



**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DE VÍAS  
DE SEÑALIZACIÓN EN SARCOMAS**

**AUTOR:**

**CÉSAR SERRANO GARCÍA**

**DIRECTORES:**

**DR. JOAN CARLES GALCERÁN**

**DR. SANTIAGO RAMÓN Y CAJAL AGÜERAS**

**DRA. CLEOFÉ ROMAGOSA PÉREZ-PORTABELLA**

**PROGRAMA DE DOCTORADO**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**2014**





Tesis presentada para aspirar al grado de Doctor por  
César Serrano García.

Visto bueno Dr. Joan Carles Galcerán

Visto bueno Dr. Santiago Ramón y Cajal Agüeras

Visto bueno Dra. Cleofé Romagosa Pérez-Portabella

En Bellaterra, a 17 de Septiembre de 2014.



# Agradecimientos

A mi director de tesis y mentor, Joan Carles, por acogerme desde que nos conocimos en su unidad, y por acompañarme durante toda la tesis doctoral, Boston y el regreso.

A mi co-director de tesis Santiago Ramón y Cajal, por haberme abierto las puertas a su Departamento como si fuera uno más y por haber iniciado la chispa que ha dado lugar a esta tesis.

A mi co-directora de tesis Cleofé Romagosa, porque has estado a mi lado en todo momento y has sido el apoyo y la ayuda que nunca me ha faltado. Porque esta tesis es sólo el comienzo de los trabajos que están por venir.

A Santi Pérez-Hoyos y Marta Vilaró, por no haberme dejado naufragar en la estadística.

A los compañeros del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron, y muy especialmente a Teresa Moliné Marimón y Sara Simonetti por toda la ayuda que me habéis prestado para que esta tesis doctoral llegara a buen puerto.

A mis compañeros de la Unidad de Tumores Genitourinarios, tumores cerebrales y sarcomas: Rafa Morales, Isaac Núñez, Jordi Rodón y Cristina Suárez. Y a Claudia Valverde, también de la

unidad, que me has acompañado en todo esto desde que empezó siendo únicamente una idea.

A todos mis compañeros del Servicio de Oncología del Vall d'Hebron, y muy especialmente a mis compañeras de residencia Irene Braña García y Eva Muñoz Couselo, que empezamos esta misma aventura los tres juntos.

Al Dr. Joaquín Arribas y a todos los miembros de su laboratorio, vosotros que fuisteis testigos que durante las primeras semanas no hice otra cosa más que escribir.

A Laura, que me has aguantado en todo el proceso de escritura con una estoicidad envidiable - y que además, seguro pensabas que podía estar haciendo alguna otra cosa mejor que esto.

A mis padres, Eugenio y Carmen. Por todo.

A Goran Bregovic y Anour Brahem, que con su música han conseguido suavizar las semanas de análisis y escritura.

# **L'essentiel est invisible pour les yeux**

Antoine de Saint-Exupéry

# Resumen

**Introducción.** Los sarcomas de partes blandas (SPB) del adulto constituyen un grupo de tumores heterogéneo, tanto a nivel fenotípico/morfológico como a nivel molecular, lo cual dificulta su manejo clínico dado que incluye cerca de 50 entidades diagnósticas diferentes. Aunque ha habido numerosos avances científicos en las últimas décadas que han llevado a comprender mejor la biología de los SPB, las principales herramientas diagnósticas, pronósticas y predictoras de beneficio terapéutico continúan siendo clínico-patológicas.

Las vías de transducción de señales desempeñan un papel crucial en el desarrollo y progresión de los SPB en adultos. A pesar de que el diagnóstico de SPB incluye numerosos subgrupos, se considera que las vías de transducción de señales de RAS/MAPK y de PI3K/mTOR son responsables de la proliferación, del comportamiento maligno y el mantenimiento del fenotipo tumoral, independientemente del subtipo tumoral.

**Hipótesis.** El estudio de la expresión y/o de la activación de estas dos vías a diferentes niveles nos permitirá identificar nodos relevantes en la biología de los SPB asociados a malignidad con potencial terapéutico.

**Material y Métodos.** Se evaluaron retrospectivamente las características clínico-patológicas de un total de 166 pacientes con tumores mesenquimales, 68 con tumores benignos y 98 con sarcomas. En cada uno de ellos se llevaron a cabo las siguientes tinciones inmunohistoquímicas para evaluar las vías de RAS/MAPK y PI3K/mTOR: 4EBP1, p4EBP1, pMAPK, pS6, EIF4E, pEIF4E. Se analizaron sus patrones de expresión y se estudió su asociación con características clínico-patológicas y pronósticas.

**Resultados.** Todos los marcadores se encontraron más activados en sarcomas excepto pMAPK, que estaba más expresado en tumores benignos. La hiperactivación de RAS/MAPK medida mediante pMAPK fue factor independiente de mal pronóstico para supervivencia libre de enfermedad (HR 3,32;  $p=0,036$ ) y supervivencia global (HR 6,67 ;  $p<0,001$ ).



# Abstract

**Background.** Adult soft tissue sarcomas (STS) represent a phenotypically, morphologically and molecularly heterogeneous group that includes up to 50 distinctive entities, and subsequently hampers daily clinical management. Several breakthroughs during the past two decades have contributed to a better understanding of these neoplasms. However, the main diagnostic, prognostic and predictive tools remain based on clinical and/or pathologic features.

Abnormalities in signaling occur in most sarcomas and remain crucial in development and malignant progression. Overactivation of RAS/MAPK and PI3K/mTOR growth-factor signaling pathways are responsible of proliferation, aggressiveness, and maintenance of tumoral phenotype regardless the particular subgroup of STS.

**Hypothesis.** Analysis and evaluation of the expression and/or activation of RAS/MAPK and PI3K/mTOR pathways in adult STS will allow us to identify relevant nodes essential for STS prognosis and therapeutics.

**Methods.** The expression of 4EBP1, p4EBP1, pMAPK, pS6, EIF4E and pEIF4E was assessed by immunohistochemistry in 166 formalin-fixed paraffin-embedded samples of mesenchymal tumors (66 benign tumors and 98 STS) to determine RAS/MAPK and PI3K/mTOR pathways activation and correlate with clinicopathological features and survival.

**Results.** All the markers investigated but pMAPK were found overexpressed in STS compared with their corresponding benign lesions. RAS/MAPK pathway hyperactivation – as measured by pMAPK expression – predicted independently impaired relapse-free (HR 3,32;  $p=0,036$ ) and overall survival (HR 6,67 ;  $p<0,001$ ).

# Abreviaturas

4EBP1:	4E-binding protein 1
ADN:	ácido desoxirribonucleico
AJCC:	American Joint Committee on Cancer
ALT:	alternative lengthening of telomeres
ARN:	ácido ribonucleico
CGA:	campos de gran aumento
EGFR:	epidermal growth factor receptor
EIF4E:	eukaryotic initiation factor 4E
FDG:	fluorodeoxiglucosa
FGFR:	fibroblast growth factor receptor
FNCLCC:	French Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer
GDP:	guanosine diphosphate
GEIS:	Grupo Español de Investigación en Sarcomas
GIST:	gastrointestinal stromal tumor
GTP:	guanosine triphosphate
HR:	Hazard ratio
IARC:	International Agency for Research on Cancer
IGF-1R:	insulin growth factor 1 receptor
LMS:	leiomiosarcoma
LPS:	liposarcoma
LPS-BD:	liposarcoma bien diferenciado
LPS-D:	liposarcoma desdiferenciado
LPS-M:	liposarcoma mixoide
LPS-P:	liposarcoma pleomórfico
NCI:	National Cancer Institute
OMS:	Organización Mundial de la Salud
PAAF:	Punción aspirativa con aguja fina
PET:	positron emission tomography
RMN:	resonancia magnética nuclear
RTQ:	receptor tirosín-quinasa
SD:	standard deviation
SEER:	Surveillance, Epidemiology, and End Results program
SG:	supervivencia global
SIDA:	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SLE:	supervivencia libre de enfermedad
SPB:	sarcomas de partes blandas
SPI:	sarcoma pleomórfico indiferenciado
SS:	sarcoma sinovial
TC:	tomografía computarizada
TMVNP:	tumor maligno de la vaina nerviosa periférica
UICC:	Unión internacional contra el cáncer
VEB:	virus de Epstein-Barr

# Tabla de Contenidos

1. Introducción.....	1
1.1. Preámbulo.....	1
1.2. Aspectos clínico-patológicos de los tumores mesenquimales.....	2
1.2.1. Demografía de los sarcomas de partes blandas.....	2
1.2.1.1. Epidemiología.....	2
1.2.1.2. Edad.....	3
1.2.1.3. Sexo.....	4
1.2.1.4. Distribución anatómica.....	4
1.2.2. Etiología.....	5
1.2.2.1. Predisposición genética.....	5
1.2.2.2. Radioterapia.....	6
1.2.2.3. Carcinógenos químicos.....	7
1.2.2.4. Irritación crónica y linfedema.....	7
1.2.2.5. Virus.....	7
1.2.3. Presentación clínica. Diagnóstico.....	8
1.2.3.1. Clínica y evolución natural.....	8
1.2.3.2. Patrón de diseminación.....	8
1.2.3.3. Evaluación diagnóstica.....	9
1.2.3.4. Estudios de imagen.....	9
1.2.3.5. Biopsia.....	10
1.2.4. Anatomía Patológica.....	12
1.2.4.1. Grado.....	12
1.2.4.2. Subtipos histológicos.....	14
1.2.5. Estadiaje.....	17
1.2.6. Tratamiento.....	19
1.2.6.1. Enfermedad localizada.....	19
1.2.6.2. Radioterapia adyuvante/neoadyuvante.....	21
1.2.6.3. Quimioterapia adyuvante/neoadyuvante.....	22
1.2.6.4. Enfermedad diseminada.....	22
1.2.7. Pronóstico. Factores de riesgo asociados a los sarcomas de partes blandas.....	24

1.2.7.1.	Estadio tumoral.....	24
1.2.7.2.	Grado histológico.....	25
1.2.7.3.	Tamaño tumoral.....	25
1.2.7.4.	Localización.....	26
1.2.7.5.	Subtipo histológico.....	26
1.2.7.6.	Márgenes.....	27
1.2.7.7.	Edad.....	27
1.2.7.8.	Factores moleculares predictivos de pronóstico.....	28
1.3.	Biología de los sarcomas.....	30
1.3.1.	Sarcomas citogenéticamente simples.....	30
1.3.2.	Sarcomas citogenéticamente complejos.....	33
1.3.3.	Características biológicas de los tumores objeto de estudio en la presente tesis doctoral.....	35
1.3.3.1.	Tumores benignos.....	35
1.3.3.2.	Tumores malignos (sarcomas).....	36
1.3.4.	Importancia de las vías de PI3K/mTOR y RAS/MAPK en sarcomas de partes blandas.....	40
1.3.4.1.	Vía de PI3K/mTOR.....	40
1.3.4.2.	Vía de RAS/MAPK.....	44
1.3.5.	Factores embudo.....	46
2.	Hipótesis de Trabajo.....	49
3.	Objetivos del Estudio.....	50
4.	Material y Métodos.....	51
4.1.	Sujetos de estudio. Criterio de inclusión.....	51
4.2.	Variables clínicas y anatomopatológicas.....	52
4.3.	Estudio de variables biológicas. Inmunohistoquímica.....	53
4.3.1.	Reactivos y estudio inmunohistoquímico.....	53
4.3.2.	Evaluación de las tinciones inmunohistoquímicas.....	55
4.4.	Análisis estadístico.....	56
5.	Resultados.....	57
5.1.	Población a estudio.....	57
5.1.1.	Selección de casos.....	57
5.1.2.	Características clínico-patológicas.....	61
5.2.	Perfil de expresión de proteínas.....	65

5.2.1. Perfil de expresión de proteínas en toda la población.....	65
5.2.2. Perfil de expresión de proteínas en tumores benignos.....	68
5.2.3. Perfil de expresión de proteínas en sarcomas.....	71
5.3. Asociación entre variables clínico-patológicas y perfil de expresión de proteínas.....	76
5.4. Estudio de la expresión de las proteínas como factores pronósticos clínico-patológicos en sarcomas.....	78
5.4.1. Supervivencia libre de enfermedad.....	78
5.4.1.1. Análisis univariante.....	78
5.4.1.2. Análisis multivariante.....	80
5.4.2. Supervivencia global.....	81
5.4.2.1. Análisis univariante.....	81
5.4.2.2. Análisis multivariante.....	84
5.5. Sarcomas Pleomórficos Indiferenciados.....	86
5.5.1. Supervivencia libre de enfermedad.....	87
5.5.1.1. Análisis univariante.....	87
5.5.1.2. Análisis multivariante.....	90
5.5.2. Supervivencia global.....	91
5.5.2.1. Análisis univariante.....	91
5.5.2.2. Análisis multivariante.....	94
6. Discusión.....	95
6.1. Justificación del estudio.....	95
6.2. La expresión de los marcadores de activación de PI3K/mTOR, pero no los de RAS/MAPK, es superior en patología maligna que en patología benigna.....	96
6.3. La hiperactivación de la vía de RAS/MAPK es un factor independiente de mal pronóstico en sarcomas de partes blandas del adulto.....	98
6.4. La hiperactivación de la vía de RAS/MAPK predice independientemente la recaída precoz en sarcomas pleomórficos indiferenciados.....	101
6.5. Limitaciones.....	102
6.5.1. Selección de casos.....	102
6.5.2. Metodología de la inmunohistoquímica.....	102
7. Conclusiones.....	103
8. Referencias.....	105

# Índice de Figuras

Figura 1. Proceso de selección de los pacientes.....	58
Figura 2. Tinciones representativas de tumores benignos.....	59
Figura 3. Tinciones representativas de sarcomas.....	60
Figura 4. Descriptiva de biomarcadores según tumor benigno/maligno.....	67
Figura 5. Descriptiva de biomarcadores en tumores benignos según subgrupo tumoral.....	69
Figura 6. Descriptiva de biomarcadores en tumores benignos según diagnóstico.....	69
Figura 7. Expresión de pMAPK en tumores benignos.....	71
Figura 8. Expresión de pS6 en tumores benignos.....	71
Figura 9. Inmunotinciones representativas de los biomarcadores objeto de estudios en sarcomas.....	72
Figura 10. Descriptiva de biomarcadores en sarcomas según diagnóstico.....	74
Figura 11. Descriptiva de biomarcadores en sarcomas según subgrupo tumoral.....	75
Figura 12. Estudio de correlación entre niveles de expresión proteica y variables clínico-patológicas en tumores benignos.....	76
Figura 13. Estudio de correlación entre niveles de expresión proteica y variables clínico-patológicas en tumores malignos.....	77
Figura 14. Tinciones representativas de pMAPK en sarcomas.....	85
Figura 15. Kaplan-Meier de la expresión de pMAPK y su relación con SLE.....	89
Figura 16. Kaplan-Meier de la expresión de Ki67 y su relación con SG.....	94

# Índice de Tablas

Tabla 1. Distribución de sarcomas por edad.....	4
Tabla 2. Distribución de los SPB.....	5
Tabla 3. Grado histológico por el sistema FNCLCC.....	13
Tabla 4. Estadíaje TNM de los SPB.....	19
Tabla 5. Supervivencia según TNM.....	25
Tabla 6. Márgenes y recaída.....	27
Tabla 7. Factores pronósticos moleculares.....	29
Tabla 8. Sarcomas con cariotipo simple y translocaciones representativas....	32
Tabla 9. Anticuerpos y condiciones empleadas en el estudio.....	54
Tabla 10. Variables categóricas clínico-patológicas en toda la muestra.....	63
Tabla 11. Recaída en sarcomas.....	64
Tabla 12. Variables categóricas clínico-patológicas en sarcomas.....	65
Tabla 13. Porcentaje de casos positivos para los inmunomarcadores.....	66
Tabla 14. Descriptiva de los biomarcadores para toda la muestra en estudio.	66
Tabla 15. Descriptiva de los biomarcadores según benigno/maligno.....	66
Tabla 16. Descriptiva para los biomarcadores separados según subgrupo tumoral para tumores benignos.....	70
Tabla 17. Descriptiva para los biomarcadores separados según diagnóstico para tumores benignos.....	70
Tabla 18. Descriptiva para los biomarcadores separados según diagnóstico para los tumores malignos.....	74
Tabla 19. Descriptiva para los biomarcadores separados según subgrupo tumoral para sarcomas.....	75
Tabla 20. Variables clínicas y SLE.....	78
Tabla 21. Variables clínicas (tratamiento) y SLE.....	79
Tabla 22. Variables patológicas y SLE.....	79
Tabla 23. Expresión de las diferentes proteínas y SLE.....	80
Tabla 24. Modelo multivariante para SLE.....	81
Tabla 25. Variables clínicas y SG.....	82
Tabla 26. Variables clínicas (tratamiento) y SG.....	82
Tabla 27. Variables patológicas y SG.....	83

Tabla 28. Expresión de las diferentes proteínas y SG.....	84
Tabla 29. Modelo multivariante para SG.....	84
Tabla 30. Descriptiva de las características de la evolución de los pacientes del subgrupo SPI.....	87
Tabla 31. Variables clínicas y SLE para SPI.....	88
Tabla 32. Variables patológicas y SLE para SPI.....	88
Tabla 33. Expresión de las diferentes proteínas y SLE para SPI.....	90
Tabla 34. Modelo multivariante para SLE en SPI.....	91
Tabla 35. Variables clínicas y SG para SPI.....	92
Tabla 36. Variables patológicas y SG para SPI.....	92
Tabla 37. Expresión de las diferentes proteínas y SG en SPI.....	93
Tabla 38. Modelo multivariante para SG en SPI.....	94



# 1

## Introducción

### 1.1. PREÁMBULO

El término *sarcoma* deriva del griego antiguo y literalmente significa blando (*sarcos*) y tumor (*-oma*), o tumor de las partes blandas. En efecto, los sarcomas constituyen un grupo de neoplasias malignas que proceden de aquellos tejidos de origen no epitelial derivados del mesodermo embrionario, es decir, del tejido mesenquimal. Su incidencia es baja, representando aproximadamente un 1% de todos los cánceres del adulto y un 12% dentro de los tumores pediátricos (1, 2). Este origen mesodérmico condiciona que los sarcomas abarquen un espectro histopatológico muy diverso, pudiendo desarrollarse en cualquier parte del organismo que contenga tejido mesenquimal: músculo estriado, músculo liso, tejido fibroso, tejido adiposo, cartílago y hueso. Dada la baja incidencia y la heterogeneidad diagnóstica, el abordaje clínico de los sarcomas es complejo, ya que con frecuencia determinados subgrupos de sarcomas se asocian con características clínicas, histológicas, pronósticas y terapéuticas muy particulares.

