωση σε σύγκριση με τους υπόλοιπους υποτύπους [75]. Η εκτίμηση της πρόγνωσης σε ασθενείς με σάρκωμα μαλακών ιστών και κατ'επέκταση και λιποσάρκωμα είναι σημαντική τόσο για την ατομική συμβουλευτική του ασθενούς καθώς επίσης και για τη θεραπευτική λήψη αποφάσεων [76-80].

2.13 Λιποσαρκώματα τα παιδιά

Στα σαρκώματα μαλακών μορίων των παιδιών όπου αποτελούν το 10 με 15 τοις εκατό όλων των περιπτώσεων, τα μικροκυτταρικά σαρκώματα με στρογγυλά μπλέ κύτταρα κυριαρχούν (π.χ., σάρκωμα

Ewing, εμβρυικό RMS, και περιφερική πρωτογενής νευροεξωδερμικής νεοπλασίας [PNET]).

Το λιποσάρκωμα είναι ένας από τους λιγότερο συχνούς τύπους μη ραβδομυοσαρκωματοειδούς σαρκώματος μαλακών μορίων της παιδικής ηλικίας και περιλαμβάνει λιγότερο από το 5% του συνόλου των σαρκώματων μαλακών ιστών στην παιδική ηλικία. [81,82]. Η χειρουργική εκτομή είναι ο πρωταρχική θεραπεία και η πρόγνωση εξαρτάται από τον ιστολογικό υπότυπο και τον βαθμό της εκτομής. Για τους ασθενείς με υπολειπόμενη νόσο, έχει χρησιμοποιηθεί ακτινοθεραπεία.

2.14 Θεραπεία λιποσαρκωμάτων

2.14.1 Χειρουργική θεραπεία

Η χειρουργική επέμβαση είναι η πιο σημαντική μορφή θεραπείας για τα λιποσαρκώματα όπως για όλα τα σαρκώματα. Η ευρεία τοπική εκτομή με καθαρά χειρουργικά όρια είναι σημαντική για τον τοπικό έλεγχο του όγκου. Ακολουθείται ο ορισμός των χειρουργικών ορίων που εισήγαγε ο Enneking το 1980 [84]. Μέχρι το 2006 τα όρια αναφέρονταν ως:

(1) Εντός της βλάβης όριο εκτομής, όταν η τομή περάσει στο εσωτερικό της βλάβης και μικροσκοπικά ή μακροσκοπικά αφέθηκε όγκος στο όριο της εκτομής.

(2) Οριακά όρια εκτομής, όταν η βλάβη αφαιρέθηκε σε ένα κομμάτι, αλλά η τομή ήταν μέσω της ψευδοκαψας ή του αντιδραστικού ιστού που περιβάλλει τη βλάβη.

(3) Ευρύ όριο εκτομής, όταν ο όγκος αφαιρέθηκε en bloc εντελώς, και περιβάλλεται από ένα περίβλημα φυσιολογικού ιστού, αλλά η τομή ήταν εντός του συμμετέχοντος διαμερίσματος.

(4) Μυική εκτομή σημαίνει ότι ο μυς στο οποίο βρισκόταν ο όγκος αφαιρέθηκε χωρίς να ανοίγεται η περιτονία του.

(5) Τμηματική εκτομή πραγματοποιείται όταν ο όγκος που συμμετέχει του διαμερίσματος πέρα από του διαφράγματος της περιτονίας του εμπλεκόμενου διαμερίσματος, αφαιρείται en bloc.

Από το 2006 έχει υπάρξει μια τροποποίηση στις ταξινομήσεις των ορίων ως εξής:

(1)Θετικά όρια, σημαίνει ότι ένα καταφανές τμήμα όγκου ή μικροσκοπικά όγκος αφήνεται στο όριο, στο οποίο αναφέρεται.

(2) Αρνητικό όριο, σημαίνει ότι δεν υπάρχει μικροσκοπικά όγκος στο όριο. Η έκταση του ορίου αναφέρεται.Περισσότερο από 20 mm φυσιολογικού ιστού γύρω από τον όγκο, ή την περιτονία που περιβάλλει πλήρως τον όγκο ταξινομείται ως , ευρύ όριο εκτομής .

Όπως αποδεικνύει και μια πρόσφατη από τις μεγαλύτερες αναφορές για λιποσαρκώματα των ακρών και του κορμού μετά από χειρουργική εκτομή για την πενταετής ειδική της νόσου επιβίωση (DSS), για την ελεύθερη νόσου επιβίωση (DFS), και την χωρίς τοπική υποτροπή επιβίωση (LRFS) τα ποσοστά ήταν: 80%, 58% και 75%, αντίστοιχα. Τα ποσοστά της πενταετούς ελεύθερης τοπικής υποτροπής επιβίωση για τον πρωτογεννή έναντι τον κλινικά υποτροπιάζοντα όγκο έναντι υπολείμματικού όγκου μετά από ριζική εκτομή ήταν: 86,1%, 52,1% και 73,3%, αντίστοιχα. Ανεξάρτητη αρνητικοί προγνωστικοί παράγοντες για την DSS ήταν το AJCC Στάδιο \geq Ib, για την DFS ήταν το grade III , η κλινική υποτροπή, και η διήθηση του δέρματος ενώ για το LRFS ήταν η κλινική υποτροπή και η R1 εκτομή[83].

Η χειρουργική εκτομή για τα οπισθοπεριτοναϊκά λιποσάρκωμα (RPLS) με αρνητικό 'οριο εκτομή είναι η μόνη μορφή θεραπείας που παρέχει πιθανότητα ίασης , ενώ η χημειοθεραπεία και/ή ακτινοθεραπεία (RT) χωρίς χειρουργική επέμβαση είναι σπανίως ευεργετικές, είτε χρησιμοποιούνται μόνοι ή σε συνδυασμό [85]. Ωστόσο, το μεγάλο μέγεθος, η ανατομική θέση και τη διεισδυτικότητα των RPLS αποτρέπει συχνά από την επίτευξη επαρκούς χειρουργικού ορίου. Επίσης, τα RPLS τείνει να εμφανίζουν υψηλό ποσοστό τοπικής υποτροπής ακόμη και σε περιπτώσεις με αρνητικά χειρουργικά όρια [86]. Δημοσιεύση δεδομένων αναδρομικής μελέτης που χρησιμοποιήθηκε μόνο χειρουργική επέμβαση έχουν αναφερθεί με ποσοστό 5-ετούς τοπικού ελέγχου (LC) ως επί το πλείστον κάτω από το 50% [87].

2.14.2 Ακτινοθεραπεία (RT)

Η ακτινοθεραπεία μπορεί να χορηγείται όπως σε όλα τα σαρκώματα έτσι και στα λιποσαρκώματα είτε ως ριζική, ή προεγχειρητική, ή μετεγχειρητική-συμπληρωματική θεραπεία. Η

συνολικά χορηγούμενη δόση ακτινοβολήσης καθορίζεται με βάση τη σχετική ανοχή του ακτινοβολούμενου ιστού . Νεότερες τεχνικές RT, όπως βραχυθεραπεία, διεγχειρητική ακτινοθεραπεία (IORT), και ακτινοθεραπεία με διαμορφούμενης έντασης δέσμη ακτινοβολήσης (IMRT) οδήγησαν στη βελτίωση των αποτελεσμάτων της θεραπείας σε ασθενείς με STS .Η βραχυθεραπεία περιλαμβάνει την άμεση εφαρμογή των ραδιενεργών εμφυτευμάτων στην κοίτη του όγκου μέσω καθετήρων που τοποθετούνται κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης. Οι επιλογές περιλαμβάνουν χαμηλού ρυθμού δόσης βραχυθεραπεία (LDR) ,κλασματοποιημένη υψηλού ρυθμού δόσης βραχυθεραπεία (HDR), ή διεγχειρητική βραχυθεραπεία HDR. Η LDR και HDR ραδιοθεραπεία συνδέονται με παρόμοια ποσοστά όσον αφορά τον τοπικό έλεγχο της νόσου [88]. Έχει προταθεί ότι η εφαρμογή HDR βραχυθεραπείας μπορεί να σχετίζεται με μικρότερη τοξικότητα,ωστόσο, αυτό δεν έχει αποδειχθεί σε τυχαιοποιημένες κλινικές μελετες [88]. Το κύριο πλεονέκτημα της εφαρμογής ακτινοθεραπείας με την τεχνική IMRT είναι η δυνατότητα χορήγησης της ακτινοβολίας με μεγαλύτερη ακρίβεια (σύμμορφη ακτινοβολήση) χορηγώντας υψηλή δόση στη περιοχή ενδιαφέροντος (όγκος , κοίτη όγκου) με ταυτόχρονη χορήγηση μειωμένης δόσης στους γύρω φυσιολογικούς ιστούς [89]. Επιπλέον, η εφαρμογή ακτινοθεραπείας καθοδηγούμενης από εικόνα (τεχνική IGRT) παρέχει την δυνατότητα ακτινοβολήσης με ακόμα μεγαλύτερη ακρίβεια [90] .Η IORT είναι η παροχή ακτινοβολίας κατά τη διάρκεια της χειρουργικής επέμβασης και μπορεί να εκτελεστεί χρησιμοποιώντας διαφορετικές τεχνικές, όπως εξωτερική ακτινοβολήση της χειρουργικής κοίτης με δέσμη ηλεκτρονίων ή η ακτινοβολήση της με την εφαρμογή καθετήρων (ενδοιστική βραχυθεραπεία) [91].

Η προεγχειρητική-εισαγωγική RT μπορεί να μειώσει τη διασπορά της νόσου κατά τη διάρκεια της χειρουργικών χειρισμών. Είναι επίσης δυνατή η σύμκρυνση του όγκου και η δυνατότητα χειρουργικής εξαίρεσης του. Με την ακτινοθεραπεία η ψευδοκάψα που περιβάλλει τον όγκο είναι δυνατόν να καταστεί ακυτταρική με αποτέλεσμα την διευκόλυνση της εκτομής του μειώνοντας τον κίνδυνο διασποράς της νόσου [92-94]. Τα περισσότερα Κέντρα περιλαμβάνουν ολόκληρη την χειρουργική κοίτη εντός του πεδίου ακτινοθεραπείας. Το κύριο μειονέκτημα της προεγχειρητικής RT, ωστόσο, είναι η επίδρασή της επί της επούλωσης του τραύματος [95,96].

Η μετεγχειρητική RT συνδέεται με υψηλότερα ποσοστά απώτερων παρενεργειών σχετιζόμενων με τη θεραπεία. Σε μια αναδρομική μελέτη, αν και δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά ως προς το αποτέλεσμα από την εφαρμογή προ ή μετεγχειρητικής ακτινοθεραπείας, παρατηρήθηκε μικρή αύξηση στην εκδήλωση απώτερων ανεπιθύμητων παρενεργειών σχετιζόμενων με την εφαρμογή μετεγχειρητικής ακτινοθεραπείας. Αυτό θα μπορούσε να συσχετίσει κυρίως με την χορήγηση υψηλότερης συνολικής δόσης ακτινοβολίας κατά την εφαρμογή μετεγχειρητικής ακτινοθεραπείας [97]. Θετικά χειρουργικά όρια συνδέονται με υψηλότερα ποσοστά τοπικών υπότροπων [98]. Η μετεγχειρητική ακτινοθεραπεία φαίνεται ότι βελτιώνει τον τοπικό έλεγχο της νόσου σε ασθενείς με θετικά χειρουργικά όρια [99]. Σε ασθενείς με θετικά χειρουργικά όρια, δόσεις ΑΚΘ > 64 Gy, μικροσκοπικά θετικά όρια, επιφανειακή θέση, και εντόπιση στα άκρα συνδέονται με καλύτερο τοπικό έλεγχο. Στα λιποσαρκώματα, η ακτινοθεραπεία μπορεί να είναι σημαντική συμπληρωματική θεραπεία μετά από χειρουργική εξαίρεση, ιδιαίτερα στον μυξοειδές υπότυπο.

Η εφαρμογή συμπληρωματικής (boost) ακτινοβολίας μετεγχειρητικά με δόση της τάξης των 16 Gy έχει χρησιμοποιηθεί σε ασθενείς με θετικά χειρουργικά όρια. Ωστόσο, τα αποτελέσματα μιας αναδρομικής μελέτης έδειξε ότι η μετεγχειρητική boost ΑΚΘ δεν παρείχε κανένα πλεονέκτημα στην πρόληψη της τοπικής υποτροπής σε ορισμένους ασθενείς με θετικά χειρουργικά όρια. Σε αυτούς τους ασθενείς περιλαμβάνονταν ασθενείς με όγκους χαμηλού βαθμού κακοήθειας, καλά διαφοροποιημένα λιποσαρκώματα και εστιακά θετικά χειρουργικά όρια σε ανατομικά σταθερές δομές [100]. Ομοίως, σε μια άλλη αναδρομική μελέτη ομάδας ασθενών με STS των άκρων δεν βρέθηκε κανένα επιπλέον όφελος από την εφαρμογή boost ακτινοθεραπείας μετεγχειρητικά, κατά την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων όσον αφορά την τοπική υποτροπή, απομακρυσμένες μετάστασεις, και τη θνησιμότητα [101]. Η παρεμβολή χρονικού διαστήματος πέραν των 8 εβδομάδων μεταξύ της χειρουργικής επέμβασης και της εφαρμογής μετεγχειρητικής ακτινοθεραπείας δεν ενδείκνυται λόγω της ανάπτυξης ίνωσης, καθώς επίσης και της πιθανότητας επαναπληθυσμοποίησης (repopulation) των κυττάρων του όγκου.

Ακτινοθεραπεία σαρκωμάτων μαλακών μορίων των άκρων, επιφάνειας κορμού, ή Κεφαλής και Τραχήλου

Τα δεδομένα από τυχαιοποιημένες μελετες [102,103] και αναδρομικές αναλύσεις [104-106] υποστηρίζουν τη χρήση της προεγχειρητικής ή μετεγχειρητικής εξωτερικής δέσμης RT (EBRT) σε κατάλληλα επιλεγμένους ασθενείς. Η βραχυθεραπεία (μόνη της ή σε συνδυασμό με EBRT) [107,108] και IMRT [109,110] έχουν επίσης αξιολογηθεί ως συμπληρωματικές της χειρουργικής επέμβασης.

Σε μία φάσης III τυχαιοποιημένη μελέτη που διεξήχθη από το Canadian Sarcoma Group , τα ποσοστά του τοπικού έλεγχου και PFS ήταν παρόμοια σε ασθενείς που έλαβαν είτε προεγχειρητικά ή μετεγχειρητικά RT σε ασθενείς με εντοπισμένη πρωτοπαθή ή υποτροπιάζουσα νόσο [111]. Ωστόσο, η προεγχειρητική RT συνδέεται με τη μεγαλύτερη συχνότητα εμφάνισης οξείας επιπλοκής του τραύματος και οι απώτερες σχετιζόμενες με τη θεραπεία ανεπιθύμητες ενέργειες ήταν πιο συχνές σε ασθενείς που έλαβαν μετεγχειρητική RT [112]. Σε μία περισσότερο πρόσφατη μελέτη φάσης II, αναφέρεται ότι η προεγχειρητική ακτινοθεραπεία με την τεχνική IMRT οδήγησε σε χαμηλότερο ποσοστό εμφάνισης επιπλοκών τραύματος σε ασθενείς με υψηλής κακοήθειας βλάβες (30,5% έναντι 43% που αναφέρθηκαν σε προηγούμενη μελέτη χρησιμοποιώντας συμβατική EBRT) [113].

Η αποτελεσματικότητα της μετεγχειρητικής EBRT μετά από χειρουργική επέμβαση διάσωσης μέλους αποδείχθηκε σε μια προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη (91 ασθενείς με υψηλού βαθμού κακοήθειας αλλοιώσεις και 51 ασθενείς με χαμηλού βαθμού αλλοιώσεις) [114]. Η μετεγχειρητική RT μείωσε σημαντικά το ποσοστό τοπικής υποτροπής στα 10 χρόνια μεταξύ των ασθενών με υψηλού βαθμού κακοήθειας αλλοιώσεων (δεν υπάρχουν τοπικές υποτροπές σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση και ΑΚΘ έναντι 22% σε αυτούς που υποβλήθηκαν σε χειρουργική επέμβαση μόνο , $P = 0.0028$). Μεταξύ των ασθενών με χαμηλού βαθμού κακοήθειας βλάβες και υψηλού, τα αντίστοιχα ποσοστά υποτροπής ήταν 5% και 32%,αντιστοίχως αλλά η πιθανότητα της μείωσης των ποσοστών της τοπικής υποτροπής σε

ασθενείς που έλαβαν EBRT δεν ήταν σημαντική σε ασθενείς με χαμηλού βαθμού κακοήθειας αλλοιώσεων. Τα αποτελέσματα 20 ετών παρακολούθησης ευνοούν τους ασθενείς που έλαβαν EBRT, αλλά οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές. Η δεκαετής ολική επιβίωση (OS) ήταν 77% και 82% για ασθενείς που έλαβαν μόνο χειρουργική επέμβαση έναντι αυτών που έλαβαν συνδυασμένη χειρουργική και εξωτερική ακτινοθεραπεία. Η 20-ετής συνολική OS των ασθενών ήταν 71% και 64% για αυτές τις ομάδες, αντίστοιχα (P =.22) [114].

Σε μια μελέτη από το Memorial Sloan Kettering, (MSKCC) που εξέτασε τις μακροπρόθεσμα αποτελέσματα 200 ασθενών που έλαβαν θεραπεία με χειρουργική επέμβαση διάσωσης του άκρου, παθολογοανατομικά αρνητικές επανεκτομές, χωρίς RT, συνδέθηκαν με ένα 5-ετές συνολικό τοπικό ποσοστό υποτροπής της τάξης του 9%, σε μια διάμεση παρακολούθηση 82 μηνών [115]. Η μεγάλη ηλικία ή / και το στάδιο III της νόσου συσχετίστηκαν με υψηλότερο ποσοστό τοπικής υποτροπής. Η γαλλική Ομάδα Σαρκώματος δημοσίευσε πρόσφατα τα αποτελέσματα όσον αφορά 283 ασθενείς με χειρουργικά εξαιρεσίμους άτυπα λιποματώδης όγκους /καλά διαφοροποιημένου λιποσαρκώματος των άκρων ή επιφάνειας κορμού, από την Conticabase βάση δεδομένων. Σε αυτούς τους ασθενείς, η μετεγχειρητική RT βελτίωσε σημαντικά την 5ετή τοπική RFS (98,3% έναντι 80,3%, με ή χωρίς συμπληρωματική RT, αντίστοιχα; P <0.001) [116]. Μαζί με την ΑΚΘ, η εντόπιση του όγκου και η το όριο εκτομής ήταν προβλεπτικοί παράγοντες του χρόνου τοπικής υποτροπής.

Σε μία προοπτική τυχαιοποιημένη μελέτη, 164 ασθενών με πλήρη εκτομή STS των άκρων ή επιφάνειας κορμού τυχαιοποιήθηκαν διεγχειρητικά να λάβουν είτε βραχυθεραπεία είτε όχι [117]. Με μέσο χρόνο παρακολούθησης 76 μηνών, τα ποσοστά του 5 ετούς τοπικού έλεγχου ήταν 82% και 69% στις ομάδες της βραχυθεραπείας και μη, αντίστοιχα. Οι ασθενείς με υψηλού βαθμού κακοήθειας αλλοιώσεις που έλαβαν βραχυθεραπεία είχαν υψηλότερα ποσοστά τοπικού ελέγχου σύγκριτικά με εκείνους που δεν έλαβαν βραχυθεραπεία (89% και 66%, αντίστοιχα). Ωστόσο, η βραχυθεραπεία δεν είχε καμία επίπτωση στον τοπικό έλεγχο σε ασθενείς με χαμηλού βαθμού κακοήθειας αλλοιώσεων. Τα ποσοστά της 5-ετούς ελεύθερης απομακρυσμένων υποτροπών ήταν 83% και 76%, αντίστοιχα, στις δύο ομάδες. Σε μια αναδρομική μελέτη από 202 ενήλικες ασθενείς με πρωτοπαθή STS υψηλής κακοήθειας των

άκρων, η βραχυθεραπεία μαζί με χειρουργική επέμβαση διατήρησης των άκρων, είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερα ποσοστά επιπλοκών του τραύματος, ευνοϊκό 5 ετή τοπικό έλεγχο, καθώς και ευνοϊκά ποσοστά απομακρυσμένης RFS και OS (84%, 63% και 70%, αντίστοιχα) [118].

Σε μια αναδρομική μελέτη 41 ασθενείς με STS των άκρων που αντιμετωπίστηκαν με χειρουργική επέμβαση διάσωσης του μέλους, η εφαρμογή μετεγχειρητικής IMRT οδήγησε σε ποσοστό 5-ετούς τοπικού ελέγχου 94%, σε ασθενείς με αρνητικά καθώς και με θετικά ή εγγύς χειρουργικά όρια, και σε επιλεγμένους ασθενείς με υψηλού κινδύνου χαρακτηριστικά [119]. Σε μια μη τυχαιοποιημένη μελέτη σύγκρισης της τεχνικής IMRT και βραχυθεραπείας σε ασθενείς με υψηλής κακοηθείας, πρωτογεννές μη μεταστατικό STS των άκρων, στον τοπικό έλεγχο η IMRT ήταν σημαντικά καλύτερη συγκριτικά με την βραχυθεραπεία (τοπικά ποσοστά ελέγχου 5 ετών ήταν 92% και 81%, αντίστοιχα, $P = 0,04$) παρά τα υψηλότερα ποσοστά των ανεπιθύμητων παρενεργιών για την IMRT [120].

Πρόσφατες εκθέσεις από μια αναδρομική μελέτη δείχνουν ότι η εφαρμογή διεγχειρητικής ακτινοθεραπείας (IORT) παρέχει εξαιρετικό τοπικό έλεγχο σε STS των ακρών [121]. Αναφέρεται πρόσφατα στην μακροπρόθεσμη έκβαση των ασθενών με STS άνω άκρων που αντιμετωπίζονται με EBRT, χειρουργική επέμβαση, και IORT. Τα 10-ετή ποσοστά ελέγχου της τοπικής υποτροπής και η OS ήταν 88% και 58%, αντίστοιχα [122]. Τα 10-ετή ποσοστά τοπικού ελέγχου ήταν 89% και 86%, αντίστοιχα, σε ασθενείς με αρνητικό όριο (R0) και θετικό όριο (R1 και R2) εκτομής. Η IORT επίσης εξετάστηκε αναδρομικά επίσης σε ομάδες ασθενών με STS του κορμού ή των άκρων που έλαβαν χειρουργική επέμβαση, IORT, και EBRT σε 3 Ισπανικά Κέντρα [123]. Ο πενταετής για την IORT έλεγχος στο πεδίο ήταν 86% και 70% για τα άκρα και το τοιχώμα του κορμού των STS, αντίστοιχα. Ωστόσο, η 5-ετής DFS ήταν 62% στην ομάδα STS άκρων και 45% στα STS τοίχωματος κορμού. Η ατελής εκτομή επηρέασε σημαντικά τον έλεγχο του πεδίου και στις δυο ομάδες, και υψηλότερη δόση IORT συσχετιζόταν θετικά με τον έλεγχο της νόσου στο πεδίο του STS του άκρου.

Ακτινοθεραπεία σε Οπισθοπεριτοναϊκά / Ενδοκοιλιακά σαρκώματα μαλακών μορίων

Η RT μπορεί να χορηγηθεί είτε ως προεγχειρητική ή μετεγχειρητική θεραπεία σε ασθενείς με χειρουργικά εξαιρεσιμη νόσο και ως ριζική θεραπεία για τα άτομα με ανεγχείρητη νόσο. Η RT δεν αποτελεί υποκατάστατο της ριζικής χειρουργικής εκτομής με κατάλληλα όρια και η επανεκτομή μπορεί να είναι απαραίτητη. Αν εκ νέου εκτομή δεν είναι εφικτή, η μετεγχειρητική RT μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ιδιαίτερα επιλεγμένους ασθενείς, οι οποίοι δεν έχουν λάβει προεγχειρητική RT, επιλογή για τον έλεγχο της μικροσκοπικής υπολειμματικής νόσου, αν και αυτή η προσέγγιση δεν έχει επιβεβαιωθεί σε τυχαιοποιημένες μελέτες. Νεότερες τεχνικές RT, όπως IMRT και 3D σύμμορφη RT χρησιμοποιώντας πρωτόνια ή φωτόνια μπορούν να επιτρέψουν την κάλυψη του όγκου του στόχου με αποδεκτά κλινικά αποτελέσματα εντός των φυσιολογικών περιορισμών της δόση ιστού σε γειτονικά όργανα [124-126]. Όταν χρησιμοποιείται EBRT, η εξελιγμένη IMRT, τομοθεραπεία, και/ή θεραπεία πρωτονίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να βελτιώσει το θεραπευτικό αποτέλεσμα. Ωστόσο, η ασφάλεια και η αποτελεσματικότητα των τεχνικών συμπληρωματικής RT θα πρέπει να αξιολογηθούν σε πολυκεντρικές τυχαιοποιημένες ελεγχόμενες μελέτες.

Η προεγχειρητική -εισαγωγική RT συχνά προτιμάται, επειδή μειώνει τον κίνδυνο διασποράς του όγκου κατά τον χρόνο της χειρουργικής επέμβασης και μπορεί να καταστήσει τους όγκους πιο επιδεκτικούς στην εκτομή [127]. Η συνήθης δόση της προεγχειρητικής RT είναι 50 Gy. Σε μια μελέτη, φάνηκε ότι η προεγχειρητική RT με επιλεκτική κλιμάκωση δόσης (45 Gy σε 25 κλάσματα σε ολόκληρο τον όγκο και στα όρια καθώς και boost δόση των 57,5 Gy στο οπίσθιο οπισθοπεριτοναϊκό όριο του όγκου που καθορίζεται από τον χειρουργό και τον ακτινοθεραπευτή ως υψηλότερου κινδύνου) ήταν ανεκτή και επέτρεψε την χρήση υψηλότερων δόσεων RT για το υψηλού κλινικού κινδύνου όγκο στόχου (υψηλού κινδύνου CTV) που κρίθηκε ότι έχει μεγαλύτερο κίνδυνο για τοπική υποτροπή [128]. Σε αυτή τη μελέτη, η οποία περιελάμβανε 16 ασθενείς με βιοψία θετική για οπισθοπεριτοναϊκό STS, 14 ασθενείς (88%) είχαν υποβληθεί σε μακροσκοπική εκτομή. Με διάμεση παρακολούθηση 28 μήνες, υπήρχαν μόνο 2 τοπικές υποτροπές, με αναλογιστικά 2 ετών τοπικό ποσοστό ελέγχου στο 80%. Οι κατευθυντήριες γραμμές έχουν συμπεριλάβει το σχήμα με 45-50 Gy σε

ολόκληρο το CTV με boost δόση προς συνολική δόση 57,5 Gy ως μια άλλη επιλογή για την προεγχειρητική RT.

Η μετεγχειρητική RT έχει συσχετιστεί με βελτιωμένη RFS σε αναδρομικές μη τυχαιοποιημένες μελέτες αλλά με καμία βελτίωση στην OS . Σε μία μελέτη, η συνδυασμένη χρήση της προεγχειρητικής RT και μετεγχειρητική βραχυθεραπείας οδήγησε σε σημαντικά καλύτερη DFS και OS σε ασθενείς με χαμηλού βαθμού κακοήθειας όγκους [129]. Σε μια πρόσφατη αναδρομική μελέτη, η χρήση σύμμορφης μετεγχειρητικής RT μαζί με επιθετική χειρουργική εκτομή συνδέθηκε με μια τάση προς μειωμένο ποσοστό τοπική υποτροπής και βελτιωμένη RFS σε σύγκριση με χειρουργική μόνο θεραπεία [130]. Στην 5-ετή παρακολούθηση , το ποσοστό RFS ήταν 60% και 47%, αντίστοιχα ($P = 0,02$). Ωστόσο, δεν υπήρξε σημαντική διαφορά στην OS μεταξύ των δύο ομάδων.

Η χρήση των IORT έδωσε ενθαρρυντικά αποτελέσματα σε ασθενείς με οπισθοπεριτοναϊκά STS [131-138]. Σε ασθενείς με οπισθοπεριτοναϊκό STS προοπτικά όταν θεραπεύτηκαν σε Κέντρο με πρωτόκολλο που περιελάμβανε μέγιστη εκτομή του όγκου, υψηλού ρυθμού δόσης IORT και μετεγχειρητική EBRT, το συνολικό ποσοστό τοπικού ελέγχου στα 5 έτη για ολόκληρη την ομάδα ήταν 62% με το ποσοστό τοπικού ελέγχου να είναι καλύτερο για τους ασθενείς με πρωτοπαθείς όγκους από εκείνους των υποτροπών (74% έναντι 54%, $P = 0,40$) [132]. Το συνολικό ποσοστό 5-ετούς επιβίωσης ελεύθερης απομακρυσμένων μεταστάσεων ήταν 82% (100% για εκείνους με χαμηλού βαθμού κακοήθειας όγκους έναντι 70% για τα άτομα με όγκους υψηλού βαθμού κακοηθείας, $P = 0,05$). Τα 5-ετή ποσοστά της DFS και OS ήταν 55% και 45%, αντίστοιχα. Η IORT με ή χωρίς EBRT υπήρξε αποτελεσματική από την άποψη του τοπικού ελέγχου και της επιβίωσης σε ασθενείς με πρωτοπαθή και υποτροπιάζων οπισθοπεριτοναϊκό STS [133-135,137]. Σε μια μελέτη που αξιολόγησε τη μακροπρόθεσμη έκβαση των ασθενών με οπισθοπεριτοναϊκό STS στην αντιμετώπιση με προεγχειρητική RT, εκτομή, και IORT με δέσμη ηλεκτρονίων RT (IOERT), η OS (74% και 30%, αντίστοιχα) και ο τοπικός έλεγχος (83% και 61%, αντίστοιχα) ήταν καλύτερα σε ασθενείς που υποβλήθηκαν σε μακροσκοπική εκτομή και IOERT σε σύγκριση με εκείνους που είχαν μόνο μακροσκοπική εκτομή [133]. Μια εν εξελίξη μελέτη (NCT01566123) εξετάζει την προεγχειρητική RT , ακολουθούμενη από χειρουργική θεραπεία με IORT σε ασθενείς με οπισθοπεριτοναϊκό

σάρκωμα υψηλού κινδύνου. Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα δείχνουν ελπιδοφόρα αποτελέσματα στον τοπικό έλεγχο και στην OS [139].

2.14.3 Χημειοθεραπεία

Επικουρική χημειοθεραπεία

Η αξία της επικουρικής χημειοθεραπείας σε ενήλικες ασθενείς που έχουν υποβληθεί σε εκτομή για σάρκωμα μαλακών μορίων των άκρων (π.χ., λειομυοσάρκωμα, λιποσάρκωμα, αρθρικό σάρκωμα) παραμένει αμφιλεγόμενη. Το μυξοειδές/στρογγυλοκυτταρικό λιποσάρκωμα είναι σχετικά χημειοευαίσθητος υποτύπος σαρκώματος μαλακών μορίων, τουλάχιστον στην μεταστατική νόσο. Επιπλέον, τα αποτελέσματα από αναδρομική μελέτη αξιολόγησης επικουρικής χημειοθεραπείας σε ασθενείς με ποιά ευαίσθητους στη χημειοθεραπεία ιστολογικούς υπότυπους είναι αντικρουόμενες [140-144]. Ενώ τρεις σύγχρονες αναδρομικές σειρές αναφέρουν ένα πιθανό όφελος επιβίωσης για επικουρική χημειοθεραπεία σε ασθενείς με λιποσάρκωμα των άκρων [140,141,143], δύο άλλες δεν αναφέρουν [142,144].

Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές του NCCN και της Ευρωπαϊκής Εταιρείας Παθολογικής Ογκολογίας [145], η επικουρική χημειοθεραπεία περιλαμβάνεται ως επιλογή για τους ασθενείς υψηλού κινδύνου, ενώ συνετή προσέγγιση είναι η εξατομίκευση της θεραπείας, λαμβάνοντας υπόψη την κατάσταση του ασθενούς, παράγοντες συνοσηρότητας (συμπεριλαμβανομένης της ηλικίας), την εντόπιση της νόσου, τον ιστολογικό υπότυπο (π.χ τον στρογγυλοκυτταρικό τύπο του μυξοειδούς λιποσαρκώματος). Το όφελος από επικουρική χημειοθεραπεία θα πρέπει να εκτιμηθεί στο πλαίσιο της αναμενόμενης τοξικότητας σχετιζόμενης με τη θεραπεία, συμπεριλαμβανομένης της πιθανής στειρότητας σε νεότερους ανθρώπους, καρδιομυοπάθεια, νεφρική βλάβη, δεύτερους καρκίνους, και η συνολική επιβάρυνση στην ποιότητα ζωής.

Το βέλτιστο θεραπευτικό σχήμα είναι απροσδιόριστο. Προτιμούνται συνήθως πέντε ή έξι κύκλους δοξορουμπικίνης (συνήθως 75 mg / m² ανά κύκλο σε τμηματικές δόσεις ή συνεχής έγχυση επί τρεις ημέρες), ιφωσφαμίδης (9 έως 10 g / m² σε τμηματικές δόσεις πάνω από τρεις ώρες ημερησίως για τρεις έως τέσσερις ημέρες), με mesna [AIM]

έναντι του MAID (mesna, δοξορουβικίνη, ιφωσφαμίδη, και δακαρβαζίνη [146]. Λαμβάνοντας υπόψη τους περιορισμούς των διαθέσιμων δεδομένων, και με την προϋπόθεση ότι μικροσκοπική μεταστατική νόσο μπορεί τελικά να απαιτήσει περισσότερους, και όχι λιγότερους, κύκλους χημειοθεραπείας, θα εξακολουθήσουν να θεωρούνται οι πέντε ή έξι κύκλοι χημειοθεραπείας η προτιμώμενη προσέγγιση.

Εισαγωγική χημειοθεραπεία

Στο θεωρητικό πλεονεκτήματα για την εισαγωγική θεραπεία περιλαμβάνεται η κυτταρομείωση του όγκου, η άμεση θεραπεία των μικρομεταστάσεων, και μια πρόιμη εκτίμηση ως προς την αποτελεσματικότητα της χημειοθεραπείας. Επίσης η κυτταρομείωση μπορεί να επιτρέψει λιγότερο ριζική χειρουργική εκτομή, και αυτή η προσέγγιση θεωρείται μια επιλογή συχνά σε ασθενείς με μεγάλα σαρκώματα των άκρων, ιδιαίτερα εάν η χειρουργική διάσωση των άκρων είναι οριακή. Όταν η εισαγωγική θεραπεία εξετάζεται για έναν ασθενή με μεγάλο ή υποτροπιάζον σάρκωμα των άκρων, και ιδιαίτερα αν η διάσωση του άκρου είναι το ζητούμενο, η ακτινοθεραπεία επιλέγεται με ή χωρίς χημειοθεραπεία.

Το όφελος από μόνη της εισαγωγικής χημειοθεραπείας σε αυτό το στάδιο είναι αβέβαιο ενώ κατάλληλες, τυχαιοποιημένες μελέτες φάσης III δεν είναι διαθέσιμες [147,148]. Μια τυχαιοποιημένη μελέτη της EORTC φάσης II στην οποία 150 ασθενείς τυχαιοποιήθηκαν σε τρεις κύκλους εισαγωγικής θεραπείας με δοξορουβικίνη (50 mg / m² ανά κύκλο) και ιφωσφαμίδης (5 g / m² ανά κύκλο) έναντι χειρουργική επέμβαση και μόνο, απέτυχε να δείξει καλύτερη επιβίωση στο σκέλος της χημειοθεραπείας, και διεκόπη πριν από την επέκταση σε μελέτη φάσης III [149]. Μερικά στοιχεία που υποστηρίζουν τη χρήση εισαγωγική θεραπείας με trabectedin, υπάρχουν, σε ασθενείς με τοπικά προχωρημένο μυξοειδές λιποσάρκωμα. Σε μια μη ελεγχόμενη μελέτη 23 ασθενών, οι επτά είχαν αντικειμενική μερική ανταπόκριση, και μετά από χειρουργική επέμβαση, οι τρεις είχαν παθολογοανατομική πλήρη απόκριση μετά από τρεις έως έξι κύκλους της τραβεκτεδίνης (1,5 mg / m² σε διάστημα 24 ωρών, μία φορά κάθε 21 ημέρες) [150]. Μια ευρωπαϊκή τυχαιοποιημένη μελέτη ανέφερε όφελος με την προσθήκη τοποπεριοχικά υπερθερμίας με εισαγωγική χημειοθεραπεία σε σύγκριση μόνο με εισαγωγική

χημειοθεραπεία σε ασθενείς με μεγάλους όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας, ή σε αρχικά ανεγχείρητη νόσο.

Εισαγωγική χημειοακτινοθεραπεία

Μακροχρόνια δεδομένα παρακολούθησης μελετών επιβεβαίωσαν ότι η προεγχειρητική χημειοακτινοθεραπεία που ακολουθείται από εκτομή και μετεγχειρητική χημειοθεραπεία με σχήμα με βάση τη δοξορουβικίνη βελτιώνει τον τοπικό έλεγχο και τα ποσοστά OS και DFS σε ασθενείς με υψηλής κακοήθειας σαρκώματα . Σε μία μελέτη στην οποία συμμετείχαν 48 ασθενείς με υψηλής κακοήθειας STS των άκρων (8 cm ή μεγαλύτερης διαμέτρου), η έκβαση των ασθενών που έλαβαν προεγχειρητική χημειοακτινοθεραπεία με το σχήμα MAID (mesna ,δοξορουβικίνη, ιφωσφαμίδη, και δακαρβαζίνη) που ακολουθήθηκε από χειρουργική επέμβαση και εν συνεχεία από μετεγχειρητική χημειοθεραπεία με την ίδια αγωγή ήταν ανώτερη από ότι τα ιστορικά κοντρόλς [151]. Ο 5-ετής σχετικός τοπικός έλεγχος, το 5 ετές ελεύθερο μακρινών μεταστάσεων διάστημα, το ελεύθερο νόσου διάστημα, και τα ποσοστά OS ήταν 92% και 86% (P =0,1155), 75% και 44% (P = 0,0016), 70% και 42% (P = 0,0002) και 87% και 58% (P = 0.0003) για τις ομάδες της MAID και του έλεγχου, αντίστοιχα [151]. Το ίδιο πρωτόκολλο αργότερα αξιολογήθηκε στην RTOG 9514 μελέτη με 66 ασθενείς με μεγάλα (8 cm ή μεγαλύτερο), υψηλής κακοήθειας (στάδιο II ή III, βαθμού κακοήθειας 2 ή 3 σε σύστημα ταξινόμησης τριών βαθμίδων), πρωτογεννή, ή τοπικά υποτροπιάζοντα STS των άκρων ή του κορμού [152,153] .Τα ποσοστά της 5 ετούς τοποπεριοχική αποτυχίας θεραπείας (συμπεριλαμβανομένου του ακρωτηριασμού) και απομακρισμένης μετάστασης ήταν 22% και 28%, αντίστοιχα, με μέση παρακολούθηση 7,7 ετών. Το εκτιμώμενο 5-ετές DFS, απομακρισμένης DFS, και τα ποσοστά OS ήταν 56%, 64% και 71%, αντίστοιχα. Ωστόσο, η προεγχειρητική χημειοακτινοθεραπεία συσχετίστηκε με σημαντική βραχυπρόθεσμη τοξικότητα [153,154].

Μεταστατική νόσος

Το λιποσάρκωμα έχει έναν αριθμό διαφορετικών υποτύπων (π.χ., καλά διαφοροποιημένο, αποδιαφοροποιημένο, μυξοειδές/στρογγυλό

κύτταρικο, πλειόμορφο), και απόκρισή τους σε χημειοθεραπεία δεν είναι καλά τεκμηριωμένη[155]. Σε μια αναδρομική μελέτη φάνηκε ότι το μυξοειδές λιποσάρκωμα είναι σχετικά χημειοευαίσθητη νόσος σε σύγκριση με τους άλλους υποτύπους λιποσαρκώματων, ιδίως τους αποδιαφοροποιημένους και καλά διαφοροποιημένους όγκους. Στις περιπτώσεις των καλά διαφοροποιημένων λιποσάρκωμάτων, ο βαθμός κακοηθείας (grading) δεν παρέχει σημαντικές πληροφορίες σε σχέση με άλλους ιστολογικούς υποτύπους όσον αφορά την ανταπόκριση στη θεραπεία. Στο μυξοειδές/στρογγυλοκυτταρικό λιποσάρκωμα, η παρουσία στρογγυλοκυτταρικού στοιχείου μπορεί να είναι ένα δυσμενές προγνωστικός παραγοντας. Η εντοπισή του όγκου, ο υψηλός δείκτης πολλαπλασιασμού, σημασμένος με MIB-1, και σημειακές μεταλλάξεις του TP53 είναι επίσης δυσμενείς προγνωστικοί παράγοντες σε μυξοειδές /στρογγυλοκυτταρικούς όγκους [156].

Η χημειοθεραπεία στα λιποσαρκώματα δεν έχει επιβεβαιώσει κάποιο όφελος. Αν και η χειρουργική εκτομή είναι η βασική θεραπευτική αγωγή, οι ασθενείς με μεγάλη υψηλής κακοηθείας λιποσαρκώματα φαίνεται να λαμβάνουν κάποιο όφελος από την θεραπεία με ακτινοβολίες και χημειοθεραπεία [157]. Ένα νέο χημειοθεραπευτικό η Τραβεκτεδίνη (Yondelis) εγκρίθηκε το Νοέμβριο του 2015 στις Ηνωμένες Πολιτείες για το ανεγχείρητο ή μεταστατικό λιποσάρκωμα ή λειομυοσάρκωμα σε ασθενείς που έχουν λάβει προηγούμενη αγωγή που περιέχει ανθρακυκλίνη. Είναι ένας αλκυκιούοντας παράγοντας που δεσμεύει κατάλοιπα γουανίνης στη μικρή αύλακα του DNA. Η έγκριση βασίστηκε σε μια δοκιμή φάσης 3 (n = 518), η οποία έδειξε στατιστικά σημαντική βελτίωση στην επιβίωση χωρίς εξέλιξη νόσου, σε σύγκριση με τη δακαρβαζίνη (4.2 μήνες vs 1,5 μήνες, P <0,0001). Δεν παρατηρήθηκε βελτίωση στη συνολική επιβίωση [158].

Τον Ιανουάριο του 2016 εριβουλίνη (Halaven) εγκρίθηκε από την αμερικανική Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) για τα ανεγχείρητο ή μεταστατικό λιποσάρκωμα σε ασθενείς που έλαβαν προηγούμενη αγωγή που περιέχει ανθρακυκλίνη. Η έγκριση FDA βασίζεται σε αποτελέσματα από υποομάδα 143 ασθενών με λιποσάρκωμα. Σε αυτήν την υποομάδα, τα αποτελέσματα έδειξαν μια βελτίωση 7 μηνών στην επιβίωση (15,6 μήνες, με εριβουλίνη σε σύγκριση με 8,4 μήνες με δακαρβαζίνη). Η διάμεση επιβίωση χωρίς εξέλιξη, δευτερεύον καταληκτικό σημείο, ήταν 2,9 μήνες με eribulin σε

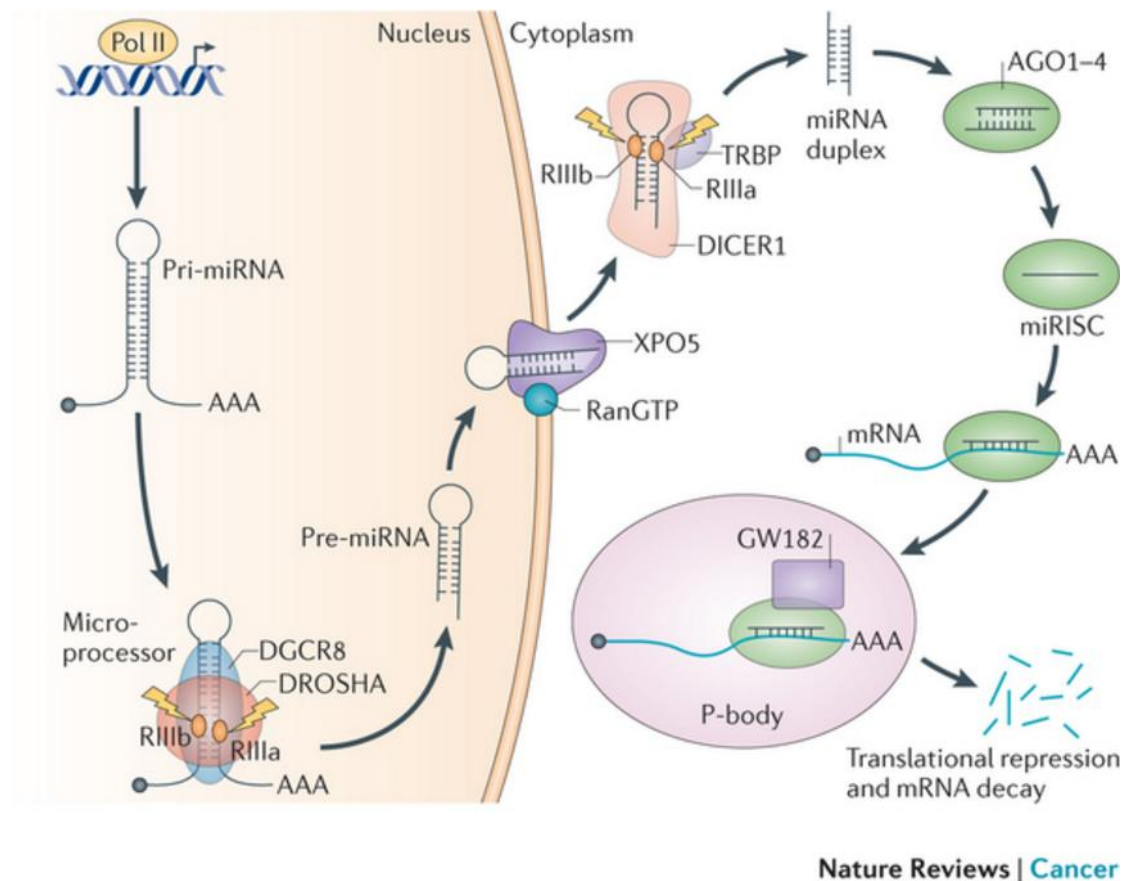
σύγκριση με 1,7 μήνες με δακαρβαζίνη. Ωστόσο, εριβουλίνη ήταν πιο τοξική από δακαρβαζίνη. Οι εμφανιζόμενες ανεπιθύμητες ενέργειες της θεραπείας περιλάμβαναν ουδετεροπενία (44% έναντι 24%), πυρεξία (28% έναντι 14%), περιφερική αισθητική νευροπάθεια (20% έναντι 4%), και αλωπεκία (35% έναντι 3%) για την εριβουλίνη σε σύγκριση με δακαρβαζίνη, αντίστοιχα [159].

3.MICRORNAS ΠΟΥ ΕΜΠΛΕΚΟΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΠΑΘΟΓΕΝΕΣΗ ΤΩΝ ΣΑΡΚΩΜΑΤΩΝ-ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΑ ΜΟΡΙΑ

3.1 Εισαγωγή- σκοπός βιβλιογραφικής ανασκόπησης

Τα microRNA (miRNAs ή mirs ή miRnas) είναι μικρά σε μέγεθος μη κωδικοποιητικά ριβονουκλεϊκά οξέα (RNA) που βρέθηκαν σε ευκαρυωτικά κύτταρα [160]. Ένα microRNA έχει κατά μέσο όρο 22 νουκλεοτιδία και είναι σχετικά μικρό σε σύγκριση με άλλα RNAs μόρια [161]. Η παρεμβολή του RNA (ή RNA interference ή RNAi), όπως ονομάζεται επίσης η μετα-μεταγραφική αποσιώπηση γονιδίου (PTGS), είναι μια βιολογική διαδικασία κατά την οποία ,μόρια RNA αναστέλλουν την έκφραση του γονιδίου, τυπικά προκαλώντας την καταστροφή-αποσιώπηση των ειδικών μορίων mRNA [162].

Τα miRNAs είναι μετα-μεταγραφικοί ρυθμιστές που προσδένονται σε συμπληρωματικές αλληλουχίες του mRNAs στόχου, συνήθως με αποτέλεσμα τη μεταγραφική καταστολή ή αποδόμηση του στόχου και τη γονιδιακή αποσιώπηση. Τα miRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II, ως προσαρμοσμένα και πολυαδενυλιωμένα πρωτογενή μετάγραφα (pri-miRNAs) που μπορεί να είναι απο περιοχές είτε κωδικοποίησης ή μη-κωδικοποίησης. Το πρωτογενές μετάγραφο διασπάται από το ένζυμο Drosha ριβονουκλεάση III για να παραχθεί ένα περίπου 70-nt στέλεχος-αγκύλη πρόδρομο miRNA (pre-miRNA), το οποίο διασπάται περαιτέρω από την κυτταροπλασματική III ριβονουκλεάση Dicer για να δημιουργηθεί το ώριμο miRNA(-5p) και ένα αντίθετης φοράς-κατοπτρικό miRNA (miRNA* ή-3p). Το ώριμο miRNA ενσωματώνεται ως ένα σύμπλοκο RNA επαγόμενο σίγησης (RISC), το οποίο αναγνωρίζει τον mRNA στόχο μέσω ατελούς ζευγαρώματος βάσεων του με το miRNA και που συχνά καταλήγει σε μεταγραφική αναστολή ή αποσταθεροποίηση του mRNA στόχου [εικόνα2] [163].



Εικόνα 2: Overview of miRNA biogenesis pathway.

Το ανθρώπινο γονιδίωμα μπορεί να κωδικοποιεί πάνω από 2500 miRNAs, τα οποία μπορεί να στοχεύουν περίπου το 60% των γονιδίων των θηλαστικών [164]. Οι θέσεις στόχοι των miRNAs είναι στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3'UTR) του mRNA και ένα microRNA μπορεί να στοχεύει διάφορα mRNAs [165]. Τα miRNAs πιστεύεται ότι είναι ένα ζωτικό και εξελικτικά αρχαίο στοιχείο της γενετικής ρύθμισης [166]. Επηρεάζοντας τη γονιδιακή ρύθμιση, τα miRNAs είναι πιθανό να εμπλέκονται στις περισσότερες βιολογικές διαδικασίες ενώ διαφορετικές ομάδες miRNAs βρέθηκαν να εκφράζονται σε διαφορετικούς τύπους κυττάρων και ιστών [167]. Η ανώμαλη έκφραση των miRNAs έχει ενοχοποιηθεί σε πολυάριθμες ασθένειες και καταστάσεις. Αρκετά miRNAs έχουν βρεθεί να σχετίζονται με ορισμένους τύπους καρκίνου και μερικές φορές αναφέρονται ως oncomirs.

Τα σαρκώματα είναι μια εξαιρετικά ετερογενής ομάδα επιθετικών και διηθητικών μεσεγχυματικών όγκων. Υπάρχουν πάνω από 50 ιστολογικοί υποτύποι και η διαγνωστική ταξινόμησή τους είναι μια μεγάλη πρόκληση. Τα σαρκώματα μπορούν να εμφανισθούν σε όλο το σώμα, αλλά η πλειοψηφία τους εμφανίζεται στα άκρα. Επίσης

συνδέονται με αυξημένο κίνδυνο ανάπτυξης απομακρισμένων μεταστάσεων, ανάλογα με τον τύπο του όγκου και τον βαθμό επιθετικότητας. Το Sarcomas microRNA Expression Database (S-MED) είναι μια αποθήκη δεδομένων που περιγράφει τα πρότυπα έκφρασης των miRNAs σε διάφορους τύπους ανθρώπινου σαρκόματος, χρησιμοποιώντας πάνω από 300 δείγματα ιστού που αντιπροσωπεύουν 22 διαφορετικούς τύπους σαρκόματος. Η βάση δεδομένων παρέχει στατιστικές λεπτομέρειες όπως αλλαγές από την αρχική τιμή της έκφρασης και τη στατιστική σημαντικότητα για διαφορετικά εκφραζόμενα miRNAs σε κάθε τύπο σάρκωματος σε σύγκριση στον αντίστοιχο κανονικό ιστό [168].

Στην παραπάνω ανασκόπηση, συνοψίζουμε τις τρέχουσες δημοσιευμένες μελέτες όσον αφορά τη συμμετοχή των microRNAs στην παθογένεση των πιο συχνών σαρκώματων σε επίπεδο ιστών, κυττάρων και κυτταρικών σειρών και τη δυνατότητα χρήσης τους ως θεραπευτικοί στόχοι ή βιοδείκτες στο μέλλον. Σκοπός της ανασκόπησης είναι η αναδείξη miRNAs με σημαντικούς ρόλους στην ογκογένεση, ανάπτυξη και εξέλιξη των μεσεκχυματικής προέλευσης όγκων υποψήφια για την περαιτέρω έρευνα μας.

3.2 Λιποσάρκωμα (LPS)

Τα miRNAs εμπλέκονται με διάφορους τρόπους στην γένεση και εξέλιξη των λιποσαρκωμάτων επηρεάζοντας διάφορα παθογεννητικά μονοπάτια. Τα miRNAs είναι δυνατό να καταστείλουν σημαντικούς μοριακούς παράγοντες που σχετίζονται με την ογκογένεση και η διαταραχή της ρυθμισής τους προκαλεί υπερέκφραση ή καταστολή διαδικασιών που προάγουν την ογκογένεση. Για παράδειγμα η αναδιάταξη του γονιδίου FUS/TLS (σύντηξη σε σάρκωμα/αντιμετάθεση σε λιποσάρκωμα) συμβάλλει στη βιογένεση ενός συγκεκριμένου υποσύνολου microRNAs. Η FUS/TLS διασταυρώνεται στη χρωματίνη σε περιοχές της μεταγραφής τους και δεσμεύει τα αντίστοιχα pri-microRNAs [169]. Η έκφραση του miR-486 είναι κατασταλαμένη σε TLS-CHOP αντιμετάθεση εκφράζομενη σε ινοβλάστες NIH3T3 και σε ιστούς μυξοειδούς λιποσαρκώματος (MLPS), ενώ εξωγενής υπερέκφραση του miR-486 καταστέλλει την ανάπτυξη των κυττάρων MLPS. Ο αναστολέας

του ενεργοποιητή πλασμινογόνου-1 (PAI-1) ως ένα γονίδιο-στόχος του miR-486, είναι ένα μοναδικό είδος αναστολέα πρωτεάσης-σερίνης και είναι γνωστό ότι αποτελεί έναν από τους βασικούς ρυθμιστές του διήθητικού και μεταστατικού δυναμικού του όγκου [170]. Επίσης το miR-135b, ένας ρυθμιστής κλειδί, εκφράζεται έντονα στο RC (στρογγυλοκυτταρικό) στοιχείο, προώθώντας τη διήθηση των κυττάρων MLPS *in vitro* και την μετάσταση *in vivo* μέσω της άμεσης καταστολής της θρομβοσπονδίνης 2 (THBS2). Μειωμένη έκφραση της THBS2 από το miR-135b αυξάνει το συνολικό ποσό των μεταλλοπρωτεϊνών 2 (MMP2) του διάμεσου ιστού και επηρεάζει την κυτταρική πυκνότητα και την εξωκυτταρική δομή του διάμεσου ιστού, οδηγώντας έτσι σε μια μορφολογική μεταβολή στον όγκο [171].

Έτσι, οι διάφοροι υπότυποι των λιποσαρκωμάτων μπορούν να παρουσιάζουν μοναδικά μοτίβα έκφρασης miRNas. Σε μια σειρά 76 δειγμάτων από πρωτογενή σαρκώματα μαλακών μορίων μη προθεραπευμένα, υψηλής κακοήθειας, εκπροσωπώντας οκτώ διαφορετικούς υποτύπους, διαπιστώθηκαν μοναδικά μοτίβα έκφρασης των miRNAs για το μυξοειδές λιποσάρκωμα. Τα υπερεκφρασμένα σχετιζόμενα με τον όγκο miRNAs περιλαμβάναν το miR-9 και miR-9* στο μυξοειδές λιποσαρκώματα σε σύγκριση με τον λιπώδη ιστό. Επιπλέον μειωμένη ρύθμιση του miR-215 παρατηρήθηκε σε DDLS σε σύγκριση με τον μη νεοπλασματικό λιπώδη ιστό και επίσης το miR-375, το οποίο προωθεί τη διαφοροποίηση των λιποκυττάρων, υποεκφράζεται σε DDLS και PLS σε σύγκριση με τον μη νεοπλασματικό λιπώδη ιστό [172].

Διάφορα miRNas με γνωστή ογκοκατασταλτική ή ογκογεννή δράση σε άλλους ιστούς φαίνεται επίσης να παρουσιάζουν διαταραχές της έκφρασης και στο λιποσάρκωμα επηρεάζοντας παθογεννητικούς μηχανισμούς. Το Let-7e, που περιλαμβάνεται στο σύμπλεγμα από 24 miRNAs και βρίσκεται στο 19q13.4, στοχεύει καταστέλλοντας την έκφραση της HMGA2 [173], η οποία αναμιγνύεται στην αναδιαμόρφωση της χρωματίνης και εμπλέκεται στην λιποσαρκωματογένεση [174]. Ειδική μεθυλίωση και αποσιώπηση του miR-193b υποδηλώνει ένα σημαντικό ρόλο στην λιποσαρκωματογένεση μέσω της αύξησης της έκφρασης του CCND1, KRAS, ETV1, STMN1, RAD51 [175]. Επίσης, το miR-155 ήταν το πιο υπερεκφραζόμενο miRNA παρουσιάζοντας ένα σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη του αποδιαφοροποιημένου

λιποσάρκωματος σε κυττάρικες σειρές .Η κασεΐνη της 1α κινάσης (CK1a) ως άμεσος στόχος και ελεγχόμενη από το miR-155 , ενισχύει τη σηματοδότηση της β-κατενίνης και την έκφραση D1 κυκλίνης, σε υπερέκφραση του miR-155 ,προάγοντας την ανάπτυξη των κυττάρων του όγκου [176]. Σε άλλη μελέτη το miR-155 βρέθηκε να υπερεκφράζεται σε όλους τους υποτύπους LPS σε σχέση με τον φυσιολογικό λιπώδη ιστό, εκτός από τα WDLS. Το Dicer ήταν υποεκφρασμένο στα LPS, ενώ το miR-155 ήταν διαφορετικά εκφρασμένο στις υποομάδες LPS κάτι που θα μπορούσε να είναι ένα εργαλείο για τη βελτίωση στη διαστρωμάτωση της νόσου και στη διαφορική διάγνωση [177]. Τέλος, το miR-155 βρέθηκε σημαντικά αυξημένο στο πλάσμα ασθενών με DDLS σε σύγκριση με τα επίπεδα που ανιχνεύθηκαν σε άλλους υποτύπους λιποσάρκωματος και σε υγιή άτομα, ώστε τα επίπεδα miRNA-155 να έχουν υψηλή διαγνωστική ακρίβεια για τη διάκριση των DDLS από υγιή άτομα ,από λιπώματα, απο MLS και το σημαντικότερο από ασθενείς με ALT [178] .

Επίσης miRNas που σχετίζονται με την διαφοροποίηση και την απόπτωση εμφανίζουν μεταβολές στα επίπεδα εκφρασής τους. Το miR-1257, ένα φερόμενο microRNA που στοχεύει την καλρετικουλίνη (calreticulin), ήταν υποεκφρασμένο σε αποδιαφοροποιημένα λιποσαρκώματα που εξέφραζαν καλρετικουλίνη. Άυξηση της ρύθμισης με μείωση της καλρετικουλίνης από μικρά παρεμβατικά RNA (siRNA) [162] επάγει τη λιπογέννεση σε κύτταρα αποδιαφοροποιημένου λιποσάρκωματος , με μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού [179]. Σε μια μελέτη σύγκρισης μεταξύ καρκινικών κυττάρων και μη καρκινικών που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς χρησιμοποιώντας ιστό σε παραφίνης το miR-145 έδειξε ότι υποεκφράζεται σε καλά διαφοροποιημένα λιποσαρκώματα. Έπισης, ένα σύνολο ειδικά των μυών microRNAs (myomiRs), τα miR-133, miR-1, και miR-206 ήταν σημαντικά υποεκφρασμένα σε καλά διαφοροποιημένο λιποσάρκωμα, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να λειτουργούν εως ογκοκατασταλτικά [180]. Στο αποδιαφοροποιημένο λιποσάρκωμα επίσης, τα miR-21 και miR 26a ήταν υπερεκφρασμένα ενώ τα εξαιρετικά πλούσια στο λιπώδη ιστό miRs, miR-143 και miR -145 ήταν υποεκφρασμένα. Μετά την αποκατάσταση της έκφρασης του miR-143 σε αποδιαφοροποιημένα κύτταρα λιποσάρκωματος, αναστέλεται ο πολλαπλασιασμός και επάγεται η απόπτωση [181]. Επιπλέον, στα DDLS, μειωμένη ρύθμιση των HOXA5 σε κύτταρα LPS, εν μέρει από υπερέκφραση του miR-26a-2, προσδίδει

στα κύτταρα LPS αντίσταση στην p53-ανεξάρτητη και κασπάση εξαρτώμενη απόπτωση [182]. Και ακόμη, σε μια σειρά 57 ιστών ανθρώπινου λιποσαρκώματος, η έκφραση των miR-144/451 μέλη του συμπλέγματος miR-143/145 ,ήταν σαφώς μειωμένη σε σύγκριση με το φυσιολογικό λιπώδη ιστό .Υπερέκφραση του miR-145 και miR-451 σε κυτταρικές σειρές λιποσάρκωματος μείωσε τον κυτταρικό ρυθμό πολλαπλασιασμού, οδήγησε σε μειωμένη πρόοδο του κυτταρικού κύκλου και επαγωγή της απόπτωσης [183] .

Επίσης ,έκφραση miRnas στο λιποσάρκωμα μπορεί να σχετίζονται με την αδράνεια των όγκων αυτών ενώ άλλα με την ανταπόκριση σε συγκεκριμένη θεραπεία. Τη φαινοτυπική αλλαγή του αδρανούς και μετατροπή σε γρήγορα αναπτυσσόμενο όγκο ελέγχουν περίπου 19 microRNAs σε όγκους λιποσαρκώματος ,οστεοσάρκωματος,αλλά και σε ανθρώπινα καρκίνωματα μαστού, και γλοιοβλάστωματος, (πχ. miR-580, miR-588 ή miR-190). Η απώλεια της έκφρασης των miRnas που σχετίζονται με την αδράνεια των όγκων (DmiRs, 16/19) ήταν η κυρίαρχη μορφή ρύθμισης που συσχετίστηκε με την αλλαγή των όγκων από αδρανείς , σε γρήγορα αναπτυσσόμενους [184]. Τέλος, η έκφραση των miRna μπορεί να σχετίζεται με αντοχή σε συγκεκριμένη θεραπεία στα λιποσαρκώματα.Σε μια μυξοειδική κυτταρική σειρά λιποσαρκώματος ανθεκτική στην τραβεκτεδίνη (402-91/ET), που λαμβάνεται με την έκθεση της 402-91 κυτταρικής σειράς σε σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του φαρμάκου, τρία miRNAs μεταξύ εκείνων που εκφράζονται διαφορετικά, το miR-130a, miR-21 και miR-7, φέρουν θέσεις του υποκινητή τους σε περιοχή του CHOP. Αυτό θα μπορούσε να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην τροποποίηση της αντίστασης στην τραβεκτεδίνη, σε ένα in vitro μοντέλο στο μυξοειδές λιποσάρκωμα [185]

3.3 Ινοσάρκωμα (FS)

Στο ινοσάρκωμα υπάρχουν κάποιες μελέτες που αφορούν έκφραση miRnas κυρίως σε κυτταρικές σειρές τα οποία φαίνεται να επηρεάζουν τις μεταλλοπρωτεάσες της μεσοκυττάριας ουσίας .Σε ανθρώπινα κύτταρα ινοσαρκώματος, τα miR-520c και miR-373 αύξησαν την έκφραση της μεταλλοπεπτιδάσης της μεσοκυττάριας ουσίας 9 (MMP9) με την άμεση στόχευση των 3'-UTRs των mRNAs του mTOR και SIRT1 (αρνητικοί

ρυθμιστές) ,καταστέλλοντας τη μεταφρασή τους, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης Ras/ Raf / MEK / Erk και NF-κB .Τελικά, η αύξηση του mRNA, της πρωτεΐνης, και της δραστηριότητας των MMP9 ,ενίσχυσε τη μετανάστευση των κυττάρων και την ανάπτυξη των κυττάρων σε 3D κολλαγόνο τύπου I πηκτώματα [186] . Επίσης σε μια άλλη μελέτη τα miR-520c και miR-373 ανέστειλαν την μετάφραση του mRNA του MT1-MMP (MMP της μεμβράνης τύπου 1) , ογκογονίδιο που σχετίζεται με την μετάσταση του όγκου ,και μείωσε την ρύθμιση της δραστηριότητας του πρωτεολυτικού ενζύμου μέσω στόχευσης της 3'UTR του mRNA της MT1-MMP σε κύτταρα ινοσαρκώματος HT1080. Επιπλέον , μείωσε την ενεργοποίηση της προ-MMP2 σε ενεργό MMP2, αλλά η ανάπτυξη ενισχύθηκε σε κύτταρα HT1080, λόγω αυξημένης ρυθμίσης την έκφρασης του γονιδίου MMP9 με τα miR-520c και miR-373 [187] . Το miR-335 αύξησε την έκφραση στην κυτταρική επιφάνεια της MT1-MMP σε ινοσάρκωμα HT-1080 και διέγειρε τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση μόνο σε κύτταρα με MT1-MMP δραστηριότητα στη μεμβράνη [188]. Μια μελέτη επίσης ανέλυσε την ικανότητα του miR-182 (ένα από τα cluster miR-183 miRNAs), το οποίο μπορεί να στοχεύσει το RECK (ογκοκατασταλτικό-εξωκυττάριος αναστολέας μεταλλοπρωτεασών), για τον έλεγχο της δραστηριότητας της MT1-MMP στην κυτταρική επιφάνεια. Η έκφραση του mRNA και της RECK πρωτεΐνης αυξήθηκε με αντι-Mirs στο miR-182, miR-183 ή miR-96 σε κύτταρα ινοσαρκώματος HT1080, αλλά δεν παρενέβει στη λειτουργία της MT1-MMP στην κυτταρικής επιφάνειας [189].

Επίδραση στην αγγειογένεση φάνηκε να έχει ένα συγκεκριμένο miRna. Η υπερέκφραση του miR-409-3p στα κύτταρα HT1080 ινοσαρκώματος οδήγησε σε σταθερά μειωμένο επίπεδο του μετάγραφου της αγγειογεννίνης (ANG-ενεργοποιητής της αγγειογένεσης-ογκογενές) και της παραγωγής ANG που επιτεύχθηκε μέσω της άμεσης σύνδεσης του παρόντος miRNA στην 3'UTR της. Έκτοπη εκφραση του miR-409-3p σε μεταμοσχευμένα HT1080 κύτταρα ,οδήγησε στην καθυστέρηση της ανάπτυξης του όγκου, της αγγείωσης και της μετάστασης στον πνεύμονα σε ξενομοσχεύματα όγκου ποντικού [190].

3.4 Επιθηλιοειδές σάρκωμα

Στα επιθηλιοειδή σαρκώματα , miRNAs συσχετίζονται με την έκφραση SMARCB1 (ογκοκατασταλτικό). Το επιθηλιοειδές σάρκωμα, και ο κακοήθης ραβδοειδής όγκος μπορούν να διακριθούν με βάση το προφίλ έκφρασης των microRNAs , ενώ το miR-193a-5p μπορεί να έχει ένα σημαντικό επίσης ρόλο στην απώλεια έκφρασης της SMARCB1 mRNA σε αυτούς τους όγκους [191]. Σε 32, δείγματα ιστών σε παραφίνη που περιλαμβάναν 30 επιθηλιοειδή σαρκώματα και δύο κακοήθεις ραβδοειδείς όγκους φάνηκε σημαντική υπερέκφραση σε τέσσερα miRNAs στα επιθηλιοειδή σαρκώματα (miR-206, miR-381, miR-671-5p, και miR-765) .Κυτταρικές σειρές ινοσαρκώματος με διατηρημένη την SMARCB1 έκφραση καλλιιεργήθηκαν σε πειράματα παροδικής επιμόλυνσης με miRNA. Τρία υπερεκφρασμένα miRNAs (miR-206, miR-381 και miR-671-5p) μπορούσαν να αποσιωπήσουν την έκφραση SMARCB1 mRNA σε καλλιέργειες κυττάρων (το περισσότερο αποτελεσματικό ήταν το miR-206) εξαλείφοντας επίσης την SMARCB1 πυρηνική χρώση, επιδεικνύοντας μια ισχυρή επίδραση επί όχι μόνο σε mRNA, αλλά επίσης σε επίπεδα πρωτεΐνης [192] .

3.5 Λειμοσάρκωμα (LMS)

Η έκφραση των miRNAs μπορεί να βοηθήσει στη διαφορική διάγνωση των λειμοσαρκωμάτων από άλλους ιστούς. Το προφίλ της έκφρασης των miRNAs ερευνήθηκε σε μια σειρά από δείγματα ιστών λειμοσαρκωμάτων (LMS) και αδιαφοροποίητων πλειόμορφων σαρκωμάτων (UPS) για να αναλυθεί αρχικά η διαφορετική έκφραση και να προσδιοριστούν συγκεκριμένες υπογραφές χρήσιμες για τη βελτίωση της διαφορικής διάγνωσης .Τα επίπεδα του miR-199-5p και miR-320a, επιβεβαίωσαν ότι το με πρώτο εκφράζεται έντονα στο UPS ενώ το τελευταίο σε LMS [193]. Επίσης,σε άλλη μελέτη ογδόντα οκτώ miRNAs αξιολογήθηκαν με ποσοτική RT-PCR σε καρκινικά και μη καρκινικά δείγματα ιστού που συλέγχθηκαν από 29 ασθενείς με σάρκωμα του ενδομητρίου, λειμοσάρκωμα, και μικτούς επιθηλιακούς μεσεγχυματικούς όγκους. Δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των miRNAs που βρέθηκαν μεταξύ όγκων λειμοσάρκωματος και των δειγμάτων ελέγχου [194]. Οι μετάστασεις από καλοήγη λειμώματα είναι πιθανές καλοήθεις βλάβες, και η ανοδός της έκφρασης του miR-221 είναι ένας ακριβής τρόπος για να τα

διαφοροποιηθούν τα λειομυοσαρκώματα από καλοήθεις μεταστάσεις λειομυωμάτων. Το miR-221, το οποίο έχει συνδεθεί με μια ποικιλία καρκίνων, ανιχνεύθηκε με υβριδοποίηση *in situ* σε 13 από 15 λειομυοσαρκώματα, σε κανένα από 8 λειομύωματα, και σε κανένα από 10 καλοήθη μεταστατικά λειομύωματα [195]. Επίσης οι όγκοι των λείων μυών της μήτρας (USMTs) περιλαμβάνουν τουλάχιστον 6 μεγάλες κατηγορίες ιστολογικών τύπων όγκων: λειομυώματα (ULM), μιτωτικώς ενεργά λειομύωματα (MALM), κυτταρικό λειομύωμα (CLM), άτυπα λειομυώματα (ALM), αβέβαιου κακοήθους δυναμικού (STUMP), και λειομυοσάρκωμα (LMS). Στο σύνολο των 167 διαφορετικών περιστατικών USMT, το miRNA προφίλ αποκάλυψε ότι ALM και LMS μοιράζονται παρόμοιες υπογραφές miRNA [196]. Τέλος σε μελέτη αναλύονται το προφίλ των miRNAs του σάρκωματος του στρώματος του ενδομητρίου (ESS) ,του λειομυοσαρκώματος (LMS), καθώς και οι υπογραφές των miRNAs των πρωτογενών και μεταστατικών LMS της μήτρας .Εννενήντα τέσσερα miRNAs ήταν σημαντικά διαφορετικά εκφρασμένα σε ESS και LMS, εκ των οποίων 76 ήταν υπερεκφρασμένα σε ESS και 18 υπερεκφρασμένα σε LMS. Σαράντα εννέα miRNAs εκφράστηκαν διαφορετικά σε πρωτογεννή και μεταστατικό LMS, εκ των οποίων 45 είχαν υπερεκφράσει στην πρωτογεννή LMS και 4 στις μεταστάσεις [197].

Τα miRNA στο λειομυοσαρκώμα μπορούν επίσης να εμπλέκονται σε διάφορες διαδικασίες όπως της διαφοροποίησης, του πολλαπλασιασμού και της απόπτωσης .Η έκφραση ενός αριθμού miRNAs σε μυομητρίο και λειομύωμα με προοδευτικές αποκλίσεις από την φυσιολογική , με την μετατροπή από λεία μυϊκά κυττάρα μυομητρίου (MSMC) σε λεία μυϊκά κύτταρα λειομυωμάτων (LSMC), και σε καρκινικά, δείχνει ότι miRNAs και η ρύθμισή τους από τα στεροειδή των ωοθηκών παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεση του λειομύωματος μέσω της σταθερότητας της έκφρασης του γονιδίου [198] .Η σημαντική υπερέκφραση του mir-1, mir-133A και mir133B και η οποία ανευρέθει σε LMS σε σύγκριση με φυσιολογικά δείγματα μυϊκού ιστού [199] , φαίνεται να παίζει σημαντικό ρολό στην μυογένεση και τον πολλαπλασιασμό των μυοβλαστών [200] .Αντίθετα, το mir-206 ένα miRNA εντόνως εκφρασμένο σε σκελετικούς μύες που εμπλέκεται στην μυϊκή διαφοροποίηση [201] βρέθηκε να υποεκφράζεται στο LMS, ενώ το mir143 είχε υψηλή και χαμηλή έκφραση σε διαφορετικά δείγματα

φανερώνοντας μοριακή ετερογένεια σε αυτό τον ιστό [199]. Επίσης, το miR-181, μέλη του let -7 , συμπεριλαμβανομένων το let-7b, το miR-155 και το miR-18a, ένα μέλος της οικογένειας miR-17-92, που τροποποιούνται κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των λείων μυϊκών ινών , περιλαμβάνουν μερικά που έχουν ήδη συσχετιστεί με άλλες διαδικασίες ανάπτυξης , συμπεριλαμβανομένων την μεσεγχυματογενή και αιματογενή διαφοροποίηση [202]. Το miR-200c σε απομονωμένα LSMCs, MSMCs, και σε κυτταρικές σειρές λειομυοσάρκωματος (SKLM-S1) κατέστειλε το mRNA και την πρωτεΐνη της ZEB1 / ZEB2, με ταυτόχρονη αύξηση της E-cadherin (Cdh1) και τη μείωση της έκφραση της βιμεντίνης, με φαινοτυπική αλλαγή , και καταστολή του πολλαπλασιασμού των MSMC και LSMC. Το miR-200c μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στην έκβαση της ανάπτυξης λειομυωμάτων, τη συντήρηση των μεσεγχυματικών τους και ινόδων χαρακτηριστικών, και, ενδεχομένως των συμπτωμάτων τους [203] .

Η επίδραση της έκφρασης συγκεκριμένων miRNA σε αυξητικούς παράγοντες και σηματοδοτικές οδούς εμφανίζεται και στα λειομυοσάρκωματα. Η ανάκτηση της λειτουργίας του miR-93 και miR-106b σε λειομύωμα λείων μυϊκών κυττάρων, λεία μυϊκά κύτταρα μυομητρίου, και σε κυτταρική σειρά λειομυοσάρκωματος δοσοεξαρτώμενα κατέστειλε την F3 και την IL8 μέσω άμεσης αλληλεπίδρασης με τις αντίστοιχες 3'-αμετάφραστες περιοχή τους, και έμμεσα μέσω της F3 καταστολής , αναστάλθηκε η IL8 , η CTGF (connective tissue growth factor) , και η PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1) έκφραση , ενώ επίσης μειώθηκε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού, και αυξήθηκε η δράση της κασπάσης-3/7 [204]. Σε κυτταρικές σειρές λειομυοσάρκωματος (SK-LMS-1) το επίπεδο της έκφρασης του miR-200c ήταν σημαντικά χαμηλότερο σε σύγκριση με τα απομονωμένα λεία μυϊκά κύτταρα λειομυώματος. Η υπερέκφραση του miR-200c σε κύτταρα SK-LMS-1 μέσω της άμεσης αλληλεπίδρασης με την 3'-αμετάφραστη περιοχή του IKBKB (υπομονάδα β της κινάσης του αναστολέα NF-kB), IL8, CDK2, και CCNE2 (Cyclin E2) , αντίστοιχα, οδήγησε σε καταστολή της έκφρασης τους. Επιπλέον, η μειωμένη μεταγραφική δραστηριότητα του p65 στον υποκινητή της IL8, αύξησε στα κύτταρα SK-LMS-1 την δραστηριότητα της κασπάσης 3/7 και ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση τους [205]. Επίσης το miR-21 εκφράζεται παθολογικά και ρυθμίζεται ορμονικά στα λειομύωμα όπου,

μέσω της λειτουργικής αλληλεπίδρασης με ωοθηκικά στεροειδή και της οδού TOP-beta σηματοδότησης, και είτε άμεσα είτε έμμεσα ρυθμίζει έναν αριθμό γονιδίων (PTEN, PDCD4 και E2F1, και TOP-beta RII), των οποίων η προϊόντα είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη και την καταστολή των λειομυωμάτων καθώς για το δυναμικό του κυτταρικού μετασχηματισμού [206]. Η υπερέκφραση του HMGA2 και η μειωμένη ρύθμιση της let-7 miRNA (miRna που μεσολαβεί της καταστολής της HMGA2) είναι μια μοριακή διαταραχή στα λειομυοσάρκωμα της μήτρας (ULMS). Διαταράσσοντας τον έλεγχο της HMGA2 με την καταστολή του let-7 προάγεται η ανάπτυξη των κυττάρων ULMS in vitro [207].

3.6 Ραβδομυοσάρκωμα (RMS) (εμβρυικό, κυψελιδικό , πλειόμορφο)

Στα ραβδομυοσάρκωμα μόνο μια μελέτη έκφρασης microRNAs συσχετίστηκε με την έκβαση της νόσου των ασθενών. Το MIRHG1 γονίδιο (που αναφέρεται επίσης ως C13 or f 250) και κωδικοποιεί το miR17-92 cluster (επίσης γνωστό ως oncomiR-1 cluster) σχετίζεται με χειρότερο ελεύθερο υποτροπής διάστημα και συνολική επιβίωση σε σύγκριση με ασθενείς χωρίς την ενίσχυση με κυψελιδικό RMS [208].

Αρκετά miRNAs που μελετήθηκαν με διαταραχή της έκφρασης φαίνεται να επηρεάζουν την εξέλιξη της μυογονικής διαφοροποίησης . Στα PRMS τα mir-1 και mir-133, δύο miRNAs με ειδικότητα στα μυικά κύτταρα, που ρυθμίζουν μυογεννητικά γονίδια είναι σχετικά υποεκφρασμένα. Τα mir-1 και mir-133 σε κυτταρικές σειρές ραβδομυοσάρκωματος παρουσίασαν κατασταλτική δράση ,ενώ το γονίδιο PAX/FOXO1 μπορεί δυνητικά να έχει ανασταλτική επίδραση στην έκφραση του mir-1 και mir-133α μέσω ασαφών μηχανισμών [209]. Η έκφραση του mir-206 επίσης είναι μειωμένη στα RMS, επανέκφραση του miR-206 και miR-1 σε κύτταρα RMS προώθησε τη μυική διαφοροποίηση και στάματησε την ανάπτυξη του όγκου με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων c-MET σε ξενομοσχεφθέντα ποντίκια [210] . Επίσης τα miR-1 και miR- 206 σε κυτταρικές γραμμές εμβρυικού RMS, δείχνουν σημαντική μείωση της έκφρασης της πρωτεΐνης Pax3, ενώ σε κυτταρικές γραμμές κυψελιδικού RMS, το μεταγραφώμα σύντηξης δεν φαίνεται να ρυθμίζεται μέσω miRNA μεσολάβησης [211] .Επιπλέον το

miR-206, όταν επάγεται σε κύτταρα RMS προωθεί την συνέχιση της διαφοροποίησης τροποποιώντας περισσότερα από 700 γονίδια. Ένα από τα πιο υψηλά υπερεκφρασμένα γονίδια, η SMYD1, είναι μια ιστόνης H3 λυσίνης 4 (H3K4) μεθυλοτρανσφεράση. Η SMYD1 σίγηση δεν φαίνεται να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό ή την απώλεια ανεξαρτησίας πρόσδεσης που επιβάλλονται από το miR-206, αλλά εξασθενεί σοβαρά την αποδιαφοροποίηση των εμβρυικών RMS (ERMS), κυψελιδικών RMS (ARMS), και μυογόνων κυττάρων. Σε αντίθεση, η σίγηση της G6PD (ένας άμεσος στόχος του miR-206), στα κύτταρα ERMS παρεμποδίζει τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη, αλλά η G6PD υπερέκφραση δεν έχει καμία συσχέτιση με την επίδραση του miR-206 στην διαφοροποίηση [212]. Επιπλέον στο αρνητικό-σύντηξης RMS (FN-RMS), ως βασικά miR-206 γονίδια στόχοι υπεύθυνα του αποκλεισμού της διαφοροποίησης εντοπίστηκαν το PAX7, Pax3, NOTCH3 και CCND2. Γενετική απάλειψη του miR-206 σε ένα μοντέλο ποντικού FN-RMS επιταχύνει και επιδεινώνει την ανάπτυξη του όγκου, υποδεικνύοντας ότι τόσο *in vitro* όσο και *in vivo* το miR-206 δρα ως καταστολέας του όγκου σε FN-RMS τουλάχιστον εν μέρει με την μείωση της ρύθμισης του PAX7 [213].

Στη ρύθμιση της ανάπτυξης του ραβδομυοσάρκωματος από microRNAs, εκτός των γνωστών ιδιαίτερα της οικογένειας των μυογόνων miRNAs (miR-1, -133a/b και -206), άλλα γνωστά ως μυογονικοί ρυθμιστές όπως το miR-29, και πρόσφατα το miR-450b-5p ή miR-203, αναγνωρίζεται ότι παίζουν ένα ρόλο στη διαφοροποίηση του ραβδομυοσάρκωματος [214]. Στο κυψελιδικό RMS το miR-335, το οποίο στοχεύει το CHFR (απώλεια της έκφρασης σε πολλούς όγκους), και το HAND 1 (λειτουργεί στη μεσόδερμική ή μυϊκή διαφοροποίηση) υπερεκφράζεται σε σύγκριση με τον φυσιολογικό σκελετικό μύ [199]. Το miR-411-5p δρα ως miRNA επαγόμενο τη διαφοροποίηση στα RMS με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση του p38MAPK μέσω απ'ευθείας μείωσης της ρύθμισης του SPRY4 σε κυτταρικές σειρές RMS. Τα αποτελέσματα αποκάλυπτουν μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ TGF-β1/SPRY4 και επίπεδων miR-411-5p εγκαθιστώντας ένα αυτορυθμιζόμενο κύκλωμα μεταξύ TGF-β1/miR-411-5p/SPRY4 και MAPK στο RMS, το οποίο ρυθμίζει την εναλλαγή μεταξύ πολλαπλασιασμού και διαφοροποίησης [215].

Παθολογικές οδοί σηματοδότησης μπορεί να παρουσιάζουν αυξημένη ρύθμιση στα RMSs μέσω διαμεσολάβησης miRnas .Το miR-29 είναι επιγενετικά σε αποσιώπηση από το ενεργοποιημένο NF-κB-YY1 μονοπάτι και αύξηση της έκφρασης του miR-29 σε ποντίκια με RMS αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου και διεγείρει τη διαφοροποίηση, υποδεικνύοντας ότι το miR-29 δρα ως καταστολέας του όγκου μέσω της προμυογονικής του λειτουργίας [216]. Το EGR1 (ογκοκατασταλτικό-μεταγραφικός ρυθμιστής) ρυθμίζεται από το miR-183 σε πολλούς τύπους όγκων, συμπεριλαμβανομένων του ραβδομυοσάρκωματος .Σε κυτταρικές σειρές συνοβιακού σάρκωματος, RMS, και καρκίνου του παχέος εντέρου διαπιστώθηκε απορρύθμιση ενός δικτύου miRNA το οποίο αποτελείται από το miR-183/EGR1/PTEN σε αυτούς τους όγκους. Το miR-183 έχει ένα δυνητικά ογκογόνο ρόλο[217]. Επίσης ,το miR-203 ήταν συχνά με μειωμένη λειτουργία από υπερμεθυλίωση του εκινητή τόσο σε κυτταρικές σειρές RMS όσο και σε ιστούς βιοψίας RMS .Επαγωγή της έκφρασης του miR-203 σε κύτταρα RMS ανέστειλε τη μετανάστευση και τον πολλαπλασιασμό τους και προώθησε την τερματική μυογονική διαφοροποίηση. Το miR-203 ασκεί την όγκοκατασταλτική του δράση με απευθείας στόχευση του p63 και του ανασταλτικού υποδοχέα του παράγοντα λευχαιμίας (LIFR) στα κύτταρα RMS, και προωθεί τη μυογόνα διαφοροποίηση αναστέλλοντας το μονοπάτι του Notch και τα μονοπάτια JAK1 / STAT1 / STAT3 [218] .Επίσης εκτός των miR-1, miR-206 και το miR-29 μπορεί να ρυθμίσει την έκφραση του PAX και του CCND2, ένα γονίδιο του κυτταρικού κύκλου, επιπλέον, το miR-29 στοχεύει επίσης το E2F7, ένα άλλο ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου, που οδηγεί σε μείωση του πολλαπλασιασμού σε κυτταρικές σειρές RMS και φανερώνει ένα ρόλο καταστολέα των όγκου για αυτό το miRNA [219] .

Συγκεκριμένα miRNAs μπορούν να στοχεύουν βασικά γονίδια στόχους με επίδραση στα RMS .Το miR-214 είναι αισθητά υποεκφρασμένο σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές RMS. Όταν εισαχθεί εκ νέου μέσα σε κύτταρα RD, μια σειρά από ανθρώπινα κύτταρα εμβρυϊκού RMS, το miR-214 έδειξε αναστολή της ανάπτυξης των καρκινικών κυττάρων, επαγωγή της μυογονικής διαφοροποίησης ,της απόπτωση, καθώς και της καταστολής του σχηματισμού αποικίας και της ογκογένεσης του ξενομοσχεύματος. Σε περίπτωση απουσίας του miR-214, η έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου N-ras είναι σημαντικά

αυξημένη σε miR-214 (-/-) εμβρυϊκών ινοβλαστών ποντικίου (MEFs), και χειρισμοί με αύξηση των επιπέδων του miR-214 χρησιμοποιώντας ανάλογα (mimics) microRNA ή αναστολέα σε κύτταρα RD σειράς , αντιστοίχως άλλαξε την έκφραση N-ras [220]. Σε μια ομάδα του κυψελιδικού RMSs, εμβρυϊκού RMSs καθώς επίσης και σε φυσιολογικό σκελετικό μυ (NSM), μέλη της οικογένειας του miR-378 ήταν δραματικά μειωμένα σε κυτταρικές σειρές και στον ιστό των RMS. Είναι επίσης ενδιαφέρον το ότι, τα μέλη της οικογένειας miR-378 παρουσιάζουν ως πιθανό στόχο τον υποδοχέα του αυξητικού παράγοντα 1 της ινσουλίνης (IGF1R). Η miR-378a-3p υπερέκφραση που λαμβάνεται σε κυτταρικές σειρές RMS καταστέλλει την έκφραση του IGF1R και επηρεάζονται τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης Akt πρωτεΐνης. Η DNA απομεθυλίωση με 5-αζα-2'-δεοξυκυτιδίνη (5-aza-dC) ήταν σε θέση να αυξήσει τη ρυθμίση των επιπέδων miR-378a-3p με ταυτόχρονη επαγωγή της απόπτωσης, μείωση της βιωσιμότητας των κυττάρων και διακοπή του κυτταρικού κύκλου στη G2-φάση [221]. Επίσης, η miR 675 επανέκφραση μετά από απομεθυλίωση με τον παράγοντα 5 αζακυτιδίνη οδήγησε σε μείωση του πολλαπλασιασμού στο RMS μέσω μείωσης της ρύθμιση της έκφρασης του IGF2 και, IGF1R με αρνητική επίδραση στην έκφραση του υποδοχέα της ινσουλίνης (INSR) σε κύτταρα ραβδομυοσάρκωματος (RMS) [222]. Το miR-27a υπερεκφράζεται στις πιο επιθετικές κυτταρικές σειρές RMS (ARMS θετικά σε αντιμετάθεση), στην οποία πιθανώς δρα ως ένα ογκογονίδιο. Το miR-27a υπερεκφράζουν κύτταρα που έδειξαν σημαντική αύξηση στο ρυθμού πολλαπλασιασμού και εμπλέκονται στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου με τη στόχευση του υποδοχέα άλφα του ρετινοϊκού οξέος (RARA) και το ρετινοϊκό άλφα υποδοχέα X (RXRA) [223].

Αρκετά miRNA με μειωμένη έκφραση στα RMS έχουν γνωστή ογκοκατασταλτική δράση σε πολλούς καρκινικούς ιστούς. Σε μια μελέτη συγκρίσης μεταξύ καρκινικών και μη καρκινικών κυττάρων που πραγματοποιήθηκε σε ασθενείς χρησιμοποιώντας ιστό παραφίνης, το miR-145 έδειξε μειωμένη έκφραση σε πλειόμορφα ραβδομυοσάρκωματα , καλά διαφοροποιημένο λιποσάρκωμα, και συνοβιακό σάρκωμα. [180]. Το miR-101 υποεκφράζεται σε ασθενείς με ERMS και σε κυτταρικές σειρές του όγκου δείχνοντας ένα αντίστροφο πρότυπο έκφρασης με την EZH2 (μεθυλοτρανσφεράση ιστονών). Το miR-101 αυξάνει την έκφρασή του σε κύτταρα ERMS μετα απο τόσο γενετική όσο

και η φαρμακογενή καταστολή της έκφρασης της EZH2 .Προκλητή έκφραση του miR-101, μειώνει τα επίπεδα EZH2 καθώς επίσης περιορίζει το μεταναστευτικό δυναμικό των κυττάρων του ERMS και εξασθενεί την κλωνογεννή και τις ανεξάρτητες προσκόλλησης δυνατότητες ανάπτυξης τους [224] .

Τέλος θεραπεία με artesunate (ημισυνθετικό παράγωγο της αρτεμισινίνης- ARS) σε κύτταρα ERMS επάγει την έκφραση των μυογεννών myomiRs, miR-133a και miR-206, τα οποία είναι σε μειωμένη ρυθμισή σε RMS, και μειώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης PAX7. Το ARS αυξάνει την έκφραση των μορίων προσκόλλησης, NCAM και ιντεγκρίνης β1, και μειώνει τη μετανάστευση και διηθητικότητα των κυττάρων ERMS in vitro.Επίσης φάνηκε να μειώνει περίπου 50% την αύξηση των ERMS ξеноμοσχευμάτων in vivo [225] .Η θεραπεία με φενρετινίδη επίσης, σε κυτταρικές σειρές ραβδομυοσάρκωματος θετικά στην αντιμετάθεση, προκάλεσε την εμφάνιση ελευθερών ριζών οξυγόνου και την προαγωγή της απόπτωσης, όπως φαίνεται από την διασπάση της κασπάσης 9 και του PARP, καθώς και την αύξηση της έκφρασης του miR-9 [226].

3.7 Αγγειοσάρκωμα

Στο αγγειοσάρκωμα σημαντική υπερέκφραση του συμπλέγματος miR-17-92 παρατηρήθηκε σε αγγειοσάρκωμα με ενισχυμένο το γονίδιο MYC σε σύγκριση με αγγειοσάρκωματα με έλλειψη της ενίσχυσης του γονιδίου MYC και άλλους αγγειακούς ιστούς (άλλων αγγειακών όγκων, μη αγγειακά σαρκώματα), με εν συνεχεία μείωση της ρύθμιση του THBS1, ενός ισχυρού αναστολέας της ενδογενούς αγγειογένεσης [227]. Σε μια άλλη έκθεση, ανθρώπινες κυτταρικές σειρές αγγειοσάρκωματος, υπερεκφράζουν το miR-214 και miR-126, γεγονός που υποδηλώνει ότι αυτά τα miRNAs έχουν δυνατότητες ως πιθανοί διαγνωστικοί βιοδείκτες [228].

3.8 Οι κακοήθεις όγκοι των ελύτρων των περιφερικών νεύρων (MPNST)

Από την ταυτοποίησή τους σχεδόν 20 χρόνια πριν, τα miRNAs έχουν βρεθεί να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στον καρκίνο, συμπεριλαμβανομένου και τους όγκους σχετιζόμενους με τη νευροϊνωμάτωση 1 (NF1). Η NF1 είναι η πιο συχνά κληρονομούμενη προδιάθεση σύνδρομου ανάπτυξης όγκου και μπορεί να οδηγήσει σε κακοήθεια μέσω της ανάπτυξης των κακοηθών όγκων των ελύτρων των περιφερικών νεύρων (MPNSTs). Αν και οι μηχανισμοί με τους οποίους καλοήγη νευρινώματα εξελίσσονται σε MPNSTs παραμένουν ακόμη αδιευκρίνιστοι γίνεται ολοένα και πιο σαφές ότι τα miRNAs διαδραματίζουν καίριο ρόλο στη διαδικασία αυτή [229]. Μετά από ανάλυση των 53 μονών πολυμορφισμών γονιδίων (SNPs) σε 11 miRNAs σε γονίδια της βιογένετικής οδού σε 356 ασθενείς (200 ασθενείς με NF1 και 156 ασθενείς τόσο με NF1 και MPNST) στην Κίνα, φάνηκε ότι οι γενετικές παραλλαγές miRNAs στα γονίδια της βιογένετικής οδού μπορεί να τροποποιήσουν τον κίνδυνο ανάπτυξης MPNST τόσο μεμονωμένα όσο και από κοινού [230]. Σε ιστούς κακοήθων όγκων των ελύτρων των περιφερικών νεύρων, σημαντικά επηρεασμένης έκφρασης miRNAs συμμετείχαν στην καταστολή του PTEN (miR-301a, miR-19a, και miR-106b), στην ρύθμιση του μονοπατιού RAS-MAPK (Let-7b, miR-195 και miR-10b), στην μεσεγχυματογενή μετατροπή (miR-200c, Let-7b, miR-135a, miR-135b, και miR-9), στην έκφραση των γονιδίων HOX (miR-210, miR-196b, miR-10a, miR-10b, και miR-9), και στην εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου (miR-195, let-7b, miR-20a, miR-210, miR-129-3p, miR-449a, και miR-106b) [231].

Διάφορα miRNA έχει φανεί να σχετίζονται με την απόπτωση σε αυτούς τους όγκους. Το προφίλ των miRNA των καλοήθων και κακοήθων PNSTs έδειξε μια σχετική μείωση της έκφραση του miR-34a στα περισσότερα MPNSTs σε σύγκριση με νευρινώματα. Η απενεργοποίηση του p53 και η επακόλουθη απώλεια της έκφρασης του miR-34a μπορεί να συνεισφέρει σημαντικά στην ανάπτυξη MPNST. Η εξωγενής έκφραση του p53 ή miR-34a προωθεί τον αποπτωτικό κυτταρικό θάνατο. Επιπλέον, εξωγενής έκφραση της p53 σε κύτταρα MPNST επάγει το miR-34a και άλλα miRNA [232]. Επίσης το προφίλ έκφρασης των miRNA σε MPNST και NF αποκάλυψε σημαντικές μεταβολές στα επίπεδα

έκφρασης από εννέα miRNAs, ένα από αυτά είναι το miR-21. Σε κύτταρα MPNST, η επιμόλυνση με αναστολέα του miR-21, αύξησε τη δραστηριότητα της κασπάσης, κατέστειλε την ανάπτυξη των κυττάρων, και αύξησε το επίπεδο της πρωτεΐνης 4 του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου 4 (PDCD4) [233]. Επιπλέον, υπερέκφραση της EZH2 (μεθυλοτρανσφεράση των ιστονών) στο MPNST αναστέλλει τη μεταγραφή του miR-30d μέσω της δέσμευσης της δραστηριότητας του υποκινητή, και οδηγεί σε αυξημένη έκφραση του πυρηνικού υποδοχέα μεταφοράς KPNB1, ο οποίος αναστέλλεται από το miR-30d στόχευοντας στην 3' UTR του KPNB1. Αναστολή της EZH2 ή KPNB1, ή miR-30D υπερέκφραση, προκαλεί απόπτωση των κυττάρων MPNST in vitro και καταστέλλει ογκογένεση in vivo [234]. Θεραπεία με DZNep (3-deazaneplanocin A) μείωσε τα επίπεδα της πρωτεΐνης EZH2 και KPNB1 και αύξησε την έκφραση του miR-30d στα κύτταρα MPNST με επαγωγή της απόπτωσης και αναστολή του κυτταρικού κύκλου in vitro. Η EZH2 ανέστειλε την έκφραση ενός άλλου μέλους της οικογένειας miR-30, του miR-30a, στα κύτταρα MPNST. Παρόμοια με το miR-30d, το miR-30a αναστέλλει την KPNB1 με στόχο την 3' αμετάφραστη περιοχή KPNB1. Η EZH2 κατέστειλε επίσης την miR-200b έκφραση και προώθησε την επιθήλιομεσεγχοματογεννή μετατροπή στα κύτταρα MPNST [235].

Τέλος miRNAs μπορούν επίσης να λειτουργήσουν είτε ως ογκογόνα είτε ως ογκοκατασταλτικά σε διαφορετικά επίπεδα αυξάνοντας το διηθητικό και μεταναστευτικό δυναμικό. Το miR-210 ταυτοποιήθηκε ως υποεκφρασμένο στα κύτταρα MPNST, και ο πιθανός του στόχος η εφρίνη-A3 (EFNA3) παρουσιάζει αυξημένη ρυθμίση σε σύγκριση με τα κύτταρα νευρίνωματος. Αυξημένη ρύθμιση του miR-210 αύξησε την κυτταρική βιωσιμότητα, το σχηματισμό αποικιών, το ποσοστό της S φάσης, και τη διηθητικότητα των κυττάρων MPNST. Αντιστρόφως, η καταστολή της έκφρασης miR-210, επάγει την καταστολή του πολλαπλασιασμού και της διήθησης των κυττάρων MPNST [236]. Μείωση της έκφρασης του miR-29c έχει έναν κεντρικό ρόλο στην πρόοδο των όγκων του ελύτρου των νεύρων με αποτελέσματα την αύξηση της διηθητικής και μεταναστευτικής δυνατότητας των κυττάρων των όγκων αυτών [237]. Το miR-204 παίζει κρίσιμο ρόλο στην ανάπτυξη του MPNST και την εξέλιξη του όγκου και μειώνει σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, μετανάστευση, και εισβολή in vitro.

Αποκατάσταση της έκφρασης miR-204 σε STS26T κυτταρική σειρά ,μειώνει την ανάπτυξη του όγκου και κακοήθη εξέλιξη in vivo [238].

3.9 Οστεοσάρκωμα (OSS)

3.9.1 MiRnas σε συσχέτιση με την ολική επιβίωση σε οστεοσάρκωμα

Η έκφραση διαφόρων miRnas στα οστεοσαρκώματα φαίνεται να σχετίζεται με την επιβίωση καθώς και με άλλες κλινικές παραμέτρους. Η έκφραση του συμπλέγματος miR-17-92 (miR-17, miR-18, miR-19a, miR-20, miR-19b, and miR-92) σε ιστούς οστεοσάρκωματος ήταν σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με γειτονικούς φυσιολογικούς ιστούς και υπήρχε σχέση μεταξύ αυξημένης ρύθμισης του miR-17-92 συμπλέγματος και προχωρημένου σταδίου TNM αυτών των ασθενών .Η υψηλή έκφραση του miR-17-92 cluster ήταν ένας ανεξάρτητος αρνητικός προγνωστικός παράγοντας για την επιβίωση χωρίς υποτροπή και την συνολική επιβίωση. Επιπλέον, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η διήθηση, και η μετανάστευση κυτταρικών γραμμών οστεοσαρκώματος επιταχύνεται σημαντικά από miR-17-92 cluster πλασμίδιο σε in vitro δοκιμασίες [239]. Επίσης, αύξηση της ρύθμισης του miR-210, πιο συχνά εμφανίζεται σε ιστούς οστεοσαρκωμάτων με μεγάλο μέγεθος του όγκου, κακή απόκριση σε προεγχειρητική χημειοθεραπεία, και θετική για μετάσταση, ενώ συσχετίστηκε με σημαντικά μειωμένη συνολική επιβίωση και η επιβίωση χωρίς εξέλιξη νόσου [240]. Ακόμη, σύγκριση με μη-καρκινικούς ιστούς των οστών, τα επίπεδα έκφρασης του miR-9 σε ιστούς οστεοσάρκωματος ήταν σημαντικά αυξημένα. Υπερέκφραση του miR-9 είναι ένας στατιστικά σημαντικός παράγοντας κινδύνου που επηρεάζει το μέγεθος του όγκου, το κλινικό στάδιο, τη μετάσταση και τη συνολική επιβίωση [241].

Επίσης, επίπεδα συγκεντρώσεων miRnas στον ορό ασθενών με OSS όπως και στους αντίστοιχους ιστούς φάνηκε να σχετίζονται με την ολική επιβίωση των ασθενών .Τα επίπεδα έκφρασης του miR-95-3p στον ορό των ασθενών με οστεοσάρκωμα ήταν σημαντικά μειωμένα ($P < 0,0001$) σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες. Η καμπύλη Kaplan-Meier έδειξε ότι οι ασθενείς με υψηλή έκφραση του miR-95-3p επέζησαν σημαντικά περισσότερο από ό, τι οι ασθενείς με χαμηλή miR-95-3p έκφραση ($P = 0,017$). Η πολυπαραγοντική ανάλυση έδειξε ότι το επίπεδο

έκφρασης miR-95-3p ($P = 0.014$) ήταν ένας ανεξάρτητος προγνωστικός βιοδείκτης για τη συνολική επιβίωση [242]. Σε μια μελέτη οι συγκεντρώσεις στον ορό του miR-9 ήταν αυξημένες σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες, και συνδέθηκαν με προχωρημένο στάδιο, μεγαλύτερο μέγεθος του όγκου, παρουσία απομακρυσμένης μετάστασης και βραχύτερη συνολική διάρκεια επιβίωσης [243]. Τα επίπεδα, επίσης, του miR-195 σε ορό ασθενών με οστεοσάρκωμα ήταν σημαντικά χαμηλότερες από εκείνες των υγιών μαρτύρων. Χαμηλή miR-195 έκφραση πιο συχνά παρουσιάστηκε σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα με προχωρημένο κλινικό στάδιο απομακρυσμένη μετάσταση, σημαντικά μικρότερη συνολική επιβίωση και ελεύθερη νόσου επιβίωση από ό, τι στα άτομα με υψηλή miR-195 έκφραση [244]. Ακόμη, το miR-326 ήταν μειωμένο σημαντικά στον ορό των ασθενών οστεοσαρκώματος και στα κυττάρα όγκου οστεοσαρκώματος σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες ($P < 0,01$). Το miR-326 στον ορό είναι ένας δυναμικά διαγνωστικός δείκτης οστεοσαρκώματος (καμπύλη ROC, AUC: 0,817) και το σημαντικότερο, οι ασθενείς με χαμηλή έκφραση του miR-326 έτειναν να εμφανίζουν απομακρυσμένη μετάσταση ($P < 0.05$), προχωρημένο κλινικό στάδιο ($P < 0.05$) και μικρότερο χρόνο επιβίωσης ($P < 0,05$). Επιπλέον, το miR-326 μπορούσε να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την διήθηση των κυττάρων οστεοσαρκώματος [245]. Η έκφραση του miR-223 ακόμη ήταν σημαντικά μειωμένη στον ορό των ασθενών με οστεοσάρκωμα και κυττάρα όγκων οστεοσαρκώματος σε σύγκριση με υγιείς ασθενείς ($P < 0,01$). Ο χρόνος επιβίωσης επίσης των ασθενών με χαμηλή έκφραση miR-223 ήταν σημαντικά μικρότερος σε σύγκριση με ασθενείς με υψηλή miR-223 έκφραση ($P < 0,001$). Επιπλέον, το miR-223 μπορούσε να αναστείλει τη μετανάστευση και τη διήθηση κυττάρων οστεοσαρκώματος [246]. Σε μια σειρά 80 ασθενών οστεοσάρκωματος, τα επίπεδα έκφρασης του miR-29a, miR-29b, και miR-29c σε ιστούς και στον ορό των ασθενών ήταν σημαντικά υψηλότερες σε σύγκριση με εκείνες των φυσιολογικών δειγμάτων ελέγχου. Σύμφωνα με την ανάλυση επιβίωσης, τα περιστατικά των ομάδων miR-29a-υψηλής έκφρασης και miR-29b-υψηλής έκφρασης έδειξαν μικρότερη τόσο τη συνολική επιβίωση όσο και την επιβίωση ελεύθερη νόσου. Επιπλέον, τα επίπεδα του miR-29a και miR-29b του ορού ήταν ανεξάρτητοι προγνωστικοί παράγοντες τόσο για την ολική όσο και την ελεύθερη νόσου επιβίωση

των ασθενών οστεοσάρκωμα [247]. Σε μελέτη έκφρασης επιπέδων του miR-133b και miR-206 αυτά ήταν σημαντικά μειωμένα τόσο σε ιστούς οστεοσαρκωμάτων όσο και στον ορό των ασθενών. Οι ασθενείς με χαμηλή έκφραση miR-133b και χαμηλή έκφραση του miR-206 είχαν και οι δύο μικρότερη συνολική επιβίωση και ελεύθερη νόσου επιβίωση από ό,τι τα άτομα με υψηλές εκφράσεις [248]. Τέλος, τα επίπεδα συγκέντρωσης του miR-300 στον ορό των ασθενών με οστεοσάρκωμα ήταν σημαντικά υψηλότερες από αυτές στον ορό υγιών μαρτύρων ($P < 0,01$). Υψηλά επίπεδα miR-300 στον ορό συσχετίστηκαν σημαντικά με προχωρημένο κλινικό στάδιο, μακρινή μετάσταση και φτωχή επιβίωση των ασθενών. Όπως προκύπτει, το miR-300 στον ορό ήταν ένας ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για οστεοσάρκωμα [249].

Οι συγκεντρώσεις επιπέδων miRNas σε ιστούς ή τον ορό ασθενών με OSS, μπορούν να σχετίζονται με την επιβίωση μέσω στόχευσης σημαντικών μοριακών παραγόντων των κυττάρων OSS. Τα επίπεδα έκφρασης miR-183 και Ezrin mRNA ήταν, αντίστοιχα, σημαντικά μειωμένα και αυξημένα σε ιστούς οστεοσάρκωματος σε σύγκριση με μη καρκινικούς ιστούς των οστών. Η μειωμένη ρύθμιση του miR-183 σχετίστηκε με αυξημένη ρύθμιση του Ezrin mRNA σε ιστούς οστεοσαρκωμάτων, καθώς επίσης φάνηκε σημαντική συσχέτιση με υψηλής κακοήθειας όγκους, κακή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, μετάσταση, υποτροπή, αποτελώντας ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα για τη συνολική επιβίωση [250]. Σε εκατοντάδες κλινικών δειγμάτων τεσσάρων πρωτοπαθών όγκων (οστεοσάρκωματος, καρκίνου προστάτη, τραχήλου της μήτρας και του πνεύμονα), το miR-22 αποδείχθηκε ότι μειώνει τον πολλαπλασιασμό των καρκινικών κυττάρων και τη διήθηση, καθώς επίσης προωθεί την κυτταρική απόπτωση μέσω αναστολής της ATP κιτρική λύασης (ACLY) ένα ένζυμο κλειδί στην de novo έναρξη της σύνθεσης των λιπιδίων. Σε ζωικά μοντέλα, μαζί με την απώλεια της έκφρασης της ACLY, ποντίκια σε αγωγή με miR-22 ανέπτυξαν μάλλον μικρότερους όγκους, είχαν λιγότερες πιθανότητες απομακρισμένης μεταστάσης, και αρκετά μεγαλύτερη επιβίωση [251]. Επίσης, το miR-665 ήταν σε μειωμένη ρύθμιση σε ιστούς οστεοσαρκώματος σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς και η συνολική επιβίωση των ασθενών με οστεοσάρκωμα χαμηλής έκφρασης miR-665 ήταν χαμηλότερη από εκείνη των ασθενών αυτών με υψηλή έκφραση miR-665. Το Rab23, μικρή GTPάση που μεσολαβεί της μεταγωγή

σήματος και στην ενδοκυττάρια πρωτεϊνική μεταφορά, είναι ένα άμεσο γονίδιο στόχος του miR-665. Η έκφραση του miR-665 συσχετίστηκε αντίστροφα με την έκφραση Rab23 στους ιστούς οστεοσάρκωματος [252]. Σε παιδιατρικούς ασθενείς, σε σύγκριση με μη καρκινικούς ιστούς των οστών, τα επίπεδα έκφρασης του miR-340 και του ROCK1 mRNA ήταν, αντίστοιχα, μειωμένα και αυξημένα σε ιστούς οστεοσαρκώματος, και επίσης συσχετίστηκαν με μετάσταση, και κακή ανταπόκριση στην προεγχειρητική χημειοθεραπεία η οποία σχετίζεται με μικρότερη συνολική επιβίωση [253]. Επίσης σε μια μελέτη με 27 παιδιατρικούς ασθενείς με οστεοσάρκωμα, βρέθηκε υπογραφή 42-miRnas των οποίων τα επίπεδα έκφρασης ταυτίστηκαν με τη συνολική και ελεύθερη υποτροπή επιβίωση. Υπήρχαν 8 κοινά miRnas (HSA-miR-429, HSA-miR-221, HSA-miR-499-5p, HSA-miR-888, HSA-miR-770-5p, HSA-miR-545, HSA-miR-541, HSA-miR-483-3p) μεταξύ των δύο συνόλων miRnas που σχετίζονται με την επιβίωση. Βιοπληροφορική ανάλυση αυτών των miRnas που σχετίζονται με την επιβίωση πρότεινε ότι θα μπορούσαν να ρυθμίζουν γονίδια που εμπλέκονται στο σύστημα πρωτεασώματος ουμπικουτίνης, TGFb, IGF, PTEN/AKT/mTOR, MAPK, PDGFR/RAF/MEK/ERK, και ErbB / μονοπάτια [254]. Χαμηλότερο επίπεδο miR-145 σε ασθενείς OSS οδήγησε σε δυσμενή πρόγνωση, ή, χαμηλότερο ποσοστό συνολικής επιβίωσης. Περαιτέρω μελέτες στον μηχανισμό έδειξαν ότι η έκφραση του έχει πιθανώς μια στενή αλληλεπίδραση με την 3'-UTR του mRNA της CDK6, της οποίας το mRNA και η έκφραση των επιπέδων ανεστάλησαν. Έχει βρεθεί ότι η έκφραση CDK6 σχετίζεται επίσης αντίστροφα με την miR-145 έκφραση σε κλινικά δείγματα. Σε in vivo πειράματα, το miR-145 αναστέλλει την ανάπτυξη του όγκου OSS [255]. Το υψηλό επίπεδο του miR-92a συσχετίστηκε με προηγμένο κλινικό στάδιο ασθενών με OSS και κυρίως μειωμένο ποσοστό επιβίωσης. Πειράματα σε ποντίκια έδειξαν ότι η miR-92a σίγηση διέκοψε την in vivo ανάπτυξη των κυττάρων OSS. Επιπλέον, η miR-92a έκφραση πιθανώς λειτουργεί ως κινητήρια δύναμη στην εξέλιξη του όγκου με την στόχευση του FBXW7 (το οποίο στοχεύει την κυκλίνης E διαμέσω ουμπικουτίνης κατάπτωσης), και τονίζει τις πιθανές επιπτώσεις του miR-92a για την πρόγνωση και τη θεραπεία του OSS [256]. Τέλος, τα επίπεδα του κυκλοφορούν miR-17 ήταν σε σημαντικά αυξημένη ρύθμιση σε ασθενείς με OSS συγκριτικά με υγιή άτομα και αντιστρόφως ανάλογα με την έκφραση του PTEN, που ταυτοποιήθηκε ως

γονίδιο στόχος του miR-17 σε ιστούς OSS. Επιπλέον, η συνολική επιβίωση των ασθενών με OSS ήταν μικρότερη σε εκείνους με υψηλή έκφραση του miR-17 σε σύγκριση με μέτρια και χαμηλή έκφραση [257].

3.9.2 MiRnas σε αυξημένη ρύθμιση σχετιζόμενα με κακή έκβαση νόσου σε οστεοσάρκωμα

Έκφραση miRnas τόσο στους ιστούς όσο και στον ορό μπορούν να συσχετισθούν με κακή έκβαση της νόσου, εκτός της συνολικής επιβίωσης, σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα όπως φάνηκε σε αρκετές μελέτες . Η συνδυασμένα χαμηλή έκφραση του miR-223 και υψηλής ECT2 (γονίδιο στόχος του miR-223) σε ιστούς , σχετίζεται σημαντικά με υψηλού βαθμού κακοήθειας του όγκου, κακή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία, παρουσία μετάστασης, και υποτροπής στα οστεοσάρκωμα [258]. Σε παιδιατρικούς ασθενείς με οστεοσάρκωμα, σε σύγκριση με μη νεοπλασματικούς ιστούς των οστών, τα επίπεδα έκφρασης του miR-214 ήταν σε σημαντικά αυξημένη ρύθμιση και μπορεί να συνδέονται με την επιδεινωση του όγκου και δυσμενή πρόγνωση [259]. Σε δείγματα βιοψίας προ θεραπείας οστεοσάρκωματος, υψηλή έκφραση του miR-181, miR-181b, και miR-181c, καθώς και μειωμένη έκφραση του miR-16, miR-29b, και miR-142-5p διαπιστώθηκαν ,με την υψηλότερη έκφραση του miR-27a και miR-181c* να χαρακτηρίζει ασθενείς που ανέπτυξαν κλινικά μεταστατική νόσο [260]. Αύξηση των επίπεδων miR-196a και miR-196b στον ορό ,παρουσιάστηκαν πιο συχνά σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα υψηλής κακοηθείας, θετικούς για μετάσταση και υποτροπή όγκους. Οι μεταβολές στα επίπεδα αυτών των κυκλοφορούντων miRNAs θα μπορούσαν να χρησιμεύσουν ως νέος προγνωστικός παράγοντας για την κακοήθεια αυτή [261]. Αύξηση της ρύθμισης του miR-21 στον ορό ήταν ένα ανεξάρτητος, δυσμενής προγνωστικός παράγοντας για τους ασθενείς με οστεοσάρκωμα .Υψηλό miR-21 στον ορό συσχετίστηκε σημαντικά με προχωρημένο στάδιο Enneking και αντίσταση στα χημειοθεραπευτικά [262]. Σε μια μελέτη, για τον εντοπισμό του δυναμικού των κυκλοφορούντων miRNAs ως βιοδείκτες στο πλάσμα σε 4 ασθενείς οστεοσάρκωματος, τα επίπεδα του miR-21 είναι σημαντικά υψηλότερα σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα σε σύγκριση με τα δείγματα ελέγχου, ενώ τα miR-199a-3p και miR-143 είναι μειωμένα σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα. Η υπογραφή τριών miRNA

επίσης μπορεί να διακρίνει τους ασθενείς από τα δείγματα ελέγχου και επιπλέον, τα κυκλοφορούντα miR-21 και miR-143 συσχετίστηκαν τόσο με την μετάσταση και όσο και τον ιστολογικό υποτύπο των ασθενών, ενώ το miR-199a-3p συσχετίστηκε μόνο με τον ιστολογικό υπότυπο [263].

3.9.3 MiRna σε μειωμένη ρύθμιση σχετιζόμενα με κακή έκβαση νόσου σε οστεοσάρκωμα

Μειωμένη ρύθμιση του miR-145 σε ιστούς μπορεί να σχετίζεται με την επιθετικότητα του όγκου και την μετάσταση στο οστεοσαρκώμα και το συγκεκριμένο miRna μπορεί να είναι ένας ανεξάρτητος προγνωστικός δείκτης για ασθενείς με οστεοσάρκωμα [264]. Το miR-206 ήταν σε μειωμένη ρύθμιση στην κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος MG63 και δείγματα ιστών πρωτογενούς όγκου, ενώ μειωμένη έκφραση miR-206 συσχετίστηκε σημαντικά με προχωρημένο κλινικό στάδιο, ταξινόμηση T, μετάσταση και η κακή ιστολογική διαφοροποίηση [265]. Η έκφραση του miR-132 ήταν σημαντικά χαμηλότερη στους ιστούς οστεοσάρκωματος από ότι σε αντίστοιχους μη κακοήθεις ιστούς των οστών. Επιπλέον, η miR-132 έκφραση ήταν περισσότερο μειωμένη στα δείγματα οστεοσαρκώματος με προχωρημένο κλινικό στάδιο, απομακρισμένη μετάσταση, και κακή ανταπόκριση σε χημειοθεραπεία [266]. Επίσης, η έκφραση του miR-26a σε ιστούς οστεοσαρκώματος και κυτταρικές σειρές ήταν πολύ χαμηλότερη από εκείνη των δειγμάτων ελέγχου, αντίστοιχα. Μειωμένη ρύθμιση του miR-26a πιο συχνά φάνηκε σε δείγματα οστεοσαρκωμάτων με προχωρημένο κλινικό στάδιο και με την παρουσία των απομακρισμένων μεταστάσεων. Αποκατάσταση της έκφρασης miR-26a ανέστειλε την διήθηση και τη μετανάστευση σε κύτταρα οστεοσαρκώματος στοχεύοντας το γονίδιο EZH2 (μεθυλοτρανσφεράση των ιστονών) [267]. Τα επίπεδα miR-451 επίσης αξιολογήθηκαν σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος και σε 68 ζεύγη ιστών οστεοσαρκώματος και παρακείμενων φυσιολογικών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η έκφραση του miR-451 ήταν σημαντικά μειωμένη σε ιστούς οστεοσάρκωματος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο φυσιολογικό. Η στατιστική ανάλυση έδειξε ότι η μειωμένη έκφραση του miR-451 συσχετίστηκε με μετάσταση και υποτροπή. Ο συνδέτης 16 της χημειοκίνης (CXCL16) αναγνωρίστηκε ως άμεσος λειτουργικός στόχος της miR-451 και η έκφραση CXCL16 ήταν αυξημένη σε ιστούς

οστεοσαρκώματος [268]. Επίσης σε άλλη μελέτη τα επίπεδα έκφρασης του miR-451 σε ιστούς οστεοσάρκωματος ήταν σημαντικά χαμηλότερα από εκείνα που αντιστοιχούν σε μη καρκινικούς ιστούς των οστών. Επιπλέον, μείωση της ρύθμισης του miR-451 συχνότερα εμφανίστηκε σε δείγματα ιστών οστεοσαρκώματος με προχωρημένο κλινικό στάδιο, μακρινή μετάσταση και φτωχή απόκριση σε εισαγωγική χημειοθεραπεία. Μετά από επιμόλυνση με miR-451, ο κυτταρικός πολλαπλασιασμός, η μετανάστευση, και η ογκογένεση στα κύτταρα οστεοσαρκώματος αναστάλθηκε σημαντικά και η κυτταρική απόπτωση αυξήθηκε [269]. Το miR-646 ήταν μειωμένο σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος και ιστών οστεοσαρκώματος σε σύγκριση με την κανονική κυτταρική σειρά οστεοβλάστη NH0st και το αντίστοιχο παρακείμενο μη καρκινικό ιστό. Μειωμένη έκφραση του miR-646 συνδέθηκε με μετάσταση. Σε κύτταρα οστεοσαρκώματος, η υπερέκφραση του miR-646 ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, και την διήθηση. Το γονίδιο FGF2 (ινοβλαστικός αυξητικός παράγοντας 2) είναι ένας νέος άμεσος στόχος του miR-646 σε κύτταρα οστεοσαρκώματος, και προκλητή έκφραση του FGF2 αντιστρεφεί μερικώς την καταστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, της μετανάστευση και της διήθηση [270]. Ακόμη το miR-503 ήταν σε μειωμένη ρύθμιση σε κυτταρικές γραμμές οστεοσαρκώματος και δείγματα πρωτογενούς όγκου, και η αποκατάσταση του miR-503 μείωσε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την διήθηση. Χαμηλά επίπεδα των miR-503 σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα συσχετίστηκε με σημαντικά μικρότερη ελεύθερη νόσου επιβίωση. Η αντικαρκινική δράση του miR-503 πιθανότατα ασκείται μέσω της στόχευσης και της καταστολής της έκφρασης L1CAM (διαμεμβρανική πρωτεΐνη-μόριο προσκόλλησης). Τα επίπεδα L1CAM ήταν σε αυξημένη ρύθμιση σε κυτταρικές γραμμές οστεοσαρκώματος και δειγμάτων πρωτογενούς όγκου [271]. Η χαμηλή έκφραση του miR-148a επίσης σχετίζεται σημαντικά με την εξέλιξη του όγκου και κακή πρόγνωση των ασθενών με OSS. Το ROCK 1 (με ρόλο στην κυτταρική κινητικότητα, μετάσταση και αγγειογένεση) ταυτοποιήθηκε ως στόχος του miR-148a σε κύτταρα Saos-2 και U2OS. Η υπερέκφραση του miR-148a ανέστειλε σημαντικά την ανάπτυξη του όγκου των κυττάρων U2OS σε ποντίκια και δείχνει ότι το miR-148a δρα ως καταστολέας του όγκου σε OSS, τουλάχιστον εν μέρει, μέσω της στόχευσης ROCK1 [272].

Τέλος, συγκεκριμένης τοποθεσίας miRNas και γονιδίων πιθανά επηρεάζουν την πρόγνωση της νόσου. Η συνδυασμένη ανάλυση miRNAs και mRNA σε ιστούς παραφίνης υποστηρίζει ένα πιθανό ρόλο της 14q32 τοποθεσίας στην εξέλιξη και έκβαση του οστεοσαρκώματος. Προγνωστικής σημασίας miRNAs βρίσκονταν στην 14q32 περιοχή και τα γονίδια στόχοι τους εμφανίζουν μοτίβα απορρύθμισης που συνδέονται με την έκβαση. Το προφίλ αυτών των miRNas είναι προβλεπτικά της χημειοανταπόκρισης (75% έως 80% ακρίβεια), και δεν συμπίπτουν με αλλά προγνωστικά προφίλ [273] . Μείωση της ρύθμισης των 14q32 έκφρασης miRNAs σε ιστούς είναι ένας εξελικτικά συντηρημένος μηχανισμός που επηρεάζει στη βιολογική συμπεριφορά του οστεοσαρκώματος, και η ποσοτικοποίηση αντιπροσωπευτικών μεταγραφημάτων από αυτή την οικογένεια, όπως miR-382, miR-134 και miR-544, παρέχει προγνωστικούς και προβλεπτικούς δείκτες [274] .

3.9.4 Mirnas με στόχευση σε μοριακούς παράγοντες σε οστεοσαρκώμα

I.Γενικά

Μοριακοί παράγοντες που εμπλέκονται μέσω των miRNas και της απορρυθμίσεώς τους στην ανάπτυξη του οστεοσαρκώματος φανερώνουν ένα πολύπλοκο δίκτυο αλληλεπιδράσεων .Για παράδειγμα ,σε υποεκφρασμένα κύτταρα ανθρώπινου οστεοσαρκώματος απουρινικής /απυριμιδινικής ενδονουκλεάσης 1 (APE1), επτά microRNA (hsa-miR-451, hsa-miR-1290, hsa-miR-765, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-513a-5p, hsa-miR-129-5p and hsa-miR-31) ήταν σε αυξημένη ρύθμιση και τα άλλα έξι (hsa-miR-29b, hsa-miR-197, has-let-7b, hsa-miR-324-5p, hsa-let-7i and hsa-miR-484) ήταν σε μειωμένη ρύθμιση. Τα miRNAs και τα γονίδια στόχοι τους που επηρεάζονται από την έκφραση του APE1 συμμετείχαν σε οδούς που σχετίζονται με διαδικασίες ανάπτυξης, τη ρύθμιση των κυτταρικών διαδικασιών, και την κυτταρική σηματοδότηση (όπως TGF- β , Wnt, MAPK και την οδό σηματοδότησης του p53) [275] .