Por cuestiones epidemiológicas y clínicas, los sarcomas se dividen en dos grandes grupos: sarcomas de partes blandas (SPB) (80-85%) y sarcomas óseos (15-20%). La presente tesis doctoral está dedicada a estudiar el primer grupo, y concretamente, los subtipos de SPB más frecuentemente observados en la clínica en adultos: sarcoma pleomórfico indiferenciado (SPI), liposarcoma

(LPS), leiomiomasarcoma (LMS) y sarcoma sinovial (SS). También incluimos en este estudio a los tumores malignos de la vaina nerviosa periférica (TMVNP), los cuales, a pesar de tener un probable origen ectodérmico, presentan numerosas similitudes con los SPB en cuanto a comportamiento, historia natural, manejo clínico y pronóstico, considerándose en la práctica sarcomas (1). Por último, esta tesis contiene también un grupo representativo de tumores mesenquimales benignos, con el doble objetivo de caracterizarlos y de usarlos como referencia a la hora de compararlos con sus correspondientes tumores malignos.

## **1.2. ASPECTOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DE LOS TUMORES MESENQUIMALES**

### **1.2.1. DEMOGRAFÍA DE LOS SARCOMAS DE PARTES BLANDAS**

#### **1.2.1.1. Epidemiología**

Desde un punto de vista epidemiológico existe escasa información relativa a los patrones de incidencia y supervivencia de los SPB, principalmente debido a los numerosos diagnósticos y localizaciones que se incluyen bajo la denominación de SPB, y también porque, en la mayoría de las ocasiones, los carcinomas son mucho más numerosos que los sarcomas en casi cualquier localización, con lo cual quedan olvidados en las estadísticas globales que incluyen todos los tipos de cáncer.

La amplia mayoría de los tumores de origen mesenquimal son benignos: aproximadamente, los tumores mesenquimales benignos son 100 veces más frecuentes que los malignos (1). Así, mientras que la incidencia global de tumores mesenquimales benignos se estima en 3.000 casos por millón de habitantes y año, la incidencia anual de los sarcomas es de 30 casos por millón de habitantes (1, 3).

Se ha estimado la incidencia aproximada de los SPB en diversas series, de origen norteamericano y europeo. En ambas localizaciones geográficas los SPB constituyen aproximadamente un 1% de todos los cánceres, con una incidencia inferior a 5 casos por cada 100.000 habitantes y año. En los Estados Unidos, el número absoluto de casos estimados para el año 2014 fue de 12.020, de los cuales 6.550 se producen en hombres y 5.470 en mujeres. En torno a una tercera parte de los pacientes diagnosticados de sarcoma (4.740 pacientes, 2.550 hombres y 2.190 mujeres) morirán como consecuencia de su tumor (1, 4).

Los datos epidemiológicos sobre sarcomas en Europa se han publicado recientemente, y por primera vez, en el *European Journal of Cancer*. La incidencia cruda de sarcomas en Europa es de 5,6 casos por 100.000 habitantes y año, estimándose un total de 27.908 casos anuales, de los cuales un 84% son SPB y 15% sarcomas óseos (5). Con respecto a los SPB, la incidencia cruda total anual se estima en 4,7 casos por 100.000 habitantes y año. No existe un estudio que proporcione datos epidemiológicos específicos para la población española. No obstante, la incidencia anual de SPB parece estar, según datos del IARC (6), entre 1 y 2 casos por 100.000 habitantes, lo cual es consistente con los datos publicados en los registros internacionales previamente mencionados en los que todos cifran esta incidencia en menos de 5 casos por 100.00 habitantes.

#### **1.2.1.2. Edad**

Los SPB aparecen a cualquier edad, aunque su incidencia se incrementa con la edad en todas las localizaciones excepto para aquellos sarcomas cuya localización primaria sea en las regiones paraorbital y cardiaca (1). Así, en la serie europea se aprecia claramente el incremento progresivo de la incidencia anual por 100.000 habitantes de los SPB paralelamente al incremento de edad: 0,9 de 0 a 14 años; 1,3 de 15 a 24 años; 4,4 de 25 a 64 años; y 13,1 para mayores de 65 años. En cambio, el patrón de sarcomas óseos es inverso, presentando una incidencia decreciente con la edad. Este patrón de incidencia dependiente de la edad se puede observar en la siguiente

tabla de datos del SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results program)(3-5) (tabla 1).

Localización	>20	20-34	35-44	45-54	55-64	65-74	75-84	85+	Todos	Casos
Todos los cánceres	1'1	2'7	5'9	13'6	20'9	25'8	22'6	7'4	100	1.671.579
Óseos	28'7	16'5	11'5	13'0	10'1	8'6	7'8	3'8	100	3.368
SPB	10'4	10'8	11'5	15'1	15'1	15'4	15'8	5'9	100	11.229

Tabla 1. Distribución por edad en casos incidentes, 2000-2004. Fuente: National Cancer Institute, SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004, Table I-10.

### 1.2.1.3. Sexo

No existen diferencias notables en cuanto a distribución por sexo, si bien los datos epidemiológicos y de supervivencia publicados anualmente por la American Cancer Society ponen de manifiesto que existe una proporción ligeramente superior de SPB en hombres que en mujeres. En cambio, la distribución total por sexo en el estudio europeo parece ser ligeramente superior en mujeres (5,0) que en hombres (4,4), aunque esto se explica debido a que la incidencia de sarcomas uterinos (1,0) y de mama (0,4) es claramente superior a la incidencia de sarcomas paratesticulares en varones (0,1); en el resto de subtipos la incidencia de SPB sí que es, de manera consistente, ligeramente superior en hombres que en mujeres. Estos resultados epidemiológicos coinciden con los obtenidos en una serie francesa que además contaba con la revisión central del diagnóstico, y en la que la incidencia total era de un 52% en varones y un 48% en mujeres (3-5, 7).

### 1.2.1.4. Distribución anatómica

Los sarcomas proceden de células mesenquimales y pueden crecer prácticamente en cualquier localización anatómica. Las extremidades constituyen la localización primaria más frecuente de los sarcomas, siendo específicamente las extremidades inferiores el lugar más común al diagnóstico (8). El resto de localizaciones es variable dependiendo de las series, si bien es cierto que los sarcomas retroperitoneales, viscerales y uterinos constituirían el

segundo subgrupo en incidencia tras los sarcomas de las extremidades. Otras localizaciones como cabeza y cuello, mama, dermis y sistema nervioso central son claramente infrecuentes (Tabla 2).

Sí que es importante resaltar que, por razones anatómicas, la localización de los sarcomas es un factor determinante del tamaño de los SPB al diagnóstico: los tumores de las partes distales de las extremidades y de la cabeza y el cuello suelen ser pequeños porque son clínicamente aparentes de manera más temprana, en comparación con tumores de las regiones proximales de las extremidades o del retroperitoneo, que llegan a tener un gran tamaño.

Localización	Incidencia (%)*
Extremidad inferior	40
Extremidad superior	20
Retroperitoneo y visceral	20
Tronco	10
Cabeza y cuello	10

Tabla 2. Distribución anatómica de los SPB. Fuente: Clark MA, et al.(9)

\*Los porcentajes son aproximados.

## 1.2.2. ETIOLOGÍA

Los SPB se consideran tumores esporádicos que aparecen *de novo*, sin haberse demostrado de manera fehaciente la existencia de un proceso de malignización de una lesión benigna pre-existente. En la mayoría de los casos tampoco existe ningún elemento etiológico identificable. Únicamente en una pequeña proporción de pacientes pueden encontrarse uno o varios de los siguientes factores predisponentes: mutaciones genéticas, radioterapia, carcinógenos químicos, irritación crónica, linfedema, y virus en pacientes inmunocomprometidos.

### 1.2.2.1. Predisposición genética

El síndrome de Li-Fraumeni es una enfermedad hereditaria autosómica dominante ocasionada por una mutación germinal en el gen supresor tumoral p53 (10). Se caracteriza principalmente por un incremento y una aparición más precoz de SPB y sarcomas óseos. Cáncer de mama, tumores cerebrales, leucemias y tumores adrenocorticales también se asocian con una mayor frecuencia, especialmente antes de los 45 años (11).

Retinoblastoma. La pérdida de ambas copias del gen supresor tumoral RB1 ocasiona una pérdida del control del ciclo celular y contribuye a incrementar la incidencia de osteosarcomas y SPB en largos supervivientes de retinoblastomas, especialmente en individuos con historia de enfermedad unilateral e historia familiar positiva, o con enfermedad bilateral (12, 13). Esta incidencia se ve incrementada en casos en los que haya habido exposición previa a agentes que producen roturas del ADN, como la radioterapia y determinados tipos de quimioterapia. Las histologías predominantes son leiomioma, fibrosarcoma, sarcoma pleomórfico indiferenciado, rhabdomioma y liposarcoma (14).

La neurofibromatosis tipo I o Enfermedad de von Recklinghausen es un síndrome familiar que consiste en la pérdida de función de ambas copias del gen supresor tumoral *NF1* (una por vía germinal y otra por vía somática) con la consiguiente desregulación oncogénica de la vía de RAS (15). Estos pacientes tienen múltiples neurofibromas que pueden malignizarse en TMVNP, observándose, por lo tanto, con una mayor frecuencia que en la población general. Presentan también una mayor incidencia de varios tipos de neoplasias, tanto de origen neural como no neural; entre los sarcomas, son más incidentes los rhabdomiomas y los tumores del estroma gastrointestinal (GIST, en su acrónimo en inglés) (16).

#### **1.2.2.2. Radioterapia**

La radiación ionizante es una causa reconocida de cáncer en general y de SPB y osteosarcomas en particular. Su riesgo se incrementa especialmente en pacientes que han recibido radioterapia de forma terapéutica para un cáncer

previo. El subtipo de SPB más frecuentemente asociado a la radioterapia es el SPI, excepto en mujeres con irradiación previa por un cáncer de mama, en cuyo caso la histología más frecuente es el angiosarcoma. Su incidencia se incrementa con la dosis y con el periodo de observación tras la radioterapia. El curso es más agresivo; no obstante, la incidencia es baja (0,5% de todos los SPB son producidos por radioterapia) (17).

#### **1.2.2.3. Carcinógenos químicos**

La relación más clara existente entre la exposición a determinados compuestos químicos industriales y SPB es la descrita entre angiosarcoma hepático tras la exposición a cloruro de vinilo y el arsénico (18, 19). Es posible que los herbicidas fenoxi y las dioxinas puedan ser elementos causales de SPB, pero esta relación es menos clara (20).

#### **1.2.2.4. Irritación crónica y linfedema**

La presencia de un linfedema crónico y masivo (elefantiasis) como agente etiológico de SPB ha sido descrito clásicamente como el síndrome de Stewart-Treves. Ocurre típicamente en linfedemas tras mastectomía, y la histología predominante es la de angiosarcoma (21).

#### **1.2.2.5. Virus**

Existe una relación causal entre infección por el virus de Epstein-Barr (VEB) y leiomioma en pacientes severamente inmunocomprometidos, como en determinadas fases de SIDA, así como en pacientes con trasplante renal, cardíaco o hepático. La mayor parte de los leiomiomas asociados a infección por el VEB tienen lugar durante la adolescencia-juventud y se desarrollan en órganos que tradicionalmente no se consideran localizaciones típicas de los leiomiomas (22).

### **1.2.3. PRESENTACIÓN CLÍNICA. DIAGNÓSTICO**

#### **1.2.3.1. Clínica y Evolución Natural**

Los síntomas y signos clínicos que acompañan al diagnóstico de los SPB son inespecíficos, varían dependiendo de la localización anatómica en la que se encuentren, y generalmente son consecuencia de la afectación de estructuras adyacentes durante su crecimiento, que en los SPB es de tipo expansivo, y rara vez infiltrante o destructivo. Por ello es frecuente que los sarcomas se encuentren rodeados de una pseudocápsula, consistente en tejido normal comprimido, si bien los márgenes del tumor se encuentran escasamente definidos.

En el caso de SPB del tronco y de las extremidades, la forma más habitual de presentación es el hallazgo incidental de una masa indolora de crecimiento paulatino. En este caso, el diagnóstico diferencial con patología benigna es complicado, aunque existen signos de alarma que ayudan al diagnóstico diferencial, como el incremento de tamaño, la presencia de dolor, un tamaño por encima de 5 centímetros y la profundidad (23). Estos tumores pueden llegar a ser muy grandes antes de que generen ningún síntoma en regiones anatómicas como el retroperitoneo, donde hay espacio suficiente para un crecimiento expansivo antes de producir síntomas derivados de la compresión de estructuras, como dolor, parestesias o edema en las extremidades inferiores. En cambio, los síntomas serán más precoces en localizaciones anatómicas más comprometidas, como en el cerebro o el mediastino. Por último, estaría el grupo de síntomas específicos de cada localización anatómica, como los que puede provocar un sarcoma uterino, o un leiomioma de vena cava inferior. En rara ocasión los pacientes presentan síntomas constitucionales como fiebre o pérdida de peso.

#### **1.2.3.2. Patrón de diseminación**

A diferencia de otras neoplasias, los SPB rara vez metastatizan por vía linfática, siendo la vía hematogena la que predominantemente ocasiona la diseminación a distancia, sobre todo en los pulmones. En torno a un 10% de



los SPB se presenta inicialmente al diagnóstico con metástasis, y en este caso, en 4 de cada 5 pacientes estarán localizadas en los pulmones, existiendo mayor riesgo de afectación metastásica si el tumor primario es grande, profundo, de alto grado, y con determinadas histologías (TMVNP) (24).

Por otro lado, en torno a un 25% de los pacientes con SPB recaerán a distancia tras un correcto manejo del tumor primario (24, 25), principalmente en los pulmones. Esta incidencia puede llegar a ser de hasta el 50% en tumores con un tamaño superior a los 5 cm, profundos, y de grado intermedio-alto (26, 27). Dentro de los subgrupos tumorales incluidos en el estudio de la presente tesis doctoral hay un notable excepción: los liposarcomas retroperitoneales (especialmente los bien diferenciados), que recurren loco-regionalmente y rara vez metastatizan a distancia.

### **1.2.3.3. Evaluación Diagnóstica**

La evaluación inicial de cualquier SPB incluye una anamnesis en la que se determina cuándo ha sido detectada la masa, el ritmo de crecimiento, y los síntomas que ocasiona. En la exploración física se valorará el tamaño y la profundidad de la masa, la fijación a estructuras adyacentes, y se descartarán signos que requieran acciones urgentes por compresión vascular o nerviosa.