II.Ογκοκατασταλτικά miRNAs σε OSS

α.Επίδραση σε παράγοντες του διάμεσου ιστού

Μείωση της ρύθμισης του miR-143 σε ιστούς συσχετίζεται με την μετάσταση στους πνεύμονες ανθρώπινου οστεοσαρκώματος προωθώντας την κυτταρική διήθηση, πιθανώς μέσω της αύξησης της ρύθμισης του MMP-13 [276]. Ακόμη, ο αυξητικός παράγοντας του συνδετικού ιστού (CTGF-πρωτεΐνη του διάμεσου ιστού με ρόλο στην κυτταρική προσκόλληση, μετανάστευση, πολλαπλασιασμό και αγγειογένεση) αυξάνει την έκφραση MMPs (MMP-2 και MMP-3) και εν συνεχεία προώθει την μετάσταση του όγκου σε κύτταρα ανθρώπινου οστεοσάρκωματος, μειώνοντας την ρύθμιση του miR-519d μέσω των οδών MEK και ERK [277]. Επίσης, η υπερέκφραση του CTGF σε κύτταρα οστεοσαρκώματος αυξάνει την παραγωγή angiopoietin-2 και επάγει την αγγειογένεση, *in vitro* και *in vivo*. Ευρήματα καταδεικνύουν ότι στην CTGF-ενισχυμένη έκφραση angiopoietin-2 και στην αγγειογένεση διαμεσολαβεί η οδός σηματοδότησης της φωσφολιπάση C (PLC) / πρωτεϊνικής κινάσης C (PKCδ). Επιπλέον, η ενδογενής miR-543 έκφραση ρυθμίζεται αρνητικά από το CTGF μέσω της οδού PLC/PKCδ [278]. Το επίπεδο έκφρασης του miR-100 ήταν σημαντικά μειωμένο σε ιστούς οστεοσάρκωματος σε σύγκριση με τους γειτονικά φυσιολογικούς ιστούς. Η προκλητή υπερέκφραση του miR-100 ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε Saos-2 και MG63 κύτταρα, ενώ αντιπαράλληλα ολιγονουκλεοτίδια (*antisense* miR-100) προωθούσαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων. Επιπλέον, η έκφραση του Cyr61, ένας εξωκυττάριος σχετιζόμενος του διάμεσου ιστού αυξητικός παράγοντας, εμφάνισε μειωμένη ρύθμιση από το miR-100 [279]. Επίσης, υπερέκφραση του miR-376c κατέστειλε την έκφραση του μετατρεπτικού αυξητικού παράγοντα άλφα (TGFα) και την έκφραση κατωφερέστερων μορίων της σηματοδότησης, όπως του υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα (EGFR), και επίσης κατέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και μείωσε τη διήθηση σε ιστούς οστεοσαρκώματος και κυτταρικές γραμμές [280].

β. Επίδραση σε πρωτεΐνες και υποδοχείς της κυτταρικής μεμβράνης

Η πρωτεΐνη Ezrin (κυτταροπλασματική πρωτεΐνη περιφερειακής μεμβράνης) συσχετίζεται με την μεταστατικό δυναμικό πολλών κακοηθειών. Υπερέκφραση του miR-183 καταστέλλει τα επίπεδα έκφρασης της Ezrin και αναστέλλει σημαντικά την κινητικότητα και την

διήθηση σε κύτταρα οστεοσαρκώματος [281]. Καταστολή της Ezrin με miR-183 προκάλεσε μείωση της φωσφορυλιωμένης p44/42 MAPK (p-p44/42 MAPK) και επίσης καταστολή της Ezrin με RNAi μιμούμενο την miR-183 δράση ,κατέστειλε τη μετανάστευση και τη διήθηση σε κυτταρικές σειρές και ιστούς, ενώ συνοδεύτηκε με μειωμένη ρύθμιση της p-p44/42 MAPK, γεγονός που υποδηλώνει ότι το miR-183 παίζει σημαντικό ρόλο στην επιθετικότητα του οστεοσαρκώματος [282]. Ακόμη ,η υπερέκφραση του miR-150 κατέστειλε σημαντικά την ικανότητα διήθησης και μετάστασης των κυττάρων OSS F5M2. Αύξηση της ρύθμισης του miR-150 μπορεί να μειώσει την διήθηση των κυττάρων OSS και της μετάστασης μέσω της μείωσης της έκφρασης του Ezrin [283].

Διαφορετικά εκφραζόμενα miRNAs, συμπεριλαμβανομένων του miR-654 και miR-370, βρέθηκαν σε ξενομοσχεύματα OSS καθώς επίσης και η πρωτεΐνη του γονιδίου IRS1 (Insulin receptor substrate 1), ένας προβλεπόμενος στόχος του miR-370, που αλληλεπιδρά με τον IGF1R. Ο IGF1R συνήθως εκφράζεται υψηλά στο OSS, παρέχοντας την εικόνα για την ευαισθησία κάποιων όγκων οστεοσαρκώματος και την αντίσταση κάποιων άλλων σε θεραπεία με αντι-IGF1R αντίσωμα [284]. Το miR-494 επίσης, είναι σημαντικά μειωμένο σε ιστούς OSS και κυτταρικές σειρές. Η υπερέκφραση του miR-494 θα μπορούσε να αναστείλει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, σχηματισμό αποικιών, τη μετανάστευση και την εισβολή *in vitro*, καθώς επίσης και την ανάπτυξη του όγκου σε μοντέλο κατεσταλμένων ποντικών. Ο υποδοχέας 1 του υπόστρωματος ινσουλίνης (IRS1), επίσης ως γονίδιο στόχος του miR-494, ρυθμίζεται αυξητικά, και αντιστρόφως ανάλογα με την miR-494 έκφραση σε ιστούς ασθενών με OSS. Υπερέκφραση του miR-494 μείωσε την ενεργοποίηση της AKT οδού σηματοδότησης [285]. Η υπερέκφραση του miR-194 ανέστειλε μερικώς τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την διήθηση των κυττάρων οστεοσαρκώματος *in vitro*, καθώς επίσης και την ανάπτυξη του όγκου και την πνευμονική μετάσταση των κυττάρων οστεοσαρκώματος *in vivo*. Η υπερέκφραση του miR-194 ανέστειλε την ανάπτυξη του όγκου και την μετάσταση του οστεοσαρκώματος πιθανώς με μείωση της ρύθμισης του στόχου του CDH2 (Cadherin-2 - διαμεμβρανική πρωτεΐνη προσκόλλησης) και IGF1R [286].

Τέλος συγκρίνοντας την έκφραση του miR-548c-3p σε ιστούς ΟΣ (n = 15) και την αντίστοιχη σε γειτονικούς του όγκου ιστούς (n = 15)

ήταν σημαντικά μειωμένη στους ιστούς OSS και σε κυτταρικές σειρές 143B, SaoS2, and HOS. Επιπλέον, το miR-548c-3p στοχεύει άμεσα στην 3'-αμετάφραστη περιοχή της ιντεγρίνης AV (ITGAV), έναν διαμεμβρανικό υποδοχέα που διασυνδέει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ κυττάρου - κυττάρου και κυττάρου-διάμεσου ιστού (ECM), ενώ η miR-548c-3p υπερέκφραση αναστέλλει τα επίπεδα του mRNA και της πρωτεΐνης του ITGAV [287].

γ.Επίδραση στον κυτταροσκελετό/κυτταροκίνηση

Το miR-145 βρέθηκε μειωμένο σε ιστούς οστεοσαρκωμάτων και κυτταρικές σειρές. Προκλητή αύξηση της έκφρασης του miR-145 ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τις ικανότητες διήθησης των MG-63 κύτταρων μέσω της στόχευσης ROCK1 (ενεργοποιείται από σερίνης/θρεονίνης πρωτεϊνική κινάση με ρόλο στην κυτταροκίνηση) [288]. Το miR-335 δρα ως καταστολέας όγκου επίσης μέσω στόχευσης του γονιδίου ROCK1 και αναστέλλοντας τη μετανάστευση και διήθηση κύτταρων οστεοσαρκώματος [289]. Επιπλέον, ευρήματα δείχνουν ότι το και το miR-340 δρα ως καταστολέας όγκου και μειωμένη ρύθμιση του σε ιστούς όγκων μπορεί να συμβάλλει στην εξέλιξη και τη μετάσταση του οστεοσαρκώματος μέσω ενός μηχανισμού που περιλαμβάνει στόχευση του ROCK1 [290]. Επίσης, το miR-214-5p ήταν σημαντικά μειωμένο σε ιστούς OSS και κυτταρικές γραμμές, σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς και κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, η χορήγηση miR-214-5p αναλόγων αύξησε σημαντικά τα miR-214-5p επίπεδα και μείωσε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό και την διήθηση των HOS and G293 κύτταρων OSS. Το miR-214-5p αναγνωρίστηκε ως νέος καταστολέας των όγκων, ο οποίος στοχεύει άμεσα το ROCK1 και καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων κυττάρων OSS [291]. Ακόμη, το miR-101 ήταν σε μειωμένη ρύθμιση στα δείγματα ιστών 20 ασθενών με οστεοσάρκωμα σε σύγκριση με παρακείμενους φυσιολογικούς γειτονικούς ιστούς ($P < 0.01$). Η υπερέκφραση του miR-101 κατέστειλε σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης της πρωτεΐνης του ROCK1, ενώ καταστολή του miR-101 ενισχύσε σημαντικά τα επίπεδα έκφρασης σε MG63 κύτταρα ($P < 0,05$). Επίσης, η υπερέκφραση του miR-101 ανέστειλε τη βιωσιμότητα των κυττάρων, μετανάστευση και διήθηση ενώ προώθησε την απόπτωση με την

αδρανοποίηση του PI3K/AKT και JAK/STAT μονοπάτιου σηματοδότησης μέσω μειωμένης ρύθμισης της ROCK1 [368].

δ.Επίδραση στην ακετυλίωση /απακετυλίωση

Το επίπεδο έκφρασης του miR-126 βρέθηκε μειώμενο σε κύτταρα οστεοσαρκώματος σε σύγκριση με τους γειτονικά φυσιολογικούς ιστούς ,ενώ η έκφραση του SIRT1, μέλος της απακετυλάσης ιστόνης, ρυθμίζεται αρνητικά από το miR-126 [292].

ε.Επίδραση στην απόπτωση

Το miR-302b, που ανάγεται από την επιρουβικήνη, μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του οστεοσαρκώματος, προάγει την κυτταρική απόπτωση και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Το miR-302b μπορεί να ενεργοποιήσει την κασπάση-3 και να ρυθμίσει την Akt/pAkt, Bcl-2, Bim έκφραση για την αύξηση της κυτταρικής απόπτωσης [293]. Αποκατάσταση της ρύθμισης του miR-143 μειώνει την κυτταρική βιωσιμότητα και επάγει την απόπτωση σε κυτταρικές σειρές OSS, κυρίως μέσω της στόχευσης των έκφραση Bcl-2 [294]. Ακόμη, η αποκατάσταση του miR-133a θα μπορούσε να μειώσει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, να προώθησει την κυτταρική απόπτωση, και να καταστέλλει την ογκογονικότητα σε κυτταρικές γραμμές οστεοσαρκώματος .Η επίδραση του miR-133a κατά των όγκων είναι πιθανόν να οφείλεται σε στόχευση και σε καταστολή της Bcl-xL και Mcl-1 έκφρασης η οποία εμποδίζει την απελευθέρωση απο τα μιτοχόνδρια περιεχομένων όπως το κυτόχρωμα c, τα οποία οδηγούν σε ενεργοποίηση της κασπάσης [295].Επίσης, σε αμφοτέρους U2OS και SAOS-2 οστεοβλαστικούς τύπους κυττάρων, η υπερέκφραση του miRNA-29a μείωσε επίσης την Bcl-2 και Mcl-1, ενώ αποσιώπηση του miRNA-29a οδήγησε σε αυξημένη έκφραση τους. Αυξημένη έκφραση των miRNA-29a αύξησε την έκφραση των δύο ογκοκατασταλτικών γονιδίων, E2F1 και E2F3 [296].

MirRnas που σχετίζονται με την έκφραση του p53 γονιδίου εμπλέκονται σε αυτή την οδό απόπτωσης. Η έκφραση του mir-34s (άμεσος στόχος του p53) ήταν μειωμένη σε δείγματα όγκων

οστεοσαρκώματος, ενώ το miR-34 γονίδιο υπέστη ελάχιστες απαλείψεις και επιγενετική αδρανοποίηση [297]. Το p53 προκάλεσε αύξηση της ρύθμισης του miR-192, miR-194 και miR-215 σε κύτταρα U2OS που φέρουν άγριου τύπου p53 καθώς επίσης το miR-192 και miR-215 αύξησαν την έκφραση του p21, που φαίνεται να είναι ογκοκατασταλτικό της καρκινογένεσης μέσω της συσσώρευσης του p21 και αναστολή του κυτταρικού κύκλου [298]. Σε άλλη μελέτη φάνηκε ότι το miR-199a και miR-34a μπορούσαν να προκαλέσουν την απόπτωση των ανθρώπινων κυττάρων οστεοσαρκώματος μέσω ενεργοποίησης του μονοπατιού σηματοδότησης p53 [299]. Η απώλεια της έκφρασης του miR-31 συνδέθηκε με ελαττώματα στην οδό του p53, και η υπερέκφραση του miR-31 ανέστειλε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυτταρικών σειρών OSS [300]. Τέλος δύο διαφορετικές κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος, U2OS και Saos-2, είχαν σχετικά υψηλά επίπεδα έκφρασης της survivin (μέλος των αναστολέων της απόπτωσης -IAP) , και ειδικοί καταστολείς της survivin είχαν σαν αποτέλεσμα την αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, διακοπή του κυτταρικού κύκλου, επαγωγή της απόπτωσης, και αυξημένη ευαισθησία στην σισπλατίνη. Δύο microRNAs, το miR-34a και miR-203, στοχεύουν ειδικά τη survivin αναστέλλοντας την έκφραση της [301].

στ.Επίδραση σε μοριακούς παράγοντες και οδούς σήματος

Σε μια μελέτη, η miR-133a και miR-133b έκφραση μειώθηκε κατά 135 φορές και 47 φορές, αντίστοιχα, και η μειωμένη έκφραση επιβεβαιώθηκε τόσο σε κατεψυγμένα όσο και εγκλεισμένα σε παραφίνη δείγματα οστεοσαρκωμάτων .Υπερέκφραση, μετά απο επιμόλυνση, του miR-133b σε κυτταρικές γραμμές U2-OS και MG-63 οστεοσάρκωματος ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την διήθηση , τη μετανάστευση, και την απόπτωση, μειώνοντας την έκφραση των προβλεπόμενων γονιδίων στόχων BCL2L2, MCL-1, IGF1R και MET, καθώς επίσης και την έκφραση phospho-Akt και FAK [302] . Το miR-199a-3p μπορεί να παίζει ένα λειτουργικό ρόλο στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων οστεοσαρκώματος, ενώ αποκατάσταση της έκφρασης του miR-199a-3p μπορεί να παρέχει θεραπευτικά οφέλη στο οστεοσάρκωμα μέσω της ρύθμισης του mTOR και STAT3 [303] . Επίσης το miR-101 ήταν υπορυθμισμένο σε ιστούς οστεοσαρκώματος και Saos-2

κυτταρική σειρά σε σύγκριση με παρακείμενους μη νεοπλασματικούς ιστούς των οστών και κυτταρική σειρά οστεοβλαστών. Η υπερέκφραση του miR-101 ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό και προώθησε την απόπτωση των κυττάρων Saos-2. Επιπλέον, βιοπληροφορική ανάλυση έδειξε ότι το γονίδιο mTOR ήταν ένας άμεσος στόχος του miR-101. Η υπερέκφραση του miR-101 μείωσε σημαντικά την έκφραση των επίπεδων του mTOR τόσο σε mRNA όσο και σε πρωτεΐνη σε Saos-2 κύτταρα [304]. Το miR-506 υποεκφράζεται σε ιστούς και κύτταρα οστεοσαρκώματος. Η υπερέκφραση του miR-506 κατέστειλε τον πολλαπλασιασμό και προώθησε την απόπτωση σε κύτταρα οστεοσαρκώματος *in vitro* και ανέστειλε την αύξηση των όγκων *in vivo*. Η υπερέκφραση του miR-506 ανέστειλε σημαντικά την δραστικότητα της AEG-1 (ή metadherin, γονίδιο στόχος που εμπλέκεται μέσω του HIF-1 στη διαμεσολάβηση της αγγειογένεσης και του συμπλόκου σίγησης του RNA-RISC), και οδήγησε σε μία ανασταλτική επίδραση στο οστεοσάρκωμα *in vitro*. Επιπλέον, η υπερέκφραση του miR-506 ή μειωμένη ρύθμιση του AEG-1, ανέστειλε το μονοπάτι σηματοδότησης της Wnt/ β -κατενίνης [305]. Ακόμη, η πρωτεΐνη του θερμικού σοκ 90B1 (Hsp90B1 - μια πρωτεΐνη συνοδός με ρόλο στην αναδίπλωση πρωτεϊνών στο εκκριτικό μονοπάτι, και στην έμφυτη και προσαρμοστική ανοσία) θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως αντικαρκινική θεραπεία σε οστεοσάρκωμα όπως έδειξε μια μελέτη σε MG63 κύτταρα οστεοσαρκώματος. Το miR-223 έχοντας τη Hsp90B ως έναν άμεσο στόχο του, μπορεί να έχει μία λειτουργία καταστολέα όγκου στο οστεοσάρκωμα μέσω της PI3K /Akt/mTOR μονοπατιού [306]. Επίσης, το miR-195-5p ήταν σημαντικά μειωμένο σε ανθρώπινα κύτταρα οστεοσαρκώματος και προκλητή έκφραση του miR-195-5p ανέστειλε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ κατέστειλε την κυτταρική μετανάστευση και διήθηση. Το miR-195-5p δεσμεύεται στην 3'-UTR του NKD1 (ρυθμιστής του Wnt οδού σηματοδότησης), και τα επίπεδα NKD1 mRNA και πρωτεΐνη μειώνονται μετά από την υπερέκφραση του miR-195-5p [307]. Το miR-187 βρέθηκε σημαντικά μειωμένο σε κυτταρικές σειρές OSS και ιστούς. Μηχανιστικά, ο ZEB2 φάνηκε να λειτουργεί ως άμεσος στόχος του miR-187 σε κύτταρα OSS και σε δείγματα ασθενών με OSS. Τα ZEB2 (παράγοντας μεταγραφής που παίζει ένα ρόλο στην TGF β οδό σηματοδότησης και εμβρυϊκή ανάπτυξη) επίπεδα έκφρασης βρέθηκαν αυξημένα και συσχετίζονται

αντίστροφα με την miR-187 έκφραση υποδηλώνοντας ότι miR-187 λειτουργεί ως καταστολέας όγκων σε OSS [308]. Ακόμη ,το επίπεδο έκφρασης του miR-133b ήταν μειωμένο, ενώ στο SIRT1 (ένζυμο που αποακετυλιώνει πρωτεΐνες που συμβάλλουν στην κυτταρική ρύθμιση,αντίδραση σε στρεσογόνους παράγοντες, μακροζωία) τα επίπεδα έκφρασης του mRNA αυξήθηκαν σε ιστούς οστεοσαρκώματος και κυτταρικές σειρές. Το SIRT1 είναι ένας νέος άμεσος στόχος του miR-133b και υπερέκφραση του miR-133b κατεστείλε την SIRT1 έκφραση και εξασθένησε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την διήθηση. Τα ανασταλτικά αποτελέσματα του άξονα miR-133b/SIRT1 στην εξέλιξη του οστεοσάρκωματος εμπλέκονται στο Wnt/ β -κατενίνης μονοπάτι [309]. Τέλος, το SNCG mRNA (πιθανά με ρόλο στην ενεργοποίηση του MAPK and Elk-1 μονοπατίου) και τα επίπεδα έκφρασης πρωτεΐνης του ήταν σημαντικά αυξημένα σε ιστούς οστεοσαρκώματος ($P < 0,01$), στο αίμα των ασθενών με οστεοσάρκωμα ($P < 0.01$) και σε ιστούς μεταστατικούς στον πνεύμονα ($P < 0,01$). Το miR-497 ήταν σημαντικά μειωμένο και στα τρία δείγματα.Ως εκ τούτου, μειωμένη ρύθμιση του miR-497 μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη και μετάσταση του οστεοσαρκώματος μέσω της αυξημένης ρύθμισης SNCG mRNA (γονίδιο-στόχος) [310].

ζ.Επίδραση σε ενζύμα μεταβολισμού των λιπιδίων

Η αναστολή της συνθετάσης των λιπαρών οξέων (FASN) έχει δείξει να καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την εισβολή και την μετανάστευση στο OSS. Η FASN μπορεί να είναι ένας άμεσος στόχος του miR-424 .Επίπεδα έκφρασης FASN mRNA και της πρωτεΐνης, ήταν σημαντικά μειωμένα σε κύτταρα U2OS επιμολυσμένα με has-miR-424 και η μετανάστευση και η εισβολή των κυττάρων μειώθηκαν σημαντικά από την υπερέκφραση του miR-424 [311]. Η menin (ενα ογκοκατασταλτικό γονίδιο που κωδικοποιείται από το MEN1) είναι σημαντικά υπορρυθμισμένο σε ιστούς οστεοσάρκωματος, σε σύγκριση με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς. Αυξημένη ρύθμιση του microRNA-142-3p από menin υπερέκφραση, αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε U2OS και MG63 κύτταρα και μειώνει την έκφραση της πρωτεΐνης του FASN μέσω σύνδεσης με την 3'-αμετάφραστη περιοχή της [312] . Επίσης ,ενίσχυση της εκφράσης της

λυσοφωσφατιδικής όξινης ακετυλοτρανσφεράσης β (LPAATβ) η οποία παίζει ρόλο στην de novo βιοσύνθεση φωσφολιπιδίων συσχετίστηκε με πολλαπλασιασμό κυττάρων οστεοσαρκώματος. Το miR-24, που στοχεύει την LPAATβ, είναι μειωμένο σε κύτταρα οστεοσαρκώματος, συμβάλλοντας στην αύξηση της ρύθμισης LPAATβ και αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων οστεοσαρκώματος [313]. Η ATP κιτρική λυάση (ACLY), ένα ένζυμο κλειδί για την έναρξη της de novo σύνθεσης των λιπιδίων, έχει βρεθεί σε αυξημένη ρύθμιση σε καρκινικά κύτταρα, και η αναστολή του προκαλεί κατασταλτικά αποτελέσματα σε μία ποικιλία όγκων. Το miR-22 (που επιβεβαιώνεται με χαμηλή έκφραση) είναι υπεύθυνο για την μετα-μεταγραφική ρύθμιση του ACLY σε τέσσερις τύπους κυττάρων όγκου συμπεριλαμβανομένων οστεοσαρκώματος, του προστάτη, του τραχήλου της μήτρας και καρκίνους του πνεύμονα [314].

η. Επίδραση στη διαφοροποίηση

Η υπερέκφραση του miR-34a οδήγησε σε μειωμένη έκφραση Eag1 (υπερεκφρασμένο στον καρκίνο, υψηλά εκφρασμένο κατά τη μυογονική διαφοροποίηση) στα κύτταρα οστεοσαρκώματος, ενώ η αναστολή του miR-34a αύξησε την έκφραση Eag1, γεγονός που υποδηλώνει ότι miR-34a θα μπορούσε να αναστείλει την ανάπτυξη οστεοσαρκώματος μέσω καταστολής της ρύθμισης της έκφρασης Eag1 [315]. Επίσης, η έκφραση της RUNX2, ενός βασικού μεταγραφικού παράγοντα που συνδέεται με τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών, είναι απορυθμισμένη στο OSS. Εξωγενής αναπλήρωση του p53-εξαρτώμενου miR-34c, μειώνει σημαντικά τα επίπεδα της πρωτεΐνης RUNX2 σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος. Η Nutlin-3-μεσολάβητης της σταθεροποίησης του p53 αυξάνει την έκφραση του miR-34c και μειώνει την RUNX2 [316]. Επιπλέον, το επίπεδο έκφρασης miR-150 είναι χαμηλότερο σε κυτταρικές γραμμές (Saos-2, MG-63) ανθρώπινου οστεοσαρκώματος σε σύγκριση με την κανονική κυτταρική σειρά οστεοβλάστη. Η υπερέκφραση του miR-150 αναστέλλει το πολλαπλασιασμό μέσω σύνδεσης στην 3'-UTR του RUNX2 με αποτέλεσμα την μείωση του επιπέδου πρωτεΐνης RUNX2 [317]. Σε ιστούς ΟΣ επίσης βρέθηκε μειωμένη ρύθμιση του miR-106a-5p, ενώ αυξημένη ρύθμιση του miR-106a-5p μπορούσε να αναστείλει τον

πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την διήθηση στοχεύοντας το HMGA2 (μεταγραφικός ρυθμιστικός παράγοντας με ρόλο στη μεσεγχοματογεννή διαφοροποίηση). [318].

θ.Σχέση με πρωτεΐνες σύντηξης

Ενώ η αναστολή του EWS-FLI1 έχει μόνο ελαφρές επιπτώσεις στην ποσότητα του CD99 μετάγραφου, προκαλείται μια δραματική μείωση του επιπέδου έκφρασης της πρωτεΐνης CD99, ως εκ τούτου, υποδηλώνοντας ότι μετα-μεταγραφικοί μηχανισμοί από microRNAs, πιθανώς διαμεσολαβούν. Το miR-30a-5p έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με την περιοχή 3'UTR του CD99 και να μειώνει τη ρύθμιση της έκφρασή του. Επιπλέον, η εκ νέου έκφραση των miRNA-30a-5p σε κυτταρική σειρά Ewing επάγει τη μείωση κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της διήθησης [319].

ι.Η δράση του Let 7

Από τα 933 miRNA που αναλύθηκαν, 108 miRNA βρέθηκαν να εκφράζονται σε 24 δείγματα ιστού OSS. MiRNAs της οικογένειας let-7 ρυθμίζουν την έκφραση των πρωτεϊνών βιμεντίνης και σερίπνης H1 (chaperone proteine) ενώ 5 miRNA της οικογένειας let-7 (HSA-let-7a, b, f, g και i) κατέστειλαν σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων OSS [320]. Η EWS πρωτεΐνη (πρωτεΐνη που δεσμεύεται στο RNA) διαμεσολαβεί στη γέννηση του ώριμου let-7g από το pre-let-7g. Το ώριμο let-7g ήταν κατεσταλμένο σε αμφότερες τις κυτταρικές σειρές σαρκώματος Ewing και πρωτογενές σάρκωμα Ewing.Επισης, τα επίπεδα έκφρασης του Dicer και CCND1 (Κυκλίνη D1), τα οποία είναι γνωστά γονίδια στόχοι της οικογένειας let-7 ήταν σε αυξημένη ρύθμιση [321]. Το KRAS είναι ένας στόχος του let-7a στα κύτταρα OSS, και η εισαγωγή του έλασσοнос αλληλόμορφου rs61764370 στην KRAS 3'-UTR επηρέασε σημαντικά την αλληλεπίδραση microRNA/mRNA και φαίνεται να αυξάνει τον κίνδυνο ανάπτυξης μεταστατικής νόσου στο OSS. Επιπλέον, σε ένα σύνολο 36 δειγμάτων ιστού OSS τριών διαφορετικών γονότυπων (TT, 22 ;TG, 10; GG, 4), η let-7a mRNA έκφραση ήταν παρόμοια μεταξύ των ομάδων, ενώ η έκφραση του mRNA και της

πρωτεΐνης του KRAS στο γονότυπο της TT ομάδας ήταν σημαντικά χαμηλότερη από ότι στις ομάδες με γονότυπο GT ή GG. Ακόμη, η let-7a αρνητική ρύθμιση στο KRAS, παρεμβαίνει στη βιωσιμότητα, στη διεισδυτικότητα και τη μετανάστευση των κυττάρων OSS μόνο σε TT γονότυπο [322].

κ. Επίδραση στο ογκογονίδιο cMYC

Βιοπληροφορικές προβλέψεις διαπίστωσαν ότι ένα υποσύνολο των 14q32 miRNAs (miR-382, miR-369-3p, miR-544 και miR-134) θα μπορούσαν δυνητικά να στοχεύσουν το cMYC μετάγραφο. Αποκατάσταση της έκφρασης αυτών των τεσσάρων 14q32 miRNAs οδήγησαν σε μειωμένα επίπεδα cMYC και επαγόμενη απόπτωση σε κύτταρα SAOS2, επιπλέον εξωγενής έκφραση των 14q32 miRNAs σε κύτταρα SAOS2 μείωσαν σημαντικά το miR-17-92, ένα μεταγραφικό στόχο της cMYC [323]. Το miR-33b ήταν σημαντικά μειωμένο σε ιστούς οστεοσαρκώματος και σειρές κυττάρων. Η υπερέκφραση του miR-33b ανέστειλε σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, και τη διήθηση σε κυτταρική σειρά MG-63. οστεοσαρκώματος. Επιπλέον, το c-MYC καταστέλεται από το miR-33b σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο, μέσω μιας ειδικής θέσης στόχου εντός του 3'UTR [324].

λ. Επίδραση στο ογκογονίδιο MET

Σε άλλη μελέτη το miR-1 βρέθηκε μειωμένο σε ιστούς οστεοσαρκώματος και κυτταρικές γραμμές και αποκατάσταση του miR-1 κατέστειλε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων οστεοσαρκώματος με αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου. Η υπομονάδα 1 του συγκρότηματος του διαμεσολαβητή (Med1) και 31 (Med 31) έχουν επιβεβαιωθεί ως στόχοι του miR-1 στο οστεοσάρκωμα. Τόσο το miR-1 όσο και η πρόκληση καταστολής της Med1 ή Med31 μείωσαν την έκφραση του πρωτο-ογκογονιδίου MET και μπλόκαραν την σηματοδότηση κατώτερα της οδού του MET [325]. Μια G>A παραλλαγή στην περιοχή κωδικοποίησης του pre-miR-34a βρέθηκε να σχετίζεται με υψηλότερη νοσηρότητα στο OSS. Με την ανίχνευση της έκφρασης του

ώριμου miR-34a σε κύτταρα επιμολυσμένα με φορείς έκφρασης pre-miR-34a διαφορετικών γονότυπων, καταδείχθηκε ότι η G>A παραλλαγή ελάττωσε την έκφραση του miR 34a in vitro. Αυτό ήταν σε συμφωνία με τα στοιχεία που συλλέχθηκαν από ιστό του όγκου και δειγμάτων ορού ασθενών. Επίσης η G>A παραλλαγή μείωσε την καταστολή του cMet σε δύο κυτταρικές σειρές OSS [326]. Μηχανιστικά, το γονίδιο PAX3 (με ρόλο στην ανάπτυξη των σκελετικών μυών) αναγνωρίστηκε ως λειτουργικός στόχος του miR-489-3p στα κύτταρα OS και επίσης φάνηκε το miR-489-3p ανέστειλε την μετάσταση των κυττάρων OS μειώνοντας την έκφραση του PAX3. Μηχανιστικές έρευνες έδειξαν ότι η μεταστατική δράση της PAX3 επιτυγχάνεται μέσω της διαμεσολάβησης στην αύξηση της ρύθμισης του κατωφερέστερου στόχου της ,του υποδοχέα MET τυροσινικής κινάσης και τα αποτελέσματα αποκαλύπτουν ότι η miR-489-3p-Pax3-MET σηματοδότηση είναι σημαντική για τη μετάσταση στο OSS [327]. Επιπλέον, το miR-613 ήταν σημαντικά μειωμένο σε ιστούς OSS και κυτταρικές σειρές, και μειωμένη έκφραση του miR-613 συσχετίστηκε με προχωρημένο στάδιο TNM και μετάσταση σε λεμφαδένες. Η υπερέκφραση του miR-613 ανέστειλε σημαντικά την έκφραση του-MET και του κατωφερέστερου PI3K/Akt /mTOR στο σηματοδοτικό μονοπάτι σε κύτταρα OSS. Σε κλινικά δείγματα OSS, υπήρχε σημαντική αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ miR-613 και η έκφραση του mRNA c-MET [328].

μ.Επίδραση σε κινάσες/GTPάσες

Η έκφραση του miR-124 είναι σημαντικά μειωμένη σε ιστούς οστεοσαρκώματος και κυτταρικές σειρές, σε σύγκριση με γειτονικούς ιστούς και επίσης σε μεταστατικούς ιστούς οστεοσαρκώματος ήταν χαμηλότερη από ότι σε μη μεταστατικούς ιστούς. Το Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, GTPάση που παίζει ρόλο στην κυτταρική κινητικότητα και μετάσταση με σχηματισμό ελασματοπόδιων) επιβεβαιώνεται ως ένα νέος, άμεσος στόχος του miR-124. Η υπερέκφραση του miR-124 κατέστειλε την έκφραση της Rac1 πρωτεΐνης και μείωσε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, την μετανάστευση, και τη διήθηση και αύξησε την απόπτωση σε MG-63 και U2OS in vitro [329]. Το miR-665 ήταν σε μειωμένη ρύθμιση σε ιστούς OSS και το Rab23, μικρή

ΓΤΡάση που μεσολαβεί της μεταγωγή σήματος , είναι ένα άμεσο γονίδιο στόχος που συσχετίστηκε αντίστροφα με την έκφραση του miR-665 στους ιστούς οστεοσάρκωματος όπως έχει ήδη σχολιαστεί σε προηγούμενο κεφάλαιο [252]. Σε μια άλλη μελέτη, το miR-379 ήταν σε μειωμένη ρύθμιση σε ιστούς οστεοσαρκώματος και κυτταρικές σειρές και περαιτέρω λειτουργική δοκιμασία αποκάλυψε ότι το miR-379 κατέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων οστεοσαρκώματος και τη διήθηση *in vitro* και επίσης καθυστέρησε την ανάπτυξη των ξενομοσχευμάτων οστεοσαρκώματος *in vivo*. Μηχανιστικά, η PDK1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase-ένζυμο που φωσφοριλιώνει την πυροσταφυλική αφυδρογονάση -PDH- ένα μιτοχονδριακό πολυενζυμικό σύμπλοκο) ταυτοποιήθηκε ως άμεσος στόχος του miR-379 στο οστεοσάρκωμα, στο οποίο η PDK1 είναι υπερεκφρασμένη και έδειξε αντίστροφη συσχέτιση με το miR-379 [330]. Το miR-124 ήταν μειωμένο σε κυτταρικές σειρές και ιστούς OSS και το χαμηλό επίπεδο των miR-124 σχετίζεται με αυξημένη έκφραση της σφιγγοσινικής κινάσης 1 (SPHK1). Αυξημένη ρύθμιση του miR-124 ανέστειλε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη διήθηση , και την έκφραση των MMP-2 και -9 σε κύτταρα OSS με άμεση SPHK1 στόχευση [331]. Το miR-638 ήταν επίσης σε μειωμένη ρύθμιση σε ιστούς OSS σε σύγκριση με αντίστοιχους μη καρκινικό ιστούς . Το PIM1 (ένα πρωτοογκογονίδιο-σερίνη/θρεονίνη κινάση) είναι κατωφερέστερο γονίδιο στόχος του miR-638 σε κύτταρα OSS, και αποσιώπηση της έκφρασης PIM1 φανερώνει το ανασταλτικό αποτέλεσμα του miR-638 επί του κυτταρικού πολλαπλασιασμού στο OSS [332]. Το miR-34c-3p ήταν σε χαμηλή έκφραση σε ιστούς OSS και κυτταρικές σειρές, καθώς και μειωμένα επίπεδα του miR-34c-3p συνδέθηκαν με υψηλό ποσοστό θνησιμότητας σε ασθενείς με OSS. Το υπόστρωμα της μυριστιδοποιημένης πλούσιας σε αλανίνη πρωτεϊνικής κινάσης C (MARCKS-με πολλαπλούς ρόλους όπως στο σχήμα των κυττάρων, την κυτταρική κινητικότητα, την έκκριση, την διαμεμβρανική μεταφορά, την ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, και ανάπτυξη του νευρικού συστήματος) αναγνωρίστηκε ως άμεσος στόχος του miR-34c-3p και η υπερέκφραση του αντιστρέφει εν μέρει τις κατασταλτικές επιδράσεις των miR-34c-3p [333]. Ακόμη, υπερέκφραση του miR-377 μείωσε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κατέστειλε την διήθηση σε MG-63 κύτταρα αλλά δεν είχε καμία επίδραση στην απόπτωση των MG-63 κυττάρων. Υπερέκφραση της κινάση 6

εξαρτώμενη της κυκλίνης (CDK6) εξασθένησε την όγκοκατασταλτική δράση του miR-377 επί του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, υποδεικνύοντας την CDK6 ως στόχος του miR-337 [340].

v.Επίδραση σε μεταγραφικούς παράγοντες

Πολλά miRna φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικούς μεταγραφικούς παράγοντες. Τα επίπεδα του miR-126 ήταν σταθερά υποεκφραζόμενα σε ιστούς και κυτταρικές σειρές OSS, σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς των οστών και φυσιολογικά κύτταρα οστεοβλαστών (NHOb). Έκτοπη έκφραση του miR-126 ανέστειλε τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση, την διήθηση, και αύξησε την απόπτωση των MG-63 κυττάρων με καταστολή της έκφρασης του Sox2 (μεταγραφικός παράγοντας που είναι απαραίτητος για τη διατήρηση της αυτο-ανανέωσης) [334]. Σε μια μελέτη, η έκφραση του miR-32 ήταν με σημαντικά μειωμένη ρύθμιση σε ιστούς οστεοσαρκώματος, σε σύγκριση με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς και μελέτες *in vitro* απέδειξαν περαιτέρω ότι τα miR-32 mimics ήταν σε θέση να καταστείλουν, τον πολλαπλασιασμό σε Saos-2 και U2OS κύτταρα. Επιπλέον, φάνηκε ότι η έκφραση της SOX9 (μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει δραστηριότητα γονιδίων που ελέγχουν την ανάπτυξη του σκελετού και τον προσδιορισμό του φύλου) ρυθμίζεται αρνητικά από miR-32 [335]. Η έκφραση του miR-202 μειώνεται σημαντικά σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος και δείγματα ιστών. Αποκατάσταση της έκφρασης miR-202 μπορεί να αναστείλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων OSS, επάγει την κυτταρική απόπτωση, και μειώνει την ανάπτυξη του όγκου σε κατεσταλμένα μοντέλα ποντικών, υποδεικνύοντας ότι το miR-202 δρα ως καταστολέας του όγκου, ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων OSS και της απόπτωσης μέσω της μείωσης της έκφρασης του Gli2 (μεταγραφικός παράγοντας, μεσολαβητής της Sonic hedgehog σηματοδότησης) [336]. Επίσης, το miR-141 και miR-146b-5p καταστέλλουν την προμεταστατική διαδικασία μεσεγχυματικών χαρακτηριστικών, αναστέλλοντας την πρωτεϊνική κινάση AKT μέσω καταστολής της AUF1 (ετερογενής πυρηνική ριβονουκλεοπρωτεΐνη) στα κύτταρα οστεοσαρκώματος. Η miR-141 και miR-146b-5p μέσω της στόχευσης της AUF1 και την καταστολή του επαγωγέα ZEB1

επιθηλιακών σε μεσεγχυματικά χαρακτηριστικών, ρυθμίζουν θετικά τους επιθηλιακούς δείκτες (E-cadherin και EpCAM) και καταστέλλουν τους μεσεγχυματικούς δείκτες (N-cadherin, βιμεντίνη, Twist2, και ZEB1) [337]. Το miR-212 ήταν σημαντικά μειωμένο σε ανθρώπινους ιστούς οστεοσαρκώματος, σε σύγκριση με παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς. Εισαγωγή miR-212 ανάλογο (mimics) σε MG63 και U2OS κύτταρα ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την διήθηση. Η περιοχή προσδιορισμού του φύλου, Y-box 4 (ή Sox4 –μεταγραφικός παράγοντας που εμπλέκεται στη ρύθμιση της εμβρυϊκής ανάπτυξης και στον καθορισμό της μοίρας του κυττάρου), είναι ένα γονίδιο στόχος του miR-212 [338]. Επιπλέον, η TUT1, μια νουκλεοτιδική τρανσφεράση, ήταν σημαντικά μειωμένη σε οστεοσάρκωμα, σε σύγκριση με παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς. Αυξημένη έκφραση TUT1 αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό σε κυτταρικές σειρές U2OS and MG63. Σε μοριακό επίπεδο, η TUT1 θα μπορούσε να αναστείλει τα επίπεδα έκφρασης των PPAR gamma (είδος πυρηνικού υποδοχέα τύπου II που ρυθμίζει την αποθήκευση των λιπαρών οξέων και το μεταβολισμό της γλυκόζης) και SREBP-1c (μεταγραφικός παράγοντας που ρυθμίζει γονίδια που απαιτούνται για τον μεταβολισμό της γλυκόζης και την παραγωγή των λιπαρών οξέων και των λιπιδίων ενώ η έκφραση της ρυθμίζεται από την ινσουλίνη), δύο βασικούς ρυθμιστικές της λιπογένεσης, μέσω αυξημένης ρύθμισης των microRNA-24 και microRNA-29a, και λειτουργώντας ως ογκοκατασταλτικό γονίδιο στο οστεοσάρκωμα [339].

Το miR-320 ήταν μειωμένο σε ανθρώπινες κυτταρικές σειρές OSS. Ετερογενής έκφραση του miR-320 ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και προκάλεσε διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Εκτός αυτού, το miR-320 στοχεύει και ρυθμίζει άμεσα την έκφραση του E2F1 (μεταγραφικός παράγοντας που διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου και της δράσης των ογκοκατασταλτικών πρωτεϊνών) σε κύτταρα U2OS [341]. Κύτταρα ιστών οστεοσαρκώματος και κυτταρικές σειρές είχαν χαμηλά επίπεδα έκφρασης του miR-491-5p, αλλά υψηλά επίπεδα έκφρασης της P4 forkhead-box (FOXP4-μεταγραφικός παραγοντας ειδικός της ρύθμισης γονιδίων ιστών και κυττάρων κατά την ανάπτυξη). Η επιμόλυνση των SAOS-2 και MG63 κυττάρων με miR-491-5p mimics ανέστειλε την έκφραση των πρωτεϊνών FOXP4 (γονίδιο στόχος), το οποίο κατέστειλε την κυτταρική ανάπτυξη

και μετανάστευση, αλλά και προήγαγε την απόπτωση [342]. Το miR-192 ήταν υπορυθμισμένο σε 20 δείγματα ιστού OSS και δύο κυτταρικές σειρές OSS, σε σύγκριση με παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς και ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοβλάστων. Περαιτέρω *in vitro* μελέτες έδειξαν ότι προκλητή έκφραση του miR-192 ανέστειλε στα κύτταρα U2OS και MG63, τον πολλαπλασιασμό, την διήθηση, τη μετανάστευση και την απόπτωση που επάγονται, μέσω της ρύθμισης του ειδικού μεταγραφικού παράγοντα του T κυττάρου (TCF7 - γονίδιο στόχος, εκφράζομενο κυρίως σε T-κύτταρα με σημαντικό ρόλο στα NK-T κύτταρα φονείς και στην εγγενή ανάπτυξη των λεμφοειδών κυττάρων) [343]. Επίσης, ο παράγοντας HIF-1a (υπομονάδα του ετεροδιμερικού μεταγραφικού παράγοντα HIF-1) αναγνωρίστηκε ως στόχος του miR-33b, και τα επίπεδα πρωτεΐνης του μειώθηκαν μετά την υπερέκφραση του miR-33b σε κύτταρα U2OS. Επιπλέον, ο HIF-1a (άμεσος στόχος) βρέθηκε σε σημαντικά αυξημένη ρύθμιση στους ιστούς οστεοσαρκώματος σε σύγκριση με παρακείμενους μη καρκινικούς ιστούς, και τα επίπεδα έκφρασή τους συσχετίζονταν αντίστροφως ανάλογα με τα επίπεδα miR-33b (σημαντικά μειωμένα) σε ιστούς οστεοσαρκώματος [344]. Ακόμη, το miR-212 βρέθηκε επίσης μειωμένο σε κυτταρικές γραμμές οστεοσαρκώματος σε σύγκριση με κυτταρικές σειρές κανονικών οστεοβλαστών. Η υπερέκφραση του miR-212 κατέστειλε σημαντικά την βιωσιμότητα και τη μετανάστευση σε MG-63 και Saos-2 κυτταρικές γραμμές. Επίσης το miR-212 θα μπορούσε να συνδεθεί απευθείας σε ακολουθίες εντός της 3'UTR του FOXA1 mRNA (μεταγραφικός παράγοντας με ρόλο στην ανάπτυξη και πολλαπλασιασμο-μετάλλαξη σε ογκογονίδιο στο οστεοσάρκωμα), με την miR-212 κατασταλτική διαμεσολάβηση στα επίπεδα πρωτεΐνης του FOXA1 σε κύτταρα οστεοσαρκώματος MG-63 και Saos-2 [345].

ξ.Επίδραση στη βλαστική ικανότητα των CSCs

Σε μια μελέτη διαπιστώθηκε ότι το miR-29b-1 (ένα μέλος της οικογένειας miRNA-29) καταστέλλει βλαστικές ιδιότητες των 3AB-OS καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSCs). Μετά από σταθερή επιμόλυνση των κυττάρων 3AB-OS με miR-29b-1, η υπερέκφραση του, μείωσε σταθερά τόσο την αναπτυξη των 3AB-OS CSCs όσο και την ικανότητά τους στον σχηματισμό αποικιών, ευαισθητοποιώντας τα

κύτταρα 3AB-OS στην προκαλούμενη απο χημειοθεραπευτικό φάρμακο απόπτωση, αλλά δεν επηρέασε τις ικανότητες μετανάστευσης και διήθησης. Το miR-29b-1 ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του CD133, N-myc, CCND2, E2F1 E2F2, Bcl-2 και IAP-2 Oct3 / 4, Sox2 Nanog [346].

ο.Επίδραση στην μεθυσίωση

MiR-101 μπορεί να δρα ως καταστολέας όγκων σε οστεοσάρκωμα, δεδομένου ότι έχει ένα κατασταλτικό ρόλο στην κυτταρική μετανάστευση, από τη στόχευση της EZH2 (μεθυσίωσης παράγοντας). Έκτοπη υπερέκφραση του miR-101 μειώνει την ρύθμιση της έκφρασης του EZH2 και αναστέλει σημαντικά τη μετανάστευση και την διήθηση των κυττάρων οστεοσαρκώματος [347].

π.Mirnas με ρόλο στο σχήμα και κινητικότητα των κυττάρων

Το miR-217 ήταν με μειωμένη ρύθμιση σε κυτταρικές γραμμές οστεοσαρκώματος και ιστούς σε σύγκριση με εκείνη σε φυσιολογικά κύτταρα των οστών ή ιστών και χαμηλό επίπεδο του miR-217 συνδέθηκε με μετάσταση. Υπερέκφραση του miR-217 κατέστειλε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την διήθηση των κυττάρων οστεοσαρκώματος μέσω αναστολής του κατωφερέστερου στόχου WASF3 (γονίδιο με ρόλο στη μετάδοση σήματος που περιλαμβάνει αλλαγές στο σχήμα των κυττάρων, κινητικότητα ή λειτουργία) και λειτουργεί ως ένα όγκοκατασταλτικό miRNA [348]. Το mir-144 είναι με μειωμένη ρύθμιση σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος και σε πρωτογενή δείγματα ιστού ανθρώπινου οστεοσαρκώματος, ενώ η έκτοπη έκφραση του αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων οστεοσαρκώματος και τη διήθηση. Το mir-144 μπορεί να ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων οστεοσαρκώματος και τη διήθηση με την καταστολή του γονιδίου στόχου του, TAGLN (πρωτεΐνη του μετασχηματισμού και αλλαγής σχήματος μέσω ευαίσθητη στη ακτίνη πρόσδεση/συγκόλληση) [349].

ρ.Σχέση με την αγγειογένεση

Η έκφραση του miR-29b ήταν σχετικά μειωμένη σε δείγματα οστεοσαρκώματος σύγκριση με παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς. Η υπερέκφραση του miR-29b κατέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MG63, τη μετανάστευση και την διήθηση και προώθησε την απόπτωση. Τέλος, το miR-29b στοχεύει άμεσα τον VEGF και υπερέκφραση του miR-29b οδήγησε σε μείωση της έκφρασης του επιπέδου της πρωτεΐνης VEGF [350]. Επίσης, το miR-410 μείωσε άμεσα την έκφραση του VEGF στοχεύοντας στην 3'-αμετάφραστη περιοχή του ,σε κύτταρα OSS και υπερέκφραση του miR-410 έδειξε επίσης αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη του όγκου in vivo. Αποκατάσταση του VEGF ανέστρεψε την επίδραση του miR-410 στα κύτταρα OSS, και αύξησε τη ρυθμίση της έκφρασης για την φωσφορυλιωμένη AKT [351]. Τέλος, τα επίπεδα έκφρασης του miR-1 ήταν σημαντικά χαμηλότερα σε ιστούς όγκων OSS από εκείνα στους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς καθώς και σε κυτταρικές σειρές U2OS SAOS-2 σε σύγκριση με κυτταρική σειρά φυσιολογικών οστεοβλαστών (NHOst). Το VEGFA είναι σε αυξημένη ρύθμιση σε ιστούς όγκων OSS και κυτταρικές σειρές SAOS-2 και U2OS. Το miR-1 δρά ως ογκοκατασταλτικό μέσω αναστολής του πολλαπλασιασμού των κυττάρων, της μετανάστευσης και της διήθησης σε κύτταρα U2OS. Το VEGFA είναι άμεσος και λειτουργικός γονίδιο-στόχος του miR-1 αναστέλλοντας άμεσα την πρωτεϊνική έκφραση του VEGFA μέσω της 3'-UTR [352].

σ.Σχέση με αυτοφαγία

Σε χημειοανθεκτικά SAOS-2 και U2OS κύτταρα οστεοσαρκώματος, τα επίπεδα miR-143 ήταν σε σημαντικά μειωμένη ρύθμιση και συνοδεύονταν από αυξήσεις στην ATG2B (autophagy related 2 homolog B) , Bcl-2, και/ή στα επίπεδα της πρωτεΐνης LC3-II9 (κεντρική πρωτεΐνη στην οδό της αυτοφαγίας, όπου λειτουργεί στην επιλογή του υπόστρωματος της αυτοφαγίας και στην βιογένεση του αυτοφαγοσώματος), και απο υψηλό ποσοστό των ALDH1+(ένζυμο της μείζονος οξειδωτικής οδού του μεταβολισμού της αλκοόλης) και CD133+ κυττάρων. Προκλητή έκφραση του miR-143 ανέστρεψε σημαντικά την χημειοαντίσταση καθώς και μείωσε τη ρύθμιση του ATG2B, LC3-I, και την έκφραση Bcl-2 σε SAOS-2- και U2OS ανθεκτικά κύτταρα [353]. Επίσης, το επίπεδο έκφρασης του miR-199a-5p

ήταν σημαντικά μειωμένο σε ανθρώπινα κύτταρα OSS MG63. Αποκατάσταση της έκφρασης miR-199a-5p προωθεί την επαγόμενη της CDDP (cisplatin) αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού σε MG63 κύτταρα και αναστέλει την επαγόμενη αυτοφαγία, υποθέτοντας ότι miR-199a-5p προάγει την κυτταροτοξικότητα του CDDP σε κύτταρα OSS μέσω αναστολής της αυτοφαγίας [354].

III. Ογκογεννή miRnas στο OSS

α. Γενικά

Διάφορα miRnas μπορούν να ευθύνονται για την εξαλλαγή των κυττάρων σε καρκινικά και λειτουργούν ως ογκογεννή (oncomiRna) στο OSS. Κάποια δεδομένα σε κύτταρα οστεοσαρκώματος δείχνουν ότι τα αποτελέσματα της miR-190 διαμεσολάβησης βασίζονται σε ένα εκτεταμένο δίκτυο με μοριακές αλλαγές στα κύτταρα του όγκου και ότι το miR-190 επηρεάζει διάφορους μεταγραφικούς παράγοντες, ογκοκατασταλτικά γονίδια και τα μονοπάτια ανταπόκρισης της ιντερφερόνης, που προάγουν την αύξηση [355]. Το miR-155 βρέθηκε επίσης να προάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, το σχηματισμό αποικιών, τη μετανάστευση και τη διήθηση σημαντικά *in vitro*. Ένας αναστολέας του miR-155 μείωσε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό, το σχηματισμό αποικίας, τη μετανάστευση και την διήθηση των κυττάρων οστεοσαρκώματος MG-63 [356]. Επίπλεον, το miR-135b που λειτουργεί ως ογκογονίδιο αναστέλλει την έκφραση της μυοκαρδίνης με τη στόχευση της 3'UTR σε MG63 κύτταρα οστεοσαρκώματος και προωθεί τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και διήθηση. Η μυοκαρδίνη (MYCD), ειδικός μεταγραφικός συνενεργοποιητής του παράγοντα ανταπόκρισης του ορού (SRF), κατέστειλε τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και τη διήθηση σε MG63 κύτταρα [357]. Σε άλλη μελέτη, τα επίπεδα έκφρασης του miR-542-3p και miR-542-5p ήταν σε σημαντικά αυξημένη ρύθμιση και η έκφραση του miR-199-3p σημαντικά μειωμένη. Η VANGL 2 (Van Gog Like 2), η οποία είναι μη κανονικό μονοπάτι καταστολέας της οδού Wnt, ήταν ένα γονίδιο στόχος του miR 542-3p. Το miR 542-3p μπορεί να ενισχύσει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευτική ικανότητα των κυττάρων U2OS. Αυτό έδειξε ότι το miR-542-3p μπορεί να δράσει ως ογκογονίδιο στην

παθογένεια του οστεοσάρκωματος [358]. Ακόμη, το miR 181, σε αυξημένη ρύθμιση στο οστεοσάρκωμα, στοχεύει τη 3'UTR του παράγοντα διάσπασης Im25 (CFIm25- υπομονάδα 5 του ειδικού παράγοντα διάσπασης και πολυαδενυλίωσης 3' mRNA). Πειράματα επιβεβαίωσαν ότι το miR 181a μειώνει την έκφραση του CFIm25 σε κύτταρα οστεοσαρκώματος. Η CFIm25 πρωτεΐνη, αναστέλοντας τον πολλαπλασιασμό και προωθώντας την απόπτωση των κυττάρων, βρίσκεται σε μειωμένη ρύθμιση σε ιστούς οστεοσάρκωματος [359]. Τέλος, το miR-210 συμμετείχε στην αποδιαφοροποίηση των κυττάρων OSS σε βλαστικά κύτταρα OSS (OSS) .Τα αποτελέσματα φανερώνουν ότι το miR-210 προώθησε την έκφραση στον TGF-β1 και στους κατωφερέστερους αποδέκτες ,μεταγραφικούς παραγόντες Snail1 και Slug (μεταγραφικοί παράγοντες που προωθούν την καταστολή του μορίου προσκόλλησης E -cadherin) οι οποίοι ήταν ιδιαίτερα αυξημένοι κατά τη διαδικασία της αποδιαφοροποίησης των κυττάρων OSS. Επιπλέον, διαπιστώθηκε ότι ο NFIC (μεταγραφικός παράγοντας) μειώθηκε σημαντικά μετά από την miR-210 χορήγηση [360].

β.Μείωση της απόπτωσης

Με διαφορετικό τρόπο oncomiRna μπορούν να επηρεάσουν την φυσιολογική λειτουργία της απόπτωσης. Το miR-181 θα μπορούσε να σχετίζεται με τη αύξηση της ρύθμισης του bcl-2 και της μεταλλοπρωτεΐνάσης 9 του διάμεσου ιστού και την μείωση της ρύθμισης του ιστικού αναστολέα μεταλλοπρωτεΐναςών-3 και p21 σε κύτταρα MG63, διευκολύνοντας τον πολλαπλασιασμό, την διήθηση και καταστέλλοντας την απόπτωση των κυττάρων οστεοσαρκώματος [361] .Το miR-199a-5p ήταν σημαντικά υπερυθμισμένο στους ιστούς και σε κύτταρα ασθενών με OSS .Επίσης, το miR-199a-5p μπορούσε να συνδεθεί άμεσα με τις 3'UTRs του mRNA τόσο του PIAS3 (αναστολέας της μεταγραφικής δραστηριότητας του STAT3) όσο και του p27 και διαμεσολαβώντας της μείωσης των επιπέδων της πρωτεΐνης του PIAS3 και p27, προκαλεί την ενεργοποίηση του STAT3 και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου σε κύτταρα OSS [362]. Απο την άλλη, η MAP2K4 (κινάση -άμεσος ενεργοποιητής ορισμένων MAP κινασών) είναι ένας πιθανός στόχος του miR-27a και μπορεί να ρυθμίζεται άμεσα από το miR-27a. Το miR-27a μπορεί να λειτουργήσει ως ένα ογκογονίδιο με τη

στόχευση της MAP2K4 στην κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος MG63. Αναστολή του miR-27a κατέστειλε σημαντικά τον πολλαπλασιασμό και τον σχηματισμό αποικιών των κυττάρων MG63 κατά 39,6% .Μετά απο επιμόλυνση με αναστολέα του miR-27a στα κύτταρα MG63, το επίπεδο της phospho-JNK1 και phospho-p38 αυξήθηκε κατά 25% και 29%, αντίστοιχα, σε συνδυασμό με την ανοδική ρύθμιση της MAP2K4 πρωτεΐνης. Η MKK/JNK οδός σηματοδότηση εμπλέκεται, στο μονοπάτι σηματοδότησης μιτοχονδριακού θανάτου, συμπεριλαμβανομένου της απελευθέρωσης κυτοχρώματος c, οδηγώντας σε απόπτωση [363]. Επίσης, το MFN-1 (mitofusin 1-διαμεσολαβητής μιτοχονδριακής σύντηξης) αποκλείει σημαντικά τον κυτταρικό κύκλο, προωθεί την απόπτωση και αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την διήθηση των κυττάρων οστεοσαρκώματος. Το miR-19b στοχεύει 3'UTR αλληλουχίες των γονιδίων Mfn1 ,αναστέλλει την έκφραση του Mfn1, και έτσι η αναστολή του Mfn1 προάγει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων [364]. Σε μια μελέτη επίσης, αναλύθηκε σε σειρά από 75 καλά χαρακτηρισμένα προ της θεραπείας δείγματα ιστών οστεοσαρκώματος η έκφραση συμπλεγμάτων miRNAs. Τα ευρήματα υπογραμμίζουν έναν κρίσιμο ρόλο του συμπλέγματος miR-17-92 και των δύο παραλόγων του miRNas mir-106a-363 και mir-106b-25 σε OSS με άμεση συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των ενεργοποιητών του συμπλέγματος MYC, E2F1-3, αναστολέων του TP53, ατομικά miRNAs, και στόχευσης προ-αποπτωτικών παραγόντων (FAS, BIM) [365].

Επιλέον ,η έκφραση του miR-301a ήταν σημαντικά υψηλότερη σε ιστούς OSS σε σύγκριση με τους παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς. Υπερέκφραση miR-301a μπορεί να αυξήσει την έκφραση CDC14A (ρόλο στην αποφοσφορίλωση του p53- στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου) και να προωθήσει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση των κυττάρων OSS. Ως εκ τούτου, το miR-301a μπορεί να είναι χρήσιμο για τη διάγνωση και τη θεραπεία οστεοσαρκώματος [366]. Το επίπεδο του mRNA του miR-21 είναι εντόνως εκφρασμένο σε ιστούς οστεοσάρκωματος σε σύγκριση με γειτονικούς ιστούς. Η υπερέκφραση του miR-21 βελτιώσε τη βιωσιμότητα των κυττάρων και την επιβίωση, και κατέστειλε την απόπτωση. Η κασπάση-8 ήταν ένα άμεσος στόχος του miR-21, και ήταν αρνητικά ρυθμισμένη από το miR-21. Επιπλέον, καταστολή του miR-21 εξασθένησε τη μείωση της απόπτωσης που προκαλείται από την αποσιώπηση της κασπάσης-8 [367]. Τέλος σε

ασθενείς με οστεοσάρκωμα, το επίπεδο έκφρασης του miR-133a στα δενδριτικά κύτταρα (DCs) ήταν αυξημένο, και η RBP-J έκφραση (σηματοδότηση) σε επίπεδα mRNA και πρωτεΐνης μειώθηκαν. Αναστολέας του miR-133a προώθησε την ωρίμανση και την ενεργοποίηση των DCs σε ασθενείς με οστεοσάρκωμα. Σε μοντέλο οστεοσάρκωματος ποντικού, miR-133a mimics κατέστειλαν την ωρίμανση και την ενεργοποίηση των DCs στο σπλήνα, ενώ αναστολέας miR-133a τις προώθησε υπονοώντας κάποια σχέση με την απόπτωση αυτού του miRna [369].