Un problema común en el diagnóstico de los SPB es el retraso diagnóstico debido a la naturaleza indolora de la masa y a su confusión con patología benigna, 100 veces más frecuente. Los criterios establecidos en el Reino Unido para referir de manera urgente a un paciente con sospecha de sarcoma han sido ya mencionados anteriormente e incluyen: incremento de tamaño, la presencia de dolor, tamaño por encima de 5 centímetros y la profundidad (23). De éstos, el factor con mayor poder predictivo de malignidad es la profundidad de la masa (28).

### **1.2.3.4. Estudios de imagen**

Es aconsejable realizar radiografías de la región afectada, dado que permiten acotar el diagnóstico diferencial al evaluar la existencia de

calcificaciones (osteosarcoma extraesquelético y sarcoma sinovial) y descartar el origen óseo de una masa de partes blandas.

La tomografía computarizada (TC) y la resonancia magnética nuclear (RMN) son las pruebas diagnósticas más comúnmente empleadas. La RMN parece ser superior a la CT para valorar la extensión de la neoplasia y su relación con estructuras adyacentes en extremidades, tronco y cabeza y cuello (29-32), mientras que la TC es la técnica de elección para los sarcomas retroperitoneales.

En la estadificación de la enfermedad metastásica se recomienda radiografía simple de tórax y TC abdominal en determinadas histologías (sarcomas retroperitoneales, liposarcomas mixoide, sarcoma epitelioides, angiosarcoma y leiomiomasarcoma). En caso de que la enfermedad pulmonar sea reseccable (menos de 5 nódulos) o ante signos de sospecha radiográficos, se recomienda confirmación mediante TC (33, 34). Pruebas dirigidas a la evaluación ósea o cerebral pueden ser útiles en determinadas situaciones.

No se recomienda realizar de manera rutinaria PET o el PET/TC de fluorodeoxiglucosa (FDG) en la evaluación inicial de los SPB (35-37). Aunque diversos estudios sugieren que el PET puede emplearse en el diagnóstico diferencial entre patología benigna y sarcomas de alto grado (38), o para predecir el riesgo de recaída sistémica tras la quimioterapia neoadyuvante (39), rara vez se indica bajo estas circunstancias. Por otro lado, el beneficio potencial que puede tener el PET para detectar metástasis ocultas extrapulmonares no modifica la actitud terapéutica (40), por lo que tampoco se recomienda su uso en esta situación.

#### **1.2.3.5. Biopsia**

Se recomienda realizar biopsia siempre que sea posible, ya que el examen histológico inicial de los SPB es esencial para el diagnóstico y el plan terapéutico. El objetivo de la biopsia consiste en obtener el subtipo histológico y el grado. La realización de la biopsia diagnóstica debe ser planificada con

precaución: por un lado, se intentará realizar antes de la RMN, para evitar que el edema post-biopsia artefactúe la interpretación de las imágenes; por otro lado, se tiene que realizar de tal modo que proporcione tejido necesario para el diagnóstico y al mismo tiempo que no dificulte la cirugía definitiva.

Existen tres modalidades de biopsia:

1. Biopsia cerrada (tru-cut). Es considerada el método de elección en la actualidad debido a la baja incidencia de complicaciones y a la alta rentabilidad diagnóstica (41). Tanto el TC como la ecografía, pero muy especialmente la RMN dinámica con contraste pueden ayudar a guiar la biopsia cerrada para incrementar el rendimiento diagnóstico en lesiones profundas o cuando existen áreas quísticas y necróticas, permitiendo seleccionar el área biopsiada (42, 43).
2. Biopsia abierta (incisional). Ha sido históricamente la técnica de elección, pero hoy en día se considera que la biopsia cerrada contiene suficiente material para el diagnóstico. Estará indicada la biopsia incisional en aquellos casos en los que la biopsia cerrada no sea diagnóstica y también cuando se requiera material adicional para citometría de flujo o estudios citogenéticos, se puede considerar la biopsia incisional.
3. Punción aspirativa con aguja fina (PAAF). Está indicada para confirmar la presencia de recidiva o enfermedad metastásica de un SPB ya conocido, por lo que, salvo en centros con gran experiencia, no se recomienda como diagnóstico inicial.

Con el uso de las biopsias cerradas se puede determinar el subtipo y el grado tumoral en un 80% de las ocasiones, y en el caso de ser evaluadas por patólogos con experiencia en SPB, la precisión diagnóstica alcanza 95-99% (44, 45).

## **1.2.4. ANATOMÍA PATOLÓGICA**

El diagnóstico anatomopatológico de los SPB se basa principalmente en la morfología y en la inmunohistoquímica, y debe realizarse de acuerdo a la clasificación de sarcomas publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2013 (1). Es posible que no pueda establecerse el diagnóstico definitivo a pesar del estudio morfológico e inmunohistoquímico. En este caso podría estar indicado su estudio molecular (detección de translocaciones, fusiones génicas o mutaciones en genes claves) en las siguientes situaciones: variante morfológica poco habitual de un subtipo de sarcoma; sarcoma con aspecto morfológico habitual, pero en una edad y/o localización anómalas. El informe anatomopatológico de una biopsia tru-cut debe contener: el tipo histológico, el grado histológico y el resultado de las pruebas complementarias que se han llevado a cabo (inmunohistoquímica y/o biología molecular).

### **1.2.4.1. Grado**

Como he mencionado anteriormente, la OMS distingue más de 50 subtipos de sarcomas. Esta complejidad dificulta la predicción del curso clínico y la evolución natural que va a tener cada neoplasia de manera individual, con lo que el manejo terapéutico de los pacientes puede ser subóptimo.

Existen múltiples sistemas para determinar el grado (46-50). Aunque históricamente los dos sistemas más utilizados en los SPB han sido el del NCI (United States National Cancer Institute) y el de la FNCLCC (French Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer), las últimas recomendaciones de la OMS establecen el de la FNCLCC como el estándar (1). El primero utiliza una combinación del tipo histológico, celularidad, pleomorfismo y tasa mitótica para los grados 1 y 3. El resto de tipos de sarcoma se clasifican como grados 2 y 3 dependiendo de la cantidad de necrosis tumoral, siendo 15% el límite entre ambos grados (51). El sistema de la FNCLCC establece una puntuación tras evaluar los siguientes tres parámetros: diferenciación tumoral, número de mitosis y cantidad de necrosis tumoral (52, 53) (Tabla 3). Cada parámetro obtiene una puntuación independiente y el grado final se calcula sumando las

tres puntuaciones. Guillou et al. realizó un estudio comparativo de ambos sistemas (NCI y FNCLCC) en un subgrupo de 410 pacientes, y observó que el sistema del NCI incluía más pacientes como grado intermedio (grado 2), mientras que el FNCLCC presentaba una mejor correlación con supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad, por lo que es el sistema más empleado en la actualidad (1, 54).

En el estudio de Coindre *et al.* se demostró que, de todos los factores pronósticos evaluados, el grado determinado mediante el sistema FNCLCC fue el factor más importante para predecir aparición de metástasis en sarcomas pleomórficos indiferenciados, sarcomas no-clasificados y sarcomas sinoviales, y el segundo y el tercero en leiomiomas y liposarcomas respectivamente. No obstante, cabe matizar que el grado 1) es factor pronóstico dependiente de cada subtipo histológico, en tanto que se considera que el tipo específico de cada sarcoma influye más, de manera global, en el pronóstico que el grado en sí, y 2) no es aplicable a todos los subtipos de SPB, y que los parámetros evaluados tienen un significado distinto en cada uno de los subtipos. Así, no se recomienda su uso en angiosarcoma, condrosarcoma extraesquelético mixoide, sarcoma alveolar de partes blandas, sarcoma de células claras y sarcoma epitelioides (54, 55).

#### **Diferenciación Tumoral**

1 punto	Gran parecido al tejido mesenquimal normal
2 puntos	Subtipo histológico identificable
3 puntos	Sarcomas indiferenciados, embrionarios, subtipo dudoso, sarcomas sinoviales, osteosarcomas, PNET

#### **Mitosis**

1 punto	0-9 mitosis / 10 CGH
2 puntos	10-19 mitosis / 10 CGH
3 puntos	≥ 20 mitosis / 10 CGH

#### **Necrosis tumoral**

0 puntos	No necrosis
1 punto	<50% necrosis
2 puntos	≥ 50% necrosis

<b>Grado Histológico</b>	<b>Puntuación total</b>
Grado 1	2, 3
Grado 2	4, 5
Grado 3	6, 7, 8

Tabla 3. Grado histológico por el sistema FNCLCC

#### **1.2.4.2. Subtipos histológicos**

La OMS clasifica a los SPB de acuerdo con el presunto tejido de origen, existiendo además distintas variantes dentro de cada subtipo. En algunos casos la histogénesis es incierta y la nomenclatura refleja la apariencia morfológica de las células o el patrón arquitectónico (ej. sarcoma alveolar). En total, se han descrito más de 50 subtipos distintos de sarcoma (óseos y de partes blandas). En cuanto a los SPB, según el origen quedarían englobados en los siguientes subgrupos:

- Tumores adipocíticos.
- Tumores fibroblásticos / miofibroblásticos.
- Tumores fibrohistiocitarios.
- Tumores del músculo liso.
- Tumores del músculo estriado.
- Tumores pericíticos (perivasculares)
- Tumores vasculares
- Tumores de la vaina nerviosa.
- Tumores con diferenciación incierta.
- Sarcomas indiferenciados/sin clasificar

Después de los GIST, los subtipos de SPB más frecuentes son SPI, leiomiomas, liposarcomas, sarcomas sinoviales y TMVNP (52, 56). Es difícil determinar cuál es el subtipo más frecuente, ya que la incidencia varía con las series y no en todas se realiza una revisión diagnóstica, por lo que no se puede afirmar más allá de que los sarcomas pleomórficos indiferenciados,

los leiomiomas y los liposarcomas son los SPB que más frecuentemente se observan en la clínica (5, 7, 52).

Los sarcomas pleomórficos indiferenciados (antiguamente histiocitoma fibroso maligno) han sido tradicionalmente considerados como el subtipo de SPB más frecuente. Sin embargo, muchos sarcomas diagnosticados originalmente como SPI pueden ser reclasificados en otros subtipos tras un correcto análisis inmunohistoquímico (57). Hoy en día se reserva este término para aquellos sarcomas que carecen de una línea específica de diferenciación, habiéndose convertido en un diagnóstico de exclusión (1). Es posible que los SPI consistan en un grupo heterogéneo de neoplasias sin nada en común más que estar todas ellas muy poco diferenciadas (58), si bien un estudio reciente sugiere que los SPI pudieran proceder de células madre mesenquimales tras la pérdida de la señalización de Wnt (59).

Los leiomiomas constituyen un subtipo de SPB que proceden del músculo liso, con lo que pueden encontrarse prácticamente en cualquier localización. Histológicamente presentan un patrón característico formado por fascículos de células fusiformes con citoplasma eosinofílico y alargado y núcleo hipercromático. Dada la estirpe muscular lisa de la que proceden, la mayoría de los leiomiomas reaccionan con tinciones inmunohistoquímicas con actina, desmina y h-caldesmon, aunque estos marcadores no son completamente específicos. Al igual que el resto de los SPB, la incidencia global de los leiomiomas aumenta con la edad, excepto en el subgrupo específico de leiomiomas uterinos, en el que la edad predominante está en torno a la perimenopausia (60). La incidencia en cuanto al sexo varía según la localización, siendo los leiomiomas retroperitoneales y de vena cava inferior mayoritarios en mujeres (61), mientras que en el resto de localizaciones hay una predominancia leve a favor de los varones (62).

Al igual que en el resto de los SPB, no existe evidencia sólida que demuestre que los leiomiomas (el tumor mesenquimal benigno derivado del músculo liso) puedan llevar a cabo un proceso de malignización (63).

El diagnóstico de liposarcoma incluye un subgrupo heterogéneo de neoplasias mesenquimales malignas de estirpe lipogénica, cada una de las cuales presenta una biología, una apariencia histológica y un comportamiento clínico diferente y distintivo. Así, los liposarcoma se pueden dividir en 4 subtipos (1, 64):

1. LPS bien diferenciado (LPS-BD)/tumor lipomatoso atípico (40-45% de todos los LPS).
2. LPS desdiferenciado (LPS-D) (5%).
3. LPS mixoide (LPS-M) (30-35%).
4. LPS pleomórfico (LPS-P) (<15%).

El origen lipogénico es evidente en LPS-BD, donde se pueden ver lipoblastos junto con células estromales atípicas en un contexto de grasa madura. A medida que los tumores van perdiendo la diferenciación, los LPS van tomando una apariencia más parecida a cualquier otro SPB, pudiendo perder incluso el componente adipocítico. En cambio, los lipomas están formados exclusivamente de adipocitos maduros y tienen una localización subcutánea, mientras que los LPS son profundos. Desde un punto de vista clínico, la determinación del grado tumoral en los LPS es clave, ya que determina el pronóstico y el manejo terapéutico. Los LPS-BD se consideran como bajo grado, ya que no tienen potencial metastásico y tienen un pronóstico muy favorable: únicamente 11% morirán como consecuencia de su enfermedad (65). Los LPS-M se consideran actualmente de grado intermedio (66). En cambio, los LPS-D y los LPS-P se clasifican como tumores de alto grado, con una tasa de mortalidad debido a la enfermedad de 28% y 35-50% respectivamente (67-69).

Los TMVNP derivan probablemente del ectodermo y tienen su origen anatómico en los nervios periféricos. Aparecen frecuentemente en el tronco, cabeza y cuello y extremidades, y en ocasiones resulta complicado realizar el diagnóstico diferencial debido a que presentan diversos patrones histomorfológicos. La presencia de una tinción positiva para S-100, aunque informativa, no es diagnóstica ya que no se expresa en todos los TMVNP. Aproximadamente el 50% de estos tumores se dan en el contexto de



neurofibromatosis tipo I, en cuyo caso resulta de la degeneración de neurofibromas plexiformes. La neurofibromatosis tipo I incrementa de manera sustancial el riesgo de desarrollar TMVNP: así, los pacientes con este síndrome tienen un riesgo del 8-13% (70), con una incidencia anual estimada del 0'16%, mientras que en la población general es del 0,001% (71).

Aunque el nombre de sarcoma sinovial induzca a pensar que estos tumores proceden de las células sinoviales, el origen es desconocido. Se observa más frecuentemente en adultos jóvenes, varones, y en las extremidades inferiores: el 90% de los casos ocurre por debajo de los 50 años, especialmente entre los 15 y los 35 años (72).

Los sarcomas sinoviales son tumores mesenquimales con cierto grado de diferenciación epitelial, y que presentan una translocación específica, t(X;18) (p11;q11). Histológicamente, los sarcomas sinoviales pueden ser bifásicos o monofásicos. El sarcoma sinovial bifásico tiene componentes epiteliales y fusocelulares en proporciones variables, mientras que el monofásico presenta únicamente una apariencia fusocelular. Aproximadamente el 90% de los sarcomas sinoviales expresan citoqueratinas en el componente epitelial. CD99, S100 y BCL-2 también se expresan en los sarcomas sinoviales y ayuda al diagnóstico diferencial.

### **1.2.5. ESTADIAJE**

El método más extendido para el estadiaje de los SPB es la 7ª edición del sistema TNM desarrollado por la International Union Against Cancer (UICC) y por el American Joint Committee on Cancer (AJCC). Este sistema utiliza el tamaño tumoral (T), la profundidad (superficial o profundo), la afectación ganglionar (N), la presencia o ausencia de metástasis (M) y el grado histológico (G) para determinar el estadio de los SPB (73) (Tabla 4). Las características específicas son las siguientes:

### **Tumor Primario (T)**

**TX** Tumor primario no evaluable

**T0** Sin evidencia de tumor primario

**T1** Tumor 5 cm o menos en su dimensión mayor\*

**T1a** Tumor superficial

**T1b** Tumor superficial

**T2** Tumor con más de 5 cm en su dimensión mayor \*

**T2a** Tumor superficial

**T2b** Tumor superficial

### **Ganglios linfáticos regionales (N)**

**NX** Ganglios linfáticos no evaluables

**N0** Sin invasión ganglionar

**N1** Metástasis en los ganglios linfáticos regionales

### **Metástasis a distancia (M)**

**M0** Sin metástasis a distancia

**M1** Metástasis a distancia

### **Grado histológico (G)**

**GX** Grado no puede ser evaluado

**G1** Grado 1

**G2** Grado 2

**G3** Grado 3

<b>ESTADIAJE TNM DE LOS SPB</b>				
Estadio IA	T1a	N0	M0	G1, GX
	T1b	N0	M0	G1, GX
Estadio IB	T2a	N0	M0	G1, GX
	T2b	N0	M0	G1, GX
Estadio IIA	T1a	N0	M0	G2, G3
	T1b	N0	M0	G2, G3
Estadio IIB	T2a	N0	M0	G2
	T2b	N0	M0	G2
Estadio III	T2a, T2b	N0	M0	G3
	Cualq. T	N1	M0	Cualq. G
Estadio IV	Cualq. T	Cualq. N	M1	Cualq. G

Tabla 4. Estadiaje TNM de los SPB, 7ª edición AJCC (2010)

Uno de los principales problemas que plantea el sistema TNM de la AJCC es que no incorpora información respecto a determinadas histologías ni a localizaciones anatómicas concretas con valor pronóstico conocido, por lo que el uso de este sistema de estadiaje fuera de las extremidades no se encuentra tan extendido (ej.: tumores retroperitoneales). Cabe añadir también que existen otros sistemas TNM órgano-específicos (ej.: sarcomas uterinos).

## 1.2.6. TRATAMIENTO

### 1.2.6.1. Enfermedad Localizada

#### Cirugía

La cirugía es, a día de hoy, el único tratamiento que se considera curativo en el manejo de los SPB localizados. El principio básico de toda cirugía es la resección en bloque del tumor junto con un rodete de tejido sano, para así evitar la posible contaminación procedente de los tejidos residuales de la superficie tumoral, y también para eliminar lesiones microsátélites que

pueden estar presentes en el tejido sano que rodea la pseudocápsula. Se han descrito dos factores que condicionan la extensión de la cirugía y los márgenes: el subtipo histológico y la presencia de barreras biológicas intactas, como una fascia muscular, una adventicia vascular, periostio o perineuro (74). Por lo tanto, el equipo quirúrgico ha de hacer siempre todo lo posible para evitar una cirugía con márgenes positivos, ya que se asocia con una peor supervivencia global (ver abajo Sección: Pronóstico) (75).

El planteamiento y el procedimiento quirúrgico varían según la localización tumoral:

*SPB en extremidades y tronco.* El objetivo es lograr una resección quirúrgica conservadora de miembro y de función a la vez que se intentará conseguir unos márgenes amplios. Únicamente se planteará la posibilidad de amputación cuando no sea posible conseguir márgenes amplios y/o de reconstrucción funcional del miembro. El procedimiento se tiene que planear previamente en base a estudios radiológicos y tener en consideración no sólo el tumor entero (evitando la ruptura de la pseudocápsula), sino también un margen de 1-2 cm de tejido sano (74, 76). Si existe infiltración ósea o vascular, será necesario llevar a cabo resecciones que incluyan el periostio o los vasos, y una reconstrucción posterior. Finalmente, es necesario tener en cuenta el subtipo histológico específico, ya que por ejemplo los mixofibrosarcomas requieren unos márgenes de resección más amplios.

*SPB retroperitoneales.* Para realizar apropiadamente resecciones de SBP retroperitoneales es necesario conocer los límites del tumor ya que el procedimiento quirúrgico requiere una resección multiorgánica agresiva en la que se extrae en bloque el tejido adiposo y los órganos que rodean a la masa tumoral con el objetivo de lograr unos márgenes limpios y evitar la contaminación por células neoplásicas (77). En estas cirugías no es infrecuente reseccionar estructuras como el riñón ipsilateral, parte del colon y mesocolon, parte del psoas, cola del páncreas y bazo. En otras ocasiones la cirugía puede conllevar una mayor comorbilidad ya que es necesario ampliar la resección a otras estructuras como la aorta, vena cava inferior, vasos ilíacos, nervio femoral, diafragma, duodeno, cabeza de páncreas e hígado (78). Este

procedimiento quirúrgico agresivo es beneficioso en pacientes con SPB retroperitoneales, especialmente cuando el riesgo de diseminación sistémica no es elevado (79-82).

### **1.2.6.2. Radioterapia adyuvante/neoadyuvante**

#### SPB en extremidades y tronco.

El objetivo final de la radioterapia consiste en tratar los márgenes quirúrgicos para minimizar el riesgo de recurrencia, no necesariamente para inducir una reducción en el tamaño del tumor *per se*. En un estudio clásico del NCI, Yang JC y col. demostraron que la radioterapia adyuvante disminuye la tasa de recurrencia de manera significativa en SPB, especialmente si son tumores de alto grado, si bien este beneficio no tiene impacto en la supervivencia global (83). En la mayoría de las series que se han publicado posteriormente se han corroborado estos datos: la radioterapia adyuvante disminuye la recurrencia local de un 20-30% a un 0-10%, aunque no modifica la supervivencia global. No hay diferencias en términos de recurrencia local ni supervivencia entre la administración de radioterapia adyuvante o neoadyuvante, aunque la radioterapia adyuvante dobla la tasa de complicaciones tempranas de la herida quirúrgica (35% vs. 17%) (84), si bien presenta menor número de complicaciones tardías y fibrosis tisular (85). De acuerdo con las guías clínicas, la radioterapia está indicada en todos los casos de SPB de alto grado, localización profunda y tamaño superior a 5 cm. Hay determinadas circunstancias particulares en las que también se recomienda el tratamiento radioterápico aunque se incumplan las recomendaciones previamente mencionadas (35-37).

#### SPB retroperitoneales.

El papel de la radioterapia neo/adyuvante en SPB retroperitoneales es controvertido, puesto que no hay resultados de ningún ensayo clínico fase III aleatorizado, únicamente series retrospectivas o de un único brazo de tratamiento (86, 87). Además, a la hora de calcular beneficios/riesgos de un procedimiento que no está aún validado, hay que considerar que el campo de

radiación abdominal incluye órganos vitales y radiosensibles, como el hígado y el intestino delgado, junto con los amplios límites del campo de radiación.

### **1.2.6.3. Quimioterapia adyuvante/neoadyuvante**

La quimioterapia sistémica es un tratamiento de rutina en muchos sarcomas de la infancia y adolescencia (especialmente sarcomas óseos), pero su uso sigue siendo aún controvertido en los SPB de adultos.

Debido a que aproximadamente de un 25 a un 50% de los pacientes con SPB desarrollan enfermedad metastática, se ha investigado activamente el uso de quimioterapia adyuvante para evitar la recaída a distancia e incrementar la supervivencia global. La evidencia disponible hasta la fecha a través de casi dos decenas de ensayos clínicos y dos metaanálisis es la siguiente:

- El régimen óptimo de quimioterapia adyuvante debe ser la combinación de antraciclinas con, preferentemente, ifosfamida.
- La quimioterapia adyuvante mejora, o al menos retrasa, la tasa de recaídas local y a distancia.
- En cuanto a la supervivencia global, los datos son muy conflictivos. Si existe un beneficio, éste es pequeño (5-10% a 10 años), y es posible que se dé únicamente en sarcomas localizados en extremidades y tronco, con histologías quimiosensibles y alto riesgo de recaída (mayores de 5 centímetros, profundos y de alto grado).

Por lo tanto, la quimioterapia adyuvante no es un tratamiento estándar en SPB y su empleo se ha de realizar estudiando caso por caso, tomando la decisión conjuntamente con cada paciente (35, 37). También se puede administrar previo a la cirugía con el objetivo de reducir el tamaño tumoral dependiendo de las necesidades quirúrgicas, especialmente cuando la resección con preservación de miembro está en el límite y o cuando el objetivo es preservar la función (88, 89).

### **1.2.6.4. Enfermedad diseminada**

#### Cirugía

#### *Recurrencia local*

Los SPB pueden recurrir localmente a pesar de un tratamiento quirúrgico óptimo, con o sin tratamiento adyuvante. Además, y según estadísticas del registro del Grupo Español de Investigación en Sarcomas (GEIS), en España el 50% de los SPB mayores de 5 cm se intervienen sin el diagnóstico previo de sarcomas (36), lo cual incrementa sustancialmente el riesgo de recurrencia local. En esta situación se recomienda realizar una cirugía con márgenes de resección amplios (o amputación si cumpliera los criterios). No se aconseja radioterapia postoperatoria si el paciente la recibió con anterioridad.

#### Recurrencia a distancia

La cirugía es una opción en pacientes con SPB y metástasis a distancia. La mayor parte de estudios se han llevado en pacientes con metástasis pulmonares que aparecen en el curso evolutivo de manera metacrónica, habiéndose identificado como criterios pronósticos favorables para la metastasectomía un intervalo libre de enfermedad superior a 12 meses, bajo grado histológico, 3 ó menos nódulos, tamaño inferior a 2 cm y edad inferior a 40 años (90-93).

#### Quimioterapia

Para aquellos pacientes que se presenten con enfermedad metastásica sincrónica o con metástasis extrapulmonares, el tratamiento estándar es la quimioterapia, a no ser que la carga tumoral sea mínima y el paciente se encuentre asintomático, en cuyo caso la observación sería otra opción recomendable (35, 37). El uso de quimioterapia en pacientes con SPB diseminado puede proporcionar mejoría sintomática, retrasar/minimizar una rápida evolución de la enfermedad y en casos limitados, puede mejorar la supervivencia global.

El tratamiento quimioterápico estándar está basado en doxorubicina en monoterapia (94). A parte de la doxorubicina, los otros dos fármacos que han demostrado una tasa de respuestas superior al 20% en SPB son la epirubicina y la ifosfamida. Aun así, la variabilidad en la tasa de respuestas es grande entre estudios, y en la mayoría de los casos se producen respuestas parciales, no completas. Por otro lado, hasta la fecha, ningún estudio ha demostrado que dobletes que contengan doxorubicina incrementen la supervivencia global, por lo que en las guías clínicas se recomienda su uso en aquellas situaciones en

las que se busque obtener una respuesta clínica (generalmente cuando existe un compromiso sintomático en el paciente). Otros quimioterápicos que han demostrado actividad en SPB son: trabectedina, gemcitabina, dacarbacina, temozolamida, docetaxel y paclitaxel. Finalmente, cada vez se va poniendo más de relieve que ciertos agentes quimioterápicos tienen perfiles de actividad distintos según el subtipo histológico de SPB (95-100).

#### Tratamientos frente a dianas moleculares

El tratamiento con fármacos dirigidos frente a dianas moleculares, salvo escasas excepciones, se encuentra aún en fase de investigación en la mayoría de los SPB. Uno de los principales problemas es que los SPB se subdividen en numerosos subgrupos, cada uno de ellos con particularidades biológicas determinadas, lo que determina que las dianas terapéuticas no sean de frecuentemente comunes entre los diversos subtipos. En la actualidad, pazopanib, un fármaco oral con actividad multiquinasa y antiangiogénica, es la única terapia dirigida aprobada en SPB (101).

### **1.2.7. PRONÓSTICO. FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A LOS SARCOMAS DE PARTES BLANDAS**

Se ha estimado que la supervivencia a los 5 años en Europa para el conjunto de los SPB es del 59%, lo cual es relativamente superior al 50% que presentan el conjunto de todos los tumores (5, 102).

La identificación de factores pronósticos en los SPB es esencial de cara al manejo terapéutico de los pacientes. Se detallan a continuación los principales factores pronósticos.

#### **1.2.7.1. Estadio tumoral**

El factor pronóstico más importante en los SPB es el estadio patológico al momento del diagnóstico. Así, en una serie reciente del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center que empleaba el sistema TNM de la AJCC, 7ª edición,



se comprobó que cuanto más avanzado era el estadio tumoral, mayor era el riesgo de recaída y menor la supervivencia a cinco años (Tabla 5) (73).

Estadio AJCC (7 <sup>a</sup> ed)	Supervivencia libre de recaída (a 5 años)	Supervivencia libre de enfermedad (a 5 años)
<b>Estadio I</b>	86%	90%
<b>Estadio II</b>	72%	81%
<b>Estadio III</b>	52%	56%

Tabla 5. Supervivencia libre de recaída y libre de enfermedad a los 5 años según el estadio TNM al diagnóstico.

### 1.2.7.2. Grado histológico

El grado histológico refleja un proceso biológico de pérdida de diferenciación respecto al tejido de origen. Por ello, es un factor pronóstico independiente del grado de malignidad del tumor, es decir, de la probabilidad de metástasis a distancia y de muerte (1). En cambio, el grado histológico no se considera un buen predictor de la recaída local, que depende más del estado de los márgenes tras la cirugía.

Las dos series más numerosas que han evaluado de manera retrospectiva el papel del grado histológico en el pronóstico de los SPB son una del MD Anderson (n=1225) y otra de la FNCLCC (n=1240). En la primera, la tasa de supervivencia libre de metástasis a los 5 años es del 98%, 85% y 64% para los grados 1, 2 y 3 respectivamente (56). Los resultados de la serie de la FNCLCC son similares, con unas tasas del 91%, 71% y 44% para los grados 1, 2 y 3 respectivamente (52).

### 1.2.7.3. Tamaño tumoral

Al igual que el grado histológico, el tamaño tumoral está incluido dentro del sistema de estadiaje TNM de la AJCC para los SPB. Aunque este sistema

incluya únicamente 5 cm de diámetro mayor como punto de corte para determinar la T, las probabilidades de metástasis a distancia (103) y de muerte por SPB (104) aumentan en función del incremento en el tamaño tumoral.

#### **1.2.7.4. Localización**

La localización de los SPB juega un papel muy importante en el pronóstico. Por un lado, ciertas localizaciones como el retroperitoneo permiten que los tumores se expandan mucho más que en otras antes de ser detectados. Por otro lado, hay otras localizaciones anatómicas que dificultan una correcta exéresis quirúrgica con márgenes amplios, bien por crecer cerca de estructuras vitales, bien por presentarse en localizaciones que imposibilitan la determinación de los márgenes quirúrgicos. Basados en estos dos principios, los SPB de las extremidades tienden a diagnosticarse más precozmente que en otras localizaciones y es más fácil llevar a cabo una cirugía con márgenes amplios, y por lo tanto su pronóstico es mejor que en otras localizaciones donde esto no es posible o está dificultado, como el retroperitoneo (105). Esto también ha quedado representado en el estudio RARECANCER (5), en el que se observó que SPB superficiales tienen una supervivencia a los 5 años de hasta el 90%, mientras que la supervivencia en otros localizados en áreas comprometidas como el mediastino o el corazón no supera el 15%.

#### **1.2.7.5. Subtipo histológico**

La serie clásica en la que Pisters *et al.* estudiaron los factores pronósticos en SPB puso de relieve que el comportamiento diferencial entre los distintos subtipos de SPB tiene implicaciones en su pronósticas (48). Aunque los resultados de esta serie únicamente se pueden hacer extensivos a SPB de las extremidades, los autores observaron que fibrosarcomas y TMVNP presentaban un mayor riesgo de recaída local en comparación con el resto de subtipos tumorales; en cuanto a la recaída a distancia, los leiomiomas son los que presentan mayor riesgo, y los liposarcomas los que menos.

Unos años después, el Memorial Sloan-Kettering Center desarrolló un nomograma para predecir la mortalidad específica de los SPB 12 años tras la

cirugía utilizando un registro de 2136 pacientes con SPB (106). El subtipo histológico resultó ser un importante factor predictivo: histologías como fibrosarcomas apenas se asociaba con riesgo de muerte por SPB, mientras que otros subtipos, como MPNST, sarcoma sinovial, leiomioma y SPI presentaban tanto riesgo de muerte como tumores de tamaño superior a 10 cm o la localización retroperitoneal, por ejemplo.

#### 1.2.7.6. Márgenes

Como se ha mencionado previamente, el objetivo de toda cirugía de SPB consiste en una resección completa previamente planificada y con márgenes de seguridad. La resección con márgenes positivos en SPB de extremidades y tronco resulta en un incremento en el riesgo de la recaída local, y en menor medida, de metástasis a distancia y muerte. En la Tabla 6 se detalla la incidencia de recurrencia local, metástasis a distancia y muerte a los 5 años en las 4 mayores series publicadas hasta la fecha (56, 75, 107, 108). En cuanto a los sarcomas retroperitoneales, el objetivo de la cirugía es el mismo, si bien requiere la resección de varias estructuras anatómicas para poder conseguir cirugías sin márgenes afectos. La imposibilidad de realizar una cirugía macroscópicamente completa (R0 o R1) tiene un impacto fuertemente negativo en la recaída local y en la supervivencia (80).