γ. MiRnas που καταστέλλουν ογκοκατασταλτικά γονίδια

Πολλά miRnas καταστέλλουν γονίδια με ογκοκατασταλτικές ιδιότητες και βρίσκονται σε αυξημένη ρύθμιση σε τόσο σε κυτταρικές σειρές όσο και σε ιστούς OSS. Το miR-214 συνδέεται άμεσα με την 3'-αμετάφραστη περιοχή (3'-UTR) του mRNA του LZTS1 (αυτόκλειστο λευκίνης φερόμενο ως ογκοκατασταλτικό 1), γονίδιο που φαίνεται να έχει ένα ρόλο στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου μέσω αλληλεπίδρασης με το σύμπλεγμα Cdk1/cyclinB1, και καταστέλλει την έκφραση της. Το miR-214 προωθεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του οστεοσαρκώματος, την διήθηση και την ανάπτυξη του όγκου σε κατασταλμένα ποντίκια, και η οποία θα μπορούσε να υποστρέφεται μετά από υπερέκφραση LZTS1, λειτουργώντας έτσι ως ογκογεννές miRNA [370]. Η υπερέκφραση του miR-25, μετά την επιμόλυνση με πρόδρομο mir-25 σε Saos 2 και U2OS κύτταρα, προωθεί τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων in vitro και την ανάπτυξη όγκου σε ένα μοντέλο ξενομοσχεύματος ποντικού. Επιπλέον, η πρωτεϊνική έκφραση του p27, ένος αρνητικού ρυθμιστή του κυτταρικού κύκλου, ρυθμίζεται αρνητικά από miR-25. Η επαναφορά του επιπέδου p27 σε κύτταρα που υπερεκφράζουν miR-25 αντέστρεψε την επίδραση ενίσχυσης του miR-25 στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων [371]. Επίσης, η δράση στο μακρύ μη κωδικοποιητικό RNA (lncRNAs) Loc285194, ένας μεταγραφικός στόχος της p53, που διαμεσολαβεί στην αναστολή της ανάπτυξης και λειτουργεί σαν ογκοκατασταλτικό στο οστεοσάρκωμα, οφείλεται εν μέρει στην ειδική καταστολή του miR-211. Σε αντίθεση με το loc285194, το miR-211 προάγει την ανάπτυξη των κυττάρων όπως φάνηκε σε μελέτη κυτταρικών σειρών [372]. Επιπλέον, σε κυτταρικές σειρές ανθρώπινου

οστεοσαρκώματος, αυξημένη ρύθμιση του miR-221 επάγει την επιβίωση των κυττάρων και την αντίσταση στην σισπλατίνη με μείωση της κυτταρικής απόπτωσης, και ακόμη, μείωση της ρύθμισης του miR-221 ανέστειλε την ανάπτυξη των κυττάρων, την αντίσταση στην σισπλατίνη και αύξησε την απόπτωση. Το PTEN είναι άμεσος στόχος του miR-221 και εισαγωγή PTEN cDNA στερούμενο 3'-UTR ή PI3K αναστολέα LY294002 κατάργησε την miR-221 σχετιζόμενη αντίσταση στην σισπλατίνη [373]. Ο τομέας WW της οξειδοαναγωγάσης (WWOX-ογκοκατασταλτικό) η οποία έχει ρόλο σε πολλές βιολογικές λειτουργίες όπως μεταβολισμό των στεροειδών, στην απόπτωση από τον TNF και στην διαφοροποίηση, ρυθμίζεται αρνητικά από την miR 214-3p και miR-10b έκφραση. Η σίγηση του miR 214-3p μέσω επιμόλυνσης με αντι-miR 214-3p, ρυθμίζει αυξητικά την έκφραση της πρωτεΐνης WWOX και επίσης αναστέλει τον πολλαπλασιασμό, τη μετανάστευση και την διήθηση των κυττάρων οστεοσαρκώματος [374]. Επίσης, σε δείγματα από ασθενείς με OSS, τα επίπεδα του miR-543 ήταν σημαντικά αυξημένα, ενώ τα επίπεδα του PRMT9 (γονίδιο με λειτουργία στην εξαρτώμενη της φωσφορυλίωσης ουβικιτινίωση) ήταν σημαντικά μειωμένα, σε σύγκριση με αντίστοιχο φυσιολογικό ιστό οστών. Η miR-543 έκφραση συσχετίζεται αρνητικά με την έκφραση PRMT9 στους ιστούς OSS και μηχανιστικά, η miR-543 αναστέλει την PRMT9 ενισχυμένη της κυτταρικής οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Η miR-543 καταστολή προωθεί την PRMT9-αυξημένη HIF-1a αστάθεια και ανέστειλε την γλυκόλυση στα κύτταρα OSS [375].

Η έκφραση του miR-802 βρέθηκε αυξημένη σε ιστούς οστεοσαρκώματος σε σύγκριση με παρακείμενους φυσιολογικούς ιστούς και προκλητή έκφραση του miR-802 ήταν σε θέση να προωθήσει τον πολλαπλασιασμό των U2OS και MG63 κυττάρων, ενώ miR-802 αντιπαράλληλα ολιγονουκλεοτίδια (αντιπαράλληλα miR-802) κατέστειλαν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η έκφραση του p27, ρυθμίζεται αρνητικά επίσης από το miR-802 [376]. Το miR-17 είναι συχνά αυξημένο σε ιστούς OSS και κυτταρικές γραμμές και η αναστολή της έκφρασης του miR-17 σε κυτταρικές γραμμές OSS κατέστειλε ουσιαδώς τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μετανάστευση και τη διήθηση. Έκφραση του miR-17 συσχετίζεται αρνητικά με το γονίδιο PTEN στους ιστούς OSS και υποδεικνύει ότι το miR-17 λειτουργεί ως ένα ογκογόνο miRNA [377]. Σε μια άλλη μελέτη, το miR 214 φάνηκε να

είναι σημαντικά αυξημένο στην πλειονότητα των 15 ιστών οστεοσαρκώματος που εξετάστηκαν καθώς και στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά οστεοσαρκώματος Saos 2. Η υπερέκφραση του miR 214 σε κύτταρα Saos 2 προώθησε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, ενώ η αναστολή των miR 214 προώθησε την απόπτωση των Saos 2 κυττάρων στο *vitro*. Το ομόλογο της φωσφατάσης και τενσίνης γονίδιο (PTEN) προσδιορίστηκε ως ένας άμεσος στόχος του miR 214 σε Saos 2 κύτταρα [378]. Επίσης, η έκφραση του miR-148a ήταν σημαντικά αυξημένη σε ιστούς οστεοσάρκωματος. Η αύξηση της έκφρασης miR-148a θα μπορούσε να προωθήσει την ανάπτυξη οστεοσαρκώματος *in vitro* και *in vivo*, με δράση που οφείλεται στην αυξημένη ενεργοποίηση σηματοδότησης της φωσφοϊνοσιτιδικής 3-κινάσης (PI3K) που προκαλείται από την miR-148a διαμεσολαβούμενη αναστολής του PTEN [379]. Τέλος, η μείωση της ρύθμισης του miR-21 (υπερεκφράζεται σημαντικά σε ιστό οστεοσάρκωματος), μειώνει την κυτταρική διήθηση και τη μετανάστευση σε κυτταρικές σειρές MG-63 οστεοσαρκώματος. Το miR-21 στοχεύει, μειώνοντας τη ρύθμιση του στόχου RECK, ενός ογκοκατασταλτικού γονιδίου, που είναι αρνητικός ρυθμιστής της μεταλλοπρωτεΐνης-9 [380].

3.9.5 MiRnas σχετιζόμενα με θεραπευτική δράση σε οστεοσάρκωμα

I.LNA and mimics

Με την καταστολή συγκεκριμένων microRnas (oncomiRnas) ή την εξωγενή χορήγηση μπορεί να παρουσιαστεί θεραπευτική δράση στα OSS. Σε μια προκλινική δοκιμή, στον εξαιρετικά κακοήθη CD133 πληθυσμό, το miR-133a ρύθμιζει την διήθηση των κυττάρων οστεοσαρκώματος που χαρακτηρίζει ένα θανατηφόρο φαινότυπο όγκου. Αποσιώπηση του miR-133a με lock νουκλεϊκό οξύ (LNA) μείωσε την κυτταρική διήθηση αυτού του κυτταρικού πληθυσμού, και η συστηματική χορήγηση του LNA μαζί με χημειοθεραπεία κατέστειλαν τη μετάσταση στον πνεύμονα και παρέτεινε την επιβίωση ποντικών που φέρουν οστεοσάρκωμα [381]. Επίσης, εισαγωγή miR-320 αναλόγων (mimics) σε U2OS και MG63 κύτταρα ανέστειλαν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, και ενώ το ποσοστό των κυττάρων σε απόπτωση παρέμεινε αναλλοίωτο, η υπερέκφραση μπορούσε επίσης να καταστείλει

την ανάπτυξη του όγκου στα κατασταλαμένα ποντίκια. Στο μοριακό επίπεδο, η έκφραση του συνθετάσης λιπαρού οξέος (FASN), ένα ένζυμο κλειδί για τη de novo βιοσύνθεση των λιπαρών οξέων, ρυθμίζεται αρνητικά από το miR-320 [382]. Το miR-195 σε μια μελέτη κυττάρων οστεοσαρκώματος φάνηκε να παίζει ένα ρόλο κλειδί επίσης στην αναστολή της μετανάστευσης και στη διήθηση μέσω στόχευσης του FASN. Η εξωγενής χορήγηση miR-195 επίσης μπορεί να έχει θεραπευτική αξία στην αγωγή του οστεοσαρκώματος [383].

II. Mirnas σχετιζόμενα με καλή ανταπόκριση στη θεραπεία

Η έκφραση ορισμένων miRnas φάνηκε ότι μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία στην θεραπεία των OSS. Προκλητή έκφραση του miR-101, μείωσε την εξαρτώμενη του DNA καταλυτική υπομονάδα της πρωτεϊνικής κινάσης (DNA-PKcs) και επαύξησε την κυτταροτοξικότητα της σαλινομυκίνης εναντίον κυττάρων OSS (U2OS και MG-63 γραμμές) [384]. Ο ομόλογος ανασυνδυασμός (HR) μεσολαβεί στην χωρίς σφάλματα επιδιόρθωση στα δίκλιωνα σπασίματα (DSBs) του DNA και η RAD51 αποτελεί ουσιαστική πρωτεΐνη καταλύτης του HR. Σε συμφωνία με την αναστολή του σχηματισμού RAD51 εστιών, τα miR-103 και miR-107 μειώνουν την ομόλογη απευθείας επιδιόρθωση και ευαισθητοποιούν τα κύτταρα σε διάφορους παράγοντες βλάβης του DNA, συμπεριλαμβανομένης της σισπλατίνης και ενός αναστολέα PARP σε κυτταρικές σειρές U2OS [385]. Επίσης, η TAp73β, μία πρωτεΐνη της p53 οικογένειας (με μειωμένη ρύθμιση σε κύτταρα οστεοσαρκώματος), εμπλέκεται στην επαγόμενη της σισπλατίνης απόπτωση σε σαρκώματα των οστών. Το miRNA-193a-5p διαμορφώνει τη βιωσιμότητα, τη κλωνογεννητική ικανότητα και την επαγόμενη της σισπλατίνης απόπτωση σε κύτταρα οστεοσαρκώματος μέσω της αναστολής της TAp73β [386]. Επιπλέον, η έκφραση του miR-422a ήταν σημαντικά μειωμένη σε ιστούς OSS και κυτταρικές σειρές σε σύγκριση με τους φυσιολογικούς μάρτυρες. Η υπερέκφραση του miR-422a ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την ικανότητα διήθησης, και επιπλέον ενισχύσε την διαμέσω της πακλιταξέλης και σισπλατίνης απόπτωση σε κύτταρα OSS. Το miR-422a στοχεύει άμεσα την TGFβ2 και ρυθμίζει την έκφραση και την ενεργοποίηση των κατωφερέστερων του μορίων, Smad2 και Smad3 στα κύτταρα OSS [387].

Εκφράσεις miRNas επηρεάζουν την θεραπεία μέσω επίδρασης στην αυτοφαγία, σε μεταλλοπρωτεάσες και μεταγραφικούς παραγόντες. Η επεξεργασία με δοξορουβικίνη των κυττάρων U-2 OSS επάγει σε σημαντικά υψηλό επίπεδο την αυτοφαγία χαρακτηριστική των κυστικών όξινων οργανιδίων (AVOs), και προκαλείται σημαντική έκφραση της πρωτεΐνης που σχετίζεται με αυτοφαγία. Το miR-101 θα μπορούσε να μειώσει σημαντικά την επαγόμενη AVOs αυτοφαγία και να μπλοκάρει την έκφραση της πρωτεΐνης που σχετίζεται με αυτοφαγία σε U-2 κύτταρα OSS ενώ ενισχύει την χημειοευαισθησία *in vitro* [388]. Το ATG16L1 επίσης (συστατικό του πρωτεϊνικού συγκροτήματος απαραίτητου της αυτοφαγίας) ήταν ένα πιθανό γονίδιο στόχο του miR-410, προκαλώντας απευθείας μείωση της έκφρασης ATG16L1 στοχεύοντας την 3' αμετάφραστη περιοχή του σε κύτταρα OSS. Αποτελέσματα έδειξαν ότι το miR-410 ήταν σε θέση να αναστέλλει σημαντικά την αυτοφαγία. Ο αναστολέας της αυτοφαγίας 3 μεθυλαδενίνη και η έκφραση του miR-410 ήταν σε θέση να βελτιώσουν τη θεραπευτική ανταπόκριση των κυττάρων σε φάρμακα χημειοθεραπείας (ραπαμυκίνη, δοξορουβικίνη και σισπλατίνη) [389]. Σε OSS η ρεσβερατρόλη (RESV), έδειξε μία μεταγραφική ανασταλτική επίδραση στην MMP-2, με τη μείωση στο CREB-DNA της δραστηριότητας δέσμευσης. Επιπλέον, ανάλυση microRNAs έδειξε ότι το miR-328 παρουσιάζει κυρίως αύξηση της ρύθμισης μετά από θεραπεία με RESV, ότι η miR-328 έκφραση σε κύτταρα με υψηλό διήθητικό χαρακτήρα μείωσε την MMP-2 έκφραση και επίσης όσον αφορά τις διήθητικές ιδιότητες υπάρχει μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της MMP-2 και miR-328 [390]. Ακόμη, ο ειδικός της τελομεράσης ογκολυτικός αδενοϊός, OBP-301 (telomelysin) αναστέλλει την έκφραση του αντιαποπτωτικού παράγοντα 1 των κυττάρων της μυελοειδούς λευχαιμίας (MCL1), η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε χημειοευαισθητοποίηση σε ανθρώπινα κύτταρα οστεοσαρκώματος. Η αύξηση της ρύθμισης του microRNA-29 που στοχεύει το MCL1 μέσω της ενεργοποίησης που προκαλείται από τον ιικό μεταγραφικό παράγοντα E2F-1 ήταν ουσιώδης για την ενίσχυση της επαγόμενης από χημειοθεραπεία απόπτωσης σε κύτταρα οστεοσαρκώματος [391]. Το miR-15b είναι σημαντικά μειωμένο σε κυτταρικές σειρές OSS ανθεκτικά σε πολλαπλές θεραπείες (MDR) σε σύγκριση με τις αρχικές κυτταρικές σειρές. Επιπλέον το Wee1 (αναστολέας απόπτωσης εκ βλάβης του DNA) είναι ένα γονίδιο στόχος του miR-15b και η συστηματική *in vitro*

χορήγηση miR-15b αναλόγων ευαισθητοποιεί κύτταρα ανθεκτικά στη δοξορουβικίνη και επάγει τον κυτταρικό θάνατο σε μοντέλα MDR του οστεοσαρκώματος. Τέλος, οι ασθενείς με οστεοσάρκωμα με χαμηλά επίπεδα έκφρασης του miR-15b είχαν σημαντικά μικρότερο χρόνο επιβίωσης από ό, τι οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα έκφρασης του miR-15b [392]. Τέλος, η physson 8-O-β-glucopyranoside (PG) μειώνει τον πολλαπλασιασμό και προάγει τη απόπτωση σε MG-63 κύτταρα OSS μέσω της ενδογενούς μιτοχονδριακής οδού, που συνοδεύεται από απώλεια του δυναμικού της μιτοχονδριακής μεμβράνης (MMP) και την απελευθέρωση κυτοχρώματος C από τα μιτοχόνδρια. Επιπλέον, η ανασταλτική δράση της PG στον επαγωγέα της μεταλλοπρωτεΐνωσης της εξωκυττάριας ουσίας (EMMPRIN) οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, στη ρύθμιση της οδού ROS-miR-27a/ZBTB10-Sp1 μεταγραφικού παράγοντα [393].

III. MiRNas σχετιζόμενα με κακή ανταπόκριση στη θεραπεία

Αρκετά miRNas σχετίζονται με κακή ανταπόκριση σε συγκεκριμένη θεραπεία. Τα επίπεδα έκφρασης του miR-128 και PTEN αγγελιοφόρου RNA σε οστεοσάρκωμα και φυσιολογικούς ιστούς των οστών, που ελήφθησαν από 100 ασθενείς με πρωτοπαθή οστεοσάρκωμα αποκάλυψαν ότι η αυξημένη ρύθμιση του miR-128 σε συνδιασμό με την μειωμένη ρύθμιση του γονιδίου PTEN στόχου του, σχετίζονται με κακή απόκριση σε χημειοθεραπεία και παρουσία μετάστασης [394]. Επίσης, φάνηκε ότι το miR-21 σε κύτταρα οστεοσαρκώματος είναι ένας σημαντικός ρυθμιστής του αποτελέσματος της αντικαρκινικής δράσης του cisplatin (CDDP), αυξάνοντας τη ρύθμιση της έκφρασης της bcl-2, που προκαλεί την αντίσταση του οστεοσαρκώματος στο φάρμακο [395]. Από την άλλη, η αναστολή του microRNA-21 επιβράδυνε τον πολλαπλασιασμό και η εξωγενής έκφραση του microRNA-21 προώθησε αυτή τη διαδικασία, σε παραγόμενες κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος. Μείωση της δραστηριότητας του microRNA-21 οδήγησε σε αυξημένη αντίσταση έναντι της σισπλατίνης, ενώ έκτοπη έκφραση του microRNA-21 έδειξε το αντίθετο αποτέλεσμα [396]. Εκτός των άλλων, microRNas όπως το miR-215 αποτελούν επίσης θεραπευτικούς στόχους στο οστεοσάρκωμα λόγω της αυξημένης αντίστασης που προκαλούν στη θεραπεία με μεθοτρεξάτη και ραλιτρεξίδη [397]. Επιπλέον τα αυξημένα επίπεδα

έκφρασης miR-155 αυξάνουν την αυτοφαγία του αντικαρκινικού φαρμάκου που προκαλείται από κύτταρα οστεοσαρκώματος ,μειώνουν την αντικαρκινική δράση ,και προάγουν πολλαπλασιασμό των κυττάρων, προτείνοντας ένα νέο μηχανισμό χημειοαντίστασης σε καρκίνους οστεοσαρκώματος [398]. Το γονίδιο του υποδοχέα τύπου 1 αγγειοτενσίνης II (AGTR1) είναι ένας από τους στόχους του miR-34a-5p στο OSS και συσχετίζεται αρνητικά με την χημειοαντίσταση στο OSS όπως φάνηκε μέσα από συστηματικές έρευνες σε ευαίσθητες και ανθεκτικές σε πολλαπλά φάρμακα σειρές κυττάρων OSS. Αυξημένα επίπεδα AGTR1 συνδέονται με αυξημένη χημειοευαισθησία σε κύτταρα OSS [399].

Στην κακή ανταπόκριση στη θεραπεία των OSS, μπορούν να εμπλέκονται miRNas σε μηχανισμούς της απόπτωσης. Το επίπεδο του miR-24 ήταν αυξημένο στο ορό ασθενών ,ιστούς και κυτταρικές σειρές OSS. Οι miR-24 αναστολείς ξαναευαισθητοποίησαν ανθεκτικά στην δοξορουβικίνη κύτταρα MG-63 (MG-63/R) και κύτταρα HOS (HOS/R). Το γονίδιο Bcl-2 αλληλεπιδρών μεσολαβητής του κυτταρικού θανάτου (BIM) αποδείχθηκε να είναι ένας στόχος του miR-24 σε MG-63 κύτταρα/R, και miR-24 αναστολείς προώθησαν την επαγόμενη από την δοξορουμπικίνη μέσω της μιτοχονδριακής οδού απόπτωσης [400]. Το miR-367 ήταν σε αυξημένη ρύθμιση σε ιστούς OSS και καλλιέργειες κυττάρων OSS. Ο KLF4 (μεταγραφικός παράγοντας-ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού, της απόπτωσης και της διαφοροποίησης) αποδείχθηκε να είναι ένας άμεσος στόχος του miR-367, και επίσης το miR-367 μπλοκάρει σημαντικά τόσο σε mRNA όσο και σε επίπεδο πρωτεΐνης τον KLF4. Επιπλέον, η υπερέκφραση του miR-367 κατέστειλε σημαντικά την αύξηση του KLF4 που επάγεται από αδριαμυκίνη (ADR) σε κύτταρα OSS, καθώς και την Bax και την διασπασμένη κασπάση 3 [401]. Επιπλέον, η miR-140-5p έκφραση προκαλείται έντονα κατά τη διάρκεια της χημειοθεραπείας σε κύτταρα οστεοσαρκώματος, και αυτό συνοδεύτηκε από την αύξηση της ρύθμισης της αυτοφαγίας. Τα αυξημένα επίπεδα έκφρασης του miR-140-5p αύξησαν την αυτοφαγία στο αντικαρκινικό φάρμακο σε κύτταρα οστεοσαρκώματος και διαμεσολάβησαν της αντίστασης στη χημειοθεραπεία. Το miR-140-5p ρυθμίζει στο πλαίσιο αυτό την αυτοφαγία, μέσω του στόχου της, την ινοσιτόλη 1,4,5-τριφωσφορική κινάση 2 (IP3k2) [402].

IV.Επαγωγή έκφρασης miRnas με θεραπεία

Διάφορες θεραπείες μπορούν να επάγουν την έκφραση των miRnas με επίδραση στο OSS. Το μακρύ μη κωδικοποιητικό RNA ZEB1-AS1 ρυθμίζεται αυξητικά και λειτουργεί ως ογκογονίδιο σε οστεοσάρκωμα. Το miR-200s είναι σε μειωμένη ρύθμιση σε ιστούς οστεοσάρκωματος, και συσχετίζεται αρνητικά με το ZEB1-AS1 (λειτουργεί ως μοριακό σφουγγάρι για miR-200s) και τα ZEB1 επίπεδα έκφρασης στο οστεοσάρκωμα. Ο συνδυασμός εξασθένησης ZEB1-AS1 και miR-200s υπερέκφρασης αναστέλλει σημαντικά τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων οστεοσαρκώματος και τη μετανάστευση [403]. Η βουσουλφάνη μπορεί να έχει δράση έναντι του οστεοσάρκωματος με την αύξηση της ρύθμισης για την οικογένεια του microRna-200, η οποία στη συνέχεια καταστέλλει τα γονίδια στόχους του ZEB1 και ZEB2 (μεταγραφικοί παράγοντες δακτυλίου ψευδαργύρου ομοειδούς πεδίου). Χορήγηση βουσουλφάνης δυνητικά ανέστειλε την ανάπτυξη εμφυτευμένου οστεοσαρκώματος σε κατεσταλμένα ποντίκια [404]. Το τρισουλφιδικό διαλλύλιο (DATs) ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό, την διήθηση και την αγγειογένεση σε κυττάρα οστεοσαρκώματος μέσω ενός νέου μηχανισμού με στόχο ένα ρυθμιστικό κύκλωμα Notch-miRnas, αυξάνοντας την έκφραση των όγκοκατασταλτικών microRNAs miR-34a, miR-143, miR-145 και miR-200b/c. Μείωση της ρύθμισης του Notch-1 και επανέκφραση miRNAs με DATs μπορεί να είναι μια αποτελεσματική προσέγγιση για τη θεραπεία του οστεοσαρκώματος [405]. Επίσης συνδυασμός φαρμάκων τροποποιητών της χρωματίνης μπορεί να είναι ένα χρήσιμο βοηθητικό στην θεραπεία του ταχέως εξελισσόμενου OSS. Θεραπεία με 4-φαινυλβουτυρικό αυξάνει την ακετυλίωση των ιστονών που σχετίζονται με το 14q32 miRNAs, αλλά κατά τρόπο ενδιαφέροντα, για την ισχυρή αποκατάσταση των 14q32 έκφρασης miRNAs, την εξασθένηση της έκφρασης cMYC, και την επαγωγή της απόπτωσης απαιτείται ταυτόχρονη θεραπεία με 5-αζακυτιδίνη, έναν αναστολέα της μεθυλίωσης του DNA [406].

3.9.6 MiRnas σχετιζόμενα με σηματοδοτικά μονοπάτια

Σημαντική είναι η σχέση που μπορούν να έχουν ορισμένα miRnas με μονοπάτια σηματοδότησης. Το mir-128 παίζει σημαντικό ρόλο στον

πολλαπλασιασμό των ανθρώπινων κυττάρων οστεοσαρκώματος με απευθείας ρύθμιση της PTEN/AKT σηματοδότησης. Έκτοπη υπερέκφραση του miR-128 προώθεισε σημαντικά ,ενώ η καταστολή της miR-128 με antisense mirna ανέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων MG63 και U2OS [407]. Ακόμη ,αναστολή της FASN (γονίδιο της συνθετάσης των λιπαρών οξέων) με παρεμβατικό RNA (RNAi) καταστέλλει τη μετάσταση σε κύτταρα οστεοσαρκώματος μέσω της μείωσης της ρύθμισης της PI3K (φωσφοϊνοσιτιδικής 3 κινάσης) / Akt / NF-κB οδού σηματοδότησης in vitro [408] .

Το miR-34 επάγεται σημαντικά από το BMP2 (bone morphogenetic protein- TGF-β superfamily) κατά τη διαφοροποίηση των οστεοβλαστών. Στους οστεοβλάστες, το miR-34c στοχεύει πολλαπλά συστατικά του μονοπατιού σηματοδότησης Notch, περιλαμβανομένων των Notch 1, Notch2 και Jag1 με άμεσο τρόπο, και επηρεάζει τη διαφοροποίηση των οστεοκλαστών με μη-κυτταρικά-αυτόνομο τρόπο σε κυτταρικές σειρές . Η κατανόηση της λειτουργικής αλληλεπίδρασης του miR-34 και Notch σηματοδότησης στην φυσιολογική ανάπτυξη των οστών και στους όγκους των οστών θα μπορούσε δυνητικά να οδηγήσει σε θεραπείες διαμόρφωσης της miR-34 σηματοδότησης [409]. Σε μια ανάλυση 8 δειγμάτων ιστού οστεοσαρκώματος εγκλεισμένα σε παραφίνη σταθεροποιημένα με φορμαλίνη, 10 miRNAs ήταν αυξημένα κατά 10 φορές σε σύγκριση με φυσιολογικούς ιστούς μάρτυρες. Μετά την επιμόλυνση 4 κυτταρικών σειρών οστεοσαρκώματος με αναστολέα miR-199b-5p, η έκφραση των παραγόντων του Notch μονοπατιού στις επιμολυσμένες κυτταρικές σειρές άλλαξε, αποδεικνύοντας ότι η αύξηση ρύθμισης του miR-199b-5p παίζει ρόλο στην σηματοδότηση του Notch σε οστεοσάρκωμα [410]. Επίσης ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων σε κυτταρικές σειρές OSS κυρίως ρυθμίζεται μέσω των αλληλεπιδράσεων των βασικών συνρυθμιστών που περιλαμβάνουν miRNAs όπως miR-9-5p, miR-138 και miR-214 και τα γονίδια TP SP1 και MYC, που εμπλέκονται στην NFκB- και RB1-σηματοδότηση και εστιακές διαδικασίες συγκόλλησης που βασίζονται σε κοινά ή αλληλεπιδρόντα γονίδια στόχους (π.χ., CDK6, CTNNB1, E2F4, HES1, ITGA6, NFκB1, Notch1 και SIN3A) [411].

Η υπερέκφραση του miR-16 εμπλέκεται σε μονοπάτι σηματοδότησης και καταστέλλει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων OSS και την ανάπτυξη του όγκου σε γυμνά ποντίκια. Το IGF1R αποτελεί

άμεσο στόχο του miR-16. Μηχανιστική έρευνα αποκάλυψε ότι η miR-16 υπερέκφραση αναστέλλει την οδό Raf1-MEK1/2-ERK1/2 ενώ τα επίπεδα IGF1R συσχετίζονται αντιστρόφως με τα επίπεδα έκφρασης miR-16, στοχεύοντας IGF1R στο OSS` [412]. Σε μια άλλη μελέτη αναλύοντας ιστούς διπιστώθηκε ότι, πολλές προβλέψεις γονιδίων στόχων , διαφορεικά εκφρασμένων miRNA (23 συνδέονται στενά με miRNAs στην περιοχή 14q32) εμπλέκονται σε σημαντικά ενδοκυττάρια μονοπάτια σηματοδότησης στο οστεοσάρκωμα, συμπεριλαμβανομένων των Notch, RAS/p21, MAPK, Wnt, και των οδών Jun / FOS [413] .

3.9.7 Μεταφορά των miRnas, συσχέτιση με μετάσταση, διαφοροποίηση, διαφορεική διάγνωση, κλωνικότητα , σύγκριση των όγκων.

MicroRNAs μπορούν να μεταφέρονται μέσω σήραγγας νανοσωλήνα (TnTs) απο κύτταρα οστεοσάρκωματος σε πρότυπα συστήματα in vitro. Το miR-19 μεταφέρθηκε μέσω TnTs σύνδεσης απο επιμολυσμένα κύτταρα K7M2 οστεοσαρκώματος σε μη επιμολυσμένα στρωματικά κύτταρα οστεοβλαστών MC3T3 ποντικού και αποδεικνύουν ότι TnTs διαμεσολαβούν την άμεση μεταφορά γενετικού υλικού μεταξύ του όγκου και στρωματικών κυττάρων[414]. Το miR-143 επίσης εισάγόμενο σε κύτταρα απελευθερώνεται εγκλεισμένο μέσα σε εξωσωμάτια (μικρά κυστίδια που παίζουν ρόλο στην ενδοκυτταρική επικοινωνία) και το εκκρινόμενο με τη μορφή εξωσωμάτων miR-143 μεταφέρεται σε κύτταρα οστεοσαρκώματος, μειώνοντας σημαντικά τη μετανάστευση [415].

Διαφορετικά miRNAs διαμορφώνονται κατά τη διάρκεια της οστεογενετικής διαφοροποίησης, με το miR-31, να ελέγχει την έκφραση Osterix (ήSP7), ενός μεταγραφικού παράγοντα που εμπλέκεται στην οστεογενετική διαφοροποίηση, και βρέθηκε σε μειωμένα επίπεδα σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος [416]. Το mir-93 φαίνεται επίσης να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και διήθηση των κυττάρων οστεοσαρκώματος [417]. Αρκετά miRnas με ογκογόνες και ογκοκατασταλτικές ιδιότητες, συμπεριλαμβανομένων των διαφόρων μελών της ογκογόνου συμπλέγματος miR-17-92, βρέθηκαν με διαταραχές της ρύθμισης σε κυτταρικές σειρές οστεοσαρκώματος. Επιπλέον, αρκετά γονίδια που εμπλέκονται στην διαφοροποίηση

(RGMB, LRRC17), τον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (CCNE1) και την απόπτωση (LIMA1, CAMK2N1), είναι απορυθμισμένα πιθανότατα λόγω των διαταραγμένων επιπέδων έκφρασης των miRNAs[418]. Επίσης, σε αξιολογούμενες κυτταρικές σειρές οστεοσαρκωμάτων για *in vivo* ογκογονικότητα, *in vitro* ικανότητα σχηματισμού αποικίας, διηθητικό/μεταναστευτικό δυναμικό και ικανότητας πολλαπλασιασμού, τα miR-199b-5p και miR-100-3p ήταν με μειωμένη ρύθμιση στις άκρως επιθετικές κυτταρικές σειρές, ενώ τα miR-155-5p, miR-135b-5p και miR-146a-5p ήταν με αυξημένη ρύθμιση. Τα miR-135b-5p και miR-146a-5p προβλέπεται περαιτέρω να συνδέονται με τη μεταστατική ικανότητα της νόσου [419].

Η διαφορετική έκφραση miRNAs χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό καρκινικών από φυσιολογικά κύτταρα οστεοσάρκωματος. Σε ένα σύνολο από 268 miRNAs που εξετάστηκαν, ορισμένα miRNAs που εντοπίστηκαν ήταν σημαντικά απορυθμισμένα σε κυτταρικές σειρές OSS σε σύγκριση με κυτταρικές σειρές οστεοβλαστών, συμπεριλαμβανομένων των miR-9, miR-99, miR-195, miR-148a και miR-181, τα οποία επιβεβαιώθηκαν ως υπερεκφρασμένα και τα miR-143, miR-145, miR-335 και miR-539, τα οποία διαπιστώθηκαν ως υποεκφρασμένα [420]. Επίσης, εικοσιδύο διαφορετικά εκφρασμένα miRNAs εντοπίστηκαν σε κυτταρικές σειρές και όγκους οστεοσάρκωματος, και 4 (miR-135b, miR-150, miR-542-5p, και miR-652) επιβεβαιώθηκαν και επικυρώθηκαν ως μια διαφορετική ομάδα των όγκων. Το miR-135b και miR-150 είχαν προηγουμένως αποδειχθεί ότι έχουν σημαντικό ρόλο στην καρκινογένεση[421]. Σε ιστούς που προέρχονται από αρχαιακά δείγματα όγκων στη φορμόλη σταθερά ενσωματωμένα σε παραφίνη (FFPE), η έκφραση τριών miRNAs (miR-451a, miR-144-3p, miR-486-5p) ήταν υψηλότερη σε οστεοβλάστωμα, ενώ η έκφραση του miR-210 ήταν υψηλότερη σε οστεοσάρκωμα. Επιβεβαίωση αυτών των δεδομένων των microRNAs σε ένα ανεξάρτητο σύνολο 22 δειγμάτων με qPCR αποκάλυψε ότι το miR-210 είναι ο δείκτης που μπορεί διαχωρίσει καλύτερα τους δυο όγκους [422].

Διαπιστώθηκε επίσης αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ ομάδων miRNA και ορισμένων γονιδίων. Τα miR-126/miR-126 *, miR-142-3p, miR-150, miR-223, miR-486-5p και τα μέλη του miR-1/miR-133a, miR-144/miR-451, miR-195/miR-497 και miR-206/miR-133b συστάδες βρέθηκαν να έχουν μειωμένη ρύθμιση σε κυτταρικές σειρές

οστεοσαρκώματος. Όλα τα miRNAs των παράλογων συμπλεγμάτων miR-17-92, miR-106b-25 και miR-106a-92 ήταν υπερεκφρασμένα. Επιπλέον, με αύξησης της ρυθμίσης miRNAs περιλαμβάνονται τα miR-9 / miR-9 *, miR-21 *, miR-31 / miR-31 *, miR-196a / miR-196a, miR-374a και τα μέλη του miR-29 και miR 130/301 οικογένειας. Στα πιο ενδιαφέροντα αντιστρόφως συσχετιζόμενα ζευγάρια miRNA / mRNA σε κυτταρικές γραμμές οστεοσαρκώματος περιλαμβάνονται τα miR-9 / TGFBR2 και miR-29/p85a ρυθμιστική υπομονάδα της PI3K. Το PTEN mRNA συσχετίζεται αντιστρόφως με το miR-92a και τα μέλη της miR-17 και miR-130/301 οικογένειας [423]. Σε σύγκριση αναλύσεων των 3AB-OS καρκινικών βλαστικών κυττάρων (CSCs) και των γονικών κυττάρων, εντοπίστηκαν 49 παραλλαγές αριθμού αντιγράφων (CNV), 3512 απορυθμισμένα γονίδια και 189 διαφορεικά εκφρασμένα miRNAs. Αναλύσεις βιοπληροφορικής επέλεξαν 196 γονίδια και 46 αντιστρόφως συσχετιζόμενα miRNAs που εμπλέκονται στην καρκινογένεση και βλαστική (stemness) ικανότητα. Ένα προβλεπτικό δίκτυο περιγράφεται επίσης για δύο οικογένειες miRNAs (let-7/98 και miR-29a, b, c) και τα αντιστρόφως συσχετιζόμενα mRNAs τους (MSTN, CCND2, Lin28B, MEST, HMGA2 και GHR) [424].

Σε μια άλλη αναφορά, η ανεύρεση 19 miRs ήταν κοινώς αποδεκτό, ότι διέπουν τη φαινοτυπική αλλαγή του αδρανούς καρκινώματος του μαστού, γλοιοβλάστωματος, οστεοσάρκωματος, και του λιποσαρκώματος σε γρήγορα αναπτυσσόμενου. Αποκατάσταση ενός μόνο DmiR (miR-580, 588 ή 190), οδήγησε σε φαινοτυπική αναστροφή των ταχέως αναπτυσσόμενων αγγειογενετικών όγκων προς παρατεταμένο λήθαργο του όγκου, και μείωση της ρύθμισης των προ-αγγειογενετικών παραγόντων, όπως TIMP-3, bFGF και TGFalpha. Αξίζει να σημειωθεί ότι το 100% των αγγειογενών οστεοσαρκωμάτων που υπερεκφράζουν το miR190 παρέμειναν αδρανή κατά τη διάρκεια ολόκληρης της περιόδου παρατήρησης για περίπου 120 ημέρες [184].

3.10 Συνοβιακό σαρκώμα (SS)

Διάφορα miRna παρουσιάζουν διαταραχές της έκφρασης στο συνοβιακό σάρκωμα (SS). Μια μελέτη σύγκρισης μεταξύ καρκινικών και μη καρκινικών κυττάρων που πραγματοποιήθηκε από ασθενείς και χρησιμοποιήθηκαν ιστοί σε παραφίνη, το miR-145 έδειξε χαμηλή

έκφραση σε συνοβιακό σάρκωμα. Ένα σύνολο ειδικά των μυών miRNas (myomiRs) το miR-133, miR-1, και miR-206 ήταν σε σημαντικά χαμηλή έκφραση, γεγονός που υποδηλώνει ότι μπορεί να λειτουργήσουν ως ογκοκατασταλτικά [425]. Επίσης ,σε μια εκτενή ανάλυση ιστών της έκφρασης των miRNAs σε σειρά από 76 προθεραπείας, πρωτογενή υψηλής κακοήθειας σαρκώματων μαλακών μορίων, στα υπερεκφρασμένα miRNAs για το συνοβιακό σάρκωμα περιλαμβάνονταν τα μέλη της οικογένειας miR-200 [172]. Στην διαφορική διάγνωση ,συστοιχίες miRNAs εντόπισαν ένα συγκεκριμένο σύνολο υπογραφής miRNAs στο αίμα που ξεχωρίζει ασθενείς με ενεργό συνοβιακό σάρκωμα από υγιείς μάρτυρες. Μια ομάδα απο επτά miRNAs (miR-99a-5p, miR-146b-5p, miR-148b-3p, miR-195-5p, miR-223-3p, miR-500b-3p και miR-505-3p) έδειξε σημαντικά αυξημένη ρύθμιση σε ασθενείς με συνοβιακό σάρκωμα σε σύγκριση με ασθενείς με λειομυοσάρκωμα, MPNST, σάρκωμα Ewing και λιποσάρκωμα [426].

Ογκοκατασταλτικά miRna με συγκεκριμένες στοχεύσεις έχουν παρατηρηθεί. Το mir143, στοχεύοντας την 3'UTR του SSX1 (www.targetscan.org),συνεργάτης στο γονίδιο σύντηξης που προκύπτει από την αντιμετάθεση t(x;18) , εκφράστηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα σε σχέση με άλλους τύπους όγκων εικάζοντας ότι η χαμηλή έκφραση αυτού του microRna επιτρέπει την παραγωγή της SYT-SSX1 ογκοπρωτεΐνης [199] . Επίσης ,το mir-99b, που περιλαμβάνεται στο σύμπλεγμα των 24 miRNas και βρίσκεται στο 19q13.4 χρωμόσωμα, στοχεύει μειώνοντας τη ρύθμιση του SMARCA5 [427] ,το οποίο κωδικοποιεί μία πρωτεΐνη που εμπλέκεται στην SWI/SNF, σύμπλοκο που συμβάλλει στη σαρκωματογένεση του συνοβιακού σαρκώματος [428]. Επιπλέον ,η μείωση της ρύθμισης του let-7e και miR-99b επάγει τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων του συνοβιακού σαρκώματος, και τροποποιεί την έκφραση των θεωρούμενων στόχων, HMGA2 και SMARCA5, ενεργώντας ως μόρια με δυνατότητες ογκογεννητικού ρόλου [427].

Λιγότερο έχουν μελετηθεί τα ογκογεννή miRna στο SS. Σε μια μελέτη, όλες οι εξεταζόμενες περιπτώσεις συνοβιακού σαρκώματος εξέφραζαν miR-17. Το miR-17 βρέθηκε να προκαλείται από τη χιμαιρική ογκοπρωτεΐνη SS18-SSX ειδική για συνοβιακό σάρκωμα, ακόμη και σε πολύ υψηλά επίπεδα σε αρκετές περιπτώσεις. Οι διαστάσεις του όγκου σε ποντίκια in vivo αυξήθηκε σημαντικά μετά απο υπερέκφραση του miR-

17 ,με σημαντική αύξηση του MIB-1 δείκτη ,αντίθετα το επίπεδο της πρωτεΐνης CDKN1A (p21) ήταν αξιοσημείωτα μειώμενο μετά απο miR-17 υπερέκφραση, κατα ένα p53-ανεξάρτητο τρόπο [429]. Τέλος το miR-183 σύμπλεγμα (αποτελείται από mir183, mir-182, mir-96 mir) είναι επίσης υπερεκφρασμένο σε SS. Σε κυτταρικές σειρές με mir-183 knock down πειράματα συνοβιακού σαρκώματος αποδεικνύεται συγκεκριμένη στόχευση και αρνητική ρύθμιση του ογκοκατασταλτικού γονιδίου EGR1 (μεταγραφικός ρυθμιστής), καθώς και του κατώτερου στο μονοπάτι PTEN στόχου [430].

3.11 Πρωτογενείς νευροεκτοδερμικοί όγκοι(PNET) / ewing όγκος

Αρκετές μελέτες των miRnas σε Ewing σαρκώματα (ES) επιδεικνύουν σημαντικούς ρόλους σε διάφορα επίπεδα με μοριακή και κλινική σημασία .Σε 49 δείγματα ES με ανάλυση μικροσυστοιχιών ανιχνεύθηκε μια υπογραφή πέντε miRNAs (miR-34a, miR-23a, miR-92a, miR-490-3p, και miR-130b) ως ανεξάρτητος προγνωστικός παράγοντας κινδύνου για την εξέλιξη της νόσου και για την επιβίωση .Η miR-34a έκφραση αποτελεί ισχυρό προβλεπτικό παράγοντα για την έκβαση στο ES. Αποκατάσταση της δράσης του miR-34a μπορεί να είναι χρήσιμη για τη μείωση του όγκου και στην αύξηση της ευαισθησίας σε σύγχρονα φάρμακα [431]. Σε ασθενείς με ES, η υψηλή έκφραση του miR-34a σε εντοπισμένους όγκους σχετίζεται με σημαντικά καλύτερη χωρίς συμβάντα και συνολική επιβίωση. Η έκφραση του miR-34a ήταν χαμηλότερη σε μεταστάσεις από ό, τι σε πρωτογενείς όγκους και αντιστρόφως ανάλογη με την έκφραση της κυκλίνης D1 και Ki-67 [432]. Επίσης,τα επίπεδα έκφρασης στον ορό του miR-125b βρέθηκαν σαφώς μειωμένα σε ασθενείς ES, σε σύγκριση με υγιείς μάρτυρες .Τα περιστατικά που είχαν μια φτωχή ανταπόκριση στη χημειοθεραπεία παρουσίασαν σημαντικά μειωμένη ρύθμιση του miR-125b .Επιπλέον η καμπύλη ROC έδειξαν ότι το miR-125b στον ορό θα μπορούσε να χρησιμεύσει ως ένα πολύτιμος βιοδείκτης για τη διαφοροποίηση των ασθενών ES από υγιείς [433].

Το ογκοκατασταλτικό miRna Let-7 φαίνεται να εμπλέκεται περισσότερο, με διάφορους τρόπους στην παθογένεση του ES σε σύγκριση με άλλα miRnas .Σημαντική συσχέτιση μεταξύ χαμηλής

έκφρασης Let-7b και αυξημένο κίνδυνο υποτροπής ανιχνεύθηκε σε ανάλυση ιστών ES. Διαπίστωθηκε επίσης μια αντίστροφη σχέση μεταξύ της έκφρασης let-7 (ογκοκατασταλτικό) και των επιπέδων πρωτεΐνης RAS και του κατωφερέστερου στόχου της p-ERK, μετά από επιμόλυνση με let-7 mimics και αναστολείς. Επιπλέον, το let-7 ταυτοποιήθηκε ως αρνητικός ρυθμιστής του HIF-1α και EWS-FLI-1 [434]. Η έκφραση let-7 σχετίζεται επίσης αρνητικά με τις διηθήσεις μακροφάγων σε ES. Υπερέκφραση let-7a κατέστειλε σημαντικά την στρατολόγηση των περιφερικών μακροφάγων του αίματος (PBMCs) *in vitro* και μειώθηκαν οι διηθήσεις μακροφάγων σε ξενομοσχευθέντες όγκους ES *in vivo*. Το πιο σημαντικό, ένα ρυθμιστικό feedback κύκλωμα που αποτελείται από το let-7a, τον μετατροπέα σήματος και ενεργοποιητή της μεταγραφής 3 (STAT3), και τον πυρηνικό παράγοντα kappa-B (NF-κB) (let-7a/STAT3/NF-κB) εμπλέκεται στην κατασταλτική δράση μέσω της let-7a-διαμεσολάβησης [435]. Επίσης τρία miRNAs, τα let-7a, miR-16 και miR-29b ήταν σημαντικά υποεκφρασμένα, ενώ το c-Myc και κυκλίνη D2 (CCND2) ήταν σημαντικά υπερεκφρασμένα σε κύτταρα ES που εξετάστηκαν σε σύγκριση με ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κυττάρια (hMSCs). Μετά από επιμόλυνση με siRNA εναντίον του c-Myc επιβεβαιώνεται η αύξηση ρύθμισης της let-7a, miR-16 και miR-29b μέσω της καταστολής του c-myc. Η επιμόλυνση των κυττάρων ES με c-Myc-siRNA και let-7a, miR-16 και miR-29b είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της έκφρασης πρωτεΐνης CCND2 και την αναστολή της προόδου του κυτταρικού κύκλου [436]. Επιπλέον, το EWS γονίδιο μεσολαβεί στην παραγωγή ώριμων let-7g από το πρώιμο pre-let-7g. Το ώριμο let-7g είναι κατεσταλμένο σε αμφότερες τις κυτταρικές σάρκωματος Ewing και πρωτογενές σάρκωμα Ewing, ενώ τα επίπεδα έκφρασης του Dicer και CCND1 (Κυκλίνη D1), τα οποία είναι γνωστά γονίδια στόχοι της let-7 οικογένειας βρίσκονται σε αυξημένη ρύθμιση [437]. Τέλος, το let-7a υποεκφράζεται σε ανθρώπινα κύτταρα ES συγκριτικά με τα ανθρώπινα μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα. Αποκατάσταση της έκφραση του let-7a, μέσω της εξωγενούς επιμόλυνσης, αναστέλλει, τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, τη μετανάστευση, καθώς και τη διήθηση. Η εξαρτώμενη από την κυκλίνη κινάση 6 (CDK6), η οποία υπερεκφράζεται και λειτουργεί ως ογκοπρωτεΐνη στα κύτταρα ES, είναι ένα γονίδιο στόχος του let-7a [438].

Η οικογένεια των όγκων Ewing σαρκώματος (ESF) εμφανίζει μια ξεχωριστή υπογραφή των miRNAs στην οποία επηρεάζεται η έκφραση πολλών ογκοκατασταλτικών γονιδίωνόπως δείχνει μια άλλη μελέτη .Για τον εντοπισμό δυνητικών ογκογόνων και κατασταλτικών microRNAs στο σάρκωμα Ewing, προσδιορίστηκε και συγκρίθηκαν η έκφραση 377 microRNAs σε 40 βιοψίες σάρκωμα Ewing, 6 κυτταρικές σειρές σαρκώματος Ewing και μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, από 6 υγιείς δότες. Από αυτά, 35 microRNAs ταυτοποιήθηκαν να εκφράζονται διαφορετικά, με 19 σε υψηλή και σε 16 σε χαμηλή έκφραση. Το miR-31, είχε τη χαμηλότερη έκφραση σε σύγκριση με μεσεγχυματικά βλαστικά κύτταρα, και οι miR-31 επιμολυσμένες κυτταρικές σειρές σαρκώματος Ewing έδειξαν ένα σημαντικό μειωμένο πολλαπλασιασμό και μειωμένη διηθητικότητα [439].Επίσης, μια άλλη υπογραφή περιλαμβάνει την επαγωγή του ογκογόνου miRNA 17-92 συμπλέγματος και την καταστολή του ογκοκατασταλτικής οικογένειας let-7. Συστημική απελευθέρωση συνθετικών let-7a σε όγκους ESF σε ποντίκια αποκατασταθιστά την έκφρασή του σε κύτταρα όγκου, μειώνει τα επίπεδα έκφρασης HMGA2 και οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης in vivo [440]. Επίσης ,υπάρχει μια συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης EWS/FLI1 και της καταστολή του mir-145, με ένα μηχανισμό σύνδεσης του miR-145 σε σειρές της '3-UTR στο FLI1.Αποκατάσταση του miR-145 σε κυτταρικές σειρές ESFT συνοδεύεται από μείωση της έκφραση της EWS/FLI1 πρωτεΐνης και οδηγεί σε μειωμένη ανάπτυξη και ογκογένεση σε ξενομοσχευθέντα κύτταρα ESFT [441]. Επιπλέον, το EWS/FLI1 μπορεί να προκαλεί μειωμένη ρύθμιση σε ομάδα microRnas (mir-100, 125b, 22, 221/222, 27a and 29a) ενώ αποκατάσταση της έκφρασης τους σε ES οδήγησε επίσης σε μείωση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού .Τα mirnas αυτής της ομάδας ρυθμίζουν αρνητικά την έκφραση πολλαπλών προ-καρκινικών παραγόντων της οδού IGF, IGF-1, IGF-1 υποδοχέα, τον υποδοχέα της ραπαμυκίνης και ριβοσωμιακή πρωτεΐνικη κινάση S6 A1. Συνεπώς, λειτουργούν ως ογκοκατασταλτικά του σαρκώματος Ewing [442].

Άλλα mirRnas με διαταραχή της έκφρασης μπορούν επηρεάζουν διαφορετικά γονίδια στόχους με διαφορετικές λειτουργίες .Σε μια μελέτη το miR 199b-5p ήταν ένας σημαντικός ρυθμιστής στα κύτταρα Ewing σαρκώματος και η έκφρασή του ήταν μειωμένη στα προερχόμενα ES κύτταρα A673/TC252 .Προκλητή έκφραση του miR-199b-5p κατέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων και την διήθηση ,

ανέστειλε την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, και προώθησε την κυτταρική απόπτωση. Επιπλέον, η παρούσα μελέτη εντόπισε το CCNL1 (cyclin L1) ως άμεσο στόχο του miR-199b-5p στα κύτταρα ES [443]. Η πρωτεΐνη επιδιόρθωσης του DNA και ο μεταγραφικός ο συμπαραάγοντας, EYA3, εκφράζονται έντονα σε δείγματα όγκων σάρκωματος Ewing. Το EWS/FLI1 διαμεσολαβεί της αύξηση της ρύθμισης του EYA3 μέσω καταστολής του miR-708. Απώλεια του EYA3 μειώνει την επιβίωση των κυττάρων του σαρκώματος Ewing και, καταστολή του EYA3 σε κύτταρα σαρκώματος Ewing οδηγεί σε ευαισθητοποίηση των χημειοθεραπευτικών που προκαλούν βλάβη στο DNA [444]. Ακόμη η έκφραση του CD99 συμβάλλει στην ογκογένεση του Ewing σαρκώματος, ρυθμίζοντας την αύξηση και διαφοροποίηση των κυττάρων του όγκου. Το miR-30a-5p έχει την ικανότητα να αλληλεπιδρά με την περιοχή 3'UTR του CD99 και να ρυθμίζει την έκφρασή του. Έτσι, η εκ νέου έκφραση των miRNA-30a-5p σε κυτταρική σειρά Ewing επάγει τη μείωση του πολλαπλασιασμού των κυττάρων και της διήθησης [445].

MiRnas με συμμετοχή σε σημαντικά μοριακά μονοπάτια εμπλέκονται επίσης στη σηματοδότηση των ES. Σε κυτταρικές σειρές A673 ES, υπερέκφραση του miR-125b, κατέστειλε την έκφραση, του mRNA της καταλυτικής υπομονάδας δέλτα του ογκογονιδίου της φωσφοϊνοσιτιδικής-3-κινάσης (PIK3CD) και της πρωτεΐνης. Καταστολή της PIK3CD μειώνει τη ρύθμιση της έκφρασης των πρωτεϊνών φωσφο-AKT και φωσφο-mTOR, υποδεικνύοντας ότι το miR-125b λειτουργεί ως καταστολέας των όγκων με στόχο την PI3K/Akt/mTOR οδό σηματοδότησης [446]. Η σηματοδότηση του αυξητικού παράγοντα της ινσουλίνης αποτελούν βασικό σηματοδοτικό μονοπάτι που εμπλέκεται στην ESF σαρκωματογένεση. Μια ομάδα miRNAs (mir-100, mir-125b, mir-22, mir-221/222, mir-27a και mir-29a) έχει προβλεφθεί ότι στοχεύει την οδό IGF, και τα οποία καταστέλλονται ισχυρά από το EWS/FlI1 στο σάρκωμα Ewing [447]. Επιπλέον αναλύσεις μικροσυστοιχιών σε σειρά ξενομοσχευμάτων απο ES, έδειξαν επανειλημένα αλλοιωμένη έκφραση στο miR-21, miR-31, miR-31*, miR-106b, miR-145, miR-150 *, miR-371-5p, miR-557 και miR-598. Αυτά τα miRNAs είχαν προβλεφθεί ότι ρυθμίζουν πολλά γονίδια σχετιζόμενα με το EWS, όπως γονίδια του μονοπατιού IGF1, EWSR1, FLI1 και γονίδιο σύντηξης τους (EWS-FLI1) [448]. Τέλος περίπου το ένα τέταρτο των γονιδίων σε μειωμένη ρύθμιση απο μέλη του συμπλέγματος miR-17-92 (oncomiRna) στο ES,

τοποθετούνται στην οδό TGFβ/BMP, και η πλειοψηφία αυτών χαρτογραφούνται κατωφερέστερα της σηματοδότησης του SMAD. Δοκιμές με φωσφορυλίωση SMAD, εντοπίζει ήπια αλλά δραστική ενεργοποίηση της TGFβ σηματοδότησης και κυτταρικά αυτόνομη δραστηριότητα του μονοπατιού BMP με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση των ρυθμιστικών μεταγραφικών καταστολέων ID1 and ID3 της βλαστικής ικανότητας. Τα ευρήματά στο πολύπλοκο ρυθμιστικό δίκτυο των miRnas στο Ewing σάρκωμα δείχνουν το miR-17-92 ως βασικό κόμβο σύνδεσης με το TGFβ/BMP μονοπάτι [449].

Επίσης διάφορα miRnas φαίνεται να σχετίζονται με την κλωνική αναπτυξη των κυττάρων των όγκων του ES. Αποκατάσταση της δραστηριότητας της TARBP2 και η συστηματική χορήγηση συνθετικών μορφών είτε δύο από τους στόχους της, miRNA-143 ή miRNA-145, ανέστειλε την κλωνικότητα βλαστικών καρκινικών κυττάρων (CSC) της οικογένειας όγκων του ES και την ανάπτυξη του όγκου in vivo [450]. Μελέτες στο ES, έχουν εντοπίσει σε αυξημένη ρύθμιση miRnas που ανήκουν στο σχετικό σύμπλεγμα (clusters) των miR-17~92a, miR-106b~25, και miR-106 ~363. MiR-αποκλειστές-sponge (μόρια RNA με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες αντίθετης φοράς miRNAs) που στρέφονται κατά του φτωχά χαρακτηρισμένου συμπλέγματος miR-106a~363 φαίνεται να είναι ένας ιδιαίτερα ισχυρός αναστολέας της κλωνογενούς ανάπτυξης σε ένα υποσύνολο κυτταρικών σειρών ES ενώ αύξηση της ρύθμισης του miR-15a είναι κατωφερέστερος μηχανισμός που συμβάλλει στην ανασταλτική δράση της miR-106a~363 ανάπτυξης του όγκου [451]. Τέλος, το miR-22, ένα EWS/Flt1 κατεσταλμένο miRna, είναι ανασταλτικό για κλωνική και ανεξάρτητη προσκόλλησης ανάπτυξη κυττάρων στο Ewing σάρκωμα. Η KDM3A (JMJD1A / JHDM2A) απομεθυλάση της ιστόνης H3K9me1/2 ,ως ένα miR-22-ρυθμιζόμενο γονίδιο, υπερεκφράζεται σε Ewing σάρκωμα. Η ελλειπή του αναστέλλει τη κλωνογενή και ανεξάρτητη από προσκόλληση ανάπτυξη σε πολλαπλές κυτταρικές σειρές που λαμβάνονται από ασθενή, καθώς και την ογκογένεση σε μοντέλο ξενομοσχεύματος [452].

Διάφορα miRna σχετίζονται με ανταπόκριση στη θεραπεία των ES. Η υπερέκφραση του miR-125b σε προγονικά κύτταρα ES είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη αντοχή του φαρμάκου, όχι μόνο στη doxorubicin , αλλά επίσης στην ετοποσίδη και βινκριστίνη, καταστέλλοντας την έκφραση των αποπτωτικών μεσολαβητών, όπως p53

και Bak [453]. Η TAp73β, μία πρωτεΐνη της οικογένειας του p53, εμπλέκεται στην απόπτωση που επάγεται από την Cisplatin στα σαρκώματα των οστών . Το miRna-193a-5p ρυθμίζει τη βιωσιμότητα, την κλωνογεννητική ικανότητα και την επαγόμενη από την Cisplatin απόπτωση μέσω της αναστολής της TAp73β [454].

3.12 Στρωματικοί όγκοι γαστρεντερικού (gist)

MiRNA αναλύσεις σε δείγματα GISTs επιβεβαίωσαν ότι οι εκφράσεις τους ποικίλλουν ανάλογα με τη μετάλλαξη των αλληλομόρφων και κάθε μετάλλαξη του KIT μπορεί να οδηγήσει σε συγκεκριμένη ογκογόνο οδό [455]. Άμεση σύγκριση μεταξύ των κακόηθους και οριακά κακόηθους GISTs αποκάλυψαν 14 σημαντικά και διαφορετικά εκφρασμένα miRNAs .Απο αυτά τα 4 ήταν τα πιο σημαντικά και διαφορετικά εκφρασμένα miRNAs (miR-221, miR-135b, miR-675* και miR-218) ενώ τα miRNAs, miR-221 και miR-675* μπορεί να σχετίζονται με την κακοήθη εξαλλαγή των GISTs [456]. Σε παιδιατρικούς GISTs άγριου τύπου η ελαττωματική κυτταρική αναπνοή φαίνεται να ενισχύει την ανάπτυξη του όγκου σε αυτές τις περιπτώσεις, που ως ομάδα έχουν έλλειψη εκφράσης ηλεκτρικής αφυδρογονάσης [SDH] B, και σε ένα μικρό υποσύνολο των όγκων άγριου τύπου φαίνονται μεταλλάξεις σε γονίδια που κωδικοποιούν τις υπομονάδες SDH [SDHx]. Ο χαρακτηρισμός μιας μικτής ομάδας 73 περιπτώσεων, συμπεριλαμβανομένων 18 παιδιατρικού γαστρικού GISTs άγριου τύπου, 25 (20 γαστρικού, 4 λεπτού εντέρου και 1 οπισθοπεριτοναϊκού) GISTs άγριου τύπου ενήλικα και 30 μεταλλαγμένου γαστρικού GISTs ενηλίκων φανέρωσαν ένα σύμπλεγμα miRNAs στο 14q32 δείχνοντας εντυπωσιακά διαφορετικά μοτίβα έκφρασης. Το εύρημα αυτό φαίνεται να οφείλεται, τουλάχιστον εν μέρει, σε διαφορετική αλληλική μεθυλίωση αυτής της αποτυπωμένης περιοχής και πιθανώς εξηγεί μία μετα-μεταγραφική ρύθμιση της αποσιώπισης (που δεν εκφράζουν μετάλλαξη για υπομονάδα SDH) των όγκων αυτών [457].

Η έκφραση διαφορετικών miRNAs μπορεί να σχετίζεται επίσης με τα κλινικά στοιχεία των όγκων. Σε 19 περιστατικά GIST, η FASCIN-1 mRNA (άμεσος στόχος του miR-133b) ήταν σε αυξημένη ρύθμιση με ταυτόχρονη μειωμένη ρύθμιση του miR-133b σε υψηλής κακοήθειας

GIST. Υπερέκφραση της FASCIN-1 συσχετίστηκε σημαντικά με μικρότερο ελεύθερο νόσου χρόνο επιβίωσης και με αρκετά επιθετικά παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά, συμπεριλαμβανομένου του μεγέθους του όγκου, των αριθμό μιτώσεων, το βαθμό κακοήθειας, την διήθηση των αιμοφόρων αγγείων και την εξέλκωση των βλεννογόνων [458]. Η miR-196a και lincRNA (μεγάλο μη κωδικοποιητικό διαγονιδιακό RNA) Hotaïr υπερέκφραση συνδέθηκε με υψηλού βαθμού κακοήθειας, μετάσταση και φτωγή επιβίωση μεταξύ των δειγμάτων GIST, ενώ παρεμβατικό RNA(RNAi) διαμεσολάβητης knockdown του Hotaïr, κατέστειλε τη διήθητικότητα κυττάρων GIST [459].