	Recaída local		Recaída a distancia		Muerte	
	M+ (%)	M- (%)	M+ (%)	M- (%)	M+ (%)	M- (%)
Trovik	36	18	28	28	NP	NP
Stojadinovic	35	18	32	24	30	20
Zagars	36	12	25	28	31	25
Gronchi	26	10	20	21	29	16

Tabla 6. Incidencia de recurrencia local, metástasis a distancia y muerte a los 5 años según el estado de los márgenes tras la cirugía en SPB de extremidades y tronco.

#### 1.2.7.7. Edad

Se han publicado diversas series investigando el efecto de la edad en el pronóstico de los SPB, y todas ellas han demostrado de manera consistente que los pacientes añosos presentan una mayor tasa de recaída local y de metástasis a distancia en comparación con los pacientes con SPB a edad más jóvenes. Son varios los factores que explican esta asociación:

1. Existe una tendencia a tratar a los pacientes añosos de forma subóptima ya que los equipos médicos buscan evitar complicaciones secundarias de cirugía, radioterapia y quimioterapia, y también los propios pacientes tienden a rechazar procedimientos más morbidos (109, 110). En este sentido, la proporción de márgenes positivos incrementa progresivamente con la edad, de un 13% en pacientes con 30 años o menos a un 27% en pacientes mayores de 75 años (110). Además, el uso de radioterapia y quimioterapia por encima de los 60 años es inferior (110).
2. Los pacientes añosos presentan más frecuentemente al diagnóstico tumores de tamaño grande y de alto grado (110-112), ambos factores pronósticos que predicen la aparición de metástasis a distancia.
3. Las histologías varían con la edad, lo cual explica también en parte la mayor tasa de recaída local y a distancia, dado que en pacientes añosos hay un predominio de sarcomas pleomórficos indiferenciados, leiomiomas, LPS-DD y LPS-PP, a diferencia de los pacientes jóvenes, en los que predominan los sarcomas sinoviales, DFSP, tumor fibroso solitario y LPS-M (110).

#### **1.2.7.8. Factores moleculares predictivos de pronóstico**

Los factores pronósticos establecidos en la actualidad y que cuentan con un amplio uso en la clínica diaria son exclusivamente clínico-patológicos. Sin embargo, en las últimas dos décadas ha habido importantes avances en el conocimiento de la biología de los sarcomas, lo cual ha ayudado a determinar subpoblaciones de alto riesgo de recaída o con menor supervivencia dentro de los distintos tipos de sarcomas. Las moléculas en las que se ha descrito implicación pronóstica en sarcomas se detallan a continuación en la tabla 7. No

obstante, su uso en clínica en la actualidad es mínimo, al igual que otras herramientas pronósticas más sofisticadas como el CINSARC (113).

MOLÉCULA	FUNCIÓN	DESCRIPCIÓN	SUBTIPO	REFERENCIAS
KI67	Marcador de proliferación	↑ expresión asociada con aparición precoz de metástasis y ↓SG	SPB adultos SS	(114-116)
TP53	Parada de ciclo celular, apoptosis, senescencia, reparación de ADN	↑ expresión o mutación asociados con ↓SLE y ↓SG	SPB adultos Sarcomas uterinos LPS-M	(114, 117-120)
PCNA	Replicación del ADN	↑ expresión asociado con peor pronóstico	SPI Sarcoma sinovial	(121, 122)
CCND1	Activación del ciclo celular	↑ expresión asociada con ↓SG en subgrupo de alto grado	SPB extremidades SPB retroperitoneales	(123, 124)
CDKN2A	Control de G1 en el ciclo celular	Pérdida asociada con ↓SG	TMVNP, LMS, LPS, SS, SPI, Angiosarcoma	(125-128)
BCL2	Anti-apoptótico	↑ expresión predice ↑SLE	LMS uterino	(129, 130)
MYC	Factor de transcripción	↑ expresión asociada con peor pronóstico	SPB	(131)
AKT1/AKT2	Supervivencia celular. Anti-apoptótico.	↑ expresión asociada con ↓SLE y ↓SG	SPB, TMVNP, LMS, SS	(132-135)
IGF1R	Supervivencia celular. Anti-apoptótico	Resultados controvertidos	SPB SS	(136)
VEGFA	Permeabilidad vascular, angiogénesis	↑ concentración tisular predice invasión local y metástasis	SPB	(137)
CDH1/CTNNB1	Mantenimiento de citoesqueleto e inhibición de contacto célula-célula	↓ CDH1 y ↑ CTNNB1 predicen ↓SG	SPB	(138)
CD40	Mediador de respuestas inmune e inflamatoria	Alta expresión asociada con baja SLE y SG	SPB	(139)

Tabla 7. Factores moleculares pronósticos descritos en la literatura.

## 1.3 BIOLOGÍA DE LOS SARCOMAS

La diversidad fenotípica que se observa en el diagnóstico anatómico-patológico e inmunohistoquímico de los SPB es también evidente a nivel genético. A pesar de esta heterogeneidad, los sarcomas exhiben rasgos comunes que los permiten agrupar, desde una perspectiva genética, en dos categorías (105, 140):

- sarcomas con cariotipo prácticamente euploide y defectos cariotípicos simples con escasos reordenamientos cromosómicos.
- sarcomas con cariotipo complejo y gran inestabilidad genómica.

### 1.3.1. SARCOMAS CITOGENÉTICAMENTE SIMPLES

La mayor parte de las alteraciones genéticas en los sarcomas citogenéticamente simples son translocaciones cromosómicas. Estos tumores, que constituyen una tercera parte de todos los sarcomas, aparecen *de novo* y contienen anomalías genéticas recurrentes que están presentes desde el inicio y conservadas durante todo el proceso de evolución clonal (141). El hecho de que estas translocaciones sean específicas de cada grupo tumoral puede deberse a que únicamente sean oncogénicas en determinados subtipos celulares y en determinados momentos del desarrollo celular (142). La mayoría de las fusiones han sido ya clonadas, y los genes de fusión y las proteínas quiméricas resultantes identificados. Estas proteínas quiméricas resultantes de las translocaciones juegan un papel esencial en la biología de estos tumores, actuando como factores de transcripción y en menor medida como factores de crecimiento, regulando la activación de numerosos genes y vías de señalización (143). La relevancia de estas proteínas quiméricas en la patogénesis de cada subtipo de sarcoma se sustenta en: 1) su requerimiento para la proliferación celular *in vitro* y 2) en el impacto en el fenotipo y en el comportamiento clínico cuando se producen variaciones mínimas en la estructura de estas proteínas (144-146).

En la Tabla 8 se resumen los subtipos de sarcomas con sus translocaciones cromosómicas más representativas (105, 140, 147-149). Las proteínas quiméricas resultantes de estos reordenamientos genómicos ejercen funciones biológicas específicas en cada subgrupo de sarcomas. No obstante, su estudio y caracterización exhaustivos no constituye el objeto de la presente tesis doctoral, dado que hemos incorporado aquellos subgrupos de SPB con una mayor prevalencia. Únicamente se han incluido de este subgrupo en nuestro estudio los sarcomas sinoviales y, en cierto modo, los liposarcomas mixoides, cuyas particularidades biológicas se encuentran descritas más adelante, en esta misma sección.

<b>Translocación</b>	<b>Genes</b>	<b>Tipo de fusión</b>
<b>Sarcoma de Ewing</b>		
t(11;22)(q24;q12)	EWSR1-FLI1	Factor de transcripción
t(21;22)(q22;q12)	EWSR1-ERG	Factor de transcripción
t(7;22)(q24;q12)	EWSR1-ETV1	Factor de transcripción
t(17;22)(q21;q12)	EWSR1-ETV4	Factor de transcripción
t(2;22)(q33;q12)	EWSR1-FEV	Factor de transcripción
<b>Sarcoma de células claras</b>		
t(12;22)(q13;q12)	EWSR1-ATF1	Factor de transcripción
<b>Tumor desmoplástico de células redondas</b>		
t(11;22)(p13;q12)	EWSR1-WT1	Factor de transcripción
<b>Condrosarcoma mixoide</b>		
t(9;22)(q22-31;q11-12)	EWSR1-NR4A3	Factor de transcripción
<b>Liposarcoma mixoide</b>		
t(12;16)(q13;p11)	FUS-DDIT3	Factor de transcripción
t(12;22)(q13;q12)	EWSR1-DDIT3	Factor de transcripción
<b>Sarcoma sinovial</b>		
t(X;18)(p11;q11)	SYT-SSX	Factor de transcripción
<b>Dermatofibrosarcoma protuberans</b>		
t(12;15)(q22;q13)	COL1A1-PDGFB	Factor de crecimiento
<b>Tumor miofibroblástico inflamatorio</b>		
2p23 reordenamientos	TMP4-ALK	Factor de crecimiento
<b>Sarcoma alveolar de partes blandas</b>		
t(X;17)(p11.2;q25)	ASPL3-TFE3	Factor de transcripción
<b>Sarcoma del estroma endometrial</b>		
t(10;17)(q22;p13)	YWHAE-FAM22A/B	Factor de transcripción
t(7;17)(p15;q21)	JAZF1-JJAZ1	Factor de transcripción
<b>Rabdomiosarcoma alveolar</b>		
t(2;13)(q35;q14)	PAX3-FOXO1A	Factor de transcripción
t(1;13)(p36;q14)	PAX7-FOXO1A	Factor de transcripción
<b>Tumor fibroso solitario</b>		
12q13	NAB2-STAT6	Factor de transcripción

Tabla 8. Sarcomas con cariotipo simple y translocaciones más representativas.



### 1.3.2. SARCOMAS CITOGENÉTICAMENTE COMPLEJOS

Los sarcomas con cariotipos citogenéticamente complejos presentan características clínicas y biológicas diferenciales respecto al grupo anterior (revisado en (105):

- tienden a detectarse en pacientes con una edad más avanzada
- frecuentes entre los sarcomas asociados a radioterapia
- eventos genéticos recurrentes infrecuentes
- alta prevalencia de afectación del ciclo celular (vías de p53 y/o RB1)
- asociación con los síndromes de Li-Fraumeni y Retinoblastoma hereditario.

Este grupo de sarcomas presenta aberraciones cromosómicas complejas, numéricas y estructurales, que recuerdan a las existentes en la mayoría de las neoplasias epiteliales. Por lo general, se observan amplificaciones inespecíficas en varios cromosomas, generalmente en combinación con deleciones que afectan a genes supresores tumorales bien conocidos, como *CDKN2A*, *CDKN2B*, *PTEN*, *RB1*, *NF1* y *P53*. Los genes pueden perder su función a través de deleciones homocigotas, o bien con una combinación de deleciones heterocigotas y mutaciones que inactivan el alelo no delecionado (150). Además, algunos de estos genes supresores tumorales también desempeñan una función crítica a la hora de mantener la integridad cromosómica, y se especula que su pérdida de función puede constituir un evento temprano que conlleva inestabilidad en los SPB con cariotipos complejos (151, 152). En otros subtipos como los leiomiomas, las deleciones son más frecuentes que las amplificaciones genómicas (153).

El origen de los SPB con cariotipo complejo no está claro, y hay varios mecanismos que intentan explicarlo, y que conllevan esencialmente inestabilidad genómica y defectos en los puntos de control del ciclo celular:

- 1) En primer lugar, el acortamiento telomérico progresivo da como resultado la asociación entre telómeros heterólogos, creando fusiones

entre diversos cromosomas y translocaciones no recíprocas (154). El cariotipo no balanceado resultante puede estabilizarse posteriormente mediante un alargamiento alternativo de los telómeros (alternative lengthening of telomeres – ALT). De hecho, el ALT, a diferencia de los sarcomas con cariotipo simple, se ha detectado frecuentemente en los SPB con cariotipo complejo (155, 156) y se ha propuesto como mecanismo involucrado en la malignización de las células troncales mesenquimales (157).

- 2) En segundo lugar, las alteraciones en el ciclo celular, y específicamente en la vía de p53, son un rasgo biológico diferenciador entre los sarcomas con cariotipo simple (vía íntegra) y los sarcomas con cariotipo complejo (vía disfuncional). p53 funciona como un sensor del daño del ADN y del estrés celular (158). Se han descrito diversos mecanismos de inactivación de p53: mutaciones puntuales en p53, delección homocigota en *CDKN2A* (que codifica p14ARF y p16) y amplificación de *MDM2*. Así, la pérdida de ARF y p53 y la sobreexpresión de MDM2 son hallazgos frecuentes en cáncer en general y en sarcomas en particular, e indican la pérdida de función de p53. Hasta un 60% de los SPB sobreexpresan formas mutadas de p53 (159). Otra observación interesante la constituye el hecho de que la presencia de alteraciones en la vía de p53 en sarcomas con cariotipos simples, si bien infrecuente, se asocia con mal pronóstico (160-165). Por último, cabe recordar la asociación entre el síndrome de Li Fraumeni y la aparición SPB (ver Sección Etiología).
- 3) En tercer y último lugar, es posible que mutaciones en determinados genes encargados de reparar el ADN puedan dar origen a los sarcomas. Esta hipótesis procede de observaciones realizadas en modelos murinos en los que defectos en la recombinación no homóloga generan diferentes subtipos de sarcomas histológicamente similares al subgrupo con cariotipo complejo (166).

En conjunto, todas estas observaciones parecen indicar que en los SPB sin alteraciones genéticas específicas y con cariotipo complejo, la inactivación de la vía de p53 debe ser un evento relativamente temprano en el desarrollo tumoral necesario para superar la parada del ciclo celular y evadir la apoptosis

que desencadenarían el acortamiento de los telómeros o las roturas de ADN que ocurren en la progresión de los sarcomas.

### **1.3.3. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DE LOS TUMORES OBJETO DE ESTUDIO EN LA PRESENTE TESIS DOCTORAL**

#### **1.3.3.1. Tumores benignos**

##### Lipomas

De un 55 a un 75% de los lipomas presentan aberraciones cromosómicas, las cuales, en la mayoría de los casos, siguen un patrón citogenético simple con cariotipos balanceados (167-169). El patrón de aberraciones cromosómicas es bastante heterogéneo, clasificándose los lipomas en tres grupos:

- Aberraciones que contienen el cromosoma 12q13-15
- Aberraciones que contienen el cromosoma 6p21-23
- Tumores con pérdida de material en 13q

El primer subgrupo es el más frecuente. Las aberraciones cromosómicas en 12q13-15 a veces dan lugar a la formación de reordenamientos cromosómicos como  $t(3;12)(q27-28;q13-15)$  y  $t(12;13)(q13-15;q12)$ , que dan lugar a las proteínas de fusión formadas por los genes *HMGIC/LPP* y *HMGIC/LHFP* respectivamente (170, 171).

##### Leiomiomas

Los leiomiomas son tumores benignos que derivan del músculo liso. Aunque generalmente son cromosómicamente estables, aproximadamente el 40-50% presentan reordenamientos cromosómicos que afectan a 12q5, 6p21 y 7q (172). Los estudios más recientes sugieren que los leiomiomas se originan a partir de un único evento “estresante” inicial, que puede ser activación oncogénica de *MED12*, o alteración metabólica (deficiencia de *FH*), o cambios cromosómicos específicos que afectan al cromosoma 7q. El resultado de esto es la aparición de aberraciones cromosómicas múltiples o cromotripsis (173).

### Schwannoma

Los schwannomas son tumores benignos, que proceden de las células de Schwann, y que generalmente aparecen aislados y de manera esporádica. Presentan un cariotipo diploide o casi diploide con una pérdida consistente, parcial o completa, del cromosoma 22, resultando en la pérdida clonal de uno o más loci en 22q (174-176). No obstante, hasta un 50% de los schwannomas presentan cariotipos completamente normales (174). El principal gen que se cree que está involucrado es NF2, cuya pérdida conlleva activación de la vía de Ras (177). De hecho, los pacientes con neurofibromatosis tipo 2 presentan una mayor incidencia de schwannomas vestibulares (178).

### Neurofibroma

Los neurofibromas son tumores benignos de la vaina nerviosa periférica histológicamente complejos. Al igual que los schwannomas, proceden de las células de Schwann, aunque también incorporan otros elementos celulares como fibroblastos, células perineurales y mastocitos. La mayoría de ellos aparecen en el seno de la Neurofibromatosis tipo I (179, 180), presentan un cariotipo simple o normal (174), y evolución clonal (175).

### **1.3.3.2. Tumores malignos (sarcomas)**

#### Leiomiomas

Se han realizado numerosos estudios citogenéticos que han demostrado que los leiomiomas tienen alteraciones cariotípicas y moleculares complejas, no consistentes y no recurrentes, y cuya extensión se asocia con un comportamiento más agresivo y una peor supervivencia (181, 182). Los cambios más consistentes que se han evidenciado a lo largo de diversos estudios son las pérdidas cromosómicas en 10q11 y 13q14, y las ganancias en 17p (revisado en (183)). Las dos primeras son de extrema importancia, ya que supone una pérdida de material genético de dos importantes tumores supresores: *PTEN* y *RB1* respectivamente.

Al igual que el resto de SPB citogenéticamente complejos, los leiomiomas tienen alteraciones frecuentes que alteran el control del ciclo

celular (184). La mencionada pérdida del gen supresor tumoral RB1 conlleva una desregulación del ciclo celular a nivel del punto de control entre las fases G1 y S. Hasta un 90% de los pacientes presentan alteraciones en diversos componentes de la vía RB1 – ciclina D1 (*RB1*, *CDKN2A*, *CCND1*, *CCND3*) (153, 184). En cambio, los leiomiomas presentan una baja tasa de alteraciones genéticas en p53/MDM2 en comparación con otros sarcomas (184, 185).

La delección de 10q conlleva la pérdida de *PTEN*, un gen supresor tumoral frecuentemente alterado en cáncer, y cuya función consiste en suprimir la activación de la vía de PI3K/mTOR. La pérdida de *PTEN* conlleva la activación de esta vía implicada en proliferación, supervivencia metabolismo y evasión de la apoptosis en células cancerígenas.

Por último, desde un punto de vista de expresión génica, se han identificado tres perfiles correspondientes a tres subtipos moleculares que se distribuyen de manera similar tanto en leiomiomas uterinos como leiomiomas no uterinos (186). El grupo I contiene aproximadamente un 25% de todos los leiomiomas, está enriquecido en genes relacionados con la contracción muscular y el citoesqueleto, se corresponde histológicamente con un leiomioma convencional, y presenta un mejor pronóstico comparado con los grupos II y III (186, 187), que tienden a solaparse más con los sarcomas pleomórficos indiferenciados (188).

### Liposarcomas

Los liposarcomas constituyen un conjunto de neoplasias mesenquimales que proceden del tejido lipídico, presentan diversos grados de atipia, y pueden contener células sarcomatosas de origen no lipogénico. Bajo estos rasgos comunes, el diagnóstico de liposarcoma incluye 4 subentidades con diferencias biológicas y clínicas diferentes:

- Liposarcoma bien diferenciado (LPS-BD) / tumor lipomatoso atípico (TLA) – 40 – 45% de todos los liposarcomas.
- Liposarcoma desdiferenciado (LPS-D) – 5%
- Liposarcoma mixoide (LPS-M) – 30 – 35%
- Liposarcoma pleomórfico (LPS-P) - <15% (1, 70)

A diferencia de otros tumores mesenquimales, existe una progresión citogenética desde LPS-BD a LPS-D (189, 190). A pesar de esta progresión, últimamente se tiende a considerar a los liposarcomas como sarcomas de complejidad citogenética intermedia (150).

#### LPS-BD/TLA

Los LPS-BD se caracterizan por tener anillos cromosómicos supernumerarios que contienen amplificada la región 12q14-15; aunque también pueden existir otras regiones cromosómicas co-amplificadas; por lo general la presencia de otras anomalías genéticas estructurales y/o numéricas es escasa (191-193). La amplificación de 12q14-15 conlleva el incremento de copias de *MDM2*, que generalmente se acompaña de la co-amplificación de genes cercanos, como *CDK4*, *SAS* y *HMGIC*. En los LPS-D, a diferencia de los LPS-BD, se han descrito mutaciones en p53 en aquellos casos con ausencia de amplificación de *MDM2* (194, 195). En conjunto, estas alteraciones conllevan una alteración del ciclo celular y de los puntos de control del mismo, y la inhibición farmacológica de *MDM2* y *CDK4* a nivel experimental ha demostrado la implicación de estos dos reguladores del ciclo celular en elementos esenciales para la proliferación y la supervivencia de los LPS-BD (150, 196).

#### LPS-M

El hallazgo citogenético característico presente en cerca del 95% de los LPS-M es la translocación recíproca  $t(12;16)(q13;p11)$ , que afecta a los genes *CHOP* y *TLS* (también conocido como *FUS*) (197). Kuroda y col. demostraron que la introducción del gen de fusión *FUS-CHOP* en preadipocitos ocasiona su transformación oncogénica e inhibe la formación de adipocitos, por lo que se cree que el nuevo gen de fusión interfiere con la transformación adipocítica, estimulando la proliferación de los pre-adipocitos y la iniciación tumoral (198).

#### LPS-P

Los LPS-P constituyen el subgrupo de liposarcomas con la presencia de una mayor cantidad de reordenamientos cromosómicos y aberraciones genéticas numerales y estructurales, sin tener ninguna que sea recurrente,

exceptuando que, aproximadamente, un 50% pueden presentar alteraciones en p53 (195, 199). Los liposarcomas en los que se encuentra amplificación en 12q14-15 pueden asociarse a cromosomas en anillo y se consideran actualmente con LPS-D con desdiferenciación homóloga (1).

### Sarcoma sinovial

El sarcoma sinovial es un sarcoma con cariotipo simple que se caracteriza por la translocación t(X;18)(p11;q11), que da lugar a la proteína de fusión SYT-SSX (9, 200). Aunque aún debatido, se postula que los mioblastos son el subtipo celular del cual proceden los sarcomas sinoviales (201).

### Tumor maligno de la vaina nerviosa periférica

Los TMVNP incluyen a todos aquellos tumores que proceden de la vaina nerviosa de los nervios, tanto superficiales como profundos, y han sido incluidos dentro de los sarcomas de partes blandas en la última edición de la clasificación de sarcomas de la OMS (1). Al igual que los SPB anteriores, los TMVNP presentan un genoma complejo, con ganancias que afectan a 4q (KIT/PDGFR), 7p (EGFR) y 8q (MYC), y deleciones de 1p, 3p, 9p (CDKN2A/B), 17q (NF1) y 17p (p53) (16, 202). Más de un 90% de los MPNST tienen pérdida de heterocigosidad de la región de *NF1* en 17q, lo cual refleja claramente el mecanismo de origen (203). *NF1* es un gen supresor tumoral localizado en 17q11.2 que codifica para la neurofibromina, un regulador negativo de la vía RAS-MAPK. Cuando se pierde la función de *NF1* por mutaciones heterocigotas acompañadas generalmente de pérdida de heterocigosidad. La neurofibromina tiene un dominio activador de ATPasa que convierte la forma activa de Ras (Ras-GTP) en su forma inactiva. Esto conlleva la activación de la vía de Ras-MAPK, implicada en proliferación y diferenciación. Este evento inicial viene acompañado de la pérdida de función de importantes genes supresores tumorales, como *PTEN* (204), *CDKN2A* (188) y p53 (205).

### Sarcoma pleomórfico indiferenciado

Esta nueva categoría incluye a los tumores malignos de origen mesenquimal en los que se han excluido todas las líneas de diferenciación

conocidas (1). Es un grupo extenso y heterogéneo que incluye hasta un 20% de todos los SPB pleomórficos (57), y hasta un 25% de los SPB asociados a radioterapia (206, 207). Los SPI presentan un cariotipo altamente complejo, constituyendo el subtipo de SPB con el mayor número de aberraciones cromosómicas, si bien ninguna de éstas son recurrentes (208). Algunos estudios apuntan que la pérdida de las regiones cromosómicas 9p21 y 13q12-q14, en donde se encuentra los gen *CDKN2A/B* y *RB1* respectivamente, constituyen las anomalía más frecuentes de este subgrupo (209).

#### **1.3.4. IMPORTANCIA DE LAS VÍAS DE PI3K/mTOR Y RAS/MAPK EN SARCOMAS DE PARTES BLANDAS**

Dentro de las diferentes fenómenos que conducen a la transformación oncogénica y al mantenimiento del fenotipo tumoral, la capacidad de crecimiento autónomo celular mediada por señales de crecimiento es uno de los mecanismos más estudiados en células tumorales, ya que se encuentran constitutivamente activados casi de forma universal. Las vías de transducción de señales más importantes en cáncer en general y en sarcomas en particular corresponden a PI3K/mTOR y RAS/MAPK.

##### **1.3.4.1. Vía de PI3K/mTOR**

###### Biología

mTOR es una serín-treonín quinasa que ejerce como nodo central de los estímulos procedentes de los factores de crecimiento a través de la vía PI3K/mTOR, y de los estímulos energéticos a través de LKB1. Las implicaciones metabólicas de mTOR (ej: glicólisis) se encuentran fuera del estudio de la presente tesis doctoral, que versa en vías de señalización de factores de crecimiento. PI3K es un componente esencial en la señalización hacia mTOR tras recoger los estímulos procedentes de los receptores tirosín-quinasa (RTQ) (210). PI3K se activa a través de la fosforilación de determinados residuos en los RTQ, o a través de proteínas adaptadoras. Una vez activado, fosforila fosfatidilinositol bifosfato (PIP2) convirtiéndolo en PIP3.



Esta acción se encuentra regulada por PTEN, un gen supresor tumoral cuya función consiste en defosforilar PIP3, transformándolo de nuevo en PIP2. PIP3 atrae a la membrana a AKT fosforilándolo en el residuo T308 (211, 212) lo cual conlleva su activación parcial. La activación completa de AKT requiere la fosforilación en S473 (213). AKT a su vez activa mTOR a través de la fosforilación y subsecuente inhibición del gen supresor tumoral TSC (tuberous sclerosis complex), que contiene dos dímeros, TSC1 y TSC2 (214, 215). Cuando específicamente TSC2 se fosforila, deja de inhibir la actividad de Rheb (Ras homologue enriched brain), una GTPasa necesaria para la activación de mTOR (216). mTOR existe en dos complejos distintos, cada uno de los cuales está compuesto de tres proteínas distintas: mTORC1 (mTOR, GβL y raptor) y mTORC2 (mTOR, GβL y rictor) (217, 218). La activación de mTORC1 conlleva la regulación de la síntesis proteica, crecimiento celular y proliferación a través de dos componentes bien caracterizados: eIF-4E (eukaryotic initiation factor 4E) y 4E-BP1 (eIF-4E binding protein), y S6K1 (S6 kinase 1) (219). mTORC2 es el encargado de fosforilar AKT en el residuo S473, responsable por lo tanto de su activación completa (213).

#### Desregulación de PI3K/mTOR en sarcomas de partes blandas

Existen múltiples eventos que pueden resultar en la hiperactivación de la vía de PI3K/mTOR en cáncer en general y en los sarcomas en particular.

#### *Activación a través de receptores de factores de crecimiento.*

La vía de mTOR puede hallarse hiperactivada en sarcomas debido a la señalización oncogénica de diversos receptores tirosina-quinasa. Concretamente, en sarcomas, los principales RTQ son IGF-1R (insulin growth factor 1 receptor), FGFR (fibroblast growth factor receptor) y EGFR (epidermal growth factor receptor).

El sistema de señalización de IGF consiste en tres ligandos (IGF-I, IGF-II e insulina), cuatro receptores de membrana (IGF-1R, IR-A, IGF-2R) y seis proteínas de unión (IGFBP-1-6) (revisado en (220)). IGF-1R es un receptor transmembrana que contiene una subunidad intracitoplasmática catalítica tirosina-quinasa, y se encuentra sobreexpresado en sarcomas, generalmente debido a falta de regulación a nivel transcripcional (en ocasiones por pérdida

de p53, en otras ocasiones por el incremento de activadores transcripcionales como proteínas de fusión) (221). Los estímulos oncogénicos de proliferación y crecimiento son transmitidos hacia el núcleo a través de las vías de señalización de PI3K/mTOR y RAS/MAPK (222). Son varios los subtipos de sarcomas en los que la vía del IGF parece jugar un papel relevante en el fenotipo tumoral, como rhabdomiosarcomas alveolares y embrionarios, sarcoma de Kaposi, GIST KIT/PDGFR negativos, tumor fibroso solitario, tumor desmoplásico de células pequeñas y redondas, tumor fibroso solitario, fibrosarcoma congénito, sarcoma de Ewing y osteosarcoma (revisado en (220)). En cuanto a los subtipos incluidos en la presente tesis doctoral, destacan los leiomiomas, los sarcomas sinoviales y los TMVNP. Hasta un 50% de los leiomiomas tienen sobreexpresión de IGF-II (223, 224) y/o activación constitutiva de IRS-1 (insulin receptor substrate 1) (225). Estos datos concuerdan con la evidencia disponible en la que se pone de manifiesto la relevancia de la activación de PI3K/mTOR en leiomiomas (226). Por otro lado, la vía de señalización constituida por IGF-II/IGF-1R parece también estar involucrada en la patogénesis y desarrollo de los sarcomas sinoviales. IGF2 es el gen que más se expresa al transfectar células con la translocación característica de los sarcomas sinoviales (SS18-SSX1 o SSX2) (227, 228). Además, aquellos sarcomas sinoviales con una mayor expresión de IGF-1R presentan una tendencia superior a desarrollar enfermedad metastásica (229). Finalmente, se han hallado de manera frecuente amplificaciones en el gen de IGF-1R en TMVNP; esto produce incremento de expresión que a su vez se correlaciona con una peor supervivencia (230). La relevancia que conlleva inhibir esta vía en la proliferación y supervivencia ha quedado demostrada también *in vitro* (revisado en (231)) y en pacientes con sarcomas, habiéndose demostrado beneficio con diferentes inhibidores de IGF-1R en ciertos subgrupos de pacientes con sarcoma de Ewing y tumor fibroso solitario, generalmente en forma de estabilización (231).

La activación oncogénica del FGFR es de máxima importancia para la proliferación, supervivencia y progresión en varias neoplasias (232). FRS2 (FGFR substrate 2) es una proteína de adaptación crítica para la señalización de FGFR. FRS2 se encuentra localizado en el cromosoma 12q13-15, una región frecuentemente amplificada en liposarcomas. Un estudio reciente ha

determinado que FRS2 está amplificado, sobreexpresado y activado en 90-100% de los LPS-D, y su bloqueo *in vitro* e *in vivo* con inhibidores del FGFR tiene un impacto sustancial en proliferación y viabilidad celular (233). La activación de la vía del FGFR parece ser también importante en sarcomas pleomórficos indiferenciados y en sarcomas sinoviales (233, 234).

Al igual que el FGFR, el EGFR también parece tener relevancia en ciertos sarcomas. Se ha encontrado un aumento de expresión en más del 50% de los sarcomas pleomórficos indiferenciados, sarcomas sinoviales, TMVNP y leiomiomasarcomas (235), aunque se ha estudiado en más profundidad en TMVNP, en donde se ha determinado un incremento del número de copias del gen del EGFR junto con un aumento de expresión que varía entre un 25% a un 70%. La inhibición farmacológica *in vitro* de EGFR en modelos celulares de TMVNP reduce la activación de las vías de PI3K/mTOR y RAS/MAPK, afectando además en la viabilidad celular (236-238). También existe evidencia en sarcomas sinoviales que apunta en la misma dirección (238, 239).

#### *Eventos genéticos.*

Recientemente se han publicado dos estudios en los que, mediante técnicas de secuenciación a gran escala y alta resolución, se ha puesto de manifiesto la presencia de mutaciones activadoras en oncogenes, o de mutaciones con pérdida de función y deleciones en genes supresores tumorales directamente involucrados en la vía de PI3K/mTOR (150, 240). Así, se han hallado mutaciones activadoras en PIK3CA y AKT, y mutaciones con pérdida de función o deleciones de PTEN en leiomiomasarcomas, liposarcomas mixoides, sarcomas pleomórficos indiferenciados y sarcomas sinoviales. El hallazgo de estos eventos genéticos presentes en la mayoría de los subtipos de SPB pone de relieve, en conjunto, que la activación de la vía de PI3K/mTOR en SPB no ocurre de forma azarosa, si no que existe una selección clonal positiva en la que prevalecen las subpoblaciones con la activación de esta vía de señalización tan importante en cáncer.

Diversos estudios funcionales en modelos animales manipulados genéticamente han confirmado estos resultados. Por ejemplo, hasta un 80% de modelos murinos en los que se ha inactivado genéticamente PTEN en el músculo liso, desarrollan leiomiomasarcomas en menos de 2 meses, lo cual

concuenda con la pérdida de expresión de PTEN y la activación constitutiva de AKT y mTOR observada en cerca del 90% de los leiomiomas (226). En el caso de los TMVNP (en los que el evento iniciador fundamental es el incremento de señalización a través de la vía de RAS/MAPK), la activación de la vía de PI3K/AKT como consecuencia de la pérdida de función de PTEN es necesaria para el llevar a cabo el proceso de progresión tumoral y malignización de los neurofibromas (241). Del mismo modo, la activación de AKT en células progenitoras mesenquimales, conjuntamente con la desregulación de p53, juega un papel esencial en la formación de liposarcomas bien diferenciados y desdiferenciados (242). En cualquiera de los tres casos anteriores, el tratamiento con inhibidores de mTOR o de la vía de PI3K/mTOR disminuyó el tamaño tumoral e incrementó la supervivencia (226, 242, 243).