Η έκφραση των miRnas στα GIST μπορούν να επιβεβαιώνουν την διαφορική διάγνωση των όγκων αυτών. Οι GISTs προέρχονται πολυεστιακά από διαφορετικές τοποθεσίες του γαστρεντερικού. Τα miR-221 και miR-222 είναι σε μειωμένη ρύθμιση στα GISTs σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό, ενώ εκφράζονται σε αυξημένα επίπεδα στο γαστρικό GIST σε σύγκριση με το δωδεκαδακτυλικό, υποστηρίζοντας την ανεξάρτητη προέλευση των δύο GISTs [460]. Δυσλειτουργία αρκετών miRNAs μπορεί να σχετίζεται με το κακοήθη δυναμικό των GISTs. Έξι από αυτά τα miRNAs, HSA-let-7c, miR-218, miR-488 #, miR-4683, miR-34c-5p και miR-4773, επελέγησαν ως τα τελικά στον κατάλογο των βιοδεικτών για το διαχωρισμό των κακοήθων GISTs από την καλοήθη GISTs [461]. Επίσης το miR-137 ήταν δραματικά μειωμένο σε κλινικά δείγματα GIST και, το Twist1, ένα βασικό γονίδιο ρυθμιστής της μεσεγχυματο επιθηλιογεννούς μετατροπής (MET), έχει αναγνωριστεί ως στόχος του miR-137. Επιπλέον, το miR-137 αυξάνει την έκφραση E-κατερίνης και κυτοκερατίνης, αλλά καταστέλλει την έκφραση της N-κατερίνης και βιμεντίνης. Πειράματα in vitro έχουν δείξει ότι η miR-137 βελτίωσε την επιθηλιακή κυτταρική μορφολογία, μείωσε τη κυτταρική μετανάστευση των GIST, ενεργοποίησε την G1 διακοπή του κυτταρικού κύκλου, και οδήγησε σε επαγωγή της απόπτωσης [462].

Αρκετά miRna επηρεάζουν την έκφραση της πρωτεΐνης KIT στα GIST. Η έκφραση του miR-218 είναι μειωμένη σε ανθρώπινους ιστούς και κυτταρικές σειρές GIST. Το miR-218 μπορεί να ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση των πρωτεϊνών KIT ενώ αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό και την διήθηση των κυττάρων GIST [463]. Τα επίπεδα έκφρασης του miR-221 και miR-222 ήταν σημαντικά κατασταλμένα σε KIT θετικά

GISTs, σε σύγκριση με τον φυσιολογικό ιστό, ενώ KIT-αρνητικά GISTs εμφάνισαν υψηλά επίπεδα έκφρασης αυτών των miRNAs [464]. Χαμηλή έκφραση του miR-221 και miR-222 [199] μπορεί να επιτρέπει την αυξημένη μετάφραση του KIT και την ογκογόνο επίδραση επί του κυττάρου, με δεδομένο το γεγονός ότι αυτά τα miRNAs στοχεύουν το 3'-UTR περιοχή του KIT σε πειραματικά συστήματα [465]. Η άμεση στόχευση των KIT από το miR-494 αποδείχθηκε, σε μια μελέτη με φρέσκους-κατεψυγμένους ιστούς από 31 ασθενείς, με τη μείωση στην έκφραση της KIT μετά από miR-494 υπερέκφραση και δείχνουν ότι το miR-494 είναι ένας αρνητικός ρυθμιστής του KIT σε GISTs [466].

Εκτός της KIT στόχευσης miRNAs εμπλέκονται σε διάφορα παθογεννητικά μονοπάτια με επιπλέον στόχους. Η miR-17, miR-20a, miR-222 υπερέκφραση σε κυτταρικές σειρές GIST ανέστειλαν σημαντικά τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, επηρέασαν την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, προώθησαν την απόπτωση και μείωσαν έντονα την πρωτεΐνη και σε μικρότερο βαθμό τα επίπεδα mRNA των προβλεπόμενων γονιδίων στόχων τους KIT και ETV1 [467]. Η miRNA 221/222 έκφραση ήταν χαμηλότερη για το άγριου τύπου σε σύγκριση με το μεταλλαγμένο GISTs. Παροδική επιμόλυνση με miR-221 και miR-222 μείωσε τη βιωσιμότητα και προώθησε την απόπτωση με την αναστολή της έκφρασης KIT και με την φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των κασπασών 3, 7 και στις τρεις κυτταρικές σειρές GIST. Το p-AKT, AKT και η έκφραση BCL2 μειώθηκαν μετά από miRNA επιμόλυνση, ενώ μόνο μικρή επίδραση στην p-mTOR, mTOR και BCL2L11 (BIM) ανιχνεύθηκε [468]. Τα νησίδα CpG (CGI) του miR-34a και miR-335 ήταν συχνά μεθυλιωμένα σε κύτταρα GIST-T1 και δείγματα πρωτογενούς ιστού GIST. Η επιμόλυνση με miR-34a ή miR-335 mimics μορίων σε κύτταρα GIST-T1 κατέστειλε τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, και το miR-34a ανέστειλε επίσης τη μετανάστευση και την διήθηση από κύτταρα GIST-T1. Επιπλέον, το miR-34a μειώνει τη ρύθμιση σε μια σειρά γονιδίων στόχων, συμπεριλαμβανομένων PDGFRA [469]. Σε ιστούς γαστρικών στρωματικών όγκων εκφράστηκαν 12 διαφορετικά microRNAs, μεταξύ των οποίων 10 miRNAs ήταν υπορυθμισμένα, και 2 ήταν σε αυξημένη ρύθμιση ($P < 0,05$). Γονιδιακή οντολογική (GO) ανάλυση έδειξε ότι τα γονίδια στόχοι του miR-3178 ενεπλάκησαν σε 5 πεδία GO και εκείνων του miR-193a-5p σε 7 πεδία GO σε επίπεδο 2. Ανάλυση εμπλουτισμού μοριακών μονοπατιών

υποδηλώνει ότι το miR-3178 και miR-193a-5p σχετίζονται με 57 και 122 οδούς σηματοδότησης, αντίστοιχα, και λειτουργούν ως κατασταλτικά miRNAs [470]. Τέλος, το miR-140*, ειδικό του χόνδρινου ιστού το οποίο φάνηκε να στοχεύει την αποακετυλάση 4 της ιστόνης (HDAC4) σε πειράματα σε ποντίκια [471], διαπιστώθηκε το ποιο υπερεκφράσμενο μεταξύ 16 miRNAs που έδειξαν αυξημένη έκφραση σε GIST, ενώ 10 miRNAs έδειξαν σχετικά μειωμένη ρύθμιση [199].

Μια άλλη σχέση που φαίνεται να εμφανίζουν τα miRNAs στα GIST είναι με την διαφορετική αναπόκριση στη θεραπεία. Η έκφραση του miR-218 εμφανίζει μειωμένη ρύθμιση σε κυτταρικές σειρές GIST ανθεκτικές στο imatinib mesylate (GIST430) σε σύγκριση με εκείνες ευαίσθητες στο imatinib mesylate, ενώ η miR-218 υπερέκφραση μπορεί να βελτιώσει την ευαισθησία των κυττάρων GIST στο imatinib mesylate, με το PI3K/AKT μονοπάτι σηματοδότησης ενδεχομένως να εμπλέκεται στο μηχανισμό [472]. Επίσης, επίπεδα υπερέκφρασης του miR-125a-5p και miR-107 συσχετίστηκαν με αντοχή στο imatinib σε δείγματα ιστών GIST από ασθενείς που έλαβαν εισαγωγική θεραπεία με imatinib. Η υπερέκφραση του miR-125a-5p τροποποίησε την ευαισθησία στο imatinib σε κύτταρα (GIST882) με ομόζυγη KIT μετάλλαξη, καταστέλοντας την έκφραση της PTPN18, και αυξάνοντας την βιωσιμότητα των κυττάρων σε GIST882 κύτταρα κατόπιν θεραπείας με imatinib [473]. Ακόμη, το PIK3C2A είναι ένα ειδικό γονίδιο στόχος του miR-518a-5p στα ανθεκτικά στο imatinib mesylate GISTs. Χαμηλή έκφραση του miR-518a-5p είναι πιθανό να αυξάνει τη ρυθμίση του PIK3C2A και να επηρεάζει την κυτταρική ανταπόκριση στο φάρμακο, προκαλώντας αντίσταση στο imatinib σε GISTs [474]. Επίσης σε μακροφάγα που έλαβαν θεραπεία με imatinib το miR155 υπερυθμίστηκε κατά 43,8%, μειώθηκε η ρύθμιση της ADAM μεταλλοπεπτιδάσης περιοχή 28 (ADAM28) κατά 41,4% και ανεστάθη η έκκριση και η δραστηριότητα των MMP-2 και MMP-9 [475]. Τέλος χημικά τροποποιημένα miRNAs 221/222 είναι αποτελεσματικοί αναστολείς της έκφρασης του γονιδίου KIT και μπορεί να παρέχουν μια εναλλακτική θεραπευτική επιλογή για την αντιμετώπιση των GIST, ως στόχος να ξεπεραστούν οι ανησυχίες της αντίστασης στα φάρμακα [476].

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

4.ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

4.1Εισαγωγή -σκοπός

Το λιποσάρκωμα (LPS) αποτελεί ένα σχετικά κοινό υπότυπο των σαρκωμάτων μαλακών μορίων (STS), τα οποία αντιπροσωπεύουν τουλάχιστον το 20% του συνόλου των περιπτώσεων STS [477,478]. Το LPS υποδιαιρείται σε τέσσερις ιστολογικούς υπότυπους που σχηματίζουν τρεις βιολογικές ομάδες με διαφορετικά μορφολογικά και κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά: i) καλά διαφοροποιημένο / απο-διαφοροποιημένο (WDLPS / DDLPS) με ενίσχυση του χρωμοσώματος 12q13-1 προκύπτοντας MDM2, HMGA2 και CDK4 υπερέκφραση, ii) το μυξοειδές/στρογγυλών κυττάρων (MRC) LPS με αντιμετάθεση (12;16) (q13;p11.2) που οδηγεί σε ένα μοναδικά διαταραγμένο μεταγραφικό παράγοντα που προέρχεται από τη σύντηξη FUS-CHOP και iii) το πλειόμορφο LPS, μια υψηλού βαθμού κακοήθειας σπάνια παραλλαγή και επιθετική νόσος [477-479].

Αν και κάθε ιστολογική ομάδα έχει διαφορετική κλινική συμπεριφορά από την άποψη της επιθετικότητας της νόσου και του αποτελέσματος, η θεραπεία είναι σε γενικό βαθμό η ίδια για όλους τους υποτύπους του LPS εκτός του μυξοειδούς. Η πλήρης χειρουργική εκτομή του όγκου παραμένει ο ακρογωνιαίος λίθος της πρωτογενούς θεραπείας. Η ακτινοθεραπεία και συμβατική κυτταροτοξική χημειοθεραπεία έχει περιορισμένη επίδραση στην αντιμετώπιση της εξάπλωση της νόσου, με την εξαίρεση του MRC LPS, και η χρήση τους παραμένει αμφιλεγόμενη [477-481]. Οι κατευθυντήριες οδηγίες για επικουρική και εισαγωγική θεραπεία και της αξιολόγηση του ιστολογικού υποτύπου των LPS κυμαίνονται σε μεγάλο βαθμό, ακόμη και μεταξύ των μεγάλων κέντρων σάρκωματος. Ο βαθμός κακοήθειας του όγκου, η εντόπιση, το μέγεθος και ο υποτύπος, είναι ευρέως αποδεκτοί προγνωστικοί παράγοντες στα LPS [480,157,482]. Παρ' όλα αυτά, είναι προφανές ότι οι βασικές προκλήσεις παραμένουν όσον αφορά την πρόγνωση των ασθενών [482-484], δεδομένου ότι πολλά λιποσαρκώματα δείχνουν αυξημένο ρυθμό υποτροπών και τελικά οδηγούνται σε προχωρημένη μη-αντιμετωπίσιμη

νόσο με υψηλά ποσοστά θνησιμότητας. Όλα αυτά δείχνουν ότι η προγνωστική και διαγνωστική αξία που αυτή βασιζόταν πρωτίστως σε απλά μορφολογικά και κυτταρογενετικά χαρακτηριστικά του όγκου δεν είναι ακριβής, δεδομένου ότι δεν περιλαμβάνει τους ποικίλους υποκείμενους μοριακούς μηχανισμούς που οδηγούν στην ανάπτυξη των LPS. Το εγγενές ετερογενές υπόβαθρο των LPS συνεχίζει να αποτελεί σημαντική θεραπευτική πρόκληση, πιθανώς λόγω της σύνθετης μοριακής ποικιλομορφία τους η οποία δεν μεταφράζεται πάντα σε ένα ξεχωριστό μορφολογικό πρότυπο [479, 480, 483, 485]. Δύναται ασθενείς με όγκους LPS με παρόμοια μορφολογικά χαρακτηριστικά να ακολουθήσουν αποκλίνουσες κλινικές πορείες ,και εσφαλμένα κατατάσσονται απο τους τρέχοντες δείκτες στην ίδια προγνωστική ομάδα .Συνεπώς, την ανεύρεση νέων προγνωστικών βιοδεικτών αντιπροσωπεύει μια προφανή ανάγκη για τη διαστρωμάτωση των ασθενών σε εκείνους που θα ωφεληθούν τελικά από τη (νεο) επικουρική θεραπεία, και σε εκείνους που μπορεί να αποφύγουν τις επιβλαβείς παρενέργειες της χημειοθεραπείας και μπορεί απλά να ακολουθήσουν την προσέγγιση της παρακολούθησης [477, 482-485].

Σε αυτό το πλαίσιο, τα αρχεία ιστών σε φορμαλίνη - σταθεροποιημένα και ενσωματωμένα με παραφίνη (FFPE) βιοτραπεζών αποτελούν μια πολύτιμη πηγή για την διερεύνηση νέων βιολογικών δεικτών και αποτελούν μια μοναδική πηγή για την έρευνα του καρκίνου. Τα δείγματα ιστού FFPE είναι τα πιο εύκολα διαθέσιμα αρχειακά υλικά στα παθολογοανατομικά εργαστήρια και στις τράπεζες ιστών σε όλο τον κόσμο [486]. Λαμβάνοντας υπόψη τη μικρή συχνότητα των LPS και τη σπανιότητα των δειγμάτων ιστού LPS σε όλο τον κόσμο, οι μελέτες που συσχετίζουν μοριακά χαρακτηριστικά LPS με κλινική έκβαση, μπορεί να πραγματοποιηθούν σχεδόν αποκλειστικά σε FFPE δείγματα.Άλλα σημαντικά πλεονεκτήματα των δειγμάτων FFPE σχετικά με την έρευνα βιοδεικτων στον καρκίνο είναι ότι είναι εύκολα προσβάσιμα, έχουν καταχωρηθεί πολύτιμες πληροφορίες για την εξέλιξη της νόσου, έχουν μεγάλες περιόδους παρακολούθησης των ασθενών, διαθέτουν μια ποικιλία προγνωστικών και δεδομένων επιβίωσης και οι τυχόν βιοδείκτες που προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας δείγματα FFPE θα μπορούσαν κατάλληλα να εξυπηρετούν τις διαδικασίες ροής εργασίας των κλινικών πρακτικών [487].

Ωστόσο, οι FFPE ιστοί δεν έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στις μελέτες έκφρασης γονιδιακού προφίλ επειδή η στερέωση με φορμαλίνη είναι γνωστό ότι οδηγεί σε μεγάλο βαθμού κατάτμηση, χημική τροποποίηση και διασύνδεση (cross-linked) του ολικού RNA. Ευτυχώς, αυτό δεν ισχύει στην περίπτωση των microRNAs, μια οικογένεια από μικρά, πολύ σταθερά και ανθεκτικά σε αποδόμηση /χημική τροποποίηση μόρια που μπορεί να μετρηθούν με αξιοπιστία ακόμη και στην περίπτωση των σκληρών δειγμάτων ιστών FFPE [488, 489].

Η αποδεδειγμένη σταθερότητα των miRNAs, τα οποία είναι μη-κωδικοποιητικά μόρια RNA που μπορούν μετα-μεταγραφικά να ρυθμίζουν πολλαπλά σχετιζόμενα με τον καρκίνο γονίδια στόχους, σε FFPE αρχειακό ιστό [488,489] αποτελούν μια ελκυστική πηγή για μελέτες μοριακού προφίλ και αξιολογούνται ως νέοι ισχυροί βιοδείκτες του καρκίνου. Εκτός από την αντοχή στην αποδόμηση τους σε δείγματα FFPE, άλλοι σημαντικοί λόγοι που κάνουν τα miRNAs μοναδικά πολύτιμα μόρια στην έρευνα βιοδεικτών στο καρκίνο, περιλαμβάνουν την ολιστική φύση των κλινικών πληροφοριών που μπορούν να προκύψουν από την ανάλυση της έκφρασης τους, δεδομένου ότι διαταραχή των επιπέδων ενός μοναδικού miRNA θα μπορούσε να αντανakλά σημαντικές αλλαγές που επηρεάζουν ένα ευρύ φάσμα σχετιζόμενο με τις βιολογικές οδούς στον καρκίνο, καθώς επίσης και ο ταχύς, εύκολος, ακριβής και οικονομικά αποδοτικός προσδιορισμός τους μέσω της qPCR [489-491].

Από το 2002, όταν η πρώτη έκθεση απορρύθμισης των miRNA στην χρόνια λεμφοκυτταρική λευχαιμία πραγματοποιήθηκε από τον Calin et al το 2002 [492], το ποσοστό των μελετών που σχετίζονται με τον καρκίνο και εμπλέκουν miRNAs ως καταστολείς του όγκου ή ογκογονίδια έχει αυξηθεί κατά 1000 φορές [491]. Ακόμη πιο εντυπωσιακό είναι το γεγονός ότι αρκετά miRNAs σήμερα διερευνώνται ως βιοδείκτες του καρκίνου σε > 100 κλινικές δοκιμές [490]. Όσον αφορά τα LPS, υπάρχουν αναφορές - αν και περιορισμένες σε σύγκριση με άλλες κακοήθειες - επισημαίνοντας συγκεκριμένα τα miRNAs που διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην μηχανιστική της λιποσαρκωματογένεσης και στην εξέλιξη των όγκων LPS. Πιο συγκεκριμένα, το miR-155, miR-21 και miR-26a-2 αναφέρεται σταθερά ότι απορυθμίζονται σημαντικά σε LPS σε σύγκριση με καλόηθεις όγκους ή κανονικό λίπος. Τα miR-155, miR-135b και miR-26-a-2 έχουν

περιγραφεί ως ογκογονίδια στα LPS [493, 182, 494, 185,171, 177, 176,178], ενώ το miR-21 είναι το πιο ευρέως γνωστό oncomiR συμμετέχοντας σε όλες σχεδόν τις ανθρώπινες κακοήθειες [185, 495-499]. Το miR-26-a-2 και miR-135b είναι τα μόνα miRNAs μέχρι σήμερα που έχουν συσχετιστεί με δυσμενή πρόγνωση των ασθενών με LPS [493,171]. Αντίθετα, τα miR-145, miR-143 και miR-451 έχουν αποδειχθεί ότι έχουν ιδιότητες όγκο-κατασταλτικών σε LPS [183,181].

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αποκαλύψει αν υπάρχει θέση στα miRNAs ως κλινικά σχετιζόμενα μόρια στη λήψη αποφάσεων και στην αντιμετώπιση των LPS. Με τις περισσότερες μελέτες μέχρι στιγμής να επικεντρώνονται στην ανώμαλη έκφραση των miRNAs σε υποτύπους του LPS (κυρίως WDLPS / DDLPS) σε σύγκριση με το κανονικό λίπος, έχουμε ως στόχο να παραχθούν πληροφορίες σχετικά με την κλινική χρησιμότητα της έκφρασης ορισμένων miRNAs, που συμμετέχουν στην γέννεση και την εξέλιξη των LPS, σε όλους τους υποτύπους και σε δείγματα ελέγχου λιπώματος, χρησιμοποιώντας μια μοναδική και καλά τεκμηριωμένη ομάδα δειγμάτων ιστού σε FFPE. Αυτή είναι η πρώτη μελέτη που αναλύει διεξοδικά την έκφραση των miRNA μορίων miR-155,-21,-145,-143και-451, προκειμένου να αξιολογήσει την κλινική αξία τους ως νέοι βιοδείκτες για τα LPS.

4.2 Υλικά και μέθοδοι

4.2.1 Δείγματα ιστού λιποσαρκωμάτων και λιπωμάτων: Κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά

Συνολικά 83 FFPE δείγματα ιστού από πρωτογενή λιποσάρκωματα (LPS) (N = 62) και λίπωματα (LPM) (N = 21) ασθενών που υποβλήθηκαν σε θεραπευτική εκτομή, μεταξύ του 1990 και του 2012 συμπεριλήφθησαν στη μελέτη μας. Εισαγωγική θεραπεία δεν είχε χορηγηθεί σε αυτά τα δείγματα ασθενών. Οι ιστοί FFPE μαζί με το λεπτομερές ιατρικό ιστορικό, τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά και τις πληροφορίες παρακολούθησης της επιβίωσης ελήφθησαν από το Κέντρο Βιοτράπεζας Καρκίνου Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (UICBC). Το παρόν ερευνητικό πρόγραμμα εγκρίθηκε από την επιτροπή δεοντολογίας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ιωαννίνων και όλοι οι ζώντες ασθενείς έδωσαν γραπτή συγκατάθεση πριν

από την έναρξη της μελέτης. Επίσης όλες οι διαγνώσεις εξετάστηκαν από δύο έμπειρους παθολογοανατόμους και η ιστολογική κατηγοριοποίηση των υπότυπων βασίστηκε στην ταξινόμηση του Π.Ο.Υ για τους όγκους σαρκωμάτων μαλακών μορίων ενώ ο βαθμός κακοήθειας του όγκου υπολογίστηκε από το σύστημα FNCLCC [479].

Η διάμεση ηλικία των ασθενών κατά τη διάγνωση για τα LPS ήταν 53,5 χρόνια (εύρος: 20 - 86) και το 61,3% ήταν άνδρες, ενώ για τους ασθενείς με LPM ήταν 47,5 χρόνια (εύρος: 33 - 90) και το 71,4% ήταν άνδρες. Το διάμεσο μέγεθος του όγκου των ασθενών ήταν 10,0 εκατοστά για τα LPS και 4,65 cm για τα LPM. Η κατανομή των διαφόρων ιστολογικών υποτύπων των LPS ήταν ως εξής: Μυξοειδή/στογγυλοκυτταρικά σε 34 ασθενείς (54,8%), πλειόμορφα λιποσαρκώματα σε 15 ασθενείς (24,2%), αποδιαφοροποιημένα σε 9 ασθενείς (14,5%) καλά διαφοροποιημένα σε 4 ασθενείς (6,5%). Το 38,1% των όγκων LPM εντοπίστηκε στον κορμό του σώματος και τα υπόλοιπα στα άκρα, για τα LPS η κατανομή των όγκων ήταν 62,9% στα άκρα, 17,7% στον κορμό και 19,4% ήταν οπισθοπεριτοναϊκή.

Σε ασθενείς με θετικά χειρουργικά όρια ή/και έχοντες όγκους υψηλού βαθμού κακοήθειας δόθηκε επικουρική θεραπεία, η οποία αποτελείται από ακτινοθεραπεία ή/και χημειοθεραπεία. Ο διάμεσος χρόνος παρακολούθησης των ασθενών με LPS ήταν 73 μήνες (2,0 έως 215 μήνες) ,με διάμεση παρακολούθηση σε ασθενείς ακόμα ζωντανούς κατά τη στιγμή της ανάλυσης που ήταν 109 μήνες (33 έως 187 μήνες). Κατά τη διάρκεια της περιόδου παρακολούθησης 33 ασθενείς απεβίωσαν, σε 34 ασθενείς αναπτύχθηκε τοπική υποτροπή και 10 προχωρήσαν σε μεταστατική νόσο.

Τα πλήρη δημογραφικά, κλινικά και παθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών παρουσιάζονται λεπτομερώς στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Κλινικοπαθολογοανατομικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών με LPS και LPM

Μεταβλητές	
<i>LPS ασθενείς (N = 62)</i>	
Ηλικία (χρόνια) ^α	53.5 (20.0 – 86.0)
Μέγεθος όγκου (διάμεσος, εύρος cm)	10.0 (0.70 –30) 50.0)
Χρόνος παρακολούθησης (μήνες) ^α	73.0 (2.0 – 215)
Φύλο	
Άνδρες	38 (61.3)
Γυναίκες	24 (38.7)
Εντόπιση	N (%)
Άκρα	39 (2.7)
Κορμός	11 (30.1)
Οπισθοπεριτόναιο	12 (53.4)
Ιστολογικός υπότυπος	N (%)
Καλά διαφοροποιημένα	4 (6.5)
Αποδιαφοροποιημένα	9 (14.5)
Μυξοειδή/στρογγυλοκυτταρικά	34 (54.8)
Πλειόμορφα	15 (24.2)
Grade FNCLCC	N (%)
I	4 (6.5)
II	31 (50.0)
III	27 (43.5)
TNM stage	N (%)
IA	2 (3.2)
IB	3 (4.8)
IIA	9 (14.5)
IIB	22 (35.5)
III	25 (40.3)
IV	1 (1.6)
Χειρουργικά Όρια	N (%)
Αρνητικά	36 (58.1)
Θετικά	17 (27.4)
x	9 (14.5)
Συμπληρωματική Χημειοθεραπεία	N (%)
Ναί	47 (75.8)
Όχι	15 (24.2)
Συμπληρωματική Ακτινοθεραπεία	N (%)
Όχι	21 (33.9)
Ναί	41 (66.1)
Ολική Επιβίωση	N (%)
Ζώντες	28 (45.2)
Αποβιώσαντες	33 (53.2)
x	1 (1.6)
Υποτροπή	
Όχι	27 (43.5)

Ναί	34 (54.8)
x	1 (1.6)
Μεταστατική Επιδείνωση	
Όχι	51 (82.3)
Ναί	10 (16.1)
x	1 (1.6)
<i>LPM ασθενείς (N = 21)</i>	
Ηλικία (χρόνια)^a	47.5 (33.0 – 90.0)
Μέγεθος όγκου (cm)^a	4.65 (1.5 – 12.0)
Φύλο	N (%)
Άνδρες	15 (71.4)
Γυναίκες	6 (28.6)
Εντόπιση	N (%)
Άκρα	8 (38.1)
Κορμός	13 (61.9)

^a Median (minimum – maximum value).

x: Unknown

4.2.2 Ομογενοποίηση των δειγμάτων ιστού FFPE και συνολική εκχύλιση του RNA

Ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο συζευγμένο με πρωτεϊνάση K και διαδικασία επώασης με Trizol χρησιμοποιήθηκε για την ομογενοποίηση των δειγμάτων ιστού FFPE. Τα μπλοκ FFPE κόπηκαν σε 10-15 μm τομές και 50 mg από αυτά μεταφέρθηκαν μέσα σε Eppendorf σωληνάρια. Η αποπαραφινολοποίηση πραγματοποιήθηκε με 1,0 ml ξυλένιο με στροβιλισμό δείγματος και επώαση σε 50 °C επί 3 λεπτά σε ήπιο κλονισμό σε ένα Cooling ThermoMixer MKR 13 (HLC, Ditabis, Pforzheim, Germany). Τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν σε πλήρη ταχύτητα για 2 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και το υπερκείμενο απορρίφθηκε. Το προκύπτον ίζημα πλύθηκε δύο φορές από οποιοδήποτε εναπομείναν ξυλένιο με 1 ml 100% αιθανόλης, με στροβιλισμό και φυγοκέντρηση σε πλήρη ταχύτητα για 2 λεπτά. Το ίζημα επώασθηκε στους 60 °C για 3-10 λεπτά μέχρι πλήρους εξάτμισης της αιθανόλης. Ένα σύνολο 200 μL ρυθμιστικού διαλύματος λύσεως FL (Macherey-Nagel, Düren, Germany) και 20 μL πρωτεϊνάσης K (20 mg / mL αρχικής συγκέντρωσης) (New England Biolabs, Herts, UK) προστέθηκαν και τα δείγματα επώαστηκαν όλη τη νύκτα σε 55°C σε ήπια ανακίνηση. Στη συνέχεια, 100 μL από Decrosslink ρυθμιστικού διαλύματος (Macherey Nagel, Düren, Γερμανία) προστέθηκαν και

επώαση στους 80°C για 15 λεπτά έλαβε χώρα, προκειμένου να τερματιστεί η αντίδραση της πρωτεΐνάσης K και αποτελεσματικά να εξαλειφθούν οι σταυροειδείς δεσμοί του RNA. Τα δείγματα στη συνέχεια ψύχθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min, 1,0 ml του αντιδραστήριου LS TRIzol® (Invitrogen) προστέθηκε και η συνολική απομόνωση RNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Τα σφαιρίδια RNA διαλύθηκαν σε RNA αποθηκευτικό διάλυμα (Ambion, Austin, TX, USA) και αποθηκεύθηκαν στους -80°C μέχρι την περαιτέρω ανάλυση. Η συγκέντρωση και η καθαρότητα του ολικού RNA προσδιορίστηκαν σε ένα Biospec-nano σπεκτροφωτόμετρο (Shimadzu).

4.2.3 Πολυαδενυλίωση του ολικού RNA και αντίστροφη μεταγραφή

Ένα μg του συνολικού RNA ανά δείγμα πολυαδενυλιωποιήθηκε με την προσθήκη 800 μM ATP και 1 U απο E.coliPoly (A) πολυμεράση σε ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης που παρέχεται από τον κατασκευαστή (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, USA) στους 37°C για 60 λεπτά, ακολουθούμενη από μία αντίδραση βήμα τερματισμού στους 65 °C για 10 min. Ακολούθως, το πολυαδενυλιωμένο RNA μεταγράφηκε αντίστροφα με 100 U M-MLV ανάστροφης μεταγραφάσης (Invitrogen, USA) στο ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης που παρέχεται από τον κατασκευαστή, με την παρουσία 20 U RNaseOUT™ ανασυνδυασμένο αναστολέα ριβονουκλεάσης (Invitrogen, USA), και 0.25 μM poly(T) προσαρμογέα(5'GCGAGCACAGAATTAATACGACTCACTATAGGTTTTTTTTT TTTTVN-3') στους 37°C για 60 λεπτά. Ένα βήμα απενεργοποίησης του ενζύμου ακολουθείται στους 70°C για 15 λεπτά.

4.2.4 Ποσοτική PCR για την ανάλυση της έκφρασης των miRNAs υποψηφίων αναφοράς και miRNAs στόχων

Μια σειρά από 14 αντιδραστήρια qPCR σχεδιάστηκαν, αναπτύχθηκαν και κανονικοποιήθηκαν για την ανάλυση της έκφρασης των 9 υποψηφίων μορίων αναφοράς miRNAs (miR-191, miR-103, miR-24, miR-28, miR-423, miR-16, miR-25, miR-331, miR-93), προκειμένου να βρεθούν τα καταλληλότερα για την κανονικοποίηση της έκφρασης,

καθώς και για τα 5 μόρια miRNAs-στόχοι (miR-155, miR-21, miR-145, miR-143 και miR-451). Αναλύσεις qPCR σε SYBR-Green βάση έτρεξαν εις διπλούν σε 96 γρήγορης αντίδρασης πλάκες σε 10 μ L αντιδράσεις (Applied Biosystems®, USA), αποτελούμενες από Kapa SYBR® Fast Universal qPCR Master Mix (Kapa Biosystems) συμπεριλαμβανομένων Rox Low παθητικής αναφοράς χρωστική, ένα πρόσθιο εκκινητή ειδικό για κάθε miRNA and ένα καθολικό αντίστροφο εκκινητή όλα σε τελική συγκέντρωση 200 nM, καθώς και 1 ng εκμαγείου cDNA. Οι αλληλουχίες όλων των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Οι αλληλουχίες των oligos που χρησιμοποιήθηκαν για την qPCR

Oligo	Primer sequence (5'→3')
miR-191 (F)	GAATCCCAAAGCAGCTGAA
miR-103 (F)	CAGCATTGTACAGGGCTATGAAA
miR-25 (F)	ATTGCACTTGTCTCGGTCTGA
miR-16 (F)	TAGCAGCACGTAAATATTGGCG
miR-24 (F)	TGGCTCAGTTCAGCAGGAAC
miR-28 (F)	AAGGAGCTCACAGTCTATTGAGAA
miR-423 (F)	GGCAGAGAGCGAGACTTTAA
miR-93 (F)	CAAAGTGCTGTTCGTGCA
miR-331 (F)	GCCCCTGGGCCTATCCTA
miR-155 (F)	AATGCTAATCGTGATAGGGGTAA
miR-21 (F)	GTAGCTTATCAGACTGATGTTGAAA
miR-145 (F)	CCAGTTTTCCCAGGAATCCCTAA
miR-143 (F)	TGAGATGAAGCACTGTAGCTCAA
miR-451 (F)	AAACCGTTACCATTACTGAGTTAA
Universal Reverse Primer	GCGAGCACAGAATTAATACGAC
F: Forward primer	

To 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, USA) μετά από ένα γρήγορο κυκλικό θερμικό πρωτόκολλο που αποτελείται από ένα στάδιο ενεργοποίησης πολυμεράσης για 3 λεπτά στους 95°C και 40 κύκλους αποδιάταξης – υβριδισμός-επέκτασης βήμα αναμονής στους 95 °C για 3 δευτερόλεπτα - 60 °C για 30 δευτερόλεπτα ,χρησιμοποιήθηκε για όλες τις αντιδράσεις qPCR, ακολουθούμενο από ένα βήμα ανάλυσης καμπύλης τήξης. Ένα δείγμα ελέγχου no-template και βαθμονομητής συμπεριλήφθηκε στην κάθε πραγματοποιούμενη qPCR που περιλαμβάνει αντιδράσεις εις διπλούν. Τα επίπεδα έκφρασης των μορίων στόχων miRNA υπολογίστηκαν ως μονάδες Σχετικής Ποσοτικοποίησης (RQ) με τη συγκριτική CT μέθοδο ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) μέσω του v.2.06 7500 λογισμικού (Applied Biosystems®, USA) χρησιμοποιώντας δύο ενδογενή miRNAs αναφοράς (συνδυασμός miR-191 και miR-103) για τον σκοπό της κανονικοποίησης.

4.2.5 Εξετάζοντας κατάλληλα μόρια για κανονικοποίηση της έκφρασης των miRNAs σε λιποςάρκωμα μέσω συνδιασμένης Genorm και NormFinder προσέγγισης

Ένα σημαντικό βήμα στην ανάλυση γονιδιακής έκφρασης, συμπεριλαμβανομένης της ανάλυσης της έκφρασης miRNA, είναι η ταυτοποίηση των κατάλληλων γονιδίων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως αναφορά για λόγους κανονικοποίησης [500,501]. Είναι γενικά παραδεκτό ότι δεν υπάρχει κοινή πρακτική όπως ένα γενικό γονίδιο αναφοράς κατάλληλο για κάθε τύπο ιστού και κάτω από διαφορετικές συνθήκες, όπως στη νόσο [502]. Στο λιποςάρκωμα δεν έχει υπάρξει μέχρι σήμερα μελέτη για να προτείνει ποια είναι γονίδια που θα μπορούσαν να δράσουν ως ενδογενή μόρια αναφοράς για την ανάλυση της έκφρασης των miRNAs. Μία ευρέως αποδεκτή προσέγγιση είναι να μετρηθεί η έκφραση αρκετών υποψηφίων γονιδίων αναφοράς σε έναν αριθμό αντιπροσωπευτικών δειγμάτων, και επιλεγθεί το γονίδιο(-α) που δείχνει τη μικροτερη μεταβολή ως αναφορά(ες) [500-503]. Για το λόγο αυτό, επιλέξαμε να αξιολογηθούν διάφορα ενδογενή μόρια miRNAs αναφοράς που έχουν προταθεί στη βιβλιογραφία και σε άλλες μελέτες έκφρασης των miRNAs που σχετίζονται με τον καρκίνο [502-511], προκειμένου να βρεθούν τα πιο κατάλληλα για τα LPS. Εμείς συνειδητά δεν συμπεριλάβαμε μεγαλύτερα μόρια RNA της οικογένειας SNORD/

RNU που χρησιμοποιούνται συνήθως για κανονικοποίηση των miRNA στους νωπούς ιστούς, λαμβάνοντας υπόψη: i) την έκταση της κατάτμησης του RNA που εμφανίζεται στους ιστούς σε FFPE και μπορεί να επηρεάσει ακόμη και αυτά τα μόρια που είναι συγκριτικά μεγαλύτερα και έτσι λιγότερο σταθερά από miRNAs, και ii) το γεγονός ότι είναι προτιμότερο να χρησιμοποιούμε κανονικοποιητές που χημικώς/δομικώς μοιάζουν όσο το δυνατόν περισσότερο με τα μόρια-στόχους. Κατά συνέπεια, αξιολογήσαμε τη σταθερότητα έκφρασης των 9 υποψηφίων μόριων αναφοράς miRNA (miR-191, miR-103, miR-24, miR-28, miR-423, miR-16, miR-25, miR-331, miR-93) σε ένα σύνολο 22 ιστών LPS και LPM, χρησιμοποιώντας τους geNorm [500] και NormFinder [501] αλγόριθμους. Εν συντομία, ο genNorm υπολογίζει και συγκρίνει την λεγόμενη M-value, ένα μέτρο της μεταβολής της έκφρασης ενός γονιδίου σε σύγκριση με όλα τις άλλα υποψήφια γονίδια, για όλα τα γονίδια, απορρίπτει το γονίδιο με την υψηλότερη M-value, και επαναλαμβάνει τη διαδικασία μέχρι να υπάρξουν μόνο δύο εναπομείναντα γονίδια. Αυτό το τελευταίο ζεύγος γονιδίων που παραμένει προτείνεται ως ο βέλτιστος συνδυασμός των γονιδίων αναφοράς. Η NormFinder, σε αντίθεση με την geNorm, λαμβάνει υπόψη τις πληροφορίες των ομάδων των δειγμάτων, όπως των δειγμάτων LPS vs LPM και υπολογίζει τόσο την εσωτερική όσο και την μεταξύ των ομάδων διακύμανση και μπορεί επίσης να προτείνει το μόνο γονίδιο με την πιο σταθερή έκφραση μαζί με το καλύτερο ζευγάρι των γονιδίων με την πιο σταθερή συνδυασμένη έκφραση [500-502].

4.2.6 Έλεγχος ποιότητας

Η ειδικότητα, ευαισθησία και η επαναληψιμότητα των ανεπτυγμένων δοκιμασιών qPCR αξιολογήθηκαν μέσω διαδικασιών ελέγχου ποιότητας που αποτελείται από: i) η ανάλυση καμπύλης τήξης σε συνδυασμό με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 3.0% για όλα τα αμπλικόνια, επαλήθευσε την παρουσία μιας μοναδικής κορυφής στην καμπύλη τήξης και μιας μοναδικής μπάντας για κάθε προϊόν ενίσχυσης, αντίστοιχα, ii) την εξέταση αρκετών δειγμάτων αρνητικού ελέγχου, όπως ελέγχου χωρίς-πρότυπο, ανάστροφη μεταγραφή-αρνητικού ελέγχου και προτύπου DNA ελέγχου που οδηγεί σε ένα μη ανιχνεύσιμο σήμα CT(cycle threshold) σε όλες τις περιπτώσεις, iii) η κατασκευή πρότυπων καμπυλών για όλα τα μόρια miRNA που δοκιμάστηκαν, επαληθεύοντας

ότι οι PCR αποδόσεις και η γραμμικότητα έπεσε κάτω από το αποδεκτό εύρος για τις αντιδράσεις qPCR, επιτρέποντας έτσι τον υπολογισμό με τη μέθοδο συγκριτικής CT και αποκλείοντας τη δυνατότητα αναστολής PCR, iv) την εκτίμηση αναπαραγωγιμότητας των δοκιμασιών αναλύοντας μια σειρά δειγμάτων από διαφορετικά μέρη του όγκου σε διαφορετικές εκτελέσεις qPCR και τον υπολογισμό του συντελεστή μεταβλητότητας από διπλές μετρήσεις [512].

Λεπτομερείς πληροφορίες σχετικά με τις διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου περιγράφονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6. Δεδομένα ελέγχου ποιότητας από τις αναλύσεις της qPCR που αναπτύχθηκαν .

qCPR Assay	r ² of standard curve	Reaction efficiency	ng of cDNA included in standard curve	Product Tm (Melting Curve)	% Coefficient of Variation (CV)*
miR-155	0.9984	98.73%	0.001-10	73.78	9.94
miR-21	0.9988	95.36%	0.0001-10	73.18	14.3
miR-145	0.9995	90.45%	0.0001-10	73.48	7.76
miR-143	0.9993	90.68%	0.0001-10	74.23	16.2
miR-451	0.9987	93.06%	0.0001-10	72.58	15.6
miR-191	0.9997	91.69%	0.0001-10	74.08	N/A
miR-103	0.9999	90.66%	0.001-10	73.93	N/A
miR-25	0.9995	90.97%	0.001-10	74.74	N/A
miR-16	0.9993	91.18%	0.001-10	74.23	N/A
miR-24	0.9997	98.96%	0.001-10	74.89	N/A
miR-28	0.9984	93.65%	0.001-10	74.34	N/A
miR-423	0.9997	92.39%	0.001-10	74.19	N/A
miR-93	0.9984	96.98%	0.001-10	75.04	N/A
miR-331	0.9997	95.04%	0.001-10	74.74	N/A
N/A: Not applicable					
*Coefficient of variation (CV) from duplicate measurements refers to the normalized expression levels of miR-155, miR-21, miR-145, miR-143 and miR-451.					

4.2.7 Βιοστατιστικές αναλύσεις

Η στατιστική σημαντικότητα μεταξύ των συνεχών μεταβλητών της μελέτης εξετάστηκαν από την ανάλυση συσχέτισης του Spearman. Οι διαφορές στην κατανομή των miRNAs στις διάφορες ονομαστικές και σειριακές μεταβλητές της μελέτης, όπως τα κλινικοπαθολογοανατομικά χαρακτηριστικά των ασθενών LPS, εξετάστηκαν από τις Mann-Whitney U, Kruskal-Wallis H ή Jonckheere-Terpstra στατιστικές δοκιμές, ανάλογα με την περίπτωση. Η μέθοδος DeLong et al χρησιμοποιήθηκε για την καμπύλη ROC ανάλυσης [513].

Για τις αναλύσεις επιβίωσης, τα επίπεδα έκφρασης όλων των μορίων miRNA στόχων που περιλαμβάνονται στη μελέτη διαχωρίστηκαν μεταξύ τους σύμφωνα με τη διάμεση τιμή της έκφρασης, αποφεύγοντας έτσι τη χρήση των στατιστικών ελάχιστης τιμή P. Κατά συνέπεια, οι ασθενείς με LPS κατανεμήθηκαν σε miR-υψηλής και miR-χαμηλής έκφρασης άτομα για κάθε miRNA. Οι μετέπειτα αναλύσεις επιβίωσης περιελάμβαναν τη δημιουργία των Kaplan-Meier καμπύλων της συνολικής (OS), της ελεύθερης υποτροπής (RFS) και της μεταστατικής ελεύθερης εξέλιξης επιβίωσης (PFS), καθώς και την ανάπτυξη των μοντέλων της Cox αναλογικής παλινδρόμησης κινδύνου για την αξιολόγηση του προγνωστικού δυναμικού των miR -155, miR-21, miR-145 και miR-451 έκφρασης για τους ασθενείς με LPS. Ένα κεντρικό πολυπαραγοντικό μοντέλο αναπτύχθηκε συμπεριλαμβανομένων των σημαντικών δημογραφικών/κλινικών παραγόντων και ισχυρών προγνωστικών δεικτών που χρησιμοποιούνται σήμερα για το LPS, όπως είναι ο βαθμός κακοήθειας του όγκου, το μέγεθος του όγκου, η εντόπιση του όγκου, τα χειρουργικά όρια, η ηλικία, το φύλο κλπ. Εναλλακτικά πολυπαραγοντικά μοντέλα κατασκευάστηκαν προκειμένου να αποφευχθεί να συμπεριληφθούν ταυτόχρονα στο ίδιο μοντέλο σημαντικοί με υψηλή συσχέτιση δείκτες, όπως χειρουργικά όρια και η θέση του όγκου και έτσι περιοριστικά συγγραμμικά (collinearity) φαινόμενα που θα μπορούσαν να επηρεάσουν την ακρίβεια των προγνωστικών μοντέλων.

Όλες οι στατιστικές αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του IBM Statistics v.23.0 και του MedCalc v.12.5 software. Two-tailed tests χρησιμοποιήθηκαν και οι τιμές $P < 0.05$ προσαρμόστηκαν για στατιστική σημαντικότητα.

4.3 Αποτελέσματα

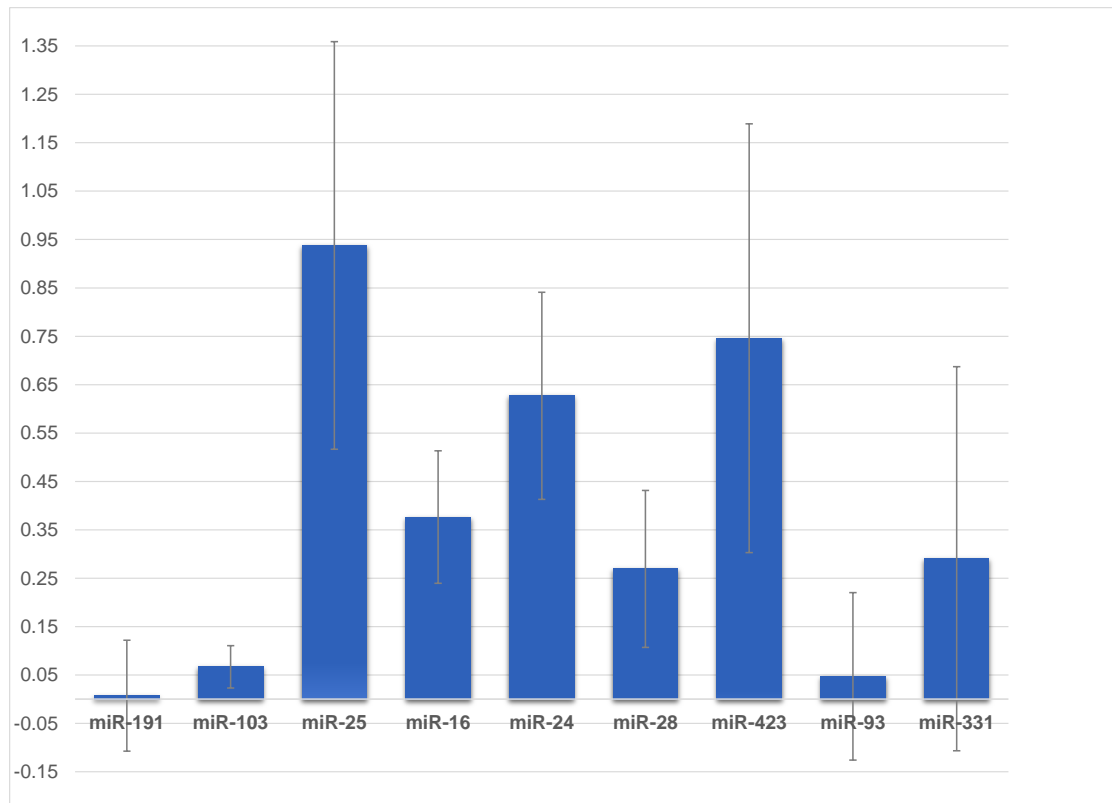
4.3.1 Ο συνδυασμός των miR-103 και miR-191 επίπεδων είναι κατάλληλος για κανονικοποίηση της έκφρασης των miRNAs στο λιποσάρκωμα

Η ανάλυση της έκφρασης των 9 υποψηφίων μόριων αναφοράς miRNA σε ένα σύνολο δειγμάτων από 13 LPS και 9 LPM με τον NormFinder αλγόριθμο (Πίνακας 7) προσδιορίζει το miR-103 ως το πιο σταθερό κανονικοποιητή (τιμή σταθερότητας = 0.152) και το miR-103 και miR-191 ως το καλύτερο συνδυασμό (τιμή σταθερότητας = 0,127) για την κανονικοποίηση της έκφρασης των miRNAs, λαμβάνοντας υπόψη τη σταθερότητα αυτών των μορίων στο εσωτερικό τόσο των LPS όσο και μέσα σε LPM (διακύμανση εντός των ομάδων), καθώς και μεταξύ LPS και LPM (διακύμανση μεταξύ των ομάδων). Πράγματι, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 7, τα miR-103 και miR-191 δεν είναι μόνο δύο από τα πιο σταθερά μόρια, δείχνοντας περιορισμένη διακύμανση μεταξύ των δειγμάτων LPS και LPM, αλλά είναι και τα πιο σταθερά μόρια σε δείγματα LPS (miR-103 εντός της ομάδας LPS διακύμανση = 0,064, miR-191 εντός της ομάδας LPS διακύμανση=0,091). Αυτό επίσης απεικονίζεται στην εικόνα 3A, όπου οι μπάρες αντιπροσωπεύουν την μεταξύ των ομάδων διακύμανση και τα σφάλματα-ράβδοι αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο στις εσωτερικές των ομάδων διακυμάνσεις. Οι ιδανικοί υποψήφιοι, στην περίπτωση μας τα miR-103 και miR-191, παρουσιάζουν διακύμανση μεταξύ ομάδων πιο κοντά στο μηδέν από τα άλλα miRNAs και συγχρόνως έχουν τις μικρότερες γραμμές σφάλματος σε σύγκριση με άλλα μόρια που αναλύθηκαν.

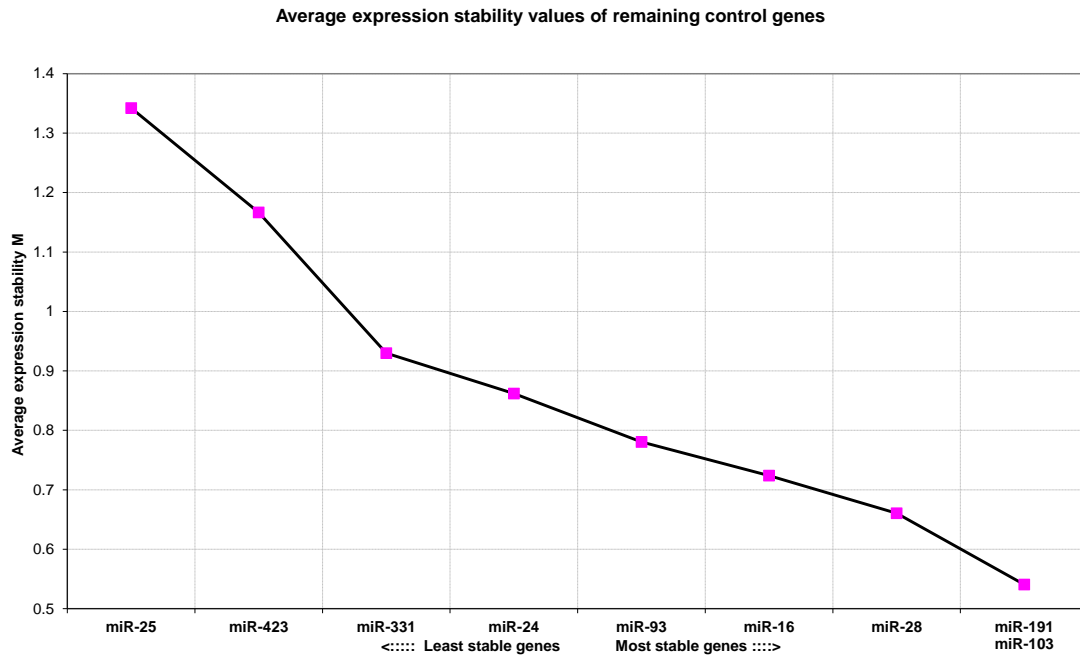
Τα πιο πάνω αποτελέσματα σχετικά με την καταλληλότητα του συνδυασμού του miR-103 και miR-191 για την κανονικοποίηση επιβεβαιώθηκαν χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο geNorm. Όπως φαίνεται στην εικόνα 3B, όταν χρησιμοποιούνται τα ίδια 22 δείγματα LPS και LPM, τα miR-103 και miR-191 έχουν πράγματι επισημανθεί ως τον πιο σταθερό συνδυασμό μορίων. Τα αποτελέσματα παραμένουν τα ίδια, όταν χρησιμοποιούνται μόνο τα δείγματα LPS για ανάλυση, σε μια προσπάθεια να ελεγχθεί η χαμηλή μεταβλητότητα του miR-103 και miR-191 σε δείγματα LPS που προσδιορίζονται από NormFinder. Αυτό τα καθιστά ιδανικούς κανονικοποιητές για τις μελέτες ανάλυσης της έκφρασης miRNA στο λιποσάρκωμα (εικόνα 3C).

Πίνακας7. Τα αποτελέσματα του NormFinder περιλαμβάνοντας , τιμές σταθερότητας , μέσα και μεταξύ των ομάδων τιμές διακύμανσης και την υπόθεση ότι τα καλύτερα miRNAs και ο καλύτερος συνδιασμός των δύο γονιδίων δίνεται απο τον αλγόριθμο.

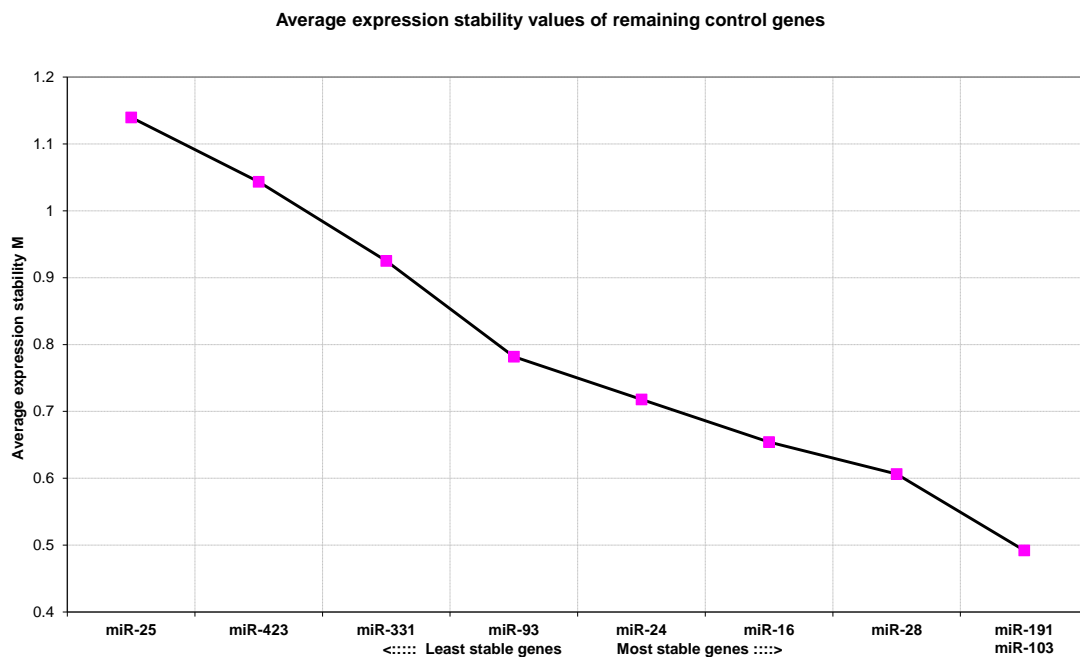
miRNA	Stability value	Intragroup variation (LPM)	Intragroup variation	Intragroup variation
			(LPS)	
miR-191	0.153	0.139	0.091	0.007
miR-103	0.152	0.023	0.064	0.067
miR-25	1.098	0.034	0.809	0.938
miR-16	0.521	0.085	0.189	0.377
miR-24	0.787	0.083	0.345	0.627
miR-28	0.433	0.144	0.180	0.269
miR-423	0.969	0.319	0.567	0.746
miR-93	0.224	0.182	0.164	0.047
miR-331	0.504	0.087	0.707	0.290
Best gene	<i>miR-103</i>			
Stability value	0.152			
Best combination of two genes	<i>miR-191 and miR-103</i>			
Stability value for best combination of two genes	0.127			



Εικόνα3Α. Η γραφική παράσταση απο τα αποτελέσματα της NormFinder για την επιλογή των καλύτερων miRNAs που θα χρησιμοποιηθούν για τον σκοπό της κανονικοποίησης .Οι μεταξύ των ομάδων διακυμάνσεις παριστάνονται με γραφήματα και οι γραμμές σφάλματος αποτελούν τις κατα μέσο όρο διακυμάνσεις μέσα στην ομάδα για κάθε miRNA .



Εικόνα 3B. Τα αποτελέσματα της GeNorm στο ίδιο σετ δειγματος που χρησιμοποιήθηκε στην NormFinder ανάλυση. Ο συνδιασμός απο τα miR-103 and miR-191 προτείνεται σαν τον πιο σταθερό αλγόριθμο.



Εικόνα 3C. Τα αποτελέσματα της GeNorm χρησιμοποιώντας μόνο δείγματα LPS. Ο συνδιασμός απο τα miR-103 and miR-191 καταδεικνύεται πάλι σαν τον πιο σταθερό.

4.3.2 Τα miRNAs -155, -21, -145, -143 και -451 εκφράζονται διαφορετικά μεταξύ των δειγμάτων λιποσαρκωμάτων και λιπωμάτων

Μετά την επιλογή του καλύτερου συνδυασμού των γονιδίων αναφοράς για κανονικοποίηση και την ολοκλήρωση του ποιοτικού ελέγχου των εκτελεσμένων qPCR αναλύσεων, μια λεπτομερής ανάλυση της έκφρασης των miRNAs στόχων πραγματοποιήθηκε σε δείγματα LPS και LPM. Ως πρώτο βήμα αυτής της ανάλυσης, εντοπίστηκαν οι σημαντικές διαφορές στα επίπεδα έκφρασης των 5 miRNA μορίων μεταξύ LPS και δείγματα LPM.

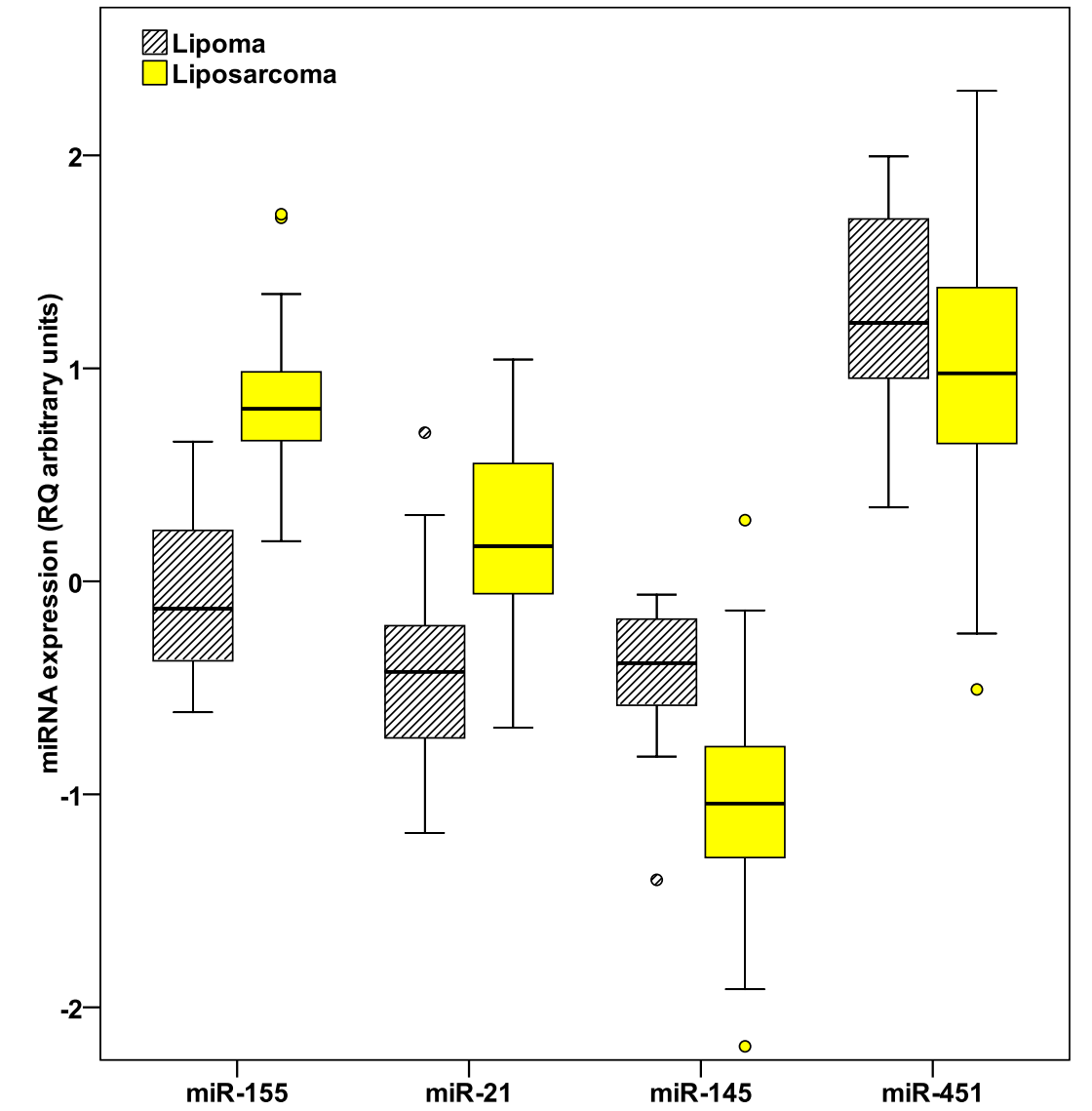
Το miR-155 και miR-21 ήταν σθεναρά υπερεκφρασμένα σε LPS σε σύγκριση με τα δείγματα LPM (εικόνα 4A). Πιο συγκεκριμένα, κατά τη σύγκριση της διάμεσης τιμής της έκφρασης, υπήρχε μια αύξηση της ρύθμισης 8.7 φορές για το miR-155 ($P = 4.3 \times 10^{-10}$) και 3,9-φορές για το miR-21 ($P = 7.0 \times 10^{-6}$), αντίστοιχα σε LPS (διάμεση miR-155 έκφραση = 5,12 μονάδες RQ, διάμεση έκφραση του miR-21 = 1,16 μονάδες RQ) σε σύγκριση με τα δείγματα LPM (διάμεση miR-155 έκφραση = 0.590 μονάδες RQ, διάμεση έκφραση του miR-21 = 0.299 μονάδες RQ).