Clínicamente, los estudios con fármacos inhibidores de la vía de PI3K/mTOR han proporcionado mayoritariamente un beneficio citostático bastante modesto, exceptuando casos aislados de sarcomas óseos, tanto con inhibidores de mTOR en monoterapia como combinaciones con inhibidores de IGFR (revisado en (244)). Estos resultados se han atribuido principalmente a la ausencia de biomarcadores específicos y la más que posible activación de vías paralelas.

#### **1.3.4.2. Vía de RAS/MAPK**

##### Biología

La vía canónica de señalización RAS/MAPK es crítica en cáncer para la supervivencia, la diseminación y la resistencia a tratamientos (245, 246). Constituye, además, un nodo que recibe múltiples estímulos, tanto externos (factores de crecimiento, interacciones con la matriz extracelular y otras células) como internos (estrés metabólico, daño del ADN, alteraciones proteicas), (247) y su activación oncogénica se asocia principalmente con proliferación e invasión (248).

Ras es una proteína G con función GTPasa que está codificada por el oncogén RAS (tres variantes en humanos: HRAS, KRAS, NRAS). Ras funciona como un interruptor, encontrándose inactivo en su estado basal al estar unido a

GDP (guanosine diphosphate). La activación de Ras se produce cuando el GDP se transforma en GTP (guanosine triphosphate) al unírsele un grupo fosfato extra, lo cual conlleva un cambio conformacional y un incremento de afinidad por efectores, desencadenando una cascada de señalización a través de RAF (ARAF, BRAF, CRAF), MEK (MEK1, MEK2) y ERK (ERK1, ERK2) (249). Una vez que ERK está fosforilado se traslada al núcleo donde activa diversos factores de transcripción, entre los que destaca la Ciclina D, responsable de poner en marcha del ciclo celular (250).

### Desregulación de RAS/MAPK en sarcomas de partes blandas

Aunque la vía de RAS/MAPK no se ha estudiado hasta la fecha con tanta profundidad como la vía de PI3K/mTOR (entre otros motivos, por su mayor complejidad y por lo dificultoso de su inhibición farmacológica), los mecanismos de activación oncogénica se pueden agrupar de una manera muy parecida a los de la vía de PI3K/mTOR.

#### *Activación a través de receptores de factores de crecimiento.*

Al igual que la vía de PI3K/mTOR, la vía de RAS/MAPK puede hallarse hiperactivada en sarcomas debido a la señalización oncogénica de diversos RTQ (IGF-1R, FGFR, EGFR) (222, 234, 236-238). La proteína RAS se encuentra localizada en la parte interna de la membrana citoplasmática, y el paso de GDP a GTP se produce mediante la transducción de señales de cualquiera de los RTQ previamente mencionados a través de proteínas intermedias (245).

#### *Eventos genéticos.*

Los dos únicos estudios en los que hasta la fecha se ha investigado la presencia de mutaciones en la vía de RAS/MAPK en sarcomas mediante técnicas altamente sensibles y a gran escala (*high-throughput*) han detectado una baja proporción de eventos genéticos (150, 240). Concretamente, en el estudio de Barretina et al no se encontró ninguno, mientras que en el estudio presentado por Cote halló mutaciones en RAS en angiosarcoma, GIST, y SPB sin origen especificado.

Más interesante es la evidencia que involucra el déficit de neurofibromina en SPB. La neurofibromina, codificada por el gen NF-1, es un regulador negativo de RAS mediante su función activadora de la capacidad GTPasa de RAS. Por lo tanto, la pérdida de función de la neurofibromina conlleva una sobreactivación de la vía de RAS/MAPK debido a que RAS permanece en su forma activa (RAS-GTP) (15, 251). De ahí que los pacientes con defecto congénito en NF-1 (neurofibromatosis tipo I) tengan un riesgo de hasta un 13% de desarrollar un TMVNP (70). Además, la activación de RAS es biológicamente relevante en tumores de origen neural. Así, hasta un 40% de TMVNP esporádicos (no asociados a neurofibromatosis tipo I) tienen mutaciones somáticas en NF-1 (252), y hasta un 10% mutaciones en BRAF o en RAS (253, 254). Respecto a los tumores benignos de origen neural, se ha descrito pérdida de heterocigosidad en un 20% de los neurofibromas cutáneos (179) y hasta en un 70% en los neurofibromas plexiformes (203), que son los que se asocian a la neurofibromatosis tipo I. Respecto a los schwannomas, nuestro grupo ha descrito un 10% de mutaciones oncogénicas en BRAF V600E (254).

La pérdida de NF-1 también parece estar involucrada en otros subtipos de sarcomas, como sarcomas pleomórficos indiferenciados (150), mixofibrosarcomas (150), leiomiomas (255, 256) y GIST (257).

### **1.3.5. Factores embudo**

Existen diversos mecanismos biológicos que participan en la transformación oncogénica, implicando múltiples cascadas de señalización, genes y proteínas con acciones complementarias y redundantes (258, 259). Dada la activación concomitante y heterogénea de las diferentes señales oncogénicas, recientemente ha sido desarrollado el concepto de factor embudo o funnel factor (260), describiéndose como una molécula donde diversas vías de señalización confluyen para la canalización de una única señal hacia niveles inferiores, constituyendo además un reflejo del potencial de transformación tumoral independientemente de las alteraciones genéticas asociadas en el proceso de transmisión de señales. El concepto parte de las observaciones

realizadas en cáncer de mama (261), ovario (262), cérvix (263) y melanoma (264), en donde se evidenció que la 4E-binding protein 1 (4EBP1) podía ser activada a través de múltiples rutas de señalización. Esta capacidad de la forma fosforilada de 4EBP1 de canalizar las distintas señales oncogénicas lo establece como un factor molecular asociado con progresión neoplásica y mal pronóstico, independientemente de las alteraciones oncogénicas que se hayan producido en las primeras fases de la cascada de señalización (261, 262, 264).

4EBP1 es una pequeña proteína que juega un papel crítico en el control de la síntesis proteica y, por lo tanto, en la supervivencia celular y en la proliferación (265). Reprime la translación proteica dada su asociación con EIF4E (eukaryotic initiation factor 4E), la subunidad del complejo EIF4F que se une al ARNm de manera cap-dependiente (266). Existen tres isoformas dentro de la familia de proteínas que se unen al factor de iniciación 4E: 4EBP1, 4EBP2 y 4EBP3, siendo 4EBP1 la más estudiada y la forma predominante en la mayoría de las células. De este modo, en células quiescentes o bajo privación de factores estimulantes, 4EBP1 se une firmemente a EIF4E, inhibiendo la iniciación del proceso de translación. En cambio, en respuesta al estímulo proliferativo 4EBP1 se fosforila hasta en 7 regiones diferentes (algunas de ellas mTOR dependiente), perdiendo la afinidad por EIF4E y se disocian. EIF4E libre se une a EIF4G (proteína de anclaje), EIF4A (ARN helicasa ATP-dependiente) y EIF4B, formando un complejo trimérico denominado EIF4F que facilita la translación proteica cap-dependiente (266). Se facilita así la translación de elementos regulatorios en la 5'-untranslated terminal regions (5'-UTR), que incluye ARNm que codifica proteínas necesarias para el paso de la fase G1 a la fase S del ciclo celular, como ciclina D1, c-MYC y ornitina decarboxilasa (267).

Las vías de transducción de señales más importantes implicadas en el crecimiento celular y en la proliferación corresponden a RAS/MAPK y PI3K/mTOR (140), y recientemente se ha demostrado que 4EBP1 es un efector crítico de la activación oncogénica de ambas vías (268).

En conjunto, todos estos resultados en los que se demuestra la importancia de 4EBP1 como factor embudo, concuerdan con la evidencia actualmente disponible en investigación translacional en donde se emplea la expresión de su forma fosforilada como marcador de activación de múltiples vías oncogénicas. Así, dado que mTOR parece ser directamente responsable de la fosforilación de cuatro de las siete regiones conocidas de 4EBP1, la inhibición de la fosforilación de 4EBP1 con inhibidores de mTOR y de PI3K en líneas celulares y modelos murinos refleja una disminución y desaparición de la forma fosforilada de 4EBP1, siendo usado en la actualidad como marcador de actividad citotóxica del fármaco (269). Resultados similares se han obtenido en ensayos clínicos fase 1 en humanos, en los que se ha llegado a observar una disminución de la expresión de 4EBP1 de hasta el 70% tras 7 días de tratamiento con inhibidores de mTOR (269).

Los SPB del adulto constituyen, por lo tanto, un grupo fenotípica y molecularmente heterogéneo, pero en el que los últimos avances en biología molecular nos indican la existencia de vías comunes de señalización, independientemente del subtipo tumoral, que pueden tener relevancia diagnóstica, pronóstica y terapéutica.



## 2

### Hipótesis de Trabajo

- Los SPB constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias de origen mesenquimal en el que las principales rutas responsables de la proliferación y del comportamiento maligno corresponden a las vías de RAS/MAPK y de PI3K/mTOR.
- El incremento de la expresión y/o de la activación de estas dos vías a diferentes niveles nos permitirá identificar nodos relevantes en la biología de los SPB asociados a malignidad con potencial pronóstico y/o terapéutico.

# 3

## Objetivos del Estudio

Las vías de transducción de señales desempeñan un papel crucial en el desarrollo y progresión de los SPB en adultos. A pesar de que el diagnóstico de SPB incluye numerosos subgrupos, se considera que las vías de transducción de señales de RAS/MAPK y de PI3K/mTOR son esenciales para la proliferación y el mantenimiento del fenotipo tumoral, independientemente del subtipo tumoral.

### **3.1. Objetivo Principal**

Determinar qué componentes de las vías de RAS/MAPK y de PI3K/mTOR tienen un papel pronóstico en SPB del adulto.

### **3.2. Objetivos Secundarios**

1. Determinar la expresión y la activación de las proteínas implicadas en las principales rutas de señalización celular en SPB, incluyendo, 4EBP1 y p4EBP1, pMAPK, pS6, EIF4E y pEIF4E, y su correlación con:
  - a. características clínico-patológicas de los tumores
  - b. pronóstico
2. Determinar si alguno de los factores estudiados (4EBP1 y p4EBP1, pMAPK, pS6, EIF4E y pEIF4E) nos permite discriminar entre patología benigna y maligna en tumores de partes blandas.

# 4

## Material y Métodos

### 4.1. Sujetos de estudio. Criterios de inclusión

Los criterios de inclusión que han conformado la población de estudio son los siguientes:

- Pacientes diagnosticados de tumor de partes blandas (benigno y maligno) en el periodo de 2000 a 2009.
  
- Pacientes diagnosticados con los siguientes subtipos histológicos:
  1. Schwannoma
  2. Neurofibroma
  3. Tumor maligno de la vaina nerviosa periférica
  4. Leiomioma no uterino
  5. Leiomioma uterino
  6. Leiomioma uterino simplástico
  7. Leiomiosarcoma no uterino
  8. Leiomiosarcoma uterino
  9. Lipoma
  10. Liposarcoma bien diferenciado
  11. Liposarcoma mixoide/células redondas

12. Liposarcoma desdiferenciado
13. Liposarcoma pleomórfico
14. Sarcoma sinovial
15. Sarcoma pleomórfico indiferenciado

- Disponer de material histológico suficiente en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron para revisar el diagnóstico y realizar las tinciones inmunohistoquímicas objeto de estudio.
  
- Disponer de información clínico-patológica y adecuado seguimiento.

## **4.2. Variables Clínicas y Anatomopatológicas**

- **Información Clínica:**

La información clínica se ha recogido de manera retrospectiva a través de la revisión de los informes clínicos procedentes de los Servicios de Oncología Médica, Oncología Radioterapia y Cirugía/Traumatología. Las variables finales que se han recogido son las siguientes:

- Fecha de diagnóstico
- Edad al diagnóstico
- Sexo
- Localización. Subdivisión en: cabeza y cuello, tronco, abdomen, pelvis y extremidades
- Tratamiento: cirugía, radioterapia, quimioterapia
- Fecha de progresión (tumores malignos)
- Fecha de deceso

- **Información anatomopatológica**

Se ha recogido retrospectivamente la información anatomopatológica procedente de los informes emitidos por el Servicio de Anatomía

Patológica. En todos los casos se ha procedido a revisar diagnóstico, grado y número de mitosis iniciales por dos patólogos expertos (Dra. Cleofé Romagosa y Dr. Santiago Ramón y Cajal). Las variables finales que se han recogido son las siguientes:

- Subtipo histológico según la clasificación de la OMS (1)
- Grado tumoral de acuerdo con los criterios establecidos por la FNCLCC (52, 53)
- Estadaje tumoral según la AJCC-7<sup>a</sup> edición (73)
- Tamaño anatomopatológico (en centímetros)
- Número de mitosis (por 10 campos de gran aumento)
- Márgenes tumorales (negativos/positivos)

### **4.3. Estudio de las Variables Biológicas. Inmunohistoquímica**

El uso de tejido humano en el presente estudio fue aprobado por el comité ético del hospital. El material se obtuvo a partir de muestras fijadas en formalina e incluidas en parafina procedentes de exéresis quirúrgicas de tumores de partes blandas, sin tratamiento previo, procedentes de los archivos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron. Se seleccionó un bloque de parafina representativo de cada caso para realizar las tinciones inmunohistoquímicas objeto de estudio, previa evaluación de una sección teñida con hematoxilina y eosina.

#### **4.3.1. REACTIVOS Y ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO**

El estudio inmunohistoquímico se realizó de forma automatizada en secciones de 3µm de tejido parafinado usando el sistema Ventana Benchmark® XT Automated IHC Stainer. Para su visualización se empleó el kit de detección Ventana *ultraView*<sup>TM</sup> Universal DAB detection kit (catalog no. 760-500).

El procedimiento consistió en los siguientes pasos:

1. Desparafinación de las secciones histológicas con la solución Ventana EZ Prep Solution (catálogo # 950-102).
2. Recuperación antigénica con la solución Ventana Tris-based buffer solution CC1 (catálogo # 950-124) a temperatura estándar durante 60 minutos.
3. Bloqueo de la peroxidasa endógena con ultraView Inhibitor con 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, durante 4 minutos a 37°C.
4. Después de los lavados, las secciones se incubaron durante 1 hora a 37°C con el anticuerpo primario. P16, KI67, Ciclina D1 y p53 requirieron 20, 16, 32 y 16 minutos de incubación respectivamente.
5. El complejo anticuerpo primario – HRP (horseradish peroxidase) se visualizó con el cromógeno diaminobenzidina tetrahidroclorhídrico (DAB)
6. Finalmente, las laminillas se contra-tiñeron durante 8 minutos con hematoxilina y durante 4 minutos con Bluing reagent.
7. Durante todo el procedimiento se añadieron controles positivos y negativos apropiados para cada anticuerpo. Las condiciones específicas para cada una de las reacciones se detallan a continuación (tabla 9).

Proteína	Sitio de fosforilación	Tipo de Anticuerpo	Dilución	Anticuerpo secundario	Fuente (No. Catálogo)
<b>p-S6</b>	Ser 240/244	policlonal	1:100	conejo	Cell Signaling (2215)
<b>p-MAPK</b>	Thr 202/ Tyr 204	policlonal	1:200	conejo	Cell Signaling (4376)
<b>4e-BP1</b>	-	policlonal	1:40	conejo	Cell Signaling (9452)
<b>p-4e-BP1</b>	Thr 70	monoclonal	1:50	conejo	Cell Signaling (9455)
<b>eiF-4E</b>	-	policlonal	1:75	conejo	Cell Signaling (9742)
<b>p-eiF-4E</b>	Ser 209	monoclonal	1:50	conejo	Cell Signaling (9741)
<b>p16</b>	-	monoclonal	Predil.	ratón	Ventana (725-4713)
<b>p53</b>	-	monoclonal	Predil.	ratón	Ventana (760-2542)
<b>KI67</b>	-	monoclonal	Predil.	conejo	Ventana (790-4286)
<b>Ciclina D1</b>	-	monoclonal	Predil.	conejo	Ventana (790-4508)

Tabla 9. Características de los anticuerpos y condiciones empleadas en el estudio.