Αντιθέτως, τα επίπεδα του miR-145, miR-143 και miR-451 ήταν σε μειωμένη ρύθμιση σε δείγματα LPS σε σύγκριση με τα δείγματα LPM. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα επίπεδα του miR-143 αρχικά διερευνήθηκαν σε ένα υποσύνολο των δειγμάτων ιστών LPS και LPM ($N = 18$) και βρέθηκαν να είναι σημαντικά μειωμένα ($P = 0,008$). Παρ' όλα αυτά, λόγω της πολύ ισχυρής συσχέτισης που παρατηρήθηκε μεταξύ των miR-143 και miR-145 επιπέδων ($r_s = 0.968$ $P = 4.6 \times 10^{-6}$), καθώς μπορεί να αναμένεται λόγω της συννιτρονικής τους έκφρασης, το miR-143 δεν αξιολογήθηκε περαιτέρω στην παρούσα μελέτη, επειδή η ανάλυση έκφρασης του αναμενόταν να αποδώσει αποτελέσματα παρόμοια με εκείνη του miR-145. Πράγματι, τα miR-145 επίπεδα έκφρασης ήταν σε σημαντικά μειωμένη ρύθμιση ($P = 1.5 \times 10^{-6}$) 4,6 φορές σε LPS (διάμεση τιμή έκφρασης = 0.0720 μονάδες RQ) σε σύγκριση με το LPM (διάμεση τιμή έκφρασης = 0.329 μονάδες RQ). Το miR-451 βρέθηκε επίσης σε μειωμένη ρύθμιση σε LPS (διάμεση έκφραση = 7,54 μονάδες RQ) σε σύγκριση με LPM (διάμεση έκφραση = 13,0 μονάδες RQ), αλλά σε ηπιότερη έκταση (1,7 φορές, $P = 0,037$) (εικόνα 4A).

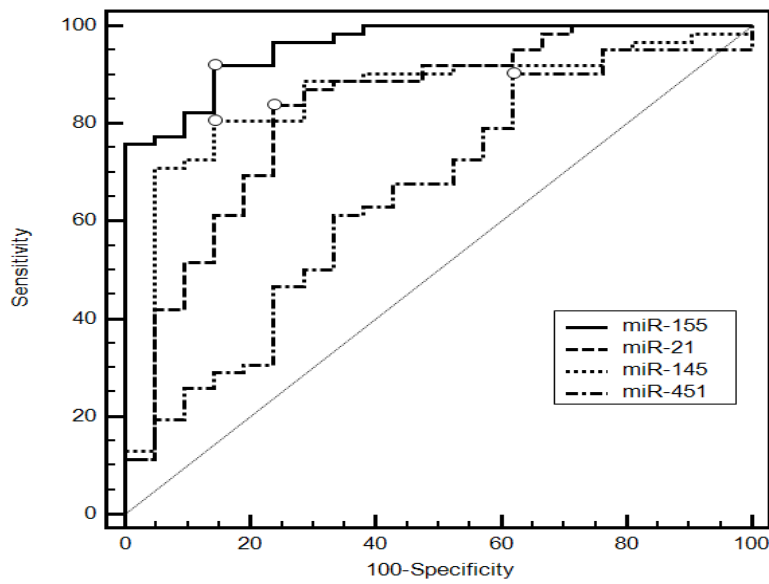
Σε μια προσπάθεια να αξιολογηθεί η διαφορική διαγνωστική ικανότητα των miRNAs, οι καμπύλες ROC αναπτύχθηκαν και η AUC μαζί με τις τιμές της ειδικότητας και ευαισθησίας υπολογίστηκαν (Εικόνα 4B και Πίνακας 8). Μεταξύ των τεσσάρων miRNAs, το miR-155 έδειξε μακράν την καλύτερη τιμή διάκρισης (AUC = 0,958, 95% CI = 0,918 - 0,998, Youden δείκτη J = 0,777, 95% CI = 0,645 - 0,871), ακολουθούμενη από το miR-145 (AUC = 0,853, 95% CI = 0,757 - 0,950, δείκτης Youden J = 0,664, 95% CI = 0,470 - 0,775). Αξίζει να σημειωθεί ότι, για το miR-155 ένας συνδυασμός 91,9% ευαισθησίας και 85,7% ειδικότητας είναι δυνατό να επιτευχθεί, ενώ σε σταθερή ευαισθησία 95,0%, η ειδικότητα είναι 76.2% και σε σταθερή ειδικότητα 95.0%, η ευαισθησία είναι 77,4% (Πίνακας 8).

Πίνακας 8. Η διακριτική ικανότητα των miR-155, miR-21, miR-145, miR-451 για δείγματα LPS vs LPM όπως εκτιμήθηκαν από τις ROC καμπύλες ανάλυσης .

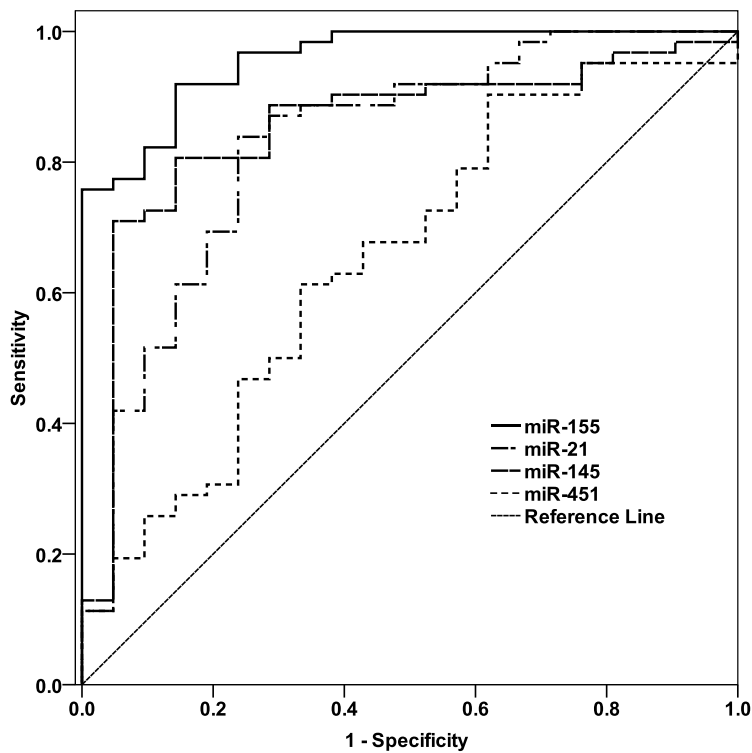
miR -	AUC (95% CI)	P	Youden index J (95% CI)	Optimal Sensitivity, Specificity	Specificity at 90% fixed sensitivity (95% CI)	Specificity at 95% fixed sensitivity (95% CI)	Sensitivity at 90% fixed specificity (95% CI)	Sensitivity at 95% fixed specificity (95% CI)
miR-155	0.958 (0.918 - 0.998)	4.3×10 ⁻¹⁰	0.777 (0.645-0.871)	91.9% , 85.7%	85.71(57.14-95.24)	76.19(43.88-90.48)	82.26(64.52-95.16)	77.42(61.29-90.32)
miR-21	0.829 (0.721 - 0.938)	7.0×10 ⁻⁶	0.600 (0.388-0.760)	83.9%, 76.2%	52.38(11.02-76.19)	38.1 (9.52-61.90)	51.61(8.06-83.87)	41.94(4.84-69.35)
miR-145	0.853 (0.757 - 0.950)	1.5×10 ⁻⁶	0.664 (0.470-0.775)	80.6%, 85.7%	61.9(9.52-90.48)	23.81(0.00-71.43)	72.58(3.23-83.87)	70.97(6.45-86.18)
miR-451	0.653 (0.516 - 0.790)	0.037	0.284 (0.123-0.428)	90.3%, 38.1%	38.1(14.29-61.90)	23.81(0.00-52.38)	25.81(8.06-54.84)	19.35(3.23-37.10)



Εικόνα 4Α. Η κατανομή της έκφρασης του miR-155, miR-21, miR-145 and miR-451 (λογαριθμικές τιμές) ανάμεσα σε δείγματα λιποσαρκωμάτων και λιπομάτων. Οι P values υπολογίστηκαν με Mann-Whitney U test .



B



Εικόνα 4B. Η καμπύλη ROC ανάλυσης για τα επίπεδα έκφρασης miR-155 , miR-21, miR-145 and miR-451 σε ασθενείς με λιποςάρκωμα και λίπωμα . Οι υπολογισμοί έγιναν με βάσει τον DeLong *et al.* Τα σημεία με τον υψηλότερο Youden δείκτη για κάθε miRNA διαγράφονται με ένα κύκλο.

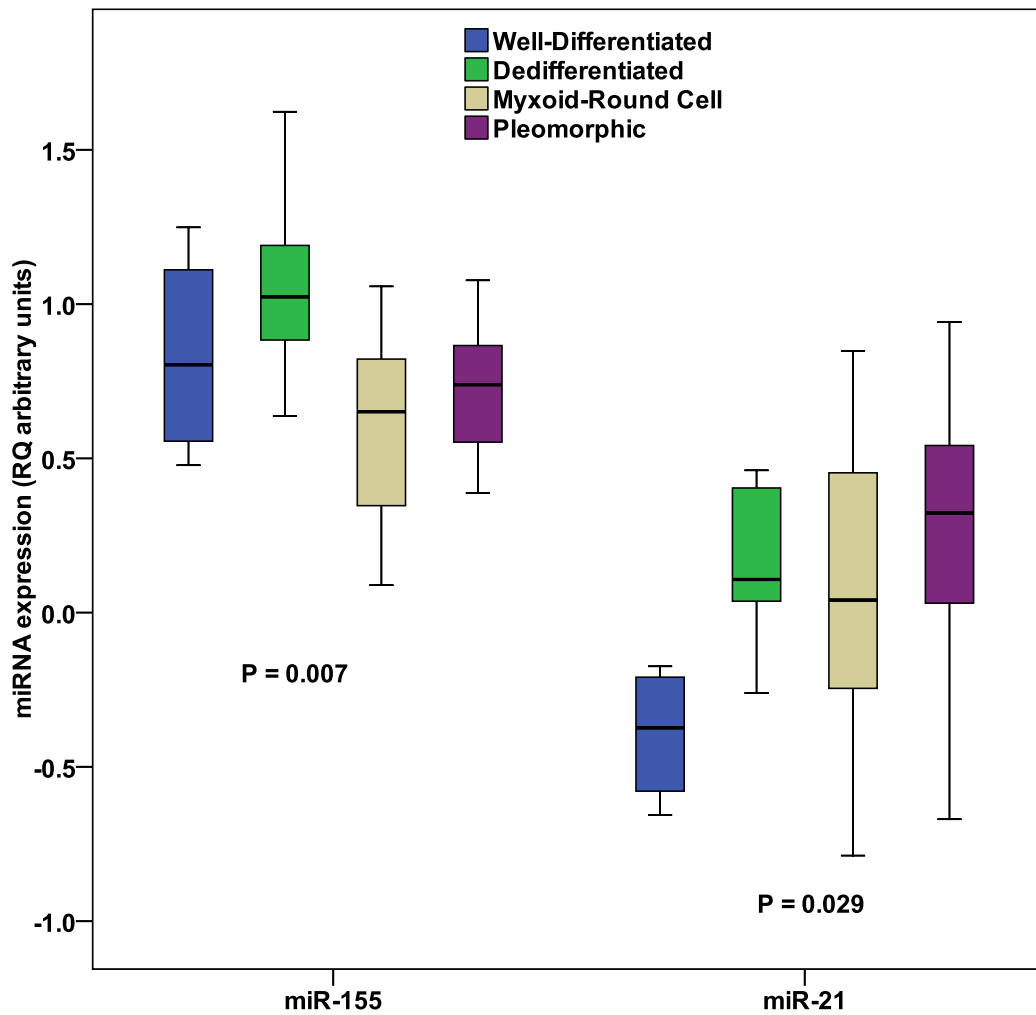
4.3.3 Τα miR-155 και miR-21 παρουσιάζουν διακριτά πρότυπα έκφρασης μεταξύ των διαφορετικών υποτύπων των όγκων LPS, και επίσης το miR-155 υπερεκφράζεται σε όγκους grade III

Προκειμένου να εντοπιστούν πιθανές συσχετίσεις μεταξύ των βασικών κλινικοπαθολογοανατομικών χαρακτηριστικών και των miRNAs, οι κατανομές των επιπέδων έκφρασης των miR-155, miR-21, miR-145 και miR-451 αναλύθηκαν σε σχέση με το φύλο, την ηλικία, τη θέση του όγκου, του υποτύπου του όγκου των ασθενών, τον βαθμό κακοήθειας του όγκου, το μέγεθος του όγκου, το στάδιο TNM και την κατάσταση των χειρουργικών ορίων .

Όπως παρουσιάζεται στην Εικόνα 5, τα επίπεδα έκφρασης του miR-155 ($P = 0,007$) και miR-21 ($P = 0,029$) εκφράζονται διαφορετικά ανάμεσα στο καλά διαφοροποιημένο, αποδιαφοροποιημένο, μυξοειδές/στρογγυλό κύτταρικο και πλειομορφικό υποτύπο των όγκων LPs. Όσον αφορά το miR-21, η επίδραση της στατιστικώς σημαντικής διαφοράς της κατανομής οφείλεται κυρίως στα χαμηλά επίπεδα του σε καλά διαφοροποιημένους όγκους σε σύγκριση με άλλους υπότυπους του όγκου ($P = 0,011$ για τη σύγκριση με αποδιαφοροποιημένους όγκους, $P = 0,026$ για τη σύγκριση με μυξοειδείς /στογγυλοκυττάρικους όγκους και $P = 0,006$ για τη σύγκριση με πλειόμορφους όγκους). Στην περίπτωση του miR-155, η διαφορετική έκφραση του αποτυπώνεται κυρίως στα υψηλά επίπεδα της στα αποδιαφοροποιημένα σε σύγκριση με το μυξοειδές/στρογγυλοκύτταρικο ($P = 2.1 \times 10^{-4}$) και πλειομορφικό υπότυπο ($P = 0,041$).

Μεταξύ των 4 miRNAs που αναλύθηκαν, μόνο το miR-155 έδειξε μια συσχέτιση με το βαθμό κακοήθειας του όγκου ($P = 0,006$), καθώς διαπιστώθηκε ότι υπερεκφράζεται σε grade III (διάμεση τιμή = 7,19 μονάδες RQ) σε σύγκριση με grade I / II όγκους (διάμεση τιμή = 4,31 μονάδες RQ).

Αυξημένη ηλικία συσχετίζεται ασθενώς με τα επίπεδα του miR-21 σε ασθενείς με LPS ($r_s = 0,292$, $P = 0,021$) ,έχει θετική συσχέτιση με τα επίπεδα του miR-155 σε ασθενείς με LPM ($r_s = 0,573$, $P = 0,008$), ενώ μια αρνητική συσχέτιση μεταξύ της ηλικίας και των επιπέδων miR-451 παρατηρήθηκε επίσης σε ασθενείς LPM ($r_s = -0,548$, $P = 0,012$). Καμία άλλη σημαντική συσχέτιση δεν παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης των miRNAs και των υπόλοιπων κλινικοπαθολογοανατομικών/δημογραφικών στοιχείων των ασθενών της μελέτης.



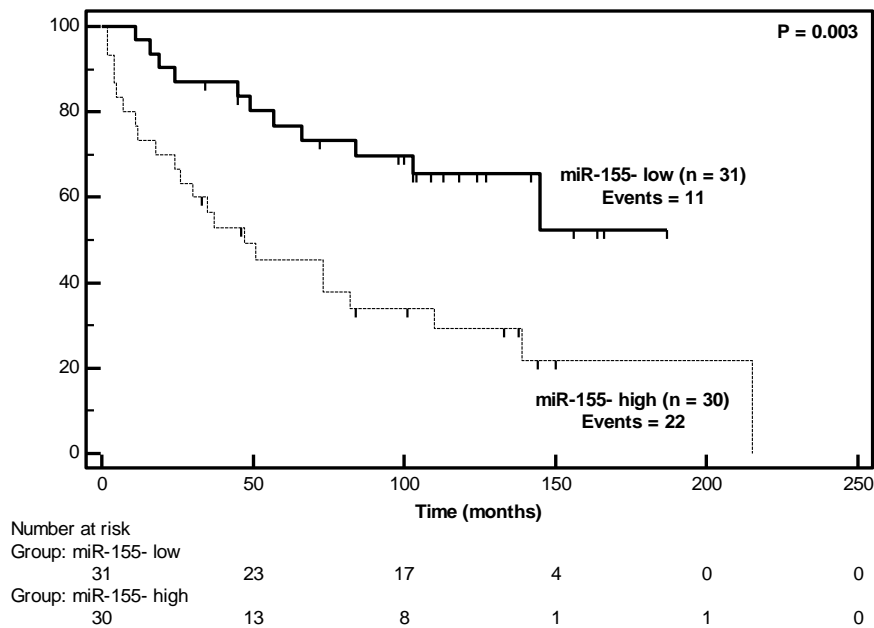
Εικόνα 5. Η κατανομή της έκφρασης των miR-155 and miR-21 (λογαριθμικές τιμές) ανάμεσα σε διαφορετικούς υπότυπους λιποσαρκωμάτων. Οι P τιμές υπολογίστηκαν με Kruskal-Wallis H test.

4.3.4 MiR-155 συνδέεται με δυσμενή ογκολογική έκβαση σε ασθενείς με λιποσάρκωμα

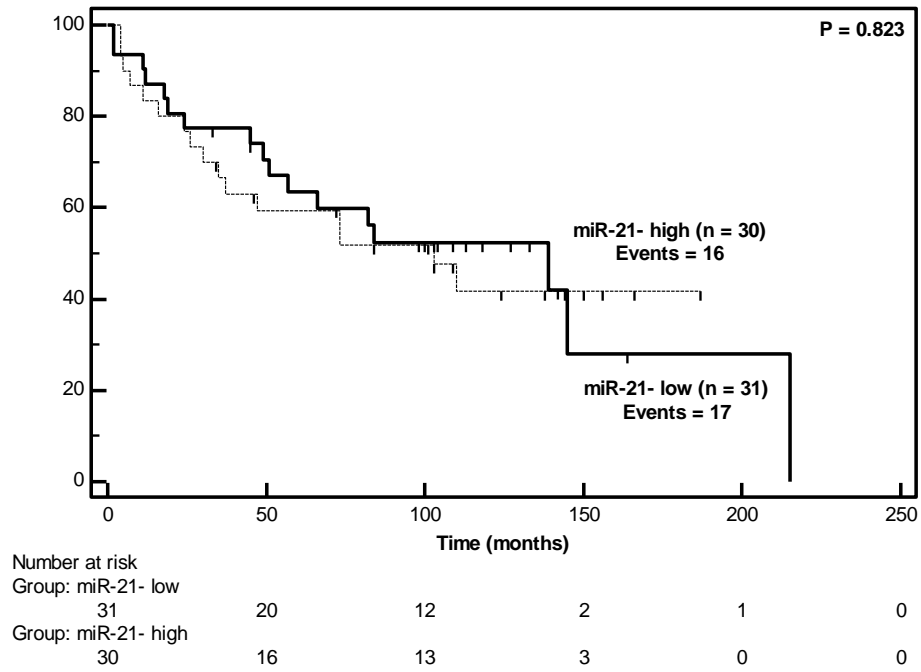
Η ανάλυση επιβίωσης Kaplan-Meier διενεργήθηκε για να διερευνηθεί πιθανές συσχετίσεις μεταξύ miR-155, miR-21, miR-145 και miR-451 επιπέδων έκφρασης και της συνολικής επιβίωσης (OS), ελεύθερη υποτροπής επιβίωση (RFS) και επιβίωση χωρίς εξέλιξη (PFS) των ασθενών με LPS, οι οποίοι ήταν διαστρωματοποιημένοι ως miR-χαμηλής και miR-υψηλής, για κάθε μόριο miRNA, σύμφωνα με τα διάμεσα επίπεδα έκφρασης σε κάθε περίπτωση.

Όπως απεικονίζεται στο Εικόνα 6, μόνο το miR-155 έδειξε μια στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την OS ($P=0,003$). Υψηλά miR-155 επίπεδα έκφρασης συσχετίστηκαν με πορεία χειρότερης OS. Οι ασθενείς που κατηγοριοποιούνται ως miR-155-υψηλής έκφρασης ήταν προφανώς τα άτομα υψηλού κινδύνου με αθροιστική πιθανότητα OS 5 ετών στο $37,8 \pm 9,2\%$, η οποία είναι σημαντικά χαμηλότερη από την αντίστοιχη πιθανότητα $73,3 \pm 8,1\%$ στα miR-155-χαμηλής έκφρασης άτομα (Εικόνα 6A). Ο σχετικός κίνδυνος (HR) για το miR-155-υψηλής έκφρασης άτομα υπολογίστηκε από την μονοπαραγοντική ανάλυση Cox παλινδρόμησης αναλογικού κινδύνου να είναι στο 2,90 (95% CI = 1,39 - 6,03, $P = 0,005$).

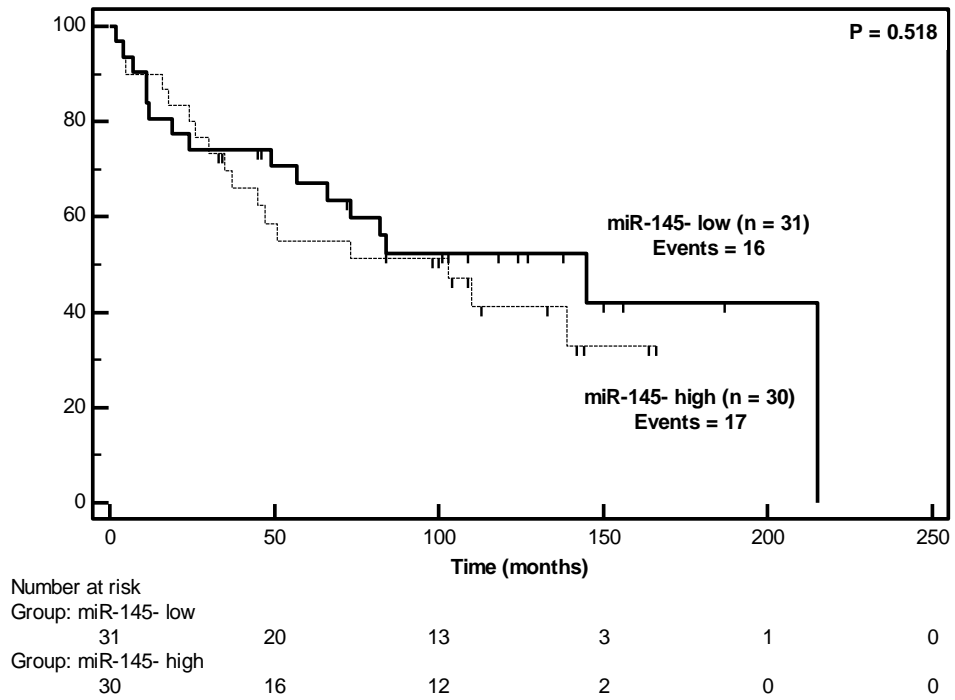
A



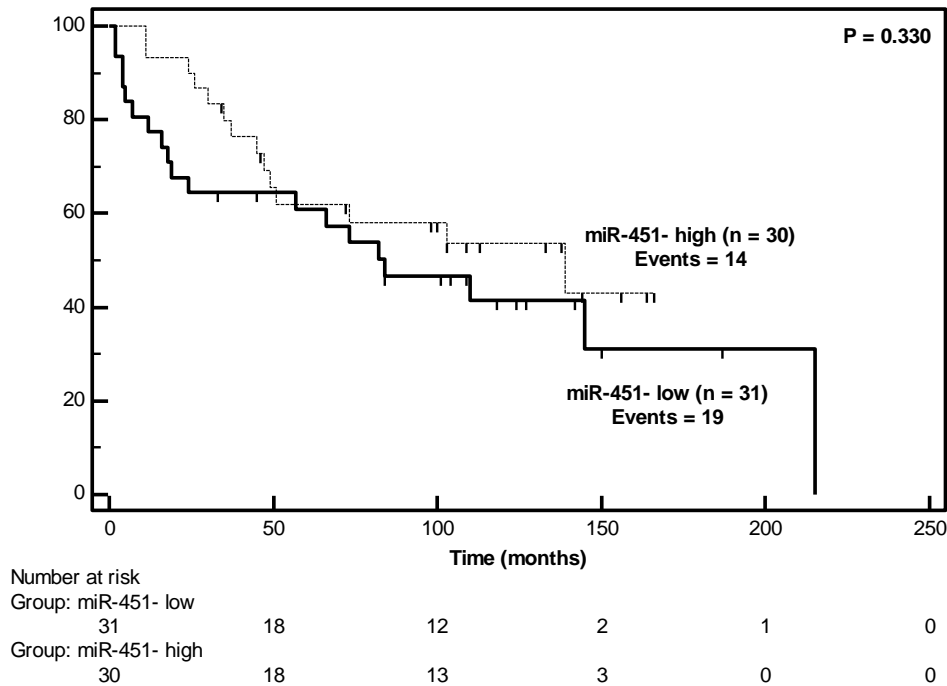
B



C



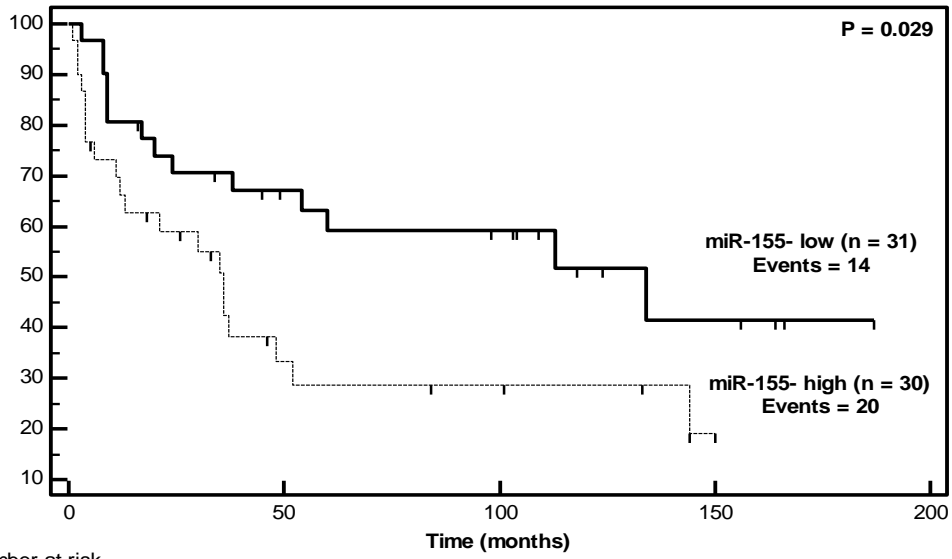
D



Εικόνα 6. Οι καμπύλες Kaplan-Meier ολικής επιβίωσης για την έκφραση των miR-155, miR-21, miR-145 και miR-451 σε ασθενείς με λιποσάρκωμα. Οι P values υπολογίστηκαν με log-rank algorithm.

Το miR-155 ήταν επίσης το μόνο miRNA μόριο της μελέτης που ήταν σε θέση να εξετάσει αποτελεσματικά τους ασθενείς με LPS ανάλογα με τον κίνδυνο υποτροπής της νόσου (τοπική υποτροπή) (Εικόνα 7). Τα άτομα που ανήκουν στην miR-155-υψηλής έκφρασης κατηγορία έδειξαν κατώτερη RFS ($P = 0,029$, σχήμα 7A), με 5-ετή ελεύθερη υποτροπής πιθανότητα μόνο $28,6 \pm 9,3\%$ σε σύγκριση με την αντίστοιχη $59,1 \pm 9,2\%$ πιθανότητα σε miR-155-χαμηλής έκφρασης ασθενείς. Πράγματι, οι ασθενείς με υψηλά επίπεδα miR-155 είχαν 2,11 φορές (95% CI = 1,06 - 4,20) περισσότερες πιθανότητες να παρουσιάσουν τοπική υποτροπή την πάροδο του χρόνου σε σύγκριση με τα miR-155-χαμηλής άτομα ($P = 0,034$).

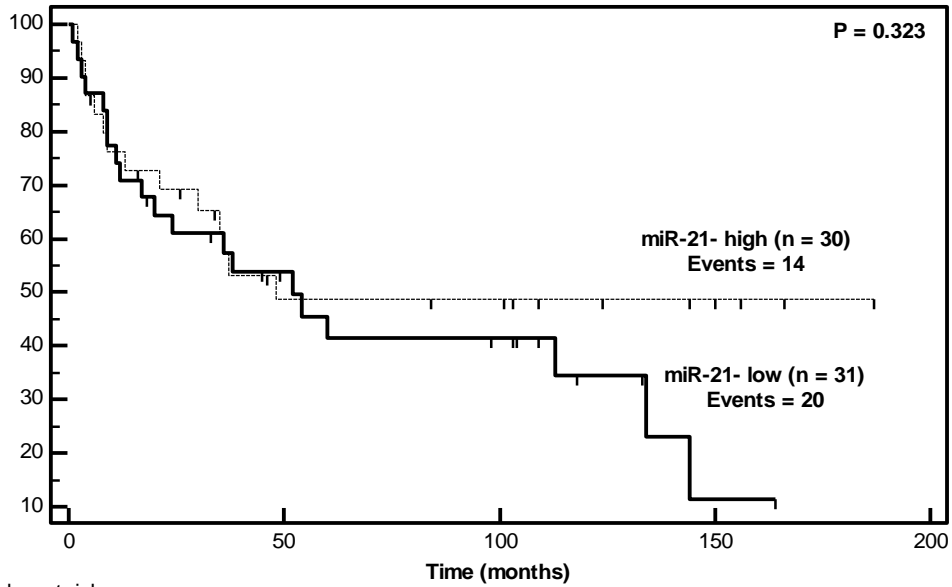
A



Number at risk

Group: miR-155- low	31	17	14	4	0
Group: miR-155- high	30	7	5	0	0

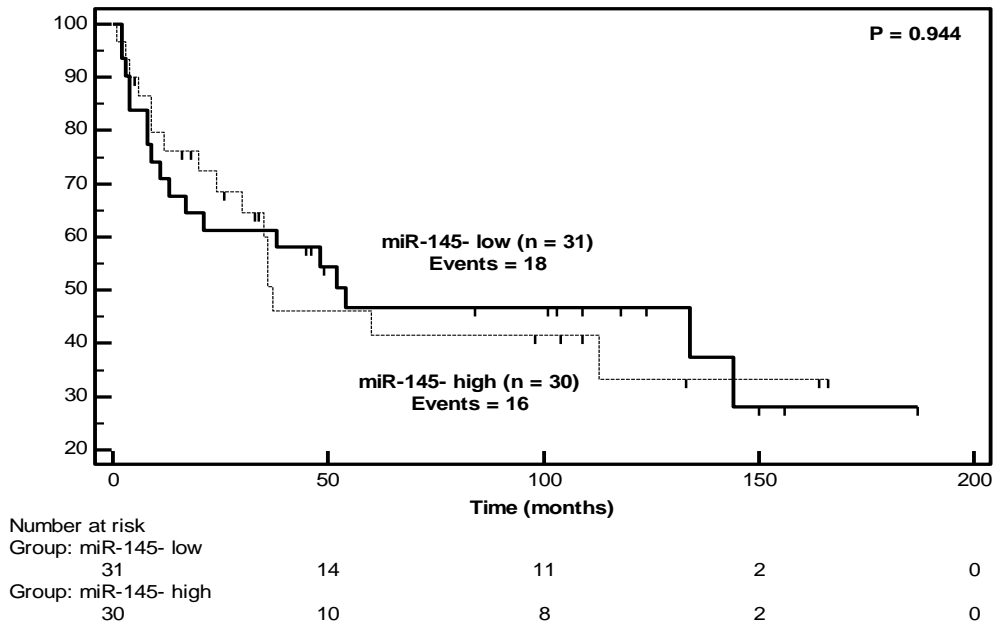
B



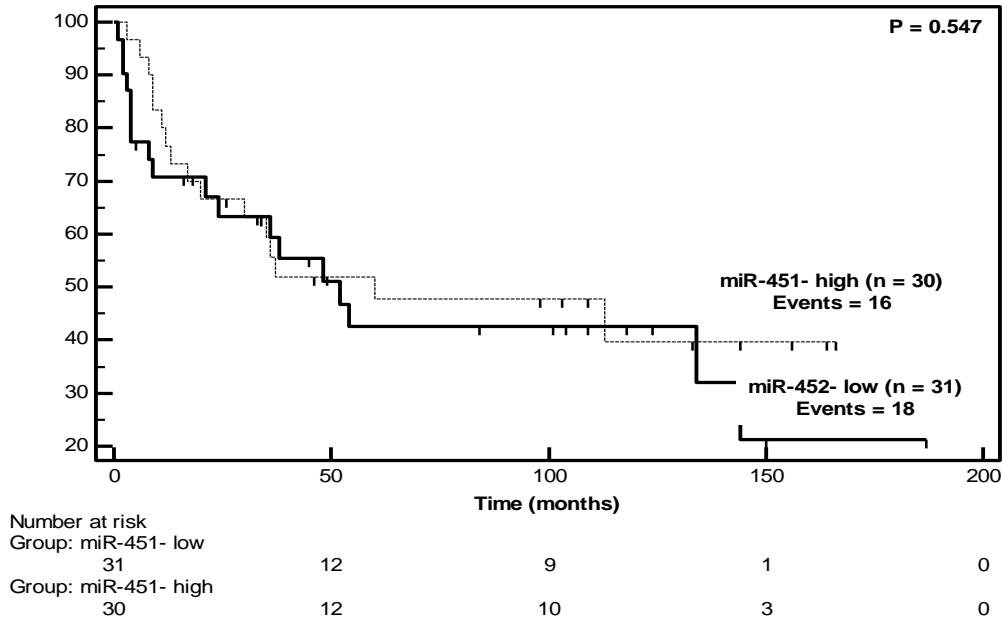
Number at risk

Group: miR-21- low	31	13	9	1	0
Group: miR-21- high	30	11	10	3	0

C



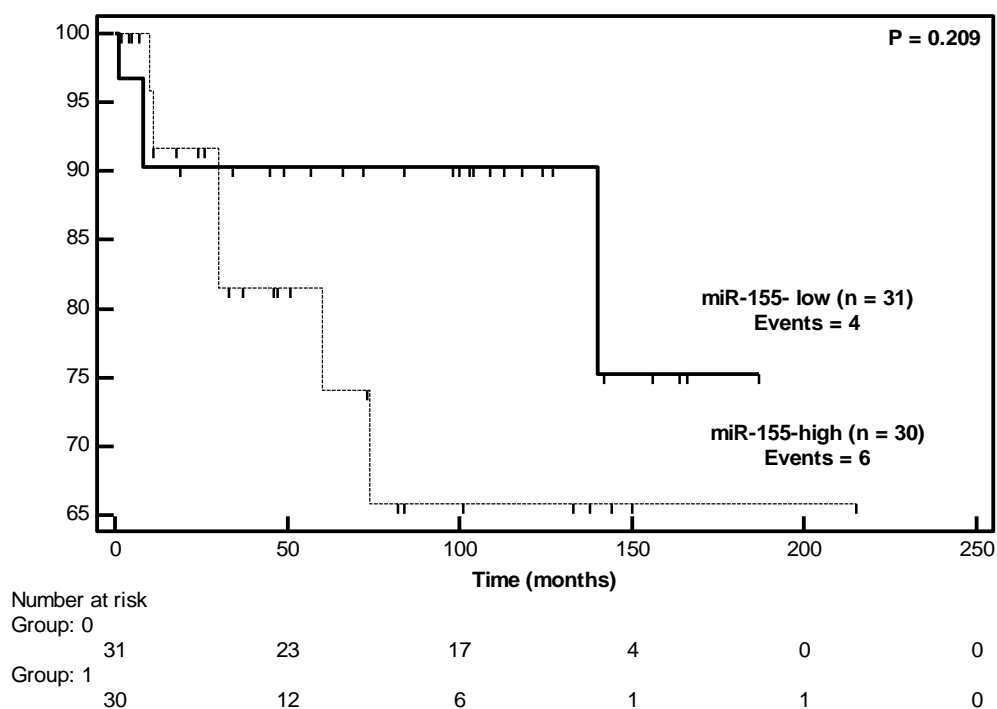
D



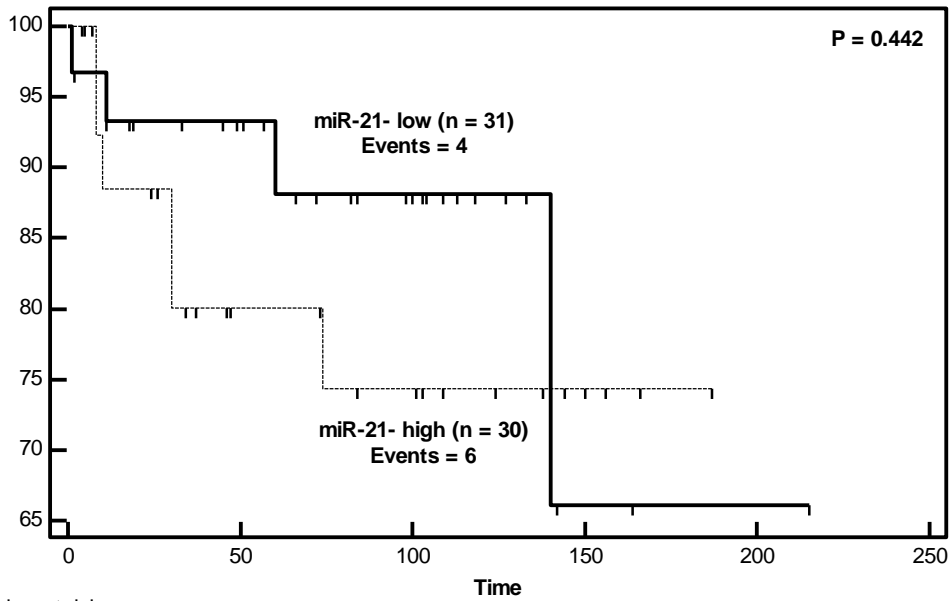
Εικόνα 7. Οι καμπύλες Kaplan-Meier ελεύθερης υποτροπής επιβίωση για την έκφραση των miR-155, miR-21, miR-145 και miR-451 σε ασθενείς με λιποσάρκωμα. Οι P values υπολογίστηκαν με log-rank algorithm.

Αντιθέτως προς την OS και την RFS, κανένα μόριο miRNA δεν σχετιζόταν σθεναρά με PFS. Η miR-155 έκφραση έδειξε μια τάση προς συσχέτιση με μειωμένα διαστήματα PFS, αλλά όχι σε στατιστικά σημαντικό βαθμό ($P = 0,209$, Εικόνα 8Α).

A



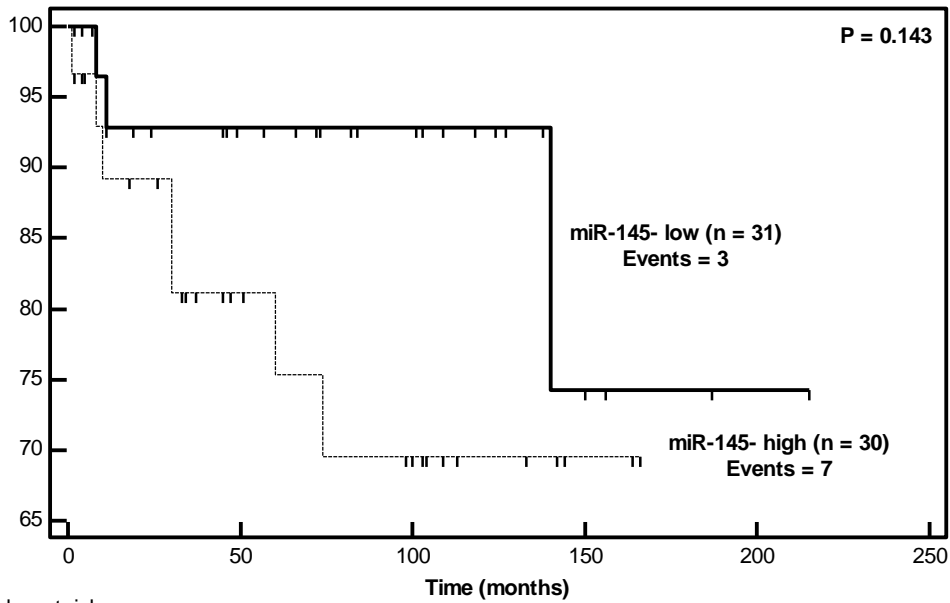
B



Number at risk

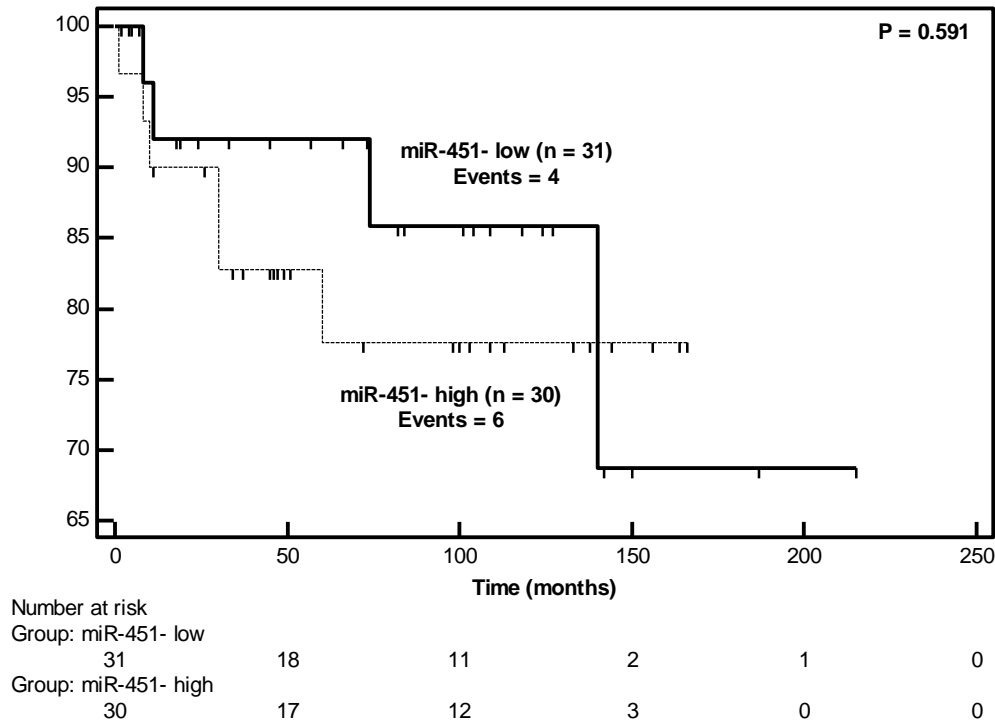
Group: miR-21- low					
31	20	11	2	1	0
Group: miR-21- high					
30	15	12	3	0	0

C



Number at risk

Group: miR-145- low					
31	20	13	3	1	0
Group: miR-145- high					
30	15	10	2	0	0

D

Εικόνα 8. Οι καμπύλες Kaplan-Meier ελεύθερης προόδου νόσου επιβίωσης για την έκφραση των miR-155, miR-21, miR-145 και miR-451 σε ασθενείς με λιποσάρκωμα. Οι P values υπολογίστηκαν με log-rank algorithm.

4.3.5 MiR-155 αντιπροσωπεύει ένα νέο ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα δυσμενούς πρόγνωσης σε LPS

Οι όγκοι βαθμού ιστολογικής κακοήθειας III (HR = 2,29, 95% CI = 1,13 - 4,66, P = 0,022), οι μεγαλύτερου μεγέθους όγκοι (HR = 1,04, 95% CI = 1,00 - 1,08, P = 0,040), όγκοι με οπισθοπεριτοναϊκή εντόπιση (HR = 2.84, 95% CI = 1,26 - 6,41, P = 0,012) και ασθενείς με θετικά χειρουργικά όρια (HR = 3,12, 95% CI = 1,47 - 6,59, P = 0,003) παρουσίασαν σημαντικά χειρότερη πρόγνωση σε σχέση με το αποτέλεσμα της OS (Πίνακας 9). Έτσι, επιβεβαιώνεται η προγνωστική σημασία αυτών των δεικτών σε LPS δείχνοντας την ακρίβεια της δειγματοληψίας και της ταξινόμησης των ομάδων των ασθενών. Κατώτερα RFS διαστήματα θα μπορούσαν να προβλεφθούν πιο αποτελεσματικά από τον οπισθοπεριτοναϊκό εντοπισμό των όγκων LPS (HR = 2,77, 95% CI = 1,28 - 5,97, P = 0,010) και από τα θετικά

χειρουργικά τους όρια (HR = 3,16, 95% CI = 1,51 - 6,60, P = 0,002) (Πίνακας 10). Ήταν επιτακτική ανάγκη να ελεγχθεί η προγνωστική αξία του miR-155 για την ανεξαρτησία της από τους ισχυρούς και ευρέως αποδεκτούς προγνωστικούς παράγοντες. Για το λόγο αυτό, πολυπαραγοντικά μοντέλα παλινδρόμησης κατά Cox εφαρμόστηκαν και διαπιστώθηκε ότι η miR-155 έκφραση διατηρεί την προγνωστική σημασία της για την OS ανεξάρτητα από τους σημερινούς αποδεκτούς προγνωστικούς παράγοντες (Πίνακας 9). Όταν γίνεται προσαρμογή για το βαθμό κακοήθειας, το μέγεθος του όγκου, την εντόπιση του όγκου, την ηλικία και το φύλο, το HR για miR-155- υψηλής έκφρασης άτομα ήταν ίσο με 2,97 (95% CI = 0,23 με 07,17, P = 0,016). Τα αποτελέσματα δεν άλλαξαν κατά τη ρύθμιση με την κατάσταση των χειρουργικών ορίων, αντί της θέσης του όγκου (HR για το miR-155 = 5,18, 95% CI = 1,8 - 14,9, P = 0,002) (Πίνακας 9).

Όσον αφορά την πρόβλεψη του RFS, τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια (Πίνακας 10). Η miR-155 έκφραση επίσης, μπορούσε να προβλέψει χειρότερα διαστήματα ελεύθερη νόσου επιβίωσης (PFS), όταν προσαρμόζεται για το βαθμό κακοήθειας, το μέγεθος του όγκου, τα χειρουργικά όρια, την ηλικία και το φύλο (HR = 2,64, 95% CI = 1,06 - 6,62, P = 0,038), αλλά η στατιστική σημαντικότητα ήταν οριακή για το miR-155 (HR = 2,19, 95% CI = 0,987 έως 4,86, P = 0,054), όταν συμπεριελάμβανε τη θέση του όγκου, αντί των χειρουργικών ορίων στο πολυπαραγοντικό μοντέλο.

Πίνακας 9. Η γραμμική Cox αναλογική ανάλυση κινδύνου της έκφρασης του miR-155 και των κλινικοπαθολογοανατομικών μεταβλητών για την πρόβλεψη της ολικής επιβίωσης.

Covariant	Univariate Analysis			Multivariate Analysis		
	HR	95% CI	P*	HR	95% CI	P*
miR-155- high	2.90	1.39 – 6.03	0.005	2.97 ^a	1.23–7.17 ^a	0.016 ^a
				5.18 ^b	1.80-14.9 ^b	0.002 ^b
Grade III tumors	2.29	1.13–4.66	0.022	1.18 ^a	0.514–2.72 ^a	0.693 ^a
				1.47 ^b	0.546–3.93 ^b	0.448 ^b
Tumor size	1.04	1.00–1.08	0.040	1.04 ^a	0.994–1.09 ^a	0.089 ^a
				1.06 ^b	1.01–1.12 ^b	0.026 ^b
Retroperitoneal Location	2.84	1.26 –6.41	0.012	1.556 ^a	1.01–2.41 ^a	0.047 ^a
Positive surgical margins	3.12	1.47–6.59	0.003	8.91 ^b	3.32–23.92 ^b	<0.001 ^b
Age	1.01	0.987–1.03	0.409	1.01 ^a	0.986–1.037 ^a	0.395 ^a
				1.03 ^b	0.997–1.06 ^b	0.076 ^b
Gender (female)	1.42	0.705–2.86	0.326	0.954 ^a	0.419–2.17 ^a	0.912 ^a
				1.16 ^b	0.491–2.75 ^b	0.733 ^b

*Test for trend

^aMultivariate model adjusted for grade, tumor size, tumor location, age, gender.

^bMultivariate model adjusted for grade, tumor size, surgical margins, age, gender.

HR: Hazard Ratio

CI: Confidence Interval

Πίνακας 10 .Η γραμμική Cox αναλογική ανάλυση κινδύνου της έκφρασης του miR-155 και των κλινικοπαθολογοανατομικών μεταβλητών για την πρόβλεψη της ελεύθερης υποτροπής επιβίωσης.

Covariant	Univariate Analysis			Multivariate Analysis		
	HR	95% CI	P*	HR	95% CI	P*
miR-155- high	2.11	1.06–4.20	0.034	2.19 ^a	0.987–4.86 ^a	0.054 ^a
				2.64 ^b	1.06–6.62 ^b	0.038 ^b
Grade III tumors	1.93	0.976–3.81	0.059	1.41 ^a	0.651–3.06 ^a	0.383 ^a
				1.99 ^b	0.765–5.18 ^b	0.159 ^b
Tumor size	1.03	0.993–1.071	0.110	1.02 ^a	0.972–1.07 ^a	0.420 ^a
				1.04 ^b	0.988–1.09 ^b	0.147 ^b
Retroperitoneal Location	2.77	1.28–5.97	0.010	2.60 ^a	1.09–6.19 ^a	0.032 ^a
Positive surgical margins	3.16	1.51–6.60	0.002	7.39 ^b	2.78–19.6 ^b	<0.001 ^b
Age	1.01	0.992–1.04	0.204	1.01 ^a	0.987–1.036 ^a	0.379 ^a
				1.03 ^b	0.998–1.05 ^b	0.065 ^b
Gender (female)	0.697	0.339–1.43	0.326	0.954 ^a	0.198–1.09 ^a	0.076 ^a
				0.530 ^b	0.217–1.29 ^b	0.163 ^b

Test for trend

^aMultivariate model adjusted for grade, tumor size, tumor location, age, gender.

^bMultivariate model adjusted for grade, tumor size, surgical margins, age, gender.

HR: Hazard Ratio

CI: Confidence Interval

4.4 Συμπεράσματα

Δύο από τους βασικούς παράγοντες που έχουν παρεμποδίσει την ανάπτυξη αποτελεσματικής αντιμετώπισης των LPS είναι ο χαμηλός επιπολασμός της νόσου και η ποικιλία των μοριακών χαρακτηριστικών σε κάθε υπότυπο του [477]. Χαμηλός επιπολασμός γενικά μεταφράζεται σε λιγότερη χρηματοδότηση για έρευνα [485], καθώς και στην έλλειψη επαρκών και πλήρως χαρακτηρισμένων σειρών δειγμάτων σε ένα συγκεκριμένο ερευνητικό χώρο. Η ετερογένεια των υποκείμενων μοριακών μηχανισμών που οδηγούν στην λιποσαρκωματογένεση και την προώθηση της ανάπτυξης και της εξέλιξης του όγκου οδηγεί σε απρόβλεπτες ανταποκρίσεις στη θεραπεία και στην εξέλιξη της νόσου. Ως αποτέλεσμα, ο ιστολογικός βαθμός κακοήθειας, και ένα περισσότερο ή λιγότερο από άλλα κλινικομορφολογικά χαρακτηριστικά, παραμένουν οι πιο σημαντικοί προγνωστικοί παράγοντες για την πρόγνωση των LPS. Ακόμα, τα άτομα με διαφορετικά παθολογοανατομικά και βιολογικά χαρακτηριστικά εσφαλμένα κατηγοριοποιούνται στην ίδια προγνωστική ομάδα και ακολουθείται για όλα η ίδια οδηγία θεραπευτικής στρατηγικής [478, 480, 482].

Στην παρούσα μελέτη, σκοπεύουμε να ξεπεραστούν αυτές οι δυσκολίες, χρησιμοποιώντας ένα μοναδικό σύνολο δειγμάτων FFPE ιστού LPS [514] και εκμεταλλευόμαστε τον κεντρικό ρόλο ορισμένων miRNAs στα χαρακτηριστικά του κακοήθους μετασχηματισμού και στην εξέλιξη των LPS, προκειμένου να μεταφράσουν τις προηγουμένως αναφερόμενες ογκοκατασταλτικές/ογκογεννητικές ιδιότητες [494, 176, 183, 181], σε νέους και αξιόπιστους προγνωστικούς μοριακούς βιοδείκτες.

Εδώ δείχνουμε ότι τα miR-143, miR-145 και miR-451, μόρια με ιδιότητες καταστολέων όγκου σε LPS [494, 183, 181], είναι σαφώς μειωμένα σε LPS σε σύγκριση με δείγματα ιστού LPM [Εικόνα 2], που πιστοποιεί τα αποτελέσματα σε προηγούμενες δημοσιευμένες μελέτες [494, 185, 183, 181, 180]. Πράγματι, έχει δειχθεί ότι η miR-143 έκφραση αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό, προάγει την απόπτωση και την κυτταροκίνηση των αποδιαφοροποιημένων κυττάρων λιποσάρκωματος

μειώνοντας την BCL2, TOP2A, PRC1 και PLK1 έκφραση [181], και ότι το miR-145 και miR-451 μπορεί επίσης να μειώσει τον ρυθμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού, προκαλεί απόπτωση και εξασθενεί την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου [183]. Παρά τις ογκοκατασταλτικές ιδιότητές τους κανένα από αυτά τα μόρια δεν ήταν σε θέση να προβλέψει την πορεία της νόσου των ασθενών με LPS σε βάσει ούτε την OS, RFS, ούτε την PFS στη μελέτη μας [Εικόνα 6 και Εικόνα 7] και ως εκ τούτου δεν μπορούν να θεωρηθούν ως προγνωστικοί βιοδείκτες για το LPS. Από την άλλη πλευρά, το miR-21 και miR-155 δύο miRNAs που έχουν επανειλημμένα αναφερθεί ως απορυθμισμένα σε LPS [494-176, 180] βρέθηκαν επίσης σθεναρά σε αυξημένη ρυθμίση στη μελέτη μας και θα μπορούσαν διακρίνουν αποτελεσματικά δείγματα LPS και LPM με υψηλή ειδικότητα και ευαισθησία [εικόνα 4]. Τα miR-155 και miR-21 παρουσίασαν επίσης ένα ξεχωριστό πρότυπο έκφρασης μεταξύ των διαφόρων υποτύπων LPS [Εικόνα 5]. Πιο συγκεκριμένα, το miR-21 παρουσίασε χαμηλότερα επίπεδα σε καλά διαφοροποιημένα σε σχέση με τους άλλους ιστολογικούς υποτύπους (αποδιαφοροποιημένα, μυξοειδή/στρογγυλοκυτταρικά και πλειόμορφους όγκους). Αυξημένα miR-21 επίπεδα στον υπότυπο των αποδιαφοροποιημένων έχουν επίσης αναφερθεί στο παρελθόν [183]. Τα miR-155 επίπεδα επίσης ρυθμίζονται αυξημένα στο αποδιαφοροποιημένο σε σύγκριση με το μυξοειδές /στρογγυλοκυτταρικό και πλειόμορφο υπότυπο [εικόνα 5] και επίσης βρέθηκε να υπερεκφράζονται σε υψηλότερου βαθμού κακοήθειας όγκους. Η συσχέτιση του miR-155 με LPS υψηλού βαθμού κακοήθειας όγκους έχει επίσης παρατηρηθεί από τον Vincenziet et al [177] όπως επίσης και τα επίπεδα του κυκλοφορούν miR-155 στον ορό από τον Boro A et al [178].

Το πιο σημαντικό είναι ότι, η miR-155 έκφραση βρέθηκε να σχετίζεται θετικά με δυσμενή ογκολογική έκβαση από την άποψη της OS ($P = 0,003$, Εικόνα 6A) και της πορείας της RFS ($P = 0,029$, Εικόνα 7A). Σύμφωνα με την πολυπαραγοντική ανάλυση, το miR-155 μπορεί να παρέχει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες ($HR = 2,97$, $95\% CI = 1.23 - 7.17$, $P = 0,016$), ανεξάρτητα από τους χρησιμοποιούμενους σήμερα προγνωστικούς δείκτες, όπως είναι ο βαθμός κακοήθειας του όγκου, τα χειρουργικά όρια, το μέγεθος του όγκου και η θέση του όγκου. Αυτό ισχύει τόσο για την OS [Πίνακας 9] όσο και την RFS [Πίνακας 10]. Αυτά τα αποτελέσματα είναι σε άμεση συμφωνία με μελέτες που

εμπλέκουν το miR-155 σε μηχανισμούς εξέλιξης των LPS [177,176]. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη των Zhang P et al δείχνει ότι miR-155 συνδέεται με την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων σε LPS και σχηματισμό αποικιών *in vitro* και καταστολή της έκφρασης του επάγει την G1-S διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Αποκλεισμός της έκφρασης του miR-155 σε ξενομοσχεύματα ποντικών *in vivo*, έχει ως αποτέλεσμα σημαντικά πιο αργή ανάπτυξη και μείωση του μεγέθους των όγκων. Είναι , γνωστό ωστόσο, ότι οι ογκογεννητικές λειτουργίες του miR-155 λαμβάνουν χώρα μέσω της κινάσης της κασεΐνης 1α (CK1a), η οποία είναι ένας άμεσος στόχος του miR-155. Μια επίδραση της CK1a στόχευσης από το miR-155, είναι η αυξημένη b-catenin /κυκλίνης D1 έκφραση που τελικά προάγει τον πολλαπλασιασμό και την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου στα LPS και πιθανά και η αυξημένη b-catenin/e-cadherin έκφραση [176]. Το miR-155 έχει επίσης συσχετισθεί με πτωχή πρόγνωση και ενεργοποιείται ως ογκογενές miRNA σε αρκετές ευρέως φάσματος ανθρώπινες κακοήθειες [515, 516], συμπεριλαμβανομένου τον καρκίνου του μαστού [517], τον καρκίνο του πνεύμονα [498], τον ορθοκολικό καρκίνο [497] και τον καρκίνο του παγκρέατος [496] .

Το μόνο miRNA που έχει αποδειχθεί, μέχρι τώρα, να έχει προγνωστική αξία για τα LPS ήταν το miR-26a-2 [493]. Η miR-26-a-2 έκφραση στοχεύει το HOXA5 σε κύτταρα LPS και έχει ως αποτέλεσμα την αντίσταση στον αποπτωτικό θάνατο μέσω ενός p53-ανεξάρτητου μηχανισμού, ενώ ταυτόχρονα έχει επίσης παρατηρηθεί συσχέτιση μεταξύ miR-26-a-2 και επιβίωσης ασθενών με LPS [493,182]. Ένα άλλο miRNA που θα μπορούσε να αξιολογηθεί για την δυνατότητα του ως βιοδείκτης στα LPS σε μια μελλοντική μελέτη είναι το miR-486, το οποίο συνδέεται με την ογκογένεση στο LPS ,στοχεύοντας τον αναστολέα -1 του ενεργοποιητή του πλασμινογόνου (PAI-1) [170]. Πράγματι, ένα άλλο πλεονέκτημα της μελέτης μας, που διευκολύνει περαιτέρω μελέτες έκφρασης σε LPS ,είναι η ταυτοποίηση για πρώτη φορά των κατάλληλων miRNAs αναφοράς για σκοπούς κανονικοποίησης. Με τον έλεγχο αρκετών υποψήφιων κανονικοποιητών , καταλήξαμε με τη χρήση των geNorm και NormFinder αλγορίθμων [500,501,502] ότι ο συνδυασμός του miR-103 και miR-191 είναι ο πλέον κατάλληλος για την κανονικοποίηση της έκφρασης miRNA στα LPS. Σε μια κεντρική πρόσφατη μελέτη που χρησιμοποίησε λιπώδεις ιστούς, συμπεριλαμβανομένων λιπώματων και φυσιολογικών παρακείμενων

λιπώδων ιστών, το miR-103 ταυτοποιήθηκε με geNorm και NormFinder ως το πιο σταθερό προϊόν μετεγγραφής miRNA σε όλα τις βιολογικά υλικά [518], η οποία είναι σε λεπτή συμφωνία με τα αποτελέσματα μας. Επιπλέον, τα miR-191 και miR-103 έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως κανονικοποιητές σε μελέτες έκφρασης των miRNAs που σχετίζονται με τον καρκίνο [502, 503, 519-524].

Στην παρούσα μελέτη δείξαμε ότι το miR-155 αντιπροσωπεύει ένα νέο, ισχυρό και ανεξάρτητο προγνωστικό παράγοντα δυσμενούς πρόγνωσης για ασθενείς με LPS. Το miR-155 μπορεί να βοηθήσει προς την κατεύθυνση της διαστρωμάτωσης των ασθενών με LPS, όσον αφορά την αναμενόμενη συνολική και ελεύθερη υποτροπής επιβίωση, και τον εντοπισμό εκείνων που θα μπορούσαν να επωφεληθούν από την επικουρική ή ακόμα εισαγωγική θεραπεία, δεδομένου ότι το miR-155 θα μπορούσε να αξιολογηθεί προεγχειρητικά σε σχετικά δείγματα βιοψίας. Η προηγούμενη αναφορά στον ογκογόνο ρόλο του miR-155, σε συνδυασμό με τα ευρήματά μας χαρακτηρίζει επίσης αυτό το miRNA ως δυνητικό θεραπευτικό στόχο για τα LPS. Θα πρέπει να τονιστεί εδώ ότι τα αποτελέσματα της μελέτης μας απαιτούν πολυκεντρική εξωτερική επικύρωση και σε βάθος προοπτικές αναλύσεις, προκειμένου να επιβεβαιώσουν σθεναρά την προγνωστική σημασία του miR-155 στο LPS.

5.ΣΥΝΟΨΗ

Η ανάλυση των επιπέδων έκφρασης του miR-155 κατά τη στιγμή της διάγνωσης θα μπορούσε να παρέχει σημαντικές προγνωστικές πληροφορίες για τους ασθενείς με LPS, ανεξάρτητα από τους σημερινούς χρησιμοποιούμενους δείκτες. Μετά από προσεκτική ευρύτερη επιβεβαίωση, το miR-155 και όταν η τεχνολογία των microRNA αποσιώπησης θα προχωρήσει [525] θα μπορούσε να αποτελέσει τη βάση μιας εξατομικευμένης και άρα πιο βελτιστοποιημένη στρατηγική θεραπείας για ασθενείς που πάσχουν από LPS.

6. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα microRnas αποτελούν μικρά μη κωδικοποιητικά (non-coding) μόρια RNA έως 22 νουκλεοτιδία οποία παρεμβαίνουν ρυθμίζοντας μετα-μεταγραφικά την έκφραση των γονιδίων. Τα miRnas συνδέονται με την 3-UTR του mRNA γονιδίου στόχου, καταστέλλοντας την μεταφρασή του, αποσιωπώντας την έκφραση της πρωτεΐνης και με αυτό τον τρόπο ρυθμίζουν βασικές κυτταρικές λειτουργίες όπως την απόπτωση, τον κυτταρικό κύκλο, την κυτταρική αναπνοή, την διαφοροποίηση, την κυτταρική επικοινωνία, τις οδούς σηματοδότησης, την αυτοφαγία κ.τ.λ. Τα miRnas απορυθμιζόμενα, εμπλέκονται με αυτό τον τρόπο, έχοντας σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και εξέλιξη πολλών ασθενειών συμπεριλαμβανομένου και του καρκίνου, γιαυτό εξετάζονται ως βιοδείκτες, διαγνωστικά μόρια αλλά και ως θεραπευτικοί στόχοι. Στα σαρκώματα μαλακών μορίων, μια σπάνια ετερογενής ομάδα μεσεκχυματογενούς προέλευσης όγκων, οι δημοσιεύσεις που αφορούν την εμπλοκή των microRnas στους μηχανισμούς της καρκινογένεσης και εξέλιξης των όγκων αυτών είναι σχετικά λίγες εν συγκρίση με τις μελέτες που αφορούν τα microRnas στους επιθηλιακούς όγκους. Στην παρούσα έρευνα εξετάστηκαν οι περισσότερες δημοσιευμένες μελέτες που αφορούν την δράση των microRnas στα πιο συχνά σαρκώματα τόσο σε επίπεδο κυττάρων, κυτταρικών σειρών, όσο και ιστών καθώς και in vivo. Στις δημοσιεύσεις της ανασκόπησης που κάναμε φάνηκε ότι τα mir-155, mir-143, mir-145, mir-451, mir-21 παρουσίασαν δράση στοχεύοντας συγκεκριμένους μοριακούς παράγοντες στα λιποσαρκώματα, όπως και σε άλλους υποτύπους σαρκωμάτων, επηρεάζοντας το μετασταστικό δυναμικό, την διαφοροποίηση, την απόπτωση αλλά και άλλες βασικές κυτταρικές διαδικασίες καθιστώντας τα υποψήφια για τη μελέτη μας. Επίσης σε κάποιες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν στην διαφορική διάγνωση μεταξύ των υποτύπων των λιποσαρκωμάτων, στην διαφορική διάγνωση με άλλα σαρκώματα ή και για τον διαχωρισμό του λιπώδους ιστού από το λιποσάρκωμα. Σε καμία όμως από τις προηγηθείσες μελέτες δεν συσχετίστηκε η έκφραση αυτών των miRnas στα λιποσαρκώματα με την πρόγνωση των ασθενών όπως και με την επιβίωση αυτών. Έχοντας ένα σύνολο 62 λιποσαρκωμάτων

και 21 λιπωμάτων πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός της έκφρασης των 5 αυτών miRnas με την μέθοδο της αντίστροφης μεταγραφής και real time – ποσοτικής αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, βασισμένη σε σχετική ποσοτικοποίηση βάσει εύρεσης συγκεκριμένων σταθερών γονιδίων αναφοράς (mir-103 και mir-191) χρησιμοποιώντας δυο αλγόριθμους .Τα αποτελέσματα των πειραμάτων ανέδειξαν την ικανότητα των miRnas στην διαφορική διάγνωση μεταξύ των λιπωμάτων και των λιποσαρκωμάτων, την διαφορετική έκφραση τους ηψηλής κακοήθειας όγκους ,και στις μεγαλύτερες ηλικίες ασθενών καθώς και μεταξύ των διαφόρων υποτύπων λιποσαρκωμάτων. Η συμφωνία της παρούσας έρευνας με προηγούμενες έρευνες σε αυτά τα αποτελέσματα καταδεικνύει, την εγκυρότητα του δείγματος καθώς και την ορθότητα της πειραματικής διαδικασίας. Όσον αφορά την έκβαση της πρόγνωσης των ασθενών βάσει των επιπέδων έκφρασης των εξεταζόμενων miRnas, απο την στατιστική ανάλυση διαπιστώθηκε ότι το mir-155 αποτελεί εναν ανέξαρτητο προγνωστικό παράγοντα κακής πρόγνωσης της ολικής επιβίωσης των ασθενών όπως επιβεβαιώθηκε απο την πολυπαραγοντική ανάλυση των δεδομένων. Μια πιθανή εξήγηση της κακής πρόγνωσης της επιβίωσης των mir-155 high ασθενών ,αποτελεί το μοριακό υπόβαθρο της καταστολής της έκφρασης της casein kinase-α απο το mir-155 και η αύξησης της ρύθμισης της b-catenin/cyclin D1 που προσδίδει η αύξηση της b-catenin σηματοδότησης όπως και ενεργοποίησή της ως σύμπλοκο μαζί με την E-cadherin με την ιδιότητα προσκολλητικού μορίου στην κυτταρική μεμβράνη. Η υπόθεση αυτή αναμένεται να εξετασθεί σε μελλοντική έρευνα .

ABSTRACT

MicroRNAs are small non-coding RNA molecules (about 22 nucleotides) which interfere in post-transcriptional regulation and gene expression. MicroRNAs function in RNA silencing, targeting to the 3'-UTR mRNA site of genes, by suppressing their translation, inhibit protein expression and thereby regulate fundamental cellular functions as apoptosis, cell cycle, cellular respiration, differentiation, cell to cell communication, signaling pathways, autophagy etc. MicroRNAs been deregulated, are involved having important roles in the onset and progression of many diseases including cancer, so are considered biomarkers, diagnostic molecules, as well as therapeutic targets. Soft tissue sarcomas, are rare heterogeneous groups tumors of mesenchymal origin, and publications related to the involvement of microRNAs in mechanisms of carcinogenicity and progression of these tumors are relatively few compared with studies concerning microRNAs in epithelial tumors. In the present study we reviewed most published studies as concern microRNAs implication in the most frequent sarcomas, in cells, cell lines and tissues specimens as well as publications for vivo studies. In our review we conclude that mir-155, mir-143, mir-145, mir-451, mir-21 showed crucial influence at specific molecular processes in liposarcomas development, as well as in other subtypes of sarcomas, affecting the metastatic potential, differentiation, apoptosis and other essential cellular functions suggesting candidates molecules for investigation in our study. More over, in some other studies were used for the differential diagnosis between the subtypes of liposarcoma, between liposarcomas with other sarcomas, or for discrimination liposarcomas from adipose tissue or lipomas. In no one of the preceding studies expression of these miRNAs in liposarcomas were correlated with prognosis and more important with survival. Having available a total of 62 liposarcomas and 21 lipomas tissue specimens the expression levels of these 5 miRNAs were determined by the method reverse transcription- real time /quantitative polymerase chain reaction (qPCR) with relative quantification based on detection of specific stable reference genes (mir-103 and mir-191) using two algorithms for normalization. The results of the experiments

demonstrated the ability of these mirnas in differential diagnosis between lipomas and liposarcomas, and also a different expression pattern of mirRNAs for high grade tumors ,in older patients and between different subtypes of liposarcoma. The agreement of this research with previous studies in these results demonstrate the validity of the samples and the accuracy of the experimental procedure. Prognosis for patients based on expression levels of miRNAs, as results from the statistical analysis, revealed that mir -155 is an independent predictor of poor prognosis in terms of overall survival as confirmed by multivariate analysis. A possible explanation for the poor prognosis of survival in mir-155 high patients, is the molecular basis of suppression in casein kinase-a expression by mir-155 ,the increase in b-catenin signaling and b-catenin/cyclin D1 expression , and activation of E-cadherin/b-catenin complex as well as the increase in adhesion capacity in cellular membrane via this molecule.This case will be considered for future research.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Miller RW, Young JL Jr, Novakovic B. Childhood cancer. *Cancer* 1995; 75:395.
2. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F. World Health Organization Classification of tumours of soft tissue and bone, 4th, IARC Press, Lyon 2013.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin* 2016; 66:7.
4. Dei Tos AP. Liposarcoma: new entities and evolving concepts. *Ann Diagn Pathol.* 2000 Aug;4(4):252-66.
5. Wibmer C, Leithner A, Zielonke N, Sperl M, Windhager R. Increasing incidence rates of soft tissue sarcomas? A population-based epidemiologic study and literature review. *Ann Oncol.* 2010 May;21(5):1106-11.
6. Gerry D, Fox NF, Spruill LS, Lentsch EJ. Liposarcoma of the head and neck: analysis of 318 cases with comparison to non-head and neck sites. *Head Neck.* 2014 Mar;36(3):393-400. doi:10.1002/hed.23311. Epub 2013 Jun 1.
7. Vocks E, Worret WI, Burgdorf WH. Myxoid liposarcoma in a 12-year-old girl. *Pediatr Dermatol.* 2000 Mar-Apr;17(2):129-32.
8. Jo VY, Fletcher CD. WHO classification of soft tissue tumours: an update based on the 2013 (4th) edition. *Pathology.* 2014 Feb;46(2):95-104.
9. Binh MB, Sastre-Garau X, Guillou L, et al. MDM2 and CDK4 immunostainings are useful adjuncts in diagnosing well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma subtypes: a comparative analysis of 559 soft tissue neoplasms with genetic data. *Am J Surg Pathol.* 2005 Oct. 29(10):1340-7.
10. Skubitz KM, Cheng EY, Clohisy DR, Thompson RC, Skubitz AP. Differential gene expression in liposarcoma, lipoma, and adipose tissue. *Cancer Invest.* 2005. 23(2):105-18.
11. Tayal S, Classen E, Bemis L, Robinson WA. C-kit expression in dedifferentiated and well-differentiated liposarcomas;

immunohistochemistry and genetic analysis. *Anticancer Res.* 2005 May-Jun. 25(3B):2215-20.

12. Hoda SA, Cheng E, Fisher C, Montgomery E, Thway K. Biopsy Interpretation of Soft Tissue Tumors. 2nd ed. *Am J Clin Pathol.* 2016 Feb;145(2):286.

13. McKee PH, Lowe D, Shaw M. Subcutaneous liposarcoma. *Clin Exp Dermatol.* 1983 Nov;8(6):593-602.

14. Italiano A, Di Mauro I, Rapp J, et al. Clinical effect of molecular methods in sarcoma diagnosis (GENSARC): a prospective, multicentre, observational study. *Lancet Oncol* 2016; 17:532.

15. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F. World Health Organization Classification of tumours of soft tissue and bone, 4th, IARC Press,

16. Conyers R, Young S, Thomas DM. Liposarcoma: molecular genetics and therapeutics. *Sarcoma* 2011; 2011:483154.

17. Ghadimi MP, Liu P, Peng T, et al. Pleomorphic liposarcoma: clinical observations and molecular variables. *Cancer* 2011; 117:5359.

18. Dei Tos AP, Pedetour F. Atypical lipomatous tumour. In: WHO Classification of tumours of soft tissue and bone, 4th, Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F. (Eds), IARC, Lyon 2013. p.33.

19. Italiano A, Bianchini L, Gjernes E, et al. Clinical and biological significance of CDK4 amplification in well-differentiated and dedifferentiated liposarcomas. *Clin Cancer Res* 2009; 15:5696

20. Fletcher CDM, Bridge JA, Hogendoorn PCW, Mertens F. World Health Organization Classification of tumours of soft tissue and bone, 4th, IARC Press, Lyon 2013

21. Deyrup AT, Weiss SW. Grading of soft tissue sarcomas: the challenge of providing precise information in an imprecise world. *Histopathology* 2006; 48:42.

22. Rubin BP, Fletcher CD, Inwards C, et al. Protocol for the examination of specimens from patients with soft tissue tumors of intermediate malignant potential, malignant soft tissue tumors, and benign/locally aggressive and malignant bone tumors. *Arch Pathol Lab Med* 2006; 130:1616.

23. Guillou L, Coindre JM, Bonichon F, et al. Comparative study of the National Cancer Institute and French Federation of Cancer Centers

Sarcoma Group grading systems in a population of 410 adult patients with soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol* 1997; 15:350.

24. Stucky CC, Johnson KN, Gray RJ, et al. Malignant peripheral nerve sheath tumors (MPNST): the Mayo Clinic experience. *Ann Surg Oncol* 2012; 19:878.

25. Olsson H. An updated review of the epidemiology of soft tissue sarcoma. *Acta Orthop Scand Suppl.* 2004 Apr;75(311):16-20.

26. Slominski A, Wortsman J, Carlson A et al. Molecular pathology of soft tissue and bone tumors. A review. *Arch Pathol Lab Med.* 1999 Dec;123(12):1246-59.

27. Kleinerman RA, Tucker MA, Abramson DH, et al. Risk of soft tissue sarcomas by individual subtype in survivors of hereditary retinoblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Jan 3;99(1):24-31.

28. Eriksson M, Hardell L, Adami HO. Exposure to dioxins as a risk factor for soft tissue sarcoma: a population-based case-control study. *J Natl Cancer Inst.* 1990 Mar 21;82(6):486-90.

29. Olsson H. A review of the epidemiology of soft tissue sarcoma. *Acta Orthop Scand Suppl.* 1999 Jun;285:8-10.

30. Enzinger F, Weiss SW. *Soft tissue tumors.* St. Louis, MO, Mosby; 1995.

31. Lawrence W Jr, Donegan WL, Natarajan N, et al. Adult soft tissue sarcomas. A pattern of care survey of the American College of Surgeons. *Ann Surg* 1987; 205:349.

32. Baratti D, Pennacchioli E, Casali PG, et al. Epithelioid sarcoma: prognostic factors and survival in a series of patients treated at a single institution. *Ann Surg Oncol* 2007; 14:3542.

33. Levy A, Le Péchoux C, Terrier P, et al. Epithelioid sarcoma: need for a multimodal approach to maximize the chances of curative conservative treatment. *Ann Surg Oncol* 2014; 21:269.

34. Christie-Large M, James SL, Tiessen L, et al. Imaging strategy for detecting lung metastases at presentation in patients with soft tissue sarcomas. *Eur J Cancer* 2008; 44:1841.

35. Riad S, Griffin AM, Liberman B, et al. Lymph node metastasis in soft tissue sarcoma in an extremity. *Clin Orthop Relat Res* 2004; :129.

36. Johannesmeyer D, Smith V, Cole DJ, et al. The impact of lymph node disease in extremity soft-tissue sarcomas: a population-based analysis. *Am J Surg* 2013; 206:289.

37. Weitz J, Antonescu CR, Brennan MF. Localized extremity soft tissue sarcoma: improved knowledge with unchanged survival over time. *J Clin Oncol* 2003; 21:2719.
38. Billingsley KG, Lewis JJ, Leung DH, et al. Multifactorial analysis of the survival of patients with distant metastasis arising from primary extremity sarcoma. *Cancer* 1999; 85:389.
39. Vezeridis MP, Moore R, Karakousis CP et al. Metastatic patterns in soft-tissue sarcomas. *Arch Surg* 1983; 118:915.
40. Potter DA, Glenn J, Kinsella T, et al. Patterns of recurrence in patients with high-grade soft-tissue sarcomas. *J Clin Oncol* 1985; 3:353.
41. Ryzewicz M, McLoughlin HA, Freudenberger C, et al. Unusual metastases from extremity soft tissue sarcomas. *Orthopedics* 2008; 31:439.
42. Wang WL, Bones-Valentin RA, Prieto VG, et al. Sarcoma metastases to the skin: a clinicopathologic study of 65 patients. *Cancer* 2012; 118:2900.
43. Schwab JH, Boland P, Guo T, et al. Skeletal metastases in myxoid liposarcoma: an unusual pattern of distant spread. *Ann Surg Oncol* 2007; 14:1507.
44. Moreau LC, Turcotte R, Ferguson P, et al. Myxoid\round cell liposarcoma (MRCLS) revisited: an analysis of 418 primarily managed cases. *Ann Surg Oncol* 2012; 19:1081.
45. Sinha S, Peach AH. Diagnosis and management of soft tissue sarcoma. *BMJ* 2010; 341:c7170.
46. Hussein R, Smith MA. Soft tissue sarcomas: are current referral guidelines sufficient? *Ann R Coll Surg Engl* 2005; 87:171.
47. Noria S, Davis A, Kandel R, et al. Residual disease following unplanned excision of soft-tissue sarcoma of an extremity. *J Bone Joint Surg Am* 1996; 78:650.
48. Rehders A, Stoecklein NH, Poremba C, et al. Reexcision of soft tissue sarcoma: sufficient local control but increased rate of metastasis. *World J Surg* 2009; 33:2599.
49. Bhanu AA, Beard JA, Grimer RJ. Should Soft Tissue Sarcomas be Treated at a Specialist Centre? *Sarcoma* 2004; 8:1.
50. Sundaram M, McGuire MH, Herbold DR. Magnetic resonance imaging of soft tissue masses: an evaluation of fifty-three histologically proven tumors. *Magn Reson Imaging* 1988; 6:237.

51. Demas BE, Heelan RT, Lane J, et al. Soft-tissue sarcomas of the extremities: comparison of MR and CT in determining the extent of disease. *AJR Am J Roentgenol* 1988; 150:615.
52. Panicek DM, Gatsonis C, Rosenthal DI, et al. CT and MR imaging in the local staging of primary malignant musculoskeletal neoplasms: Report of the Radiology Diagnostic Oncology Group. *Radiology* 1997; 202:237.
53. Bastiaannet E, Groen H, Jager PL, et al. The value of FDG-PET in the detection, grading and response to therapy of soft tissue and bone sarcomas; a systematic review and meta-analysis. *Cancer Treat Rev* 2004; 30:83.
54. Lucas JD, O'Doherty MJ, Cronin BF, et al. Prospective evaluation of soft tissue masses and sarcomas using fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Br J Surg* 1999; 86:550.
55. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines www.nccn.org (Accessed on May 18, 2011).
56. American College of Radiology (ACR) appropriateness criteria for follow-up of malignant or aggressive musculoskeletal tumors (<http://www.acr.org/~media/ACR/Documents/AppCriteria/Diagnostic/FollowupMalignantOrAggressiveMusculoskeletalTumors.pdf> (Accessed on May 13, 2013)).
57. Mohammed TL, Chowdhry A, Reddy GP, et al. ACR Appropriateness Criteria® screening for pulmonary metastases. *J Thorac Imaging* 2011; 26:W1.
58. Noble JL, Moskovic E, Fisher C, Judson I. Imaging of skeletal metastases in myxoid liposarcoma. *Sarcoma* 2010; 2010:262361.
59. Lucas JD, O'Doherty MJ, Wong JC, et al. Evaluation of fluorodeoxyglucose positron emission tomography in the management of soft-tissue sarcomas. *J Bone Joint Surg Br* 1998; 80:441.
60. Iagaru A, Chawla S, Menendez L, Conti PS. 18F-FDG PET and PET/CT for detection of pulmonary metastases from musculoskeletal sarcomas. *Nucl Med Commun* 2006; 27:795.
61. Pastorino U, Veronesi G, Landoni C, et al. Fluorodeoxyglucose positron emission tomography improves preoperative staging of resectable lung metastasis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126:1906.
62. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines available online at www.nccn.org (Accessed on May 19, 2011).

63. Strauss DC, Qureshi YA, Hayes AJ, et al. The role of core needle biopsy in the diagnosis of suspected soft tissue tumours. *J Surg Oncol* 2010; 102:523
64. Hau A, Kim I, Kattapuram S, et al. Accuracy of CT-guided biopsies in 359 patients with musculoskeletal lesions. *Skeletal Radiol* 2002; 31:349.
65. Rougraff BT, Aboulafia A, Biermann JS, Healey J. Biopsy of soft tissue masses: evidence-based medicine for the musculoskeletal tumor society. *Clin Orthop Relat Res* 2009; 467:2783.
66. American Joint Committee on Cancer Staging Manual, Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al (Eds), Springer, New York 2010. p.291.
67. Suit HD, Mankin HJ, Wood WC, et al. Treatment of the patient with stage M0 soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol* 1988; 6:854.
68. Rööser B, Attewell R, Berg NO, Rydholm A. Prognostication in soft tissue sarcoma. A model with four risk factors. *Cancer* 1988; 61:817.
69. Weiss SW GJ. Enzinger and Weiss's soft tissue tumors, 4th ed. St. Louis(Mo): CV Mosby Co; 2001.
70. Linehan DC, Lewis JJ, Leung D, Brennan MF. Influence of biologic factors and anatomic site in completely resected liposarcoma. *J Clin Oncol*. 2000 Apr;18(8):1637-
71. Kindblom LG, Angervall L, Svendsen P. Liposarcoma a clinicopathologic, radiographic and prognostic study. *Acta Pathol Microbiol Scand Suppl*.1975;253:1-71.
72. Gustafson P, Rydholm A, Willen H, Baldetorp B, Ferno M, Akerman M. Liposarcoma: a population-based epidemiologic and prognostic study of features of 43 patients, including tumor DNA content. *Int J Cancer*. 1993 Oct 21;55(4):541-6.
73. Dalal KM, Kattan MW, Antonescu CR, Brennan MF, Singer S. Subtype specific prognostic nomogram for patients with primary liposarcoma of 51 the retroperitoneum, extremity, or trunk. *Ann Surg*. 2006 Sep;244(3):381-91.
74. Antonescu CR, Tschernyavsky SJ, Decuseara R, Leung DH, Woodruff JM, Brennan MF, et al. Prognostic impact of P53 status, TLS-CHOP fusion transcript structure, and histological grade in myxoid liposarcoma: a molecular and clinicopathologic study of 82 cases. *Clin Cancer Res*. 2001 Dec;7(12):3977-87.

- 75.** Linehan DC, Lewis JJ, Leung D, Brennan MF. Influence of biologic factors and anatomic site in completely resected liposarcoma. *J Clin Oncol.* 2000 Apr;18(8):1637-43.
- 76.** Reitan JB, Kaalhus O, Brennhovd IO, Sager EM, Stenwig AE, Talle K. Prognostic factors in liposarcoma. *Cancer.* 1985;55(10):2482-90.
- 77.** Orson GG, Sim FH, Reiman HM, Taylor WF. Liposarcoma of the musculoskeletal system. *Cancer.* 1987;60(6):1362-70.
- 78.** Chang HR, Gaynor J, Tan C, Hajdu SI, Brennan MF. Multifactorial analysis of survival in primary extremity liposarcoma. *World J Surg.* 1990 Sep-Oct;14(5):610-8.
- 79.** Pearlstone DB, Pisters PW, Bold RJ, Feig BW, Hunt KK, Yasko AW, et al. Patterns of recurrence in extremity liposarcoma: implications for staging and follow-up. *Cancer.* 1999;85(1):85-92.
- 80.** Kim HS¹, Lee J, Yi SY, Jun HJ, Choi YL, Ahn GH, Seo SW, Lim DH, Ahn . Liposarcoma: exploration of clinical prognostic factors for risk based stratification of therapy. *BMC Cancer.* 2009 Jun 26;9:205.
- 81.** Marcus KC, Grier HE, Shamberger RC, Gebhardt MC, Perez-Atayde A, Silver B. Childhood soft tissue sarcoma: a 20-year experience. *J Pediatr.* 1997 Oct. 131(4):603-7.
- 82.** Spunt SL, Poquette CA, Hurt YS, et al. Prognostic factors for children and adolescents with surgically resected nonrhabdomyosarcoma soft tissue sarcoma: an analysis of 121 patients treated at St Jude Children's Research Hospital. *J Clin Oncol.* 1999 Dec. 17(12):3697-705.
- 83.** Rutkowski P, Trepka S, Ptaszynski K, Kołodziejczyk M. Surgery quality and tumor status impact on survival and local control of resectable liposarcomas of extremities or the trunk wall. *Clin Orthop Relat Res.* 2013 Mar;471(3):860-70. doi: 10.1007/s11999-012-2592-0
- 84.** Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. *Clin Orthop Relat Res.* 1980 Nov-Dec(153):106-20.
- 85.** Papanicolaou N, Yoder IC, Lee MJ. Primary retroperitoneal neoplasms: how close can we come in making the correct diagnosis. *Urol Radiol.* 1992;14:221-8.
- 86.** Jaques DP, Coit DG, Hajdu SI, Brennan MF. Management of primary and recurrent soft-tissue sarcoma of the retroperitoneum. *Ann Surg.* 1990;212:51-9.

- 87.** Lewis JJ, Leung D, Woodruff JM, Brennan MF. Retroperitoneal soft-tissue sarcoma: analysis of 500 patients treated and followed at a single institution. *Ann Surg.* 1998;228:355–65.
- 88.** Pohar S, Haq R, Liu L, et al. Adjuvant high-dose-rate and low-dose-rate brachytherapy with external beam radiation in soft tissue sarcoma:a comparison of outcomes. *Brachytherapy* 2007;6:53-57.
- 89.** Leibel SA, Fuks Z, Zelefsky MJ, et al. Intensity-modulated radiotherapy. *Cancer J* 2002;8:164-176.
- 90.** Wang D, Zhang Q, Eisenberg BL, et al. Significant Reduction of Late Toxicities in Patients With Extremity Sarcoma Treated With Image-Guided Radiation Therapy to a Reduced Target Volume: Results of Radiation Therapy Oncology Group RTOG-0630 Trial. *J Clin Oncol* 2015;33:2231-2238.
- 91.** Tran PT, Hara W, Su Z, et al. Intraoperative radiation therapy for locally advanced and recurrent soft-tissue sarcomas in adults. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;72:1146-1153.
- 92.** Kuklo TR, Temple HT, Owens BD, et al. Preoperative versus postoperative radiation therapy for soft-tissue sarcomas. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)* 2005;34:75-80
- 93.** Al-Absi E, Farrokhyar F, Sharma R, et al. A systematic review and meta-analysis of oncologic outcomes of pre- versus postoperative radiation in localized resectable soft-tissue sarcoma. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1367-1374.
- 94.** Sampath S, Schultheiss TE, Hitchcock YJ, et al. Preoperative versus postoperative radiotherapy in soft-tissue sarcoma: multi-institutional analysis of 821 patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2011;81:498-505.
- 95.** Cheng EY, Dusenbery KE, Winters MR, Thompson RC. Soft tissue sarcomas: preoperative versus postoperative radiotherapy. *J Surg Oncol* 1996;61:90-99.
- 96.** Davis AM, O'Sullivan B, Bell RS, et al. Function and health status outcomes in a randomized trial comparing preoperative and postoperative radiotherapy in extremity soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol* 2002;20:4472-4477
- 97.** Zagars GK, Ballo MT, Pisters PWT, et al. Preoperative vs. postoperative radiation therapy for soft tissue sarcoma: a retrospective comparative evaluation of disease outcome. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*

2003;56:482-488.

98. Wilson AN, Davis A, Bell RS, et al. Local control of soft tissue sarcoma of the extremity: the experience of a multidisciplinary sarcoma group with definitive surgery and radiotherapy. *Eur J Cancer* 1994;30A:746-751.

99. Delaney TF, Kepka L, Goldberg SI, et al. Radiation therapy for control of soft-tissue sarcomas resected with positive margins. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2007;67:1460-1469.

100. Al Yami A, Griffin AM, Ferguson PC, et al. Positive surgical margins in soft tissue sarcoma treated with preoperative radiation: is a postoperative boost necessary? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;77:1191-1197.

101. Alamanda VK, Song Y, Shinohara E, et al. Postoperative radiation boost does not improve local recurrence rates in extremity soft tissue sarcomas. *J Med Imaging Radiat Oncol* 2014;58:633-640.

102. Yang JC, Chang AE, Baker AR, et al. Randomized prospective study of the benefit of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcomas of the extremity. *J Clin Oncol* 1998;16:197-203

103. O'Sullivan B, Davis AM, Turcotte R, et al. Preoperative versus postoperative radiotherapy in soft-tissue sarcoma of the limbs: a randomised trial. *Lancet* 2002;359:2235-2241.

104. Alektiar KM, Velasco J, Zelefsky MJ, et al. Adjuvant radiotherapy for margin-positive high-grade soft tissue sarcoma of the extremity. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;48:1051-1058.

105. Jebsen NL, Trovik CS, Bauer HC, et al. Radiotherapy to improve local control regardless of surgical margin and malignancy grade in extremity and trunk wall soft tissue sarcoma: a Scandinavian sarcoma group study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2008;71:1196-1203

106. Kim B, Chen YL, Kirsch DG, et al. An effective preoperative three-dimensional radiotherapy target volume for extremity soft tissue sarcoma and the effect of margin width on local control. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2010;77:843-850.

107. Pisters PW, Harrison LB, Leung DH, et al. Long-term results of a prospective randomized trial of adjuvant brachytherapy in soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol* 1996;14:859-868

- 108.** Alektiar KM, Leung D, Zelefsky MJ, et al. Adjuvant brachytherapy for primary high-grade soft tissue sarcoma of the extremity. *Ann Surg Oncol* 2002;9:48-56.
- 109.** Alektiar KM, Brennan MF, Healey JH, Singer S. Impact of intensity-modulated radiation therapy on local control in primary soft-tissue sarcoma of the extremity. *J Clin Oncol* 2008;26:3440-3444.
- 110.** Alektiar KM, Brennan MF, Singer S. Local control comparison of adjuvant brachytherapy to intensity-modulated radiotherapy in primary high-grade sarcoma of the extremity. *Cancer* 2011;117:3229-3234
- 111.** O'Sullivan B, Davis A, Turcotte R, et al. Five-year results of a randomized phase III trial of pre-operative vs post-operative radiotherapy in extremity soft tissue sarcoma [abstract]. *J Clin Oncol* 2004;22(14_Suppl):Abstract 9007.
- 112.** Davis AM, O'Sullivan B, Turcotte R, et al. Late radiation morbidity following randomization to preoperative versus postoperative radiotherapy in extremity soft tissue sarcoma. *Radiother Oncol* 2005;75:48-53.
- 113.** O'Sullivan B, Griffin AM, Dickie CI, et al. Phase 2 study of preoperative image-guided intensity-modulated radiation therapy to reduce wound and combined modality morbidities in lower extremity soft tissue sarcoma. *Cancer* 2013;119:1878-1884.
- 114.** Beane JD, Yang JC, White D, et al. Efficacy of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcoma of the extremity: 20-year follow-up of a randomized prospective trial. *Ann Surg Oncol* 2014;21:2484-2489.
- 115.** Cahlon O, Spierer M, Brennan MF, et al. Long-term outcomes in extremity soft tissue sarcoma after a pathologically negative resection and without radiotherapy. *Cancer* 2008;112:2774-2779.
- 116.** Cassier PA, Kantor G, Bonvalot S, et al. Adjuvant radiotherapy for extremity and trunk wall atypical lipomatous tumor/well-differentiated LPS (ALT/WD-LPS): a French Sarcoma Group (GSF-GETO) study. *Ann Oncol* 2014;25:1854-1860
- 117.** Pisters PW, Harrison LB, Leung DH, Woodruff JM, Casper ES, Brennan MF. Long-term results of a prospective randomized trial of adjuvant brachytherapy in soft tissue sarcoma. *J Clin Oncol*. 1996 Mar;14(3):859-68

- 118.** Alektiar KM, Leung D, Zelefsky MJ, Healey JH, Brennan MF. Adjuvant brachytherapy for primary high-grade soft tissue sarcoma of the extremity. *Ann Surg Oncol*. 2002 Jan-Feb;9(1):48-56.
- 119.** Alektiar KM, Brennan MF, Healey JH, Singer S. Impact of intensity-modulated radiation therapy on local control in primary soft-tissue sarcoma of the extremity. *J Clin Oncol*. 2008 Jul 10;26(20):3440-4.
- 120.** Alektiar KM, Brennan MF, Singer S. Local control comparison of adjuvant brachytherapy to intensity-modulated radiotherapy in primary high-grade sarcoma of the extremity. *Cancer*. 2011 Jul 15;117(14):3229-34. doi: 10.1002/cncr.25882. Epub 2011 Jan 24.
- 121.** Call JA, Stafford SL, Petersen IA, Haddock MG. Use of intraoperative radiotherapy for upper-extremity soft-tissue sarcomas: analysis of disease outcomes and toxicity. *Am J Clin Oncol* 2014;37:81-85.
- 122.** Calvo FA, Sole CV, Polo A, et al. Limb-sparing management with surgical resection, external-beam and intraoperative electron-beam radiation therapy boost for patients with primary soft tissue sarcoma of the extremity: a multicentric pooled analysis of long-term outcomes. *Strahlenther Onkol* 2014;190:891-898
- 123.** Sole CV, Calvo FA, Cambeiro M, et al. Intraoperative radiotherapy-containing multidisciplinary management of trunk-wall soft-tissue sarcomas. *Clin Transl Oncol* 2014;16:834-842.
- 124.** Musat E, Kantor G, Caron J, et al. Comparison of intensity modulated postoperative radiotherapy with conventional postoperative conformal radiotherapy for retroperitoneal sarcoma. *Cancer Radiother* 2004;8:255-261
- 125.** Yoon SS, Chen YL, Kirsch DG, et al. Proton-beam, intensity-modulated, and/or intraoperative electron radiation therapy combined with aggressive anterior surgical resection for retroperitoneal sarcomas. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1515-1529.
- 126.** Swanson EL, Indelicato DJ, Louis D, et al. Comparison of three-dimensional (3D) conformal proton radiotherapy (RT), 3D conformal photon RT, and intensity-modulated RT for retroperitoneal and intra-abdominal sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2012;83:1549-1557.
- 127.** Zlotecki RA, Katz TS, Morris CG, et al. Adjuvant radiation therapy for resectable retroperitoneal soft tissue sarcoma: the University of Florida experience. *Am J Clin Oncol* 2005;28:310-316

- 128.** Tzeng CW, Fiveash JB, Popple RA, et al. Preoperative radiation therapy with selective dose escalation to the margin at risk for retroperitoneal sarcoma. *Cancer* 2006;107:371-379.
- 129.** Jones JJ, Catton CN, O'Sullivan B, et al. Initial results of a trial of preoperative external-beam radiation therapy and postoperative brachytherapy for retroperitoneal sarcoma. *Ann Surg Oncol* 2002;9:346-354.
- 130.** Le Péchoux C, Musat E, Baey C, et al. Should adjuvant radiotherapy be administered in addition to front-line aggressive surgery (FAS) in patients with primary retroperitoneal sarcoma? *Annals of Oncology* 2013;24:832-837
- 131.** Sindelar WF, Kinsella TJ, Chen PW, et al. Intraoperative radiotherapy in retroperitoneal sarcomas. Final results of a prospective, randomized, clinical trial. *Arch Surg* 1993;128:402-410.
- 132.** Alektiar KM, Hu K, Anderson L, et al. High-dose-rate intraoperative radiation therapy (HDR-IORT) for retroperitoneal sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000;47:157-163.
- 133.** Gieschen HL, Spiro IJ, Suit HD, et al. Long-term results of intraoperative electron beam radiotherapy for primary and recurrent retroperitoneal soft tissue sarcoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;50:127-131.
- 134.** Petersen IA, Haddock MG, Donohue JH, et al. Use of intraoperative electron beam radiotherapy in the management of retroperitoneal soft tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;52:469-475.
- 135.** Bobin JY, Al-Lawati T, Granero LE, et al. Surgical management of retroperitoneal sarcomas associated with external and intraoperative electron beam radiotherapy. *Eur J Surg Oncol* 2003;29:676-681.
- 136.** Pisters PWT, Ballo MT, Fenstermacher MJ, et al. Phase I trial of preoperative concurrent doxorubicin and radiation therapy, surgical resection, and intraoperative electron-beam radiation therapy for patients with localized retroperitoneal sarcoma. *J Clin Oncol* 2003;21:3092-3097
- 137.** Krempien R, Roeder F, Oertel S, et al. Intraoperative electron-beam therapy for primary and recurrent retroperitoneal soft-tissuesarcoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;65:773-779.
- 138.** Stucky CC, Wasif N, Ashman JB, et al. Excellent local control with preoperative radiation therapy, surgical resection, and intra-

operative electron radiation therapy for retroperitoneal sarcoma. *J Surg Oncol* 2014;109:798-803.

139. Roeder F, Ulrich A, Habl G, et al. Clinical phase I/II trial to investigate preoperative dose-escalated intensity-modulated radiation therapy (IMRT) and intraoperative radiation therapy (IORT) in patients with retroperitoneal soft tissue sarcoma: interim analysis. *BMC Cancer* 2014;14:617.

140. Eilber FC, Eilber FR, Eckardt J, et al. The impact of chemotherapy on the survival of patients with high-grade primary extremity liposarcoma. *Ann Surg* 2004; 240:686.

141. Ferrari A, Gronchi A, Casanova M, et al. Synovial sarcoma: a retrospective analysis of 271 patients of all ages treated at a single institution. *Cancer* 2004; 101:627.

142. Cormier JN, Huang X, Xing Y, et al. Cohort analysis of patients with localized, high-risk, extremity soft tissue sarcoma treated at two cancer centers: chemotherapy-associated outcomes. *J Clin Oncol* 2004; 22:4567.

143. Eilber FC, Brennan MF, Eilber FR, et al. Chemotherapy is associated with improved survival in adult patients with primary extremity synovial sarcoma. *Ann Surg* 2007; 246:105.

144. Palmerini E, Staals EL, Alberghini M, et al. Synovial sarcoma: retrospective analysis of 250 patients treated at a single institution. *Cancer* 2009; 115:2988.

145. Casali PG, Blay JY, ESMO/CONTICANET/EUROBONET Consensus Panel of experts. Soft tissue sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 5:v198.

146. Antman K, Crowley J, Balcerzak SP, et al. An intergroup phase III randomized study of doxorubicin and dacarbazine with or without ifosfamide and mesna in advanced soft tissue and bone sarcomas. *J Clin Oncol* 1993; 11:1276.

147. Grobmyer SR, Maki RG, Demetri GD, et al. Neo-adjuvant chemotherapy for primary high-grade extremity soft tissue sarcoma. *Ann Oncol* 2004; 15:1667.

148. Italiano A, Penel N, Robin YM, et al. Neo/adjuvant chemotherapy does not improve outcome in resected primary synovial sarcoma: a study of the French Sarcoma Group. *Ann Oncol* 2009; 20:425.

- 149.** Gortzak E, Azzarelli A, Buesa J, et al. A randomised phase II study on neo-adjuvant chemotherapy for 'high-risk' adult soft-tissue sarcoma. *Eur J Cancer* 2001; 37:1096.
- 150.** Gronchi A, Bui BN, Bonvalot S, et al. Phase II clinical trial of neoadjuvant trabectedin in patients with advanced localized myxoid liposarcoma. *Ann Oncol* 2012; 23:77
- 151.** DeLaney TF, Spiro IJ, Suit HD, et al. Neoadjuvant chemotherapy and radiotherapy for large extremity soft-tissue sarcomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003;56:1117-1127.
- 152.** Kraybill WG, Harris J, Spiro IJ, et al. Phase II study of neoadjuvant chemotherapy and radiation therapy in the management of high-risk, high-grade, soft tissue sarcomas of the extremities and body wall: Radiation Therapy Oncology Group Trial 9514. *J Clin Oncol* 2006;24:619-625.
- 153.** Kraybill WG, Harris J, Spiro IJ, et al. Long-term results of a phase 2 study of neoadjuvant chemotherapy and radiotherapy in the management of high-risk, high-grade, soft tissue sarcomas of the extremities and body wall: Radiation Therapy Oncology Group Trial 9514. *Cancer* 2010;116:4613-4621
- 154.** Mullen JT, Kobayashi W, Wang JJ, et al. Long-term follow-up of patients treated with neoadjuvant chemotherapy and radiotherapy for large, extremity soft tissue sarcomas. *Cancer* 2012;118:3758-3765.
- 155.** Jones RL, Fisher C, Al-Muderis O, Judson IR. Differential sensitivity of liposarcoma subtypes to chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2005 Dec. 41(18):2853-60.
- 156.** Oda Y, Yamamoto H, Takahira T, et al. Frequent alteration of p16(INK4a)/p14(ARF) and p53 pathways in the round cell component of myxoid/round cell liposarcoma: p53 gene alterations and reduced p14(ARF) expression both correlate with poor prognosis. *J Pathol*. 2005 Dec. 207(4):410-21.
- 157.** Dalal KM, Antonescu CR, Singer S. Diagnosis and management of lipomatous tumors. *J Surg Oncol*. 2008 Mar 15. 97(4):298-313.
- 158.** Judson R, et al. A randomized phase III study of trabectedin (T) or dacarbazine (D) for the treatment of patients (pts) with advanced liposarcoma (LPS) or leiomyosarcoma (LMS). Abstract 10503. *Presented at American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2015 Annual Meeting, Chicago, IL.*

- 159.** Halaven (eribulin) [package insert]. Woodcliff Lake, NJ: Eisai, Inc. January, 2016.
- 160.** Bartel, D. P. (2009). "MicroRNAs: target recognition and regulatory functions". *Cell* 136 (2): 215–233.
- 161.** Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z (July 2005). "Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs". *Nat. Genet.* 37 (7): 766–70.
- 162.** Haynes KA, Ceroni F, Flicker D, Younger A, Silver PA. A sensitive switch for visualizing natural gene silencing in single cells. *ACS Synth Biol.* 2012 Mar 16;1(3):99-106.
- 163.** Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015 Jun;15(6):321-33.
- 164.** Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP (January 2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs". *Genome Res.* 19 (1): 92–105.
- 165.** Zhang R, Su B (2006). "Small but influential: the role of microRNAs on gene regulatory network and 3'UTR evolution". *J. Gen. Gen.* 36: 1–6.
- 166.** Tanzer A, Stadler PF (May 2004). "Molecular evolution of a microRNA cluster". *J. Mol. Biol.* 339 (2): 327–35.
- 167.** Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM (February 2005). "Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs". *Nature* 433 (7027): 769–73.
- 168.** Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T (April 2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse". *Curr. Biol.* 12 (9): 735–9.
- 169.** Morlando M, Dini Modigliani S, Torrelli G, Rosa A, Di Carlo V, Caffarelli E, Bozzoni I. FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment. *EMBO J.* 2012 Dec 12;31(24):4502-10.
- 170.** Borjigin N, Ohno S, Wu W, Tanaka M, Suzuki R, Fujita K, Takanashi M, Oikawa K, Goto T, Motoi T, Kosaka T, Yamamoto K, Kuroda M. TLS-CHOP represses miR-486 expression, inducing upregulation of a metastasis regulator PAI-1 in human myxoid

liposarcoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Oct 19;427(2):355-60.

171. Nezu Y, Hagiwara K, Yamamoto Y et al .MiR-135b, a key regulator of malignancy, is linked to poor prognosis in human myxoid liposarcoma. *Oncogene.* 2016 May 9.

172. Renner M, Czwan E, Hartmann W, Penzel R, Brors B, Eils R, Wardelmann E, Büttner R, Lichter P, Schirmacher P, Mechtersheimer G. MicroRNA profiling of primary high-grade soft tissue sarcomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2012 Nov;51(11):982-96.

173. Yong Sun Lee and Anindya Dutta et al. The tumor suppressor microRNA *let-7* represses the HMGGA2 oncogene. *Genes Dev.* 2007 May 1; 21(9): 1025–1030.

174. Meza-Zepeda LA, Berner JM, Henriksen J, South AP, Pedeutour F, Dahlberg AB, Godager LH, Nizetic D, Forus A, Myklebost O. Ectopic sequences from truncated HMGIC in liposarcomas are derived from various amplified chromosomal regions. *Genes Chromosomes Cancer.* 2001 Jul;31(3):264-73.

175. Taylor BS, Decarolis PL, Angeles CV, Brenet F, Schultz N, Antonescu CR, Scandura JM, Sander C, Viale AJ, Socci ND, Singer S. Frequent alterations and epigenetic silencing of differentiation pathway genes in structurally rearranged liposarcomas. *Cancer Discov.* 2011 Dec 11;1(7):587-597.

176. Zhang P, Bill K, Liu J, Young E, Peng T, Bolshakov S, Hoffman A, Song Y, Demicco EG, Terrada DL, Creighton CJ, Anderson ML, Lazar AJ, Calin GG, Pollock RE, Lev D. MiR-155 is a liposarcoma oncogene that targets casein kinase-1 α and enhances β -catenin signaling. *Cancer Res.* 2012 Apr 1;72(7):1751-62. Epub 2012 Feb 20.

177. Vincenzi B, Iuliani M, Zoccoli A, et al .Deregulation of dicer and mir-155 expression in liposarcoma. *Oncotarget.* 2015 Apr 30;6(12):10586-91.

178. Boro A, Bauer D, Born W, Fuchs B. Plasma levels of miRNA-155 as a powerful diagnostic marker for dedifferentiated liposarcoma. *Am J Cancer Res.* 2016 Jan 15;6(2):544-52.

179. Hisaoka M, Matsuyama A, Nakamoto M. Aberrant calreticulin expression is involved in the dedifferentiation of dedifferentiated liposarcoma. *Am J Pathol.* 2012 May;180(5):2076-83.

- 180.** Yu PY, Balkhi MY, Ladner KJ et al .A selective screening platform reveals unique global expression patterns of microRNAs in a cohort of human soft-tissue sarcomas. *Lab Invest.* 2016 Apr;96(4):481-91.
- 181.** Ugras S, Brill E, Jacobsen A, Hafner M, Socci ND, Decarolis PL, Khanin R, O'Connor R, Mihailovic A, Taylor BS, Sheridan R, Gimble JM, Viale A, Crago A, Antonescu CR, Sander C, Tuschl T, Singer S.Small RNA sequencing and functional characterization reveals MicroRNA-143 tumor suppressor activity in liposarcoma. *Cancer Res.* 2011 Sep 1;71(17):5659-69. Epub 2011 Jun 21.
- 182.** Lee DH, Forscher C, Di Vizio D, Koeffler HP. *Sci Rep.*Induction of p53-independent apoptosis by ectopic expression of HOXA5 in human liposarcomas.2015 Jul 29;5:12580.
- 183.** Gits CM, van Kuijk PF, Jonkers MB et al.MicroRNA expression profiles distinguish liposarcoma subtypes and implicate miR-145 and miR-451 as tumor suppressors. *Int J Cancer.* 2013 Dec 21.
- 184.** Almog N, Ma L, Schwager C et al.Consensus micro RNAs governing the switch of dormant tumors to the fast-growing angiogenic phenotype. *PLoS One.* 2012;7(8):e44001.
- 185.** Uboldi S, Calura E, Beltrame L, et al.A systems biology approach to characterize the regulatory networks leading to trabectedin resistance in an in vitro model of myxoid liposarcoma. *PLoS One.* 2012;7(4):e35423
- 186.** Liu P, Wilson MJ. *J Cell Physiol.*MiR-520c and miR-373 upregulate MMP9 expression by targeting mTOR and SIRT1, and activate the Ras/Raf/MEK/Erk signaling pathway and NF- κ B factor in human fibrosarcoma cells. 2012 Feb;227(2):867-76.
- 187.** Lu S, Zhu Q, Zhang Y,et al .Dual-functions of miR-373 and miR-520c by differently regulating the activities of MMP2 and MMP9.. *J Cell Physiol.* 2014 Dec 24.
- 188.** Rojas F, Hernandez ME, Silva M, et al . The Oncogenic Response to MiR-335 Is Associated with Cell Surface Expression of Membrane-Type 1 Matrix Metalloproteinase (MT1-MMP) Activity.*PLoS One.* 2015 Jul 23;10(7):e0132026.
- 189.** Silva M, Hernandez ME, Rojas F, Li L, Subramanian S, Wilson MJ.MicroRNA miR-182 cluster mediated modulation of RECK without changes in cell surface membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *Am J Cancer Res.* 2015 Aug 15;5(9):2918-28

- 190.** Weng C, Dong H, Chen G, Zhai Y, Bai R, Hu H, Lu L, Xu Z. MiR-409-3p inhibits HT1080 cell proliferation, vascularization and metastasis by targeting angiogenin. *Cancer Lett.* 2012 Oct 28;323(2):171-9.
- 191.** Kohashi K, Yamamoto H, Kumagai R, Yamada Y, Hotokebuchi Y, Taguchi T, Iwamoto Y, Oda Y. Differential microRNA expression profiles between malignant rhabdoid tumor and epithelioid sarcoma: miR193a-5p is suggested to downregulate SMARCB1 mRNA expression. *Mod Pathol* 2014 Jun;27(6):832-9.
- 192.** Papp G, Krausz T, Stricker TP, Szendrői M, Sági Z. Genes Chromosomes Cancer. 2014 Feb;53(2):168-76. SMARCB1 expression in epithelioid sarcoma is regulated by miR-206, miR-381, and miR-671-5p on Both mRNA and protein levels.
- 193.** Guled M, Pazzaglia L, Borze I, Mosakhani N, Novello C, Benassi MS, Knuutila S. Differentiating soft tissue leiomyosarcoma and undifferentiated pleomorphic sarcoma: A miRNA analysis. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014 Aug;53(8):693-702.
- 194.** Kowalewska M, Bakula-Zalewska E, Chechlinska M, Goryca K, Nasierowska-Guttmejer A, Danska-Bidzinska A, Bidzinski M. MicroRNAs in uterine sarcomas and mixed epithelial-mesenchymal uterine tumors: a preliminary report. *Tumour Biol.* 2013 Aug;34(4):2153-60.
- 195.** Nuovo GJ, Schmittgen TD. Benign metastasizing leiomyoma of the lung: clinicopathologic, immunohistochemical, and micro-RNA analyses. *Diagn Mol Pathol.* 2008 Sep;17(3):145-50.
- 196.** Zhang Q, Ubago J, Li L, Guo H, Liu Y, Qiang W, Kim JJ, Kong B, Wei JJ. Molecular analyses of 6 different types of uterine smooth muscle tumors: Emphasis in atypical leiomyoma. *Cancer.* 2014 Oct 15;120(20):3165-77.
- 197.** Ravid Y, Formanski M, Smith Y, Reich R, Davidson B. Uterine leiomyosarcoma and endometrial stromal sarcoma have unique miRNA signatures. *Gynecol Oncol.* 2016 Mar;140(3):512-7.
- 198.** Pan Q, Luo X, Chegini N. Differential expression of microRNAs in myometrium and leiomyomas and regulation by ovarian steroids. *J Cell Mol Med.* 2008 Jan-Feb;12(1):227-40
- 199.** Subramanian S, Lui WO, Lee CH, Espinosa I, Nielsen TO, Heinrich MC, Corless CL, Fire AZ, van de Rijn M. MicroRNA expression signature of human sarcomas.. *Oncogene.* 2008 Mar 27;27(14):2015-26

- 200.** Chen JF, Mandel EM, Thomson JM, Wu Q, Callis TE, Hammond SM, Conlon FL, Wang DZ. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. *Nat Genet.* 2006 Feb;38(2):228-33.
- 201.** Kim HK, Lee YS, Sivaprasad U, Malhotra A, Dutta A. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. *J Cell Biol.* 2006 Aug 28;174(5):677-87.
- 202.** Danielson LS, Menendez S, Attolini CS, Guijarro MV, Bisogna M, Wei J, Socci ND, Levine DA, Michor F, Hernando E. A differentiation-based microRNA signature identifies leiomyosarcoma as a mesenchymal stem cell-related malignancy. *Am J Pathol.* 2010 Aug;177(2):908-17.
- 203.** Chuang TD¹, Panda H, Luo X, Chegini N. MiR-200c is aberrantly expressed in leiomyomas in an ethnic-dependent manner and targets ZEBs, VEGFA, TIMP2, and FBLN5. *Endocr Relat Cancer.* 2012 Jul 22;19(4):541-56.
- 204.** Chuang TD, Luo X, Panda H, Chegini N. MiR-93/106b and their host gene, MCM7, are differentially expressed in leiomyomas and functionally target F3 and IL-8. *Mol Endocrinol.* 2012 Jun;26(6):1028-42.
- 205.** Chuang TD, Ho M, Khorram O. The Regulatory Function of miR-200c on Inflammatory and Cell-Cycle Associated Genes in SK-LMS-1, A Leiomyosarcoma Cell Line. *Reprod Sci.* 2014 Oct 9. pii: 1933719114553450.
- 206.** Pan Q, Luo X, Chegini N. MicroRNA 21: response to hormonal therapies and regulatory function in leiomyoma, transformed leiomyoma and leiomyosarcoma cells. *Mol Hum Reprod.* 2010 Mar;16(3):215-27.
- 207.** Shi G, Perle MA, Mittal K, Chen H, Zou X, Narita M, Hernando E, Lee P, Wei JJ. Let-7 repression leads to HMGA2 overexpression in uterine leiomyosarcoma. *J Cell Mol Med.* 2009 Sep;13(9B):3898-905
- 208.** Reichert JL, Duan F, Smith LM, Gustafson DM, O'Connor RS, Zhang C, Dunlevy MJ, Gastier-Foster JM, Barr FG. Genomic and clinical analysis of amplification of the 13q31 chromosomal region in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *Clin Cancer Res.* 2011 Mar 15;17(6):1463-73.
- 209.** Rao PK, Missiaglia E, Shields L, Hyde G, Yuan B, Shepherd CJ, Shipley J, Lodish HF. Distinct roles for miR-1 and miR-133a in the

proliferation and differentiation of rhabdomyosarcoma cells.. *FASEB J.* 2010 Sep;24(9):3427-37

210. Taulli R, Bersani F, Foglizzo V, Linari A, Vigna E, Ladanyi M, Tuschl T, Ponzetto C. The muscle-specific microRNA miR-206 blocks human rhabdomyosarcoma growth in xenotransplanted mice by promoting myogenic differentiation. *J Clin Invest.* 2009 Aug;119(8):2366-78.

211. Li L, Sarver AL, Alamgir S, Subramanian S. Downregulation of microRNAs miR-1, -206 and -29 stabilizes PAX3 and CCND2 expression in rhabdomyosarcoma. *Lab Invest.* 2012 Apr;92(4):571-83.

212. Coda DM, Lingua MF, Morena D, Foglizzo V, Bersani F, Ala U, Ponzetto C, Taulli R. SMYD1 and G6PD modulation are critical events for miR-206-mediated differentiation of rhabdomyosarcoma. *Cell Cycle.* 2015;14(9):1389-402.

213. Hanna JA, Garcia MR, Go JC, et al. PAX7 is a required target for microRNA-206-induced differentiation of fusion-negative rhabdomyosarcoma. *Cell Death Dis.* 2016 Jun 9;7(6):e2256.

214. Cieśla M, Dulak J, Józkwicz A et al. MicroRNAs and epigenetic mechanisms of rhabdomyosarcoma development. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014 May 14. pii: S1357-2725(14)00147-2.

215. Sun M, Huang F, Yu D, et al. Autoregulatory loop between TGF- β 1/miR-411-5p/SPRY4 and MAPK pathway in rhabdomyosarcoma modulates proliferation and differentiation. *Cell Death Dis.* 2015 Aug 20;6:e1859.

216. Wang H, Garzon R, Sun H, Ladner KJ, Singh R, Dahlman J, Cheng A, Hall BM, Qualman SJ, Chandler DS, Croce CM, Guttridge DC. NF-kappaB-YY1-miR-29 regulatory circuitry in skeletal myogenesis and rhabdomyosarcoma. *Cancer Cell.* 2008 Nov 4;14(5):369-81

217. Sarver AL, Li L, Subramanian S. MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration. *Cancer Res.* 2010 Dec 1;70(23):9570-80.

218. Diao Y, Guo X, Jiang L, Wang G, Zhang C, Wan J, Jin Y, Wu Z. miR-203, a tumor suppressor frequently down-regulated by promoter hypermethylation in rhabdomyosarcoma. *J Biol Chem.* 2014 Jan 3;289(1):529-39

219. *Lab Invest.* 2012 Apr;92(4):571-83. Downregulation of microRNAs miR-1, -206 and -29 stabilizes PAX3 and CCND2

expression in rhabdomyosarcoma. Li L, Sarver AL, Alamgir S, Subramanian S.

220. Oncotarget. 2014 Apr 30;5(8):2161-75. MiR-214 and N-ras regulatory loop suppresses rhabdomyosarcoma cell growth and xenograft tumorigenesis. Huang HJ¹, Liu J, Hua H, Li SE, Zhao J, Yue S, Yu TT, Jin YC, Cheng SY.

221. Megiorni F, Cialfi S, McDowell HP, Felsani A, Camero S, Guffanti A, Pizer B, Clerico A, De Grazia A, Pizzuti A, Moles A, Dominici C. Deep Sequencing the microRNA profile in rhabdomyosarcoma reveals down-regulation of miR-378 family members. BMC Cancer. 2014 Nov 25;14:880.

222. Tarnowski M, Tkacz M, Czerewaty M, et al. 5-Azacytidine inhibits human rhabdomyosarcoma cell growth by downregulating insulin-like growth factor 2 expression and reactivating the H19 gene product miR-675, which negatively affects insulin-like growth factors and insulin signaling. Int J Oncol. 2015 May;46(5):2241-50.

223. Tombolan L, Zampini M, Casara S, et al. MicroRNA-27a Contributes to Rhabdomyosarcoma Cell Proliferation by Suppressing RARA and RXRA. PLoS One. 2015 Apr 27;10(4):e0125171

224. Vella S, Pomella S, Leoncini PP et al. MicroRNA-101 is repressed by EZH2 and its restoration inhibits tumorigenic features in embryonal rhabdomyosarcoma. Clin Epigenetics. 2015 Aug 6;7:82.

225. Beccafico S, Morozzi G, Marchetti MC, et al. Artesunate induces ROS- and p38 MAPK-mediated apoptosis and counteracts tumor growth in vivo in embryonal rhabdomyosarcoma cells. Carcinogenesis. 2015 Sep;36(9): 1071-83.

226. Herrero Martín D, Boro A, Schäfer BW. Cell-based small-molecule compound screen identifies fenretinide as potential therapeutic for translocation-positive rhabdomyosarcoma. PLoS One. 2013;8(1):e55072.

227. Italiano A, Thomas R, Breen M, et al. The miR-17-92 cluster and its target THBS1 are differentially expressed in angiosarcomas dependent on MYC amplification. Genes Chromosomes Cancer. 2012 Jun;51(6):569-78

228. Heishima K, Mori T, Ichikawa Y, et al. MicroRNA-214 and MicroRNA-126 Are Potential Biomarkers for Malignant Endothelial Proliferative Diseases. Int J Mol Sci. 2015 Oct 23;16(10):25377-91.

229. Sedani A, Cooper DN, Upadhyaya M. An emerging role for microRNAs in NF1 tumorigenesis. Hum. Genomics. 2012 Nov 17;6:23.

- 230.** Weng Y, Chen Y, Chen J , et al .Identification of serum microRNAs in genome-wide serum microRNA expression profiles as novel noninvasive biomarkers for malignant peripheral nerve sheath tumor diagnosis. *Med Oncol.* 2013 Jun;30(2):531.
- 231.** Masliah-Planchon J, Pasmant E, Luscan A,et al .MicroRNAome profiling in benign and malignant neurofibromatosis type 1-associated nerve sheath tumors: evidences of PTEN pathway alterations in early NF1 tumorigenesis. *BMC Genomics.* 2013 Jul 13;14:473
- 232.** Subramanian S, Thayanithy V, West RB, et al .Genome-wide transcriptome analyses reveal p53 inactivation mediated loss of miR-34a expression in malignant peripheral nerve sheath tumours. *J Pathol.* 2010 Jan;220(1):58-70.
- 233.** Itani S, Kunisada T, Morimoto Y,et al .MicroRNA-21 correlates with tumorigenesis in malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) via programmed cell death protein 4 (PDCD4). *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012 Sep;138(9):1501-9.
- 234.** Zhang P, Garnett J, Creighton CJ,et.EZH2-miR-30d-KPNB1 pathway regulates malignant peripheral nerve sheath tumour cell survival and tumourigenesis.*J Pathol.* 2014 Feb;232(3):308-18.
- 235.** Zhang P, Yang X, Ma X et al.Antitumor effects of pharmacological EZH2 inhibition on malignant peripheral nerve sheath tumor through the miR-30a and KPNB1 pathway. *Mol Cancer.* 2015 Mar 7;14:55.
- 236.** Wang Z, Yin B, Wang B, et al. MicroRNA-210 Promotes Proliferation and Invasion of Peripheral Nerve Sheath Tumor Cells Targeting EFNA3. *Oncol Res.* 2014;21(3):145-54.
- 237.** Presneau N, Eskandarpour M, Shemais T,et al .MicroRNA profiling of peripheral nerve sheath tumours identifies miR-29c as a tumour suppressor gene involved in tumour progression. *Br J Cancer.* 2013 Mar 5;108(4):964-72.
- 238.** Gong M, Ma J, Li M, et al .MicroRNA-204 critically regulates carcinogenesis in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neuro Oncol.* 2012 Aug;14(8):1007-17.
- 239.** Li X, Yang H, Tian Q,et al .Upregulation of microRNA-17-92 cluster associates with tumor progression and prognosis in osteosarcoma. *Neoplasma.* 2014 Mar 20.

- 240.** Cai H, Lin L, Cai H, Tang M, Wang Z. Prognostic evaluation of microRNA-210 expression in pediatric osteosarcoma. *Med Oncol.* 2013 Jun;30(2):499.
- 241.** Xu SH, Yang YL, Han SM, Wu ZH. MicroRNA-9 expression is a prognostic biomarker in patients with osteosarcoma. *World J Surg Oncol.* 2014 Jun 27;12:195.
- 242.** Niu J, Sun Y, Guo Q, Niu D, Liu B. Serum miR-95-3p is a diagnostic and prognostic marker for osteosarcoma. *Springer plus.* 2016 Nov 9;5(1):1947
- 243.** Fei D, Li Y, Zhao D, et al. Serum miR-9 as a prognostic biomarker in patients with osteosarcoma. *J Int Med Res.* 2014 Jun 24;42(4):932-937.
- 244.** Cai H, Zhao H, Tang J, Wu H. Serum miR-195 is a diagnostic and prognostic marker for osteosarcoma. *J Surg Res.* 2014 Nov 21. pii: S0022-4804(14)01061-0.
- 245.** Cao L, Wang J, Wang PQ. MiR-326 is a diagnostic biomarker and regulates cell survival and apoptosis by targeting Bcl-2 in osteosarcoma. *Biomed Pharmacother.* 2016 Oct 7;84:828-835
- 246.** Dong J, Liu Y, Liao W, et al . miRNA-223 is a potential diagnostic and prognostic marker for osteosarcoma. *J Bone Oncol.* 2016 May 3;5(2):74-9.
- 247.** Hong Q, Fang J, Pang Y, Zheng J. Prognostic value of the microRNA-29 family in patients with primary osteosarcomas. *Med Oncol.* 2014 Aug;31(8):37.
- 248.** Zhang C, Yao C, Li H, et al . Serum levels of microRNA-133b and microRNA-206 expression predict prognosis in patients with osteosarcoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Jun 15;7(7):4194-203.
- 249.** Liu JD, Xin Q, Tao CS, et al . Serum miR-300 as a diagnostic and prognostic biomarker in osteosarcoma. *Oncol Lett.* 2016 Nov;12(5):3912-3918.
- 250.** Mu Y, Zhang H, Che L, Li K. Clinical significance of microRNA-183/Ezrin axis in judging the prognosis of patients with osteosarcoma. *Med Oncol.* 2014 Feb;31(2):821
- 251.** Xin M, Qiao Z, Li J, et al . miR-22 inhibits tumor growth and metastasis by targeting ATP citrate lyase: evidence in osteosarcoma, prostate cancer, cervical cancer and lung cancer. *Oncotarget.* 2016 Jul 12;7(28):44252-44265.

- 252.** Dong C, Du Q, Wang Z et al .MicroRNA-665 suppressed the invasion and metastasis of osteosarcoma by directly inhibiting RAB23. *Am J Transl Res.* 2016 Nov 15;8(11):4975-4981.
- 253.** Cai H, Lin L, Cai H, et al .Combined microRNA-340 and ROCK1 mRNA profiling predicts tumor progression and prognosis in pediatric osteosarcoma. *Int J Mol Sci.* 2014 Jan 6;15(1):560-73.
- 254.** Sanchez-Diaz PC, Hsiao TH, Zou Y,et al .In silico functional analyses and discovery of survival-associated microRNA signatures in pediatric osteosarcoma. *Oncoscience.* 2014 Sep 23;1(9):599-608.
- 255.** Li Y, Liu J, Liu ZZ, et al .MicroRNA-145 inhibits tumour growth and metastasis in osteosarcoma by targeting cyclin-dependent kinase, CDK6. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016 Dec;20(24):5117-5125.
- 256.** Jiang X, Li X, Wu F, et al . Overexpression of miR-92a promotes the tumor growth of osteosarcoma by suppressing F-box and WD repeat-containing protein 7. *Gene.*2017 Mar 30;606:10-16.
- 257.** Li S, Gao Y, Wang Y, et al .Serum microRNA-17 functions as a prognostic biomarker in osteosarcoma. *Oncol Lett.* 2016 Dec;12(6):4905-4910. doi: 10.3892/ol.2016.5362. Epub 2016 Nov 7.
- 258.** Zhang H, Yin Z, Ning K, et al. Prognostic value of microRNA-223/epithelial cell transforming sequence 2 signaling in patients with osteosarcoma. *Hum Pathol.* 2014 Mar 5. pii: S0046-8177(14)00097-5.
- 259.** Wang Z, Cai H, Lin L,et al .Upregulated expression of microRNA-214 is linked to tumor progression and adverse prognosis in pediatric osteosarcoma*Pediatr Blood Cancer.* 2014 Feb;61(2):206-10..
- 260.** Jones KB, Salah Z, Del Mare S, et al.MiRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma. *Cancer Res.* 2012 Apr 1;72(7):1865-77
- 261.** Zhang C, Yao C, Li H, et al .Combined elevation of microRNA-196a and microRNA-196b in sera predicts unfavorable prognosis in patients with osteosarcomas. *Int J Mol Sci.* 2014 Apr 17;15(4):6544-55.
- 262.** Yuan J, Chen L, Chen X,et al.Identification of serum microRNA-21 as a biomarker for chemosensitivity and prognosis in human osteosarcoma. *J Int Med Res.* 2012;40(6):2090-7.
- 263.** Ouyang L, Liu P, Yang S, et al .A three-plasma miRNA signature serves as novel biomarkers for osteosarcoma. *Med Oncol.* 2013 Mar;30(1):340.

- 264.** Tang M, Lin L, Cai H, et al .MicroRNA-145 downregulation associates with advanced tumor progression and poor prognosis in patients suffering osteosarcoma. *Onco Targets Ther.* 2013 Jul 8;6:833-8
- 265.** Bao YP, Yi Y, Peng LL, et al .Roles of microRNA-206 in osteosarcoma pathogenesis and progression. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(6):3751-5.
- 266.** Yang J, Gao T, Tang J, et al . Loss of microRNA-132 predicts poor prognosis in patients with primary osteosarcoma. *Mol Cell Biochem.* 2013 Sep;381(1-2):9-15.
- 267.** Song QC, Shi ZB, Zhang YT, et al .Downregulation of microRNA-26a is associated with metastatic potential and the poor prognosis of osteosarcoma patients. *Oncol Rep.* 2014 Mar;31(3):1263-70.
- 268.** Zhang F, Huang W, Sheng M, Liu T. MiR-451 inhibits cell growth and invasion by targeting CXCL16 and is associated with prognosis of osteosarcoma patients. *Tumour Biol.* 2014 Nov 13. [Epub ahead of print].
- 269.** Yuan J, Lang J, Liu C, et al. The expression and function of miRNA-451 in osteosarcoma. *Med Oncol.* 2015 Jan;32(1):324.
- 270.** Sun XH, Geng XL, Zhang J, Zhang C. MiRNA-646 suppresses osteosarcoma cell metastasis by downregulating fibroblast growth factor 2 (FGF2). *Tumour Biol.* 2014 Nov 18.
- 271.** Chong Y, Zhang J, Guo X, et al. MicroRNA-503 Acts as a Tumor Suppressor in Osteosarcoma by Targeting L1CAM. *PLoS One.* 2014 Dec 23;9(12):e114585.
- 272.** Yang H, Peng Z, Da Z, et al . MicroRNA-148a Acts As a Tumor Suppressor in Osteosarcoma Via Targeting Rho-Associated Coiled-Coil Kinase. *Oncol Res.* 2017 Jan 23.
- 273.** Kelly AD, Haibe-Kains B, Janeway KA, et al .MicroRNA paraffin-based studies in osteosarcoma reveal reproducible independent prognostic profiles at 14q32. *Genome Med.* 2013 Jan 22;5(1):2.
- 274.** Sarver AL, Thayanithy V, Scott MC, et al . MicroRNAs at the human 14q32 locus have prognostic significance in osteosarcoma. *Orphanet J Rare Dis.* 2013 Jan 11;8:7.
- 275.** Dai N, Zhong ZY, Cun YP, et al .Alteration of the microRNA expression profile in human osteosarcoma cells transfected with APE1 siRNA. *Neoplasma.* 2013;60(4):384-94.

- 276.** Osaki M, Takeshita F, Sugimoto Y, et al .MicroRNA-143 regulates human osteosarcoma metastasis by regulating matrix metalloprotease-13 expression. *Mol Ther.* 2011 Jun;19(6):1123-30.
- 277.** Tsai HC, Su HL, Huang CY,et al .CTGF increases matrix metalloproteinases expression and subsequently promotes tumor metastasis in human osteosarcoma through down-regulating miR-519d. *Oncotarget.* 2014 Jun 15;5(11):3800-12.
- 278.** Wang LH, Tsai HC, Cheng YC, et al.CTGF promotes osteosarcoma angiogenesis by regulating miR-543/angiopoietin 2 signaling. *Cancer Lett.* 2017 Jan 18;391:28-37.
- 279.** Huang J, Gao K, Lin J, Wang Q.MicroRNA-100 inhibits osteosarcoma cell proliferation by targeting Cyr61. *Tumour Biol.* 2014 Feb;35(2):1095-100.
- 280.** Jin Y, Peng D, Shen Y, et al . MicroRNA-376c inhibits cell proliferation and invasion in osteosarcoma by targeting to transforming growth factor-alpha. *DNA Cell Biol.* 2013 Jun;32(6):302-9.
- 281.** Zhao H, Guo M, Zhao G, et al .MiR-183 inhibits the metastasis of osteosarcoma via downregulation of the expression of Ezrin in F5M2 cells. *Int J Mol Med.* 2012 Nov;30(5):1013-20.
- 282.** Zhu J, Feng Y, Ke Z, et al . Down-regulation of miR-183 promotes migration and invasion of osteosarcoma by targeting Ezrin. *Am J Pathol.* 2012 Jun;180(6):2440-51.
- 283.** Zhan C, Li C, Zhang H, et al .MicroRNA-150 upregulation reduces osteosarcoma cell invasion and metastasis by downregulating Ezrin. *Oncol Lett.* 2016 Nov;12(5):3457-3462.
- 284.** D.L. Stabley, D. Kamara, J. Holbrook, et al .Digital Gene Expression of miRNA in Osteosarcoma Xenografts: Finding Biological Relevance in miRNA High Throughput Sequencing Data. *J Biomol Tech.* Sep 2010; 21(3 Suppl): S25
- 285.** Zhi X, Wu K, Yu D, et al . MicroRNA-494 inhibits proliferation and metastasis of osteosarcoma through repressing insulin receptor substrate-1. *Am J Transl Res.* 2016 Aug 15;8(8):3439-47.
- 286.** Han K, Zhao T, Chen X, et al . MicroRNA-194 suppresses osteosarcoma cell proliferation and metastasis in vitro and in vivo by targeting CDH2 and IGF1R. *Int J Oncol.* 2014 Oct;45(4):1437-49.

- 287.** Luo Z, Li D, Luo X, et al . Decreased Expression of miR-548c-3p in Osteosarcoma Contributes to Cell Proliferation Via Targeting ITGAV. *Cancer Biother Radiopharm.* 2016 Jun;31(5):153-8.
- 288.** Li E, Zhang J, Yuan T, Ma B. MiR-145 inhibits osteosarcoma cells proliferation and invasion by targeting ROCK1. *Tumour Biol.* 2014 May 7. [Epub ahead of print].
- 289.** Wang Y, Zhao W, Fu Q. MiR-335 suppresses migration and invasion by targeting ROCK1 in osteosarcoma cells. *Mol Cell Biochem.* 2013 Dec;384(1-2):105-11.
- 290.** Zhou X, Wei M, Wang W. MicroRNA-340 suppresses osteosarcoma tumor growth and metastasis by directly targeting ROCK1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Aug 9;437(4):653-8
- 291.** Zhang M, Wang D, Zhu T, Yin R. MiR-214-5p Targets ROCK1 and Suppresses Proliferation and Invasion of Human Osteosarcoma Cells. *Oncol Res.* 2017 Jan 2;25(1):75-81.
- 292.** Xu JQ, Liu P, Si MJ, Ding XY. MicroRNA-126 inhibits osteosarcoma cells proliferation by targeting Sirt1. *Tumour Biol.* 2013 Dec;34(6):3871-7.
- 293.** Zhang Y, Hu H, Song L, et al . Epirubicin-mediated expression of miR-302b is involved in osteosarcoma apoptosis and cell cycle regulation. *Toxicol Lett.* 2013 Sep 12;222(1):1-9.
- 294.** Zhang H, Cai X, Wang Y, et al . MicroRNA-143, down-regulated in osteosarcoma, promotes apoptosis and suppresses tumorigenicity by targeting Bcl-2. *Oncol Rep.* 2010 Nov;24(5):1363-9
- 295.** Ji F, Zhang H, Wang Y, et al . MicroRNA-133a, downregulated in osteosarcoma, suppresses proliferation and promotes apoptosis by targeting Bcl-xL and Mcl-1. *Bone.* 2013 Sep;56(1):220-6.
- 296.** Zhang W, Qian JX, Yi HL, et al . The microRNA-29 plays a central role in osteosarcoma pathogenesis and progression. *Mol Biol (Mosk).* 2012 Jul-Aug;46(4):622-7.
- 297.** He C, Xiong J, Xu X, et al . Functional elucidation of MiR-34 in osteosarcoma cells and primary tumor samples. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Oct 9;388(1):35-40.
- 298.** Braun CJ, Zhang X, Savelyeva I, et al . p53-Responsive micromRNAs 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. *Cancer Res.* 2008 Dec 15;68(24):10094-104.

- 299.** Tian Y, Zhang YZ, Chen W .MicroRNA-199a-3p and microRNA-34a regulate apoptosis in human osteosarcoma cells .Biosci Rep. 2014 Aug 6;34(4). pii: e00132.
- 300.** Creighton CJ, Fountain MD, Yu Z, et al .Molecular profiling uncovers a p53-associated role for microRNA-31 in inhibiting the proliferation of serous ovarian carcinomas and other cancers. Cancer Res. 2010 Mar 1;70(5):1906-15.
- 301.** Chen X, Chen XG, Hu X, et al .MiR-34a and miR-203 Inhibit Survivin Expression to Control Cell Proliferation and Survival in Human Osteosarcoma Cells. J Cancer. 2016 May 25;7(9):1057-65.
- 302.** Zhao H, Li M, Li L,et al .MiR-133b is down-regulated in human osteosarcoma and inhibits osteosarcoma cells proliferation, migration and invasion, and promotes apoptosis.PLoS One. 2013 Dec 31;8(12):e83571
- 303.** Duan Z, Choy E, Harmon D, et al .MicroRNA-199a-3p is downregulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation and migration. Mol Cancer Ther. 2011 Aug;10(8):1337-45.
- 304.** Lin S, Shao NN, Fan L, et al .Effect of microRNA-101 on proliferation and apoptosis of human osteosarcoma cells by targeting mTOR. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2014 Dec;34(6):889-95
- 305.** Yao J, Qin L, Miao S, et al . Overexpression of miR-506 suppresses proliferation and promotes apoptosis of osteosarcoma cells by targeting astrocyte elevated gene-1.Oncol Lett. 2016 Sep;12(3):1840-1848
- 306.** Li G, Cai M, Fu D, et al .Heat shock protein 90B1 plays an oncogenic role and is a target of microRNA-223 in human osteosarcoma. Cell Physiol Biochem. 2012;30(6):1481-90
- 307.** Qu Q, Chu X, Wang P. MicroRNA-195-5p suppresses osteosarcoma cell proliferation and invasion by suppressing naked cuticle homolog 1. Cell Biol Int. 2016 Dec 29.
- 308.** Fei D, Zhao K, Yuan H, et al .MicroRNA-187 exerts tumor-suppressing functions in osteosarcoma by targeting ZEB2. Am J Cancer Res. 2016 Dec 1;6(12):2859-2868.
- 309.** Ying S, Jianjun H, Xue Y, et al .MicroRNA-133b inhibits cell proliferation and invasion in osteosarcoma by targeting to Sirt1. Oncol Res. 2017 Jan 5.

- 310.** Wang L, Gao H, Gong N, Gong M. Downregulation of microRNA-497 is associated with upregulation of synuclein γ in patients with osteosarcoma. *Exp Ther Med*. 2016 Dec;12(6):3761-3766.
- 311.** Long XH, Mao JH, Peng AF, et al . Tumor suppressive microRNA-424 inhibits osteosarcoma cell migration and invasion via targeting fatty acid synthase. *Exp Ther Med*. 2013 Apr;5(4):1048-1052.
- 312.** Yang YQ, Qi J, Xu JQ et al . MicroRNA-142-3p, a novel target of tumor suppressor menin, inhibits osteosarcoma cell proliferation by down-regulation of FASN. *Tumour Biol*. 2014 Oct;35(10):10287-93.
- 313.** Song L, Yang J, Duan P, et al . MicroRNA-24 inhibits osteosarcoma cell proliferation both in vitro and in vivo by targeting LPAAT β . *Arch Biochem Biophys*. 2013 Jul 15;535(2):128-35.
- 314.** Xin M, Qiao Z, Li J, et al . miR-22 inhibits tumor growth and metastasis by targeting ATP citrate lyase: evidence in osteosarcoma, prostate cancer, cervical cancer and lung cancer. *Oncotarget*. 2016 Jul 12;7(28):44252-44265.
- 315.** Wu X, Zhong D, Gao Q, et al . MicroRNA-34a inhibits human osteosarcoma proliferation by downregulating ether à go-go 1 expression. *Int J Med Sci*. 2013;10(6):676-82
- 316.** Van der Deen M, Taipaleenmäki H, Zhang Y, et al . MicroRNA-34c inversely couples the biological functions of the runt-related transcription factor RUNX2 and the tumor suppressor p53 in osteosarcoma. *J Biol Chem*. 2013 Jul 19;288(29):21307-19.
- 317.** Wang L, Wang W, Li J, et al . MicroRNA-150 inhibits osteosarcoma cell proliferation by targeting RUNX2 gene. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2016 Dec 28;41(12):1285-1290.
- 318.** He QY, Wang GC, Zhang H, et al . miR-106a-5p Suppresses the Proliferation, Migration, and Invasion of Osteosarcoma Cells by Targeting HMGA2. *DNA Cell Biol*. 2016 Sep;35(9):506-20.
- 319.** Franzetti GA, Laud-Duval K, Bellanger D, et al . MiR-30a-5p connects EWS-FLI1 and CD99, two major therapeutic targets in Ewing tumor. *Oncogene*. 2013 Aug 15;32(33):3915-21.
- 320.** Kobayashi E, Satow R, Ono M, et al . MicroRNA Expression and Functional Profiles of Osteosarcoma. *Oncology*. 2014;86(2):94-103
- 321.** Sohn EJ, Park J, Kang SI, Wu YP. Accumulation of pre-let-7g and downregulation of mature let-7g with the depletion of EWS. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Sep 14;426(1):89-93.

- 322.** Zhang S, Hou C, Li G, et al .A single nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the KRAS gene disrupts the interaction with let-7a and enhances the metastatic potential of osteosarcoma cells. *Int J Mol Med.* 2016 Sep;38(3):919-26.
- 323.** Thayanithy V, Sarver AL, Kartha RV, et al .Perturbation of 14q32 miRNAs-cMYC gene network in osteosarcoma. *Bone.* 2012 Jan;50(1):171-81.
- 324.** Xu N, Li Z, Yu Z, et al .MicroRNA-33b Suppresses Migration and Invasion by Targeting c-Myc in Osteosarcoma Cells. *PLoS One.* 2014 Dec 29;9(12):e115300.
- 325.** Jiang C, Chen H, Shao L, Wang Q .MicroRNA-1 functions as a potential tumor suppressor in osteosarcoma by targeting Med1 and Med31. *Oncol Rep.* 2014 Sep;32(3):1249-56.
- 326.** Lv H, Pei J, Liu H, et al .A polymorphism site in the pre-miR-34a coding region reduces miR-34a expression and promotes osteosarcoma cell proliferation and migration. *Mol Med Rep.* 2014 Dec;10(6):2912-6.
- 327.** Liu Q, Yang G, Qian Y .Loss of MicroRNA-489-3p promotes osteosarcoma metastasis by activating PAX3-MET pathway. *Mol Carcinog.* 2016 Nov 15.
- 328.** Li X, Sun X, Wu J, Li Z. *Am J Cancer Res.* MicroRNA-613 suppresses proliferation, migration and invasion of osteosarcoma by targeting c-MET. 2016 Dec 1;6(12):2869-2879.
- 329.** Geng S, Zhang X, Chen J, et al .The tumor suppressor role of miR-124 in osteosarcoma. *PLoS One.* 2014 Jun 27;9(6):e91566.
- 330.** Li Z, Shen J, Chan MT, Wu WK. MicroRNA-379 suppresses osteosarcoma progression by targeting PDK1. *J Cell Mol Med.* 2016 Oct 25.
- 331.** Zhou Y, Han Y, Zhang Z, et al .MicroRNA-124 upregulation inhibits proliferation and invasion of osteosarcoma cells by targeting sphingosine kinase 1. *Hum Cell.* 2016 Oct 14.
- 332.** Wang XX, Liu J, Tang YM, et al. MicroRNA-638 inhibits cell proliferation by targeting suppress PIM1 expression in human osteosarcoma. *Tumour Biol.* 2017 Jan 3
- 333.** Liu H, Su P, Zhi L, Zhao K. MiR-34c-3p acts as a tumor suppressor gene in osteosarcoma by targeting MARCKS. *Mol Med Rep.* 2017 Mar;15(3):1204-1210.

- 334.** Yang C, Hou C, Zhang H, et al . MiR-126 functions as a tumor suppressor in osteosarcoma by targeting Sox2. *Int J Mol Sci.* 2013 Dec 31;15(1):423-37.
- 335.** Xu JQ, Zhang WB, Wan R, Yang YQ. MicroRNA-32 inhibits osteosarcoma cell proliferation and invasion by targeting Sox9. *Tumour Biol.* 2014 Oct;35(10):9847-53.
- 336.** Sun Z, Zhang T , Hong H , Liu Q, H.Mir-202 suppresses proliferation and induces apoptosis of osteosarcoma cells by downregulating gli2.. *mol cell biochem.* 2014 dec;397(1-2):277-83.
- 337.** Al-Khalaf HH, Aboussekhra A.MicroRNA-141 and microRNA-146b-5p inhibit the prometastatic mesenchymal characteristics through the RNA-binding protein AUF1 targeting the transcription factor ZEB1 and the protein kinase AKT. *J Biol Chem.* 2014 Nov 7;289(45):31433-47.
- 338.** Luo XJ, Tang DG, Gao TL, et al .MicroRNA-212 Inhibits Osteosarcoma Cells Proliferation and Invasion by Down-Regulation of Sox4. *Cell Physiol Biochem.* 2014;34:2180-8
- 339.** Zhu DQ, Lou YF, He ZG, Ji M. Nucleotidyl transferase TUT1 inhibits lipogenesis in osteosarcoma cells through regulation of microRNA-24 and microRNA-29a. *Tumour Biol.* 2014 Dec;35(12):11829-35.
- 340.** Wang L , Shao J, Zhang X, et al .MicroRNA-377 suppresses the proliferation of human osteosarcoma MG-63 cells by targeting CDK6. *Tumour Biol.* 2015 Jan 11. [Epub ahead of print]
- 341.** Wu H, Li W, Zhang M, et al . Inhibitory roles of miR-320 in osteosarcoma via regulating E2F1. *J Cancer Res Ther.* 2016 Oct;12(Supplement):68-71.
- 342.** Yin Z, Ding H, He E, et al .Up-regulation of microRNA-491-5p suppresses cell proliferation and promotes apoptosis by targeting FOXP4 in human osteosarcoma. *Cell Prolif.* 2016 Oct 5.
- 343.** Wang Y, Zhang S, Xu Y, et al .Upregulation of miR-192 inhibits cell growth and invasion and induces cell apoptosis by targeting TCF7 in human osteosarcoma. *Tumour Biol.* 2016 Sep 28.
- 344.** Zhou Y, Yang C, Wang K, et al .MicroRNA-33b inhibits the proliferation and migration of osteosarcoma cells via targeting hypoxia-inducible factor-1 α . *Oncol Res.* 2016 Sep 22.

- 345.** Liu J, Chen B, Yue B, Yang J. MicroRNA-212 suppresses the proliferation and migration of osteosarcoma cells by targeting forkhead box protein A1. *Exp Ther Med.* 2016 Dec;12(6):4135-4141.
- 346.** Di Fiore R, Drago-Ferrante R, Pentimalli F, et al .MicroRNA-29b-1 impairs in vitro cell proliferation, self-renewal and chemoresistance of human osteosarcoma 3AB-OS cancer stem cells. *Int J Oncol.* 2014 Nov;45(5):2013-23.
- 347.** Zhang K, Zhang Y, Ren K, et al .MicroRNA-101 inhibits the metastasis of osteosarcoma cells by downregulation of EZH2 expression. *Oncol Rep.* 2014 Nov;32(5):2143-9.
- 348.** Shen L, Wang P, Yang J, Li X. MicroRNA-217 regulates WASF3 expression and suppresses tumor growth and metastasis in osteosarcoma. *PLoS One.* 2014 Oct 7;9(10):e109138.
- 349.** Zhao M, Huang J, Gui K, et al .The downregulation of miR-144 is associated with the growth and invasion of osteosarcoma cells through the regulation of TAGLN expression. *Int J Mol Med.* 2014 Dec;34(6):1565-72.
- 350.** Zhang K, Zhang C, Liu L, Zhou J. A key role of microRNA-29b in suppression of osteosarcoma cell proliferation and migration via modulation of VEGF. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Aug 15;7(9):5701-8.
- 351.** Zhao D, Jia P, Wang W, Zhang G. VEGF-mediated suppression of cell proliferation and invasion by miR-410 in osteosarcoma. *Mol Cell Biochem.* 2015 Feb;400(1-2):87-95.
- 352.** Niu J, Sun Y, Guo Q, et al . miR-1 Inhibits Cell Growth, Migration, and Invasion by Targeting VEGFA in Osteosarcoma Cells. *Dis Markers.* 2016;2016:7068986. Epub 2016 Sep 29.
- 353.** Zhou J, Wu S, Chen Y, Zhao J, Zhang K, Wang J, Chen S. MicroRNA-143 is associated with the survival of ALDH1+CD133+ osteosarcoma cells and the chemoresistance of osteosarcoma. *Exp Biol Med (Maywood).* 2015 Jan 8. pii: 1535370214563893.
- 354.** Li Y, Jiang W, Hu Y, Da Z, et al .MicroRNA-199a-5p inhibits cisplatin-induced drug resistance via inhibition of autophagy in osteosarcoma cells. *Oncol Lett.* 2016 Nov;12(5):4203-4208.
- 355.** Almog N, Briggs C, Beheshti A, et al . Transcriptional changes induced by the tumor dormancy-associated microRNA-190. *Transcription.* 2013 Jul 1;4(4).

- 356.** Lv H, Guo J, Li S, Jiang D. MiR-155 inhibitor reduces the proliferation and migration in osteosarcoma MG-63 cells. *Exp Ther Med.* 2014 Nov;8(5):1575-1580.
- 357.** Xu WG, Shang YL, Cong XR, et al .MicroRNA-135b promotes proliferation, invasion and migration of osteosarcoma cells by degrading myocardin.*Int J Oncol.* 2014 Nov;45(5):2024-32.
- 358.** Li H, Liu H, Pei J,et al.miR-542-3p overexpression is associated with enhanced osteosarcoma cell proliferation and migration ability by targeting Van Gogh-like 2. *Mol Med Rep.* 2015 Feb;11(2):851-6.
- 359.** Zhu ZJ, Huang P, Chong YX, et al .MicroRNA-181a promotes proliferation and inhibits apoptosis by suppressing CFIm25 in osteosarcoma. *Mol Med Rep.* 2016 Nov;14(5):4271-4278.
- 360.** Zhang H, Mai Q, Chen J.MicroRNA-210 is increased and it is required for dedifferentiation of osteosarcoma cell line. *Cell Biol Int.* 2016 Dec 29.
- 361.** *Tumour Biol.* 2013 Dec;34(6):3331-7.MicroRNA 181a improves proliferation and invasion, suppresses apoptosis of osteosarcoma cell.Jianwei Z¹, Fan L, Xiancheng L, Enzhong B, Shuai L, Can L.
- 362.** Wang C, Ba X, Guo Y, et al .MicroRNA-199a-5p promotes tumour growth by dual-targeting PIAS3 and p27 in human osteosarcoma. *Sci Rep.* 2017 Jan 25;7:41456.
- 363.** Pan W, Wang H, Jianwei R, Ye Z.MicroRNA-27a Promotes Proliferation, Migration and Invasion by Targeting MAP2K4 in Human Osteosarcoma Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2014;33(2):402-12.
- 364.** Li X, Wang FS, Wu ZY,et al.MicroRNA-19b targets Mfn1 to inhibit Mfn1-induced apoptosis in osteosarcoma cells. *Neoplasma.* 2014;61(3):265-73.
- 365.** Arabi L, Gsponer JR, Smida J, et al.Upregulation of the miR-17-92 cluster and its two paraloga in osteosarcoma - reasons and consequences. *Genes Cancer.* 2014 Apr;5(1-2):56-63.
- 366.** Ni Z, Shang XF, Wang YF,et al . Upregulated microRNA-301a in osteosarcoma promotes tumor progression by targeting CDC14A.*Genet Mol Res.* 2016 May 23;15(2).
- 367.** Xu B, Xia H, Cao J, et al .MicroRNA-21 Inhibits the Apoptosis of Osteosarcoma Cell Line SAOS-2 Via Targeting Caspase-8. *Oncol Res.*2017 Jan 20.

- 368.** Jiang R, Zhang C, Liu G, et al. MicroRNA-101 inhibits proliferation, migration and invasion in osteosarcoma cells by targeting ROCK1. *Am J Cancer Res.* 2017 Jan 1;7(1):88-97. eCollection 2017.
- 369.** Gao X, Han D, Fan W. Down-regulation of RBP-J mediated by microRNA-133a suppresses dendritic cells and functions as a potential tumor suppressor in osteosarcoma. *Exp Cell Res.* 2016 Oct 26. pii: S0014-4827(16)30344-5.
- 370.** Xu Z, Wang T. MiR-214 promotes the proliferation and invasion of osteosarcoma cells through direct suppression of LZTS1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Jun 27;449(2):190-5.
- 371.** Wang XH, Cai P, Wang MH, Wang Z. MicroRNA-25 promotes osteosarcoma cell proliferation by targeting the cell-cycle inhibitor p27. *Mol Med Rep.* 2014 Aug;10(2):855-9.
- 372.** Liu Q, Huang J, Zhou N, et al. LncRNA loc285194 is a p53-regulated tumor suppressor. *Nucleic Acids Res.* 2013 May;41(9):4976-87
- 373.** Zhao G, Cai C, Yang T, et al. MicroRNA-221 induces cell survival and cisplatin resistance through PI3K/Akt pathway in human osteosarcoma. *PLoS One.* 2013;8(1):e53906.
- 374.** Gao K, Yin J, Dong J. Deregulated WWOX is involved in a negative feedback loop with microRNA-214-3p in osteosarcoma. *Int J Mol Med.* 2016 Dec;38(6):1850-1856.
- 375.** Zhang H, Guo X, Feng X, et al. MiRNA-543 promotes osteosarcoma cell proliferation and glycolysis by partially suppressing PRMT9 and stabilizing HIF-1 α protein. *Oncotarget.* 2017 Jan 10;8(2):2342-2355.
- 376.** Cao ZQ, Shen Z, Huang WY, et al. MicroRNA-802 promotes osteosarcoma cell proliferation by targeting p27. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(12):7081-4.
- 377.** Gao Y, Luo LH, Li S, Yang C. MiR-17 inhibitor suppressed osteosarcoma tumor growth and metastasis via increasing PTEN expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Feb 7;444(2):230-4. Epub 2014 Jan 22
- 378.** Wang X, Sun J, Fu C, et al. MicroRNA-214 regulates osteosarcoma survival and growth by directly targeting phosphatase and tensin homolog. *Mol Med Rep.* 2014 Dec;10(6):3073-9.

- 379.** Zhang H, Wang Y, Xu T, et al .Increased expression of microRNA-148a in osteosarcoma promotes cancer cell growth by targeting PTEN. *Oncol Lett.* 2016 Nov;12(5):3208-3214.
- 380.** Ziyan W, Shuhua Y, Xiufang W, Xiaoyun L.MicroRNA-21 is involved in osteosarcoma cell invasion and migration.*Med Oncol.* 2011 Dec;28(4):1469-74.
- 381.** Fujiwara T, Katsuda T, Hagiwara K, et al .Clinical relevance and therapeutic significance of microRNA-133a expression profiles and functions in malignant osteosarcoma-initiating cells. *Stem Cells.* 2014 Apr;32(4):959-73.
- 382.** Cheng C, Chen ZQ, Shi XT.MicroRNA-320 inhibits osteosarcoma cells proliferation by directly targeting fatty acid synthase. *Tumour Biol.* 2014 Jan 5.
- 383.** Mao JH, Zhou RP, Peng AF, et al .MicroRNA-195 suppresses osteosarcoma cell invasion and migration in vitro by targeting FASN. *Oncol Lett.* 2012 Nov;4(5):1125-1129.
- 384.** Zhen YF, Li ST, Zhu YR, et al .Identification of DNA-PKcs as a primary resistance factor of salinomycin in osteosarcoma cells. *Oncotarget.* 2016 Oct 17.
- 385.** Huang JW, Wang Y, Dhillon KK, et al .Systematic screen identifies miRNAs that target RAD51 and RAD51D to enhance chemosensitivity. *Mol Cancer Res.* 2013 Dec;11(12):1564-73.
- 386.** Jacques C, Calleja LR, Baud'huin M, et al .MiRNA-193a-5p repression of p73 controls Cisplatin chemoresistance in primary bone tumors. *Oncotarget.* 2016 Jul 29.
- 387.** Liu M, Xiusheng H, Xiao X, Wang Y.Overexpression of miR-422a inhibits cell proliferation and invasion, and enhances chemosensitivity in osteosarcoma cells.*Oncol Rep.* 2016 Oct 19.
- 388.** Chang Z, Huo L, Li K, et al .Blocked autophagy by miR-101 enhances osteosarcoma cell chemosensitivity in vitro. *ScientificWorld Journal.* 2014;2014:794756.
- 389.** Chen R, Li X, He B, Hu W.MicroRNA-410 regulates autophagy-related gene ATG16L1 expression and enhances chemosensitivity via autophagy inhibition in osteosarcoma. *Mol Med Rep.* 2017 Mar;15(3):1326-1334.
- 390.** Yang SF, Lee WJ, Tan P, et al .Upregulation of miR-328 and inhibition of CREB-DNA-binding activity are critical for resveratrol-

mediated suppression of matrix metalloproteinase-2 and subsequent metastatic ability in human osteosarcomas. *Oncotarget*. 2014 Dec 30. [Epub ahead of print]

391. Osaki S, Tazawa H, Hasei J, et al . Ablation of MCL1 expression by virally induced microRNA-29 reverses chemoresistance in human osteosarcomas. *Sci Rep*. 2016 Jun 30;6:28953

392. Duan Z, Gao Y, Shen J, et al .MiR-15b modulates multidrug resistance in human osteosarcoma in vitro and in vivo. *Mol Oncol*. 2017 Feb;11(2):151-166.

393. Wang Z, Yang H. EMMPRIN, SP1 and microRNA-27a mediate physcion 8-O- β -glucopyranoside-induced apoptosis in osteosarcoma cells. *Am J Cancer Res*. 2016 Jun 1;6(6):1331-44.

394. Tian Z, Guo B, Yu M, et al .Upregulation of micro-ribonucleic acid-128 cooperating with downregulation of PTEN confers metastatic potential and unfavorable prognosis in patients with primary osteosarcoma. *Onco Targets Ther*. 2014 Sep 15;7:1601-8.

395. Ziyang W, Yang L.MicroRNA-21 regulates the sensitivity to cisplatin in a human osteosarcoma cell line. *Ir J Med Sci*. 2014 Nov 9.

396. Vanas V, Haigl B, Stockhammer V, Sutterlüty-Fall H.MicroRNA-21 Increases Proliferation and Cisplatin Sensitivity of Osteosarcoma-Derived Cells. *PLoS One*. 2016 Aug 11;11(8):e0161023.

397. Zhou W, Hao M, Du X, Chen K, Wang Yang J. Advances G, in targeted therapy for osteosarcoma .*Discov Med*.2014.Jun; 17(96): 301-7.

398. Chen L, Jiang K, Jiang H, Wei P.MiR-155 mediates drug resistance in osteosarcoma cells via inducing autophagy. *Exp Ther Med*. 2014 Aug;8(2):527-532. Epub 2014 Jun 2

399. Pu Y, Zhao F, Li Y, et al . The miR-34a-5p promotes the multi-chemoresistance of osteosarcoma via repression of the AGTR1 gene. *BMC Cancer*. 2017 Jan 10;17(1):45.

400. Sun Y, He N, Dong Y, Jiang C. MiR-24-BIM-Smac/DIABLO axis controls the sensitivity to doxorubicin treatment in osteosarcoma. *Sci Rep*. 2016 Sep 29;6:34238.

401. Wang GC, He QY, Tong DK, et al .MiR-367 negatively regulates apoptosis induced by adriamycin in osteosarcoma cells by targeting KLF4. *J Bone Oncol*. 2016 Feb 17;5(2):51-6.

- 402.** Wei R, Cao G, Deng Z, et al . MiR-140-5p attenuates chemotherapeutic drug-induced cell death by regulating autophagy through inositol 1,4,5-trisphosphate kinase 2 (IP3k2) in human osteosarcoma cells. *Biosci Rep.* 2016 Oct 14;36(5).
- 403.** Liu C, Pan C, Cai Y, Wang H. Interplay between Long Noncoding RNA ZEB1-AS1 and miR-200s Regulates Osteosarcoma Cell Proliferation and Migration. *J Cell Biochem.* 2017 Jan 11.
- 404.** Mei Q, Li F, Quan H, et al . Busulfan inhibits growth of human osteosarcoma via miR-200 family microRNAs in vitro and in vivo. *Cancer Sci.* 2014 May 11.
- 405.** Li Y, Zhang J, Zhang L, et al . Diallyl trisulfide inhibits proliferation, invasion and angiogenesis of osteosarcoma cells by switching on suppressor microRNAs and inactivating of Notch-1 signaling. *Carcinogenesis.* 2013 Jul;34(7):1601-10.
- 406.** Thayanithy V, Park C, Sarver AL, et al . Combinatorial treatment of DNA and chromatin-modifying drugs cause cell death in human and canine osteosarcoma cell lines. *PLoS One.* 2012;7(9):e43720
- 407.** Shen L, Chen XD, Zhang YH. MicroRNA-128 promotes proliferation in osteosarcoma cells by downregulating PTEN. *Tumour Biol.* 2013 Oct 15.
- 408.** Liu ZL, Mao JH, Peng AF, et al . Inhibition of fatty acid synthase suppresses osteosarcoma cell invasion and migration via downregulation of the PI3K/Akt signaling pathway in vitro. *Mol Med Rep.* 2013 Feb;7(2):608-12.
- 409.** Bae Y, Yang T, Zeng HC, et al . MiRNA-34c regulates Notch signaling during bone development. *Hum Mol Genet.* 2012 Jul 1;21(13):2991-3000.
- 410.** Won KY, Kim YW, Kim HS, et al . MicroRNA-199b-5p is involved in the Notch signaling pathway in osteosarcoma. *Hum Pathol.* 2013 Aug;44(8):1648-55.
- 411.** Poos K, Smida J, Nathrath M, et al . How microRNA and transcription factor co-regulatory networks affect osteosarcoma cell proliferation. *PLoS Comput Biol.* 2013;9(8):e1003210.
- 412.** Chen L, Wang Q, Wang GD, et al . MiR-16 inhibits cell proliferation by targeting IGF1R and the Raf1-MEK1/2-ERK1/2 pathway in osteosarcoma. *FEBS Lett.* 2013 May 2;587(9):1366-72.

- 413.** Maire G, Martin JW, Yoshimoto M, et al .Analysis of miRNA-gene expression-genomic profiles reveals complex mechanisms of microRNA deregulation in osteosarcoma. *Cancer Genet.* 2011 Mar;204(3):138-46.
- 414.** Thayanithy V, Dickson EL, Steer C, et al .Tumor-stromal cross talk: direct cell-to-cell transfer of oncogenic microRNAs via tunneling nanotubes. *Transl Res.* 2014 May 24. pii: S1931-5244(14)00198-4.
- 415.** Shimbo K, Miyaki S, Ishitobi H,et al .Exosome-formed synthetic microRNA-143 is transferred to osteosarcoma cells and inhibits their migration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Mar 7;445(2):381-7.
- 416.** Baglio SR, Devescovi V, Granchi D, Baldini N.MicroRNA expression profiling of human bone marrow mesenchymal stem cells during osteogenic differentiation reveals Osterix regulation by miR-31. *Gene.* 2013 Sep 15;527(1):321-31.
- 417.** Montanini L, Lasagna L, Barili V,et al .MicroRNA cloning and sequencing in osteosarcoma cell lines: differential role of miR-93. *Cell Oncol (Dordr).* 2012 Feb;35(1):29-41
- 418.** Baumhoer D, Zillmer S, Unger K,et al.MicroRNA profiling with correlation to gene expression revealed the oncogenic miR-17-92 cluster to be up-regulated in osteosarcoma.*Cancer Genet.* 2012 May;205(5):212-9.
- 419.** Lauvrak SU, Munthe E, Kresse SH, et al.Functional characterisation of osteosarcoma cell lines and identification of mRNAs and miRNAs associated with aggressive cancer phenotypes. *Br J Cancer.* 2013 Oct 15;109(8):2228-36
- 420.** Hu H, Zhang Y, Cai XH,et al .Changes in microRNA expression in the MG-63 osteosarcoma cell line compared with osteoblasts. *Oncol Lett.* 2012 Nov;4(5):1037-1042.
- 421.** Lulla RR, Costa FF, Bischof JM, et al . Identification of Differentially Expressed MicroRNAs in Osteosarcoma. *Sarcoma.* 2011;2011:732690.
- 422.** Riester SM, Torres-Mora J, Dudakovic A, et al . Hypoxia-related microRNA-210 is a diagnostic marker for discriminating osteoblastoma and osteosarcoma. *J Orthop Res.* 2016 Jun 21.
- 423.** Namløs HM, Meza-Zepeda LA, Barøy T,et al . Modulation of the osteosarcoma expression phenotype by microRNAs.*PLoS One.* 2012;7(10):e48086.

- 424.** Di Fiore R, Fanale D, Drago-Ferrante R, et al .Genetic and molecular characterization of the human osteosarcoma 3AB-OS cancer stem cell line: a possible model for studying osteosarcoma origin and stemness. *J Cell Physiol.* 2013 Jun;228(6):1189-201.
- 425.** Yu PY, Balkhi MY, Ladner KJ, et al .A selective screening platform reveals unique global expression patterns of microRNAs in a cohort of human soft-tissue sarcomas. *Lab Invest.* 2016 Apr;96(4):481-91.
- 426.** Fricke A, Ullrich PV, Heinz J, et al .Identification of a blood-borne miRNA signature of synovial sarcoma. *Mol Cancer.* 2015 Aug 7;14:151.
- 427.** Hisaoka M, Matsuyama A, Nagao Y, et al .Identification of altered MicroRNA expression patterns in synovial sarcoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2011 Mar;50(3):137-45
- 428.** Kato H, Tjernberg A, Zhang W, et al .SYT associates with human SNF/SWI complexes and the C-terminal region of its fusion partner SSX1 targets histones. *J Biol Chem.* 2002 Feb 15;277(7):5498-505.
- 429.** Minami Y, Kohsaka S, Tsuda M, et al . SS18-SSX-regulated miR-17 promotes tumor growth of synovial sarcoma by inhibiting p21WAF1/CIP1. *Cancer Sci.* 2014 Sep;105(9):1152-9.
- 430.** Sarver AL, Li L, Subramanian S. MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration. *Cancer Res.* 2010 Dec 1;70(23):9570-80.
- 431.** Nakatani F, Ferracin M, Manara MC, et al . miR-34a predicts survival of Ewing's sarcoma patients and directly influences cell chemosensitivity and malignancy. *J Pathol.* 2012 Apr;226(5):796-805.
- 432.** Marino MT, Grilli A, Baricordi C, Scotlandi K.Prognostic significance of miR-34a in Ewing sarcoma is associated with cyclin D1 and ki-67 expression. *Ann Oncol.* 2014 Oct;25(10):2080-6.
- 433.** Nie CL, Ren WH, Ma Y, et al .Circulating miR-125b as a biomarker of Ewing's sarcoma in Chinese children. *Genet Mol Res.* 2015 Dec 29;14(4):19049-56.
- 434.** Hameiri-Grossman M, Porat-Klein A, Yaniv I, et al .The association between let-7, RAS and HIF-1 α in Ewing Sarcoma tumor growth.*Oncotarget.* 2015 Oct 20;6(32):33834-48.
- 435.** Zhang Z, Li Y, Huang L, et al . Let-7a suppresses macrophage infiltrations and malignant phenotype of Ewing sarcoma via STAT3/NF- κ B positive regulatory circuit. *Cancer Lett.* 2016 May 1;374(2):192-201.

- 436.** Kawano M, Tanaka K, Itonaga I, et al . c-Myc Represses Tumor-Suppressive microRNAs, let-7a, miR-16 and miR-29b, and Induces Cyclin D2-Mediated Cell Proliferation in Ewing's Sarcoma Cell Line. *PLoS One*. 2015 Sep 22;10(9):e0138560.
- 437.** Sohn EJ, Park J, Kang SI, Wu YP. Accumulation of pre-let-7g and downregulation of mature let-7g with the depletion of EWS. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Sep 14;426(1):89-93.
- 438.** Zhang Z, Huang L, Yu Z, et al . Let-7a Functions as a Tumor Suppressor in Ewing's Sarcoma Cell Lines Partly by Targeting Cyclin-Dependent Kinase 6. *DNA Cell Biol*. 2014 Mar;33(3):136-47
- 439.** Karnuth B, Dedy N, Spieker T, et al . Differentially expressed miRNAs in Ewing sarcoma compared to mesenchymal stem cells: low miR-31 expression with effects on proliferation and invasion. *PLoS One*. 2014 Mar 25;9(3):e93067.
- 440.** De Vito C, Riggi N, Suvà ML, et al . Let-7a is a direct EWS-FLI-1 target implicated in Ewing's sarcoma development. *PLoS One*. 2011;6(8):e23592.
- 441.** Ban J, Jug G, Mestdagh P, et al. Hsa-mir-145 is the top EWS-FLI1-repressed microRNA involved in a positive feedback loop in Ewing's sarcoma. *Oncogene*. 2011 May 5;30(18):2173-80.
- 442.** McKinsey EL, Parrish JK, Irwin AE, et al . A novel oncogenic mechanism in Ewing sarcoma involving IGF pathway targeting by EWS/Fli1-regulated microRNAs. *Oncogene*. 2011 Dec 8;30(49):4910-20.
- 443.** Li W, Li Y, Guo J, et al . Overexpression of miR-199b-5p inhibits Ewing's sarcoma cell lines by targeting CCNL1. *Mol Med Rep*. 2015 Sep;12(3):3359-64.
- 444.** Robin TP, Smith A, McKinsey E, et al . EWS/FLI1 regulates EYA3 in Ewing sarcoma via modulation of miRNA-708, resulting in increased cell survival and chemoresistance. *Mol Cancer Res*. 2012 Aug;10(8):1098-108.
- 445.** Franzetti GA, Laud-Duval K, Bellanger D, et al. MiR-30a-5p connects EWS-FLI1 and CD99, two major therapeutic targets in Ewing tumor. *Oncogene*. 2013 Aug 15;32(33):3915-21.
- 446.** Li J, You T, Jing J. MiR-125b inhibits cell biological progression of Ewing's sarcoma by suppressing the PI3K/Akt signalling pathway. *Cell Prolif*. 2014 Apr;47(2):152-60. Epub 2014 Feb 12.

- 447.** McKinsey EL, Parrish JK, Irwin AE, et al. A novel oncogenic mechanism in Ewing sarcoma involving IGF pathway targeting by EWS/Fli1-regulated microRNAs. *Oncogene*. 2011 Dec 8;30(49):4910-20.
- 448.** Mosakhani N, Guled M, Leen G, et al. An integrated analysis of miRNA and gene copy numbers in xenografts of Ewing's sarcoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2012 Mar 20;31:24.
- 449.** Schwentner R, Herrero-Martin D, Kauer MO, et al. The role of miR-17-92 in the miRegulatory landscape of Ewing sarcoma. *Oncotarget*. 2016 Dec 22. oncotarget.14091.
- 450.** De Vito C, Riggi N, Cornaz S, et al. A TARBP2-dependent miRNA expression profile underlies cancer stem cell properties and provides candidate therapeutic reagents in Ewing sarcoma. *Cancer Cell*. 2012 Jun 12;21(6):807-21.
- 451.** Dylla L, Jedlicka P. Print 2013. Growth-promoting role of the miR-106a~363 cluster in Ewing sarcoma. *PLoS One*. 2013 Apr 26;8(4):e63032.
- 452.** Parrish JK, Sechler M, Winn RA, Jedlicka P. The histone demethylase KDM3A is a microRNA-22-regulated tumor promoter in Ewing Sarcoma. *Oncogene*. 2013 Dec 23.
- 453.** Iida K, Fukushi J, Matsumoto Y, Oda Y, et al. MiR-125b develops chemoresistance in Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. *Cancer Cell Int*. 2013 Mar 4;13(1):21.
- 454.** Jacques C, Calleja LR, Baud'huin M, et al. MiRNA-193a-5p repression of p73 controls Cisplatin chemoresistance in primary bone tumors. *Oncotarget*. 2016 Jul 29.
- 455.** Bachet JB, Tabone-Eglinger S, Dessaux S, et al. Print 2013. Gene expression patterns of hemizygous and heterozygous KIT mutations suggest distinct oncogenic pathways: a study in NIH3T3 cell lines and GIST samples. *PLoS One*. 2013 Apr 12;8(4):e61103.
- 456.** Shi Y, Wang CZ, Hou YY, et al. Screening of differentially expressed microRNAs in borderline and malignant gastrointestinal stromal tumors. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*. 2013 Jan;42(1):20-5.
- 457.** Kelly L, Bryan K, Kim SY, et al. Post-transcriptional dysregulation by miRNAs is implicated in the pathogenesis of gastrointestinal stromal tumor [GIST]. *PLoS One*. 2013 May 24;8(5):e64102

- 458.** Yamamoto H, Kohashi K, Fujita A, Oda Y. Fascin-1 overexpression and miR-133b downregulation in the progression of gastrointestinal stromal tumor. *Mod Pathol.* 2013 Apr;26(4):563-71.
- 459.** Niinuma T, Suzuki H, Nojima M, et al . Upregulation of miR-196a and HOTAIR drive malignant character in gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res.* 2012 Mar 1;72(5):1126-36.
- 460.** Blandamura S, Alessandrini L, Bertorelle R, et al .Multiple sporadic gastrointestinal stromal tumors concomitant with ampullary adenocarcinoma: a case report with KIT and PDGFRA mutational analysis and miR-221/222 expression profile. *Pathol Res Pract.* 2014 Jun;210(6):392-6.
- 461.** Tong HX, Zhou YH, Hou YY, et al . Expression profile of microRNAs in gastrointestinal stromal tumors revealed by high throughput quantitative RT-PCR microarray. *World J Gastroenterol.* 2015 May 21;21(19):5843-55.
- 462.** Liu S, Cui J, Liao G, et al .MiR-137 regulates epithelial-mesenchymal transition in gastrointestinal stromal tumor. *Tumour Biol.* 2014 Sep;35(9):9131-8.
- 463.** Fan R, Zhong J, Zheng S, et al . MicroRNA-218 inhibits gastrointestinal stromal tumor cell and invasion by targeting KIT. *Tumour Biol.* 2013 Dec 29.
- 464.** Koelz M, Lense J, Wrba F, et al .Down-regulation of miR-221 and miR-222 correlates with pronounced Kit expression in gastrointestinal stromal tumors. *Int J Oncol.* 2011 Feb;38(2):503-11.
- 465.** Fontana L, Pelosi E, Botta R, et al .MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation.⁹*Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Dec 13;102(50):18081-6.
- 466.** Kim WK, Park M, Kim YK, et al .MicroRNA-494 downregulates KIT and inhibits gastrointestinal stromal tumor cell proliferation. *Clin Cancer Res.* 2011 Dec 15;17(24):7584-94.
- 467.** Gits CM, van Kuijk PF, Jonkers MB, et al . MiR-17-92 and miR-221/222 cluster members target KIT and ETV1 in human gastrointestinal stromal tumours. *Br J Cancer.* 2013 Sep 17;109(6):1625-35.
- 468.** Ihle MA, Trautmann M, Kuenstlinger H, et al .miRNA-221 and miRNA-222 induce apoptosis via the KIT/AKT signalling pathway in gastrointestinal stromal tumours. *Mol Oncol.* 2015 Aug;9(7):1421-33.

- 469.** Isosaka M, Niinuma T, Nojima M, et al .A Screen for Epigenetically Silenced microRNA Genes in Gastrointestinal Stromal Tumors. *PLoS One*. 2015 Jul 27;10(7):e0133754.
- 470.** Xiao J, Wang QX, Zhu YQ. Altered expression profile of micrnas in gastric stromal tumor. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2015 Dec;35(6):842-50.
- 471.** Tuddenham L, Wheeler G, Ntounia-Fousara S, et al .The cartilage specific microRNA-140 targets histone deacetylase 4 in mouse cells.. *FEBS Lett*. 2006 Jul 24;580(17):4214-7.
- 472.** Fan R, Zhong J, Zheng S, et al. microRNA-218 increase the sensitivity of gastrointestinal stromal tumor to imatinib through PI3K/AKT pathway. *Clin Exp Med*. 2014 Apr 5. [Epub ahead of print].
- 473.** Akçakaya P, Caramuta S, Åhlen J, et al.microRNA expression signatures of gastrointestinal stromal tumours: associations with imatinib resistance and patient outcome. *Br J Cancer*. 2014 Nov 25;111(11):2091-102.
- 474.** Shi Y, Gao X, Hu Q, et al .PIK3C2A is a gene-specific target of microRNA-518a-5p in imatinib mesylate-resistant gastrointestinal stromal tumor. *Lab Invest*. 2016 Jun;96(6):652-60.
- 475.** GacicJ, Vorkapic E, Olsen RS, et al . Imatinib reduces cholesterol uptake and matrix metalloproteinase activity in human THP-1 macrophages.*Pharmacol Rep*. 2016 Feb;68(1):1-6.
- 476.** Durso M, Gaglione M, Piras L, et al.Chemical modifications in the seed region of miRNAs 221/222 increase the silencing performances in gastrointestinal stromal tumor cells. *Eur J Med Chem*. 2016 Mar 23;111:15-25.
- 477.** Guan Z, Yu X, Wang H et al. Advances in the targeted therapy of liposarcoma. *Onco Targets Ther* 2015; 8: 125-136.
- 478.** Casali PG. Histology- and non-histology-driven therapy for treatment of soft tissue sarcomas. *Ann Oncol* 2012; 23 Suppl 10: x167-169.
- 479.** Fletcher CD. The evolving classification of soft tissue tumours - an update based on the new 2013 WHO classification. *Histopathology* 2014; 64: 2-11.
- 480.** Dodd LG. Update on liposarcoma: a review for cytopathologists. *Diagn Cytopathol* 2012; 40: 1122-1131.

- 481.** Italiano A, Toulmonde M, Cioffi A et al. Advanced well-differentiated/dedifferentiated liposarcomas: role of chemotherapy and survival. *Ann Oncol* 2012; 23: 1601-1607.
- 482.** Kollar A, Benson C. Current management options for liposarcoma and challenges for the future. *Expert Rev Anticancer Ther* 2014; 14: 297-306.
- 483.** Abbas Manji G, Singer S, Koff A, Schwartz GK. Application of molecular biology to individualize therapy for patients with liposarcoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2015; 213-218.
- 484.** Crago AM, Singer S. Clinical and molecular approaches to well differentiated and dedifferentiated liposarcoma. *Curr Opin Oncol* 2011; 23: 373-378.
- 485.** Bennani-Baiti IM. Epigenetic and epigenomic mechanisms shape sarcoma and other mesenchymal tumor pathogenesis. *Epigenomics* 2011; 3: 715-732.
- 486.** Berg D, Malinowsky K, Reischauer B et al. Use of formalin-fixed and paraffin-embedded tissues for diagnosis and therapy in routine clinical settings. *Methods Mol Biol* 2011; 785: 109-122.
- 487.** Williams PM, Lively TG, Jessup JM, Conley BA. Bridging the gap: moving predictive and prognostic assays from research to clinical use. *Clin Cancer Res* 2012; 18: 1531-1539.
- 488.** Li J, Smyth P, Flavin R et al. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnol* 2007; 7: 36.
- 489.** Xi Y, Nakajima G, Gavin E et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA* 2007; 13: 1668-1674.
- 490.** Nana-Sinkam SP, Croce CM. Clinical applications for microRNAs in cancer. *Clin Pharmacol Ther* 2013; 93: 98-104.
- 491.** Soriano A, Jubierre L, Almazan-Moga A et al. microRNAs as pharmacological targets in cancer. *Pharmacol Res* 2013; 75: 3-14.
- 492.** Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15524-15529.

- 493.** Lee DH, Amanat S, Goff C et al. Overexpression of miR-26a-2 in human liposarcoma is correlated with poor patient survival. *Oncogenesis* 2013; 2: e47.
- 494.** Sun R, Shen JK, Choy E et al. The emerging roles and therapeutic potential of microRNAs (miRs) in liposarcoma. *Discov Med* 2015; 20: 311-324.
- 495.** Kumarswamy R, Volkmann I, Thum T. Regulation and function of miRNA-21 in health and disease. *RNA Biol* 2011; 8: 706-713.
- 496.** Frampton AE, Krell J, Jamieson NB et al. microRNAs with prognostic significance in pancreatic ductal adenocarcinoma: A meta-analysis. *Eur J Cancer* 2015; 51: 1389-1404.
- 497.** Shibuya H, Iinuma H, Shimada R et al. Clinicopathological and prognostic value of microRNA-21 and microRNA-155 in colorectal cancer. *Oncology* 2010; 79: 313-320.
- 498.** Yang M, Shen H, Qiu C et al. High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence and unfavourable survival in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2013; 49: 604-615.
- 499.** Zhu W, Xu B. MicroRNA-21 identified as predictor of cancer outcome: a meta-analysis. *PLoS One* 2014; 9: e103373.
- 500.** Vandesaempele J, De Preter K, Pattyn F et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: RESEARCH0034.
- 501.** Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004; 64: 5245-5250.
- 502.** Latham GJ. Normalization of microRNA quantitative RT-PCR data in reduced scale experimental designs. *Methods Mol Biol* 2010; 667: 19-31.
- 503.** Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 2008; 14: 844-852.
- 504.** Davoren PA, McNeill RE, Lowery AJ et al. Identification of suitable endogenous control genes for microRNA gene expression analysis in human breast cancer. *BMC Mol Biol* 2008; 9: 76.

- 505.** Chang KH, Mestdagh P, Vandesompele J et al. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2010; 10: 173.
- 506.** Wotschovsky Z, Meyer HA, Jung M et al. Reference genes for the relative quantification of microRNAs in renal cell carcinomas and their metastases. *Anal Biochem* 2011; 417: 233-241.
- 507.** Song J, Bai Z, Han W et al. Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci* 2012; 57: 897-904.
- 508.** Viprey VF, Corrias MV, Burchill SA. Identification of reference microRNAs and suitability of archived hemopoietic samples for robust microRNA expression profiling. *Anal Biochem* 2012; 421: 566-572.
- 509.** Zhu HT, Dong QZ, Wang G et al. Identification of suitable reference genes for qRT-PCR analysis of circulating microRNAs in hepatitis B virus-infected patients. *Mol Biotechnol* 2012; 50: 49-56.
- 510.** Zheng G, Wang H, Zhang X et al. Identification and validation of reference genes for qPCR detection of serum microRNAs in colorectal adenocarcinoma patients. *PLoS One* 2013; 8: e83025.
- 511.** Das MK, Andreassen R, Haugen TB, Furu K. Identification of Endogenous Controls for Use in miRNA Quantification in Human Cancer Cell Lines. *Cancer Genomics Proteomics* 2016; 13: 63-68.
- 512.** Jones R, Payne B. *Clinical investigation and statistics in laboratory medicine.* 1997.
- 513.** DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL. Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics* 1988; 44: 837-845.
- 514.** Gogou P, Pakos E, Batistatou A et al. Clinicopathologic study of E-cadherin/beta-catenin complex, and topoisomerase-II in a series of 71 liposarcoma cases. *World J Surg Oncol* 2012; 10: 28.
- 515.** Jurkovicova D, Magyerkova M, Kulcsar L et al. miR-155 as a diagnostic and prognostic marker in hematological and solid malignancies. *Neoplasma* 2014; 61: 241-251.
- 516.** Czyzyk-Krzeska MF, Zhang X. MiR-155 at the heart of oncogenic pathways. *Oncogene* 2014; 33: 677-678.
- 517.** Kong W, He L, Richards EJ et al. Upregulation of miRNA-155 promotes tumour angiogenesis by targeting VHL and is associated with

poor prognosis and triple-negative breast cancer. *Oncogene* 2014; 33: 679-689.

518. Neville MJ, Collins JM, Gloyn AL et al. Comprehensive human adipose tissue mRNA and microRNA endogenous control selection for quantitative real-time-PCR normalization. *Obesity (Silver Spring)* 2011; 19: 888-892.

519. Chen HC, Chen GH, Chen YH et al. MicroRNA deregulation and pathway alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer* 2009; 100: 1002-1011.

520. Formosa A, Lena AM, Markert EK et al. DNA methylation silences miR-132 in prostate cancer. *Oncogene* 2013; 32: 127-134.

521. Gallardo E, Navarro A, Vinolas N et al. miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2009; 30: 1903-1909.

522. Hu Z, Dong J, Wang LE et al. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis* 2012; 33: 828-834.

523. Jiao LR, Frampton AE, Jacob J et al. MicroRNAs targeting oncogenes are down-regulated in pancreatic malignant transformation from benign tumors. *PLoS One* 2012; 7: e32068.

524. Shen Y, Li Y, Ye F et al. Identification of miR-23a as a novel microRNA normalizer for relative quantification in human uterine cervical tissues. *Exp Mol Med* 2011; 43: 358-366.

525. Cheng CJ, Bahal R, Babar IA et al. MicroRNA silencing for cancer therapy targeted to the tumour microenvironment. *Nature* 2015; 518: 107-110.