En todos los casos se han teñido y evaluado los marcadores de vías de señalización (pMAPK, pS6, 4EBP1, p4EBP1, EIF4E, pEIF4E). Dado el interés

particular que despertaban los SPI, se ha realizado un estudio más exhaustivo en este subgrupo y se han añadido marcadores del ciclo celular (p16, p53, KI67 y Ciclina D1).

#### **4.3.2. EVALUACIÓN DE LAS TINCIONES INMUNOHISTOQUÍMICAS**

Las proteínas del ciclo celular (p16, p53, KI67 y Ciclina D1) se han evaluado como porcentaje de células tumorales teñidas y localización subcelular. Los factores de crecimiento y transcripción (pMAPK, pS6, 4EBP1, p4EBP1, EIF4E, pEIF4E) se han evaluado de una manera semi-cuantitativa mediante una Histo-score (Hscore) (261). En el Hscore se evalúa el porcentaje de células teñidas (tinción núcleo-citoplásmica para todos los marcadores, excepto para pMAPK, que es nuclear) y la intensidad de la tinción en 10 campos de gran aumento (x400) representativos. La intensidad se define como:

- 0: no se aprecian células teñidas
- 1: tinción débil
- 2: intensidad moderada
- 3: tinción fuerte

El Hscore se calcula multiplicando la intensidad por el porcentaje de células teñidas, obteniendo resultados que pueden ir de 0 a 300.

Todos los casos han sido evaluados independientemente por el autor y por un patólogo experto. Se considera como resultado final la media entre ambas lecturas siempre y cuando la discrepancia sea menor de un 10% de positividad o 20 puntos Hscore. En caso de discrepancia mayor del 10% o 20 puntos Hscore, se han revisado conjuntamente los casos y se ha consensuado el resultado final.

Para el análisis estadístico, se ha considerado una tinción positiva según el punto de corte:

- Factores de crecimiento y de transcripción: al estar poco estudiados, se ha considerado la mediana como punto de corte, excepto en aquellos casos en los que se ha observado una distribución bimodal.

- Marcadores del ciclo celular: se han utilizado puntos de corte referenciados en la literatura (ver Resultados).

#### **4.4. Análisis Estadístico**

Los análisis estadísticos se han llevado a cabo utilizando el Statistical Package for Social Sciences, versión 15.0 (SPSS, Chicago, IL).

Se ha efectuado el estudio descriptivo de las variables demográficas y de las características clínico-patológicas en: 1) toda la cohorte, 2) tumores benignos y malignos, y 3) en cada subgrupo en concreto.

Se ha evaluado la presencia de diferencias de las distintas covariables (características demográficas, clínicas y anatomopatológicas, y biomarcadores) en tumores benignos vs malignos, y por subgrupo. Para ello, en la comparación de medias para muestras independientes (al separar la base de datos de benignos y malignos) se ha usado la prueba paramétrica T de Student para las variables continuas que siguen una distribución Normal y la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para las variables continuas que no siguen una distribución Normal. Se ha empleado la prueba de Kruskal-Wallis en el caso en el que se trataran de 3 ó más grupos. En la comparación de variables categóricas para muestras independientes se ha usado la prueba Chi-cuadrado o la prueba de Fisher.

En la correlación de marcadores con variables clínico-patológicas se ha usado el coeficiente rho de Spearman.

Se ha definido tiempo a la recaída o supervivencia libre de enfermedad (SLE) como la diferencia entre las fechas de diagnóstico y primera recaída, ya fuera local, a distancia o ambas. La supervivencia global (SG) se ha calculado como la diferencia entre las fechas de diagnóstico y de muerte o último contacto en su defecto. El SLE y la SG se han modelado usando el método de Kaplan-Meier y se han analizado mediante el Log-rank test y el análisis multivariante de la regresión de Cox. Los Hazard ratios (HR) ajustados de los predictores del SLE y la SG han sido estimados también con el modelo de regresión de Cox. Todos los test estadísticos han sido realizados con un nivel de significación bilateral de 0,05.



# 5

## Resultados

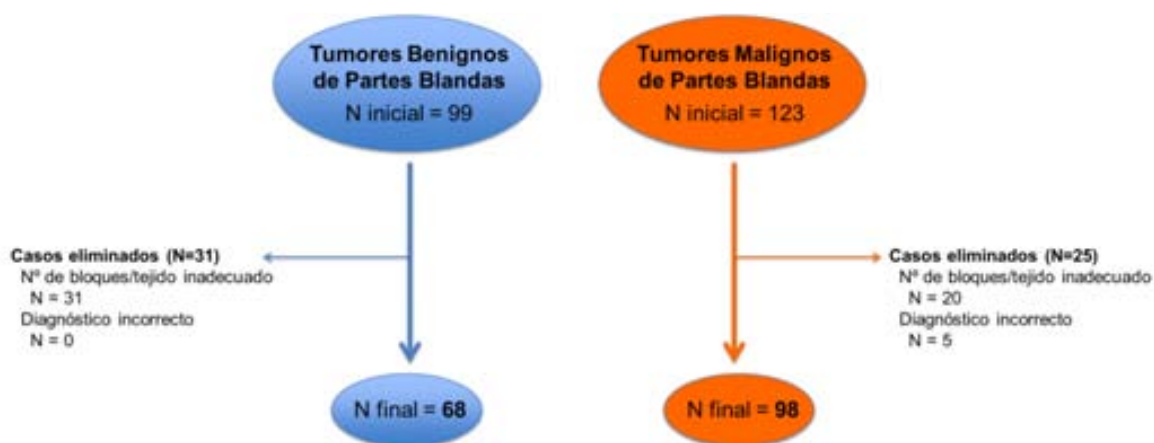
### 5.1. Población a Estudio

#### 5.1.1. SELECCIÓN DE CASOS

Se seleccionaron pacientes diagnosticados de tumor de partes blandas registrados en la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron durante el periodo que va de 2000 a 2009. El procedimiento de selección de casos para el presente estudio se realizó por dos vías distintas según se tratasen de tumores benignos o malignos (Figura 1).

- a) Tumores benignos. Al incorporarse al proyecto con finalidad comparativa (con la patología maligna correspondiente), se seleccionaron al azar entre 10 a 40 casos por diagnóstico. Se seleccionaron inicialmente un total de 99 tumores benignos (38 schwannomas, 20 neurofibromas, 27 leiomiomas y 14 lipomas). Tras revisar el diagnóstico, la existencia de un número de bloques suficiente y la calidad de la fijación, quedaron para el estudio un total de 68 tumores benignos: 15 schwannomas, 15 neurofibromas, 24 leiomiomas y 14 lipomas. El diagnóstico inicial fue correcto en todos los casos. En la Figura 2 se puede ver una tinción (hematoxilina/eosina) representativa de cada tumor.

b) Tumores malignos. Se extrajeron de la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica todos los casos de TMVNP, leiomiocarcinoma, liposarcinoma, sarcoma sinovial y SPI intervenidos quirúrgicamente y diagnosticados durante el periodo previamente mencionado. Aquellos casos sin pieza de resección quirúrgica no se incluyeron en la búsqueda inicial. Se obtuvieron un total de 123 pacientes (18 TMVNP, 29 leiomiocarcinomas, 22 liposarcinomas, 12 sarcomas sinoviales y 42 SPI). Tras revisar el diagnóstico (aplicando FISH y tinciones de IHQ no disponibles en el momento), la existencia de un número de bloques suficiente y la calidad de la fijación, quedaron para el estudio un total de 98 tumores malignos: 18 TMVNP, 19 LMS, 17 LPS, 7 sarcomas sinoviales y 37 SPI. Hubo 5 casos con diagnóstico erróneo inicial de SPI. En la Figura 3 se puede ver una tinción representativa de cada tumor.



Tipo de tumor benigno	N
Estirpe Neural	30
Schwannoma	15
Neurofibroma	15
Leiomioma	24
Leiomioma no uterino	7
Leiomioma uterino	11
Leiomioma uterino simplástico	6
Lipoma	14

Tipo de Sarcoma	N
TMVNP	18
Leiomiocarcinoma	19
Leiomiocarcinoma no uterino	8
Leiomiocarcinoma uterino	11
Liposarcinoma	17
Liposarcinoma bien diferenciado	6
Liposarcinoma mixoide/ célula redonda	6
Liposarcinoma desdiferenciado	4
Liposarcinoma pleomórfico	1
Sarcoma sinovial	7
Sarcoma pleomórfico indiferenciado	37

Figura 1. Proceso de selección de los pacientes objeto de estudio.

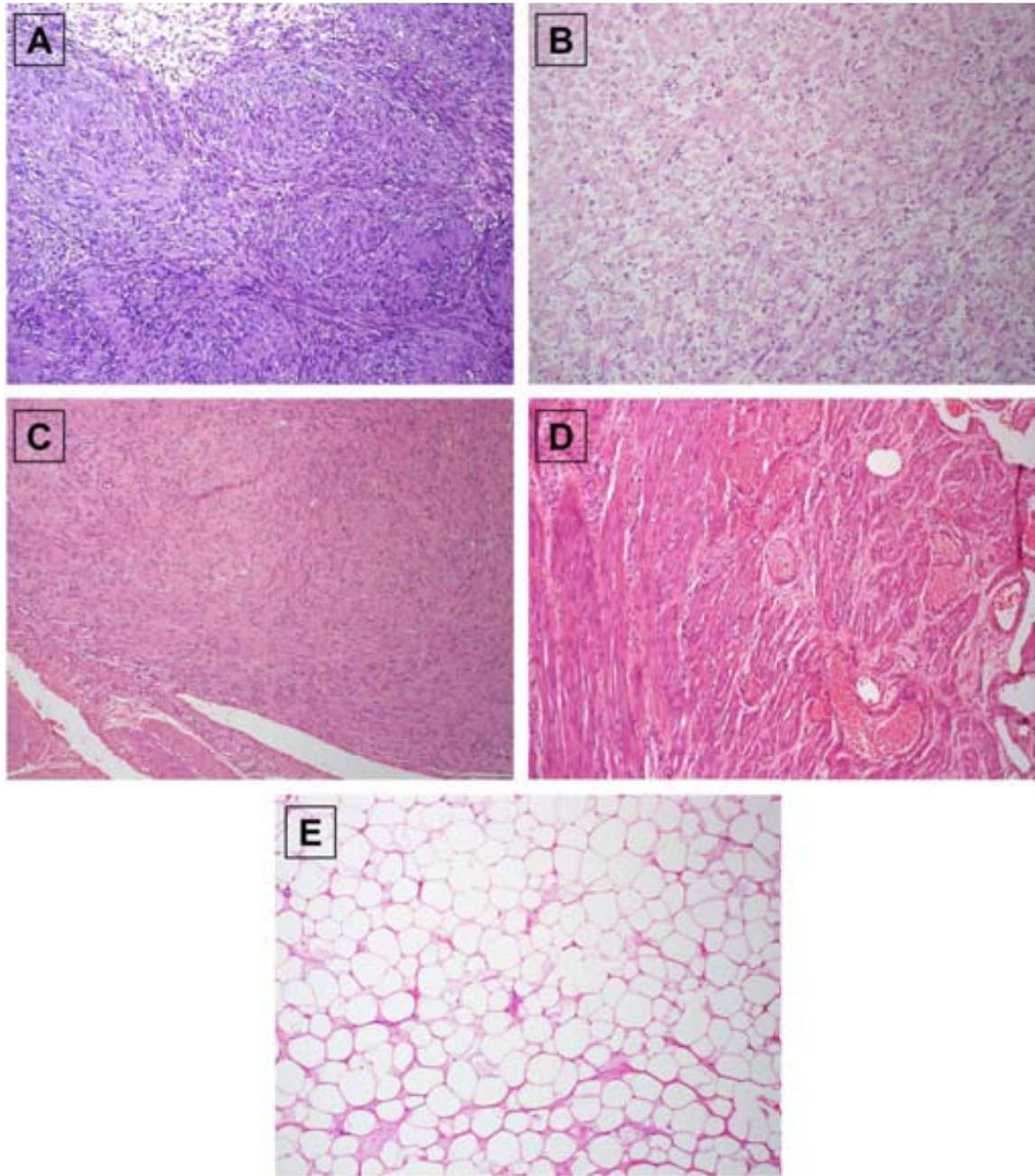


Figura 2. Tinciones representativas de los tumores benignos objeto de estudio. A) Schwannoma; B) Neurofibroma; C) Leiomioma no uterino; D) Leiomioma uterino; E) Lipoma. Magnificación 10X.



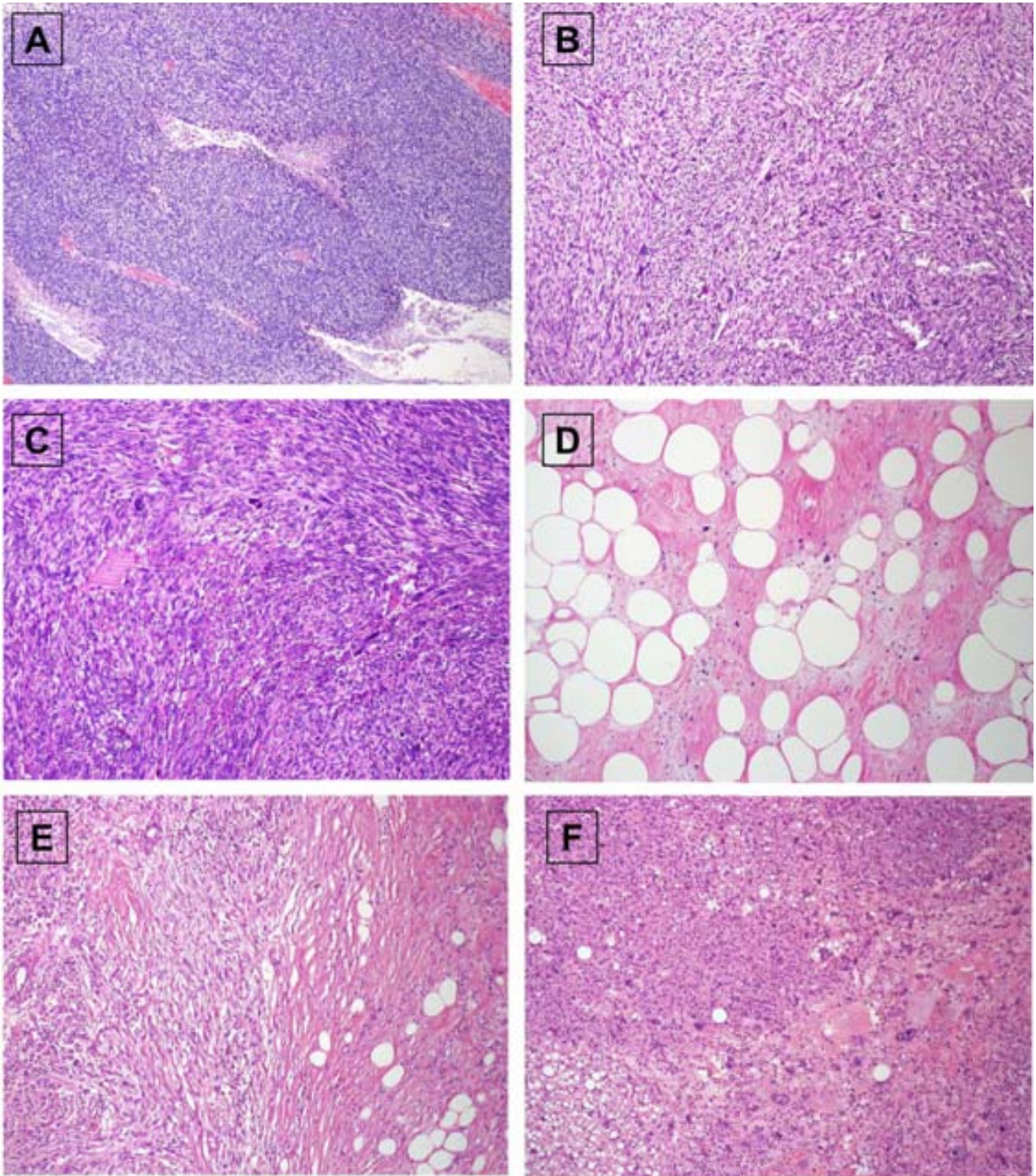


Figura 3. Tinciones representativas de los sarcomas objeto de estudio. A) TMVNP; B) Leiomyosarcoma no uterino; C) Leiomyosarcoma uterino; D) Liposarcoma bien diferenciado; E) Liposarcoma dediferenciado; F) Liposarcoma pleomórfico; G) Liposarcoma mixoide; H) Sarcoma sinovial; I) Sarcoma pleomórfico indiferenciado. Magnificación 10X, excepto en el sarcoma sinovial (20X).



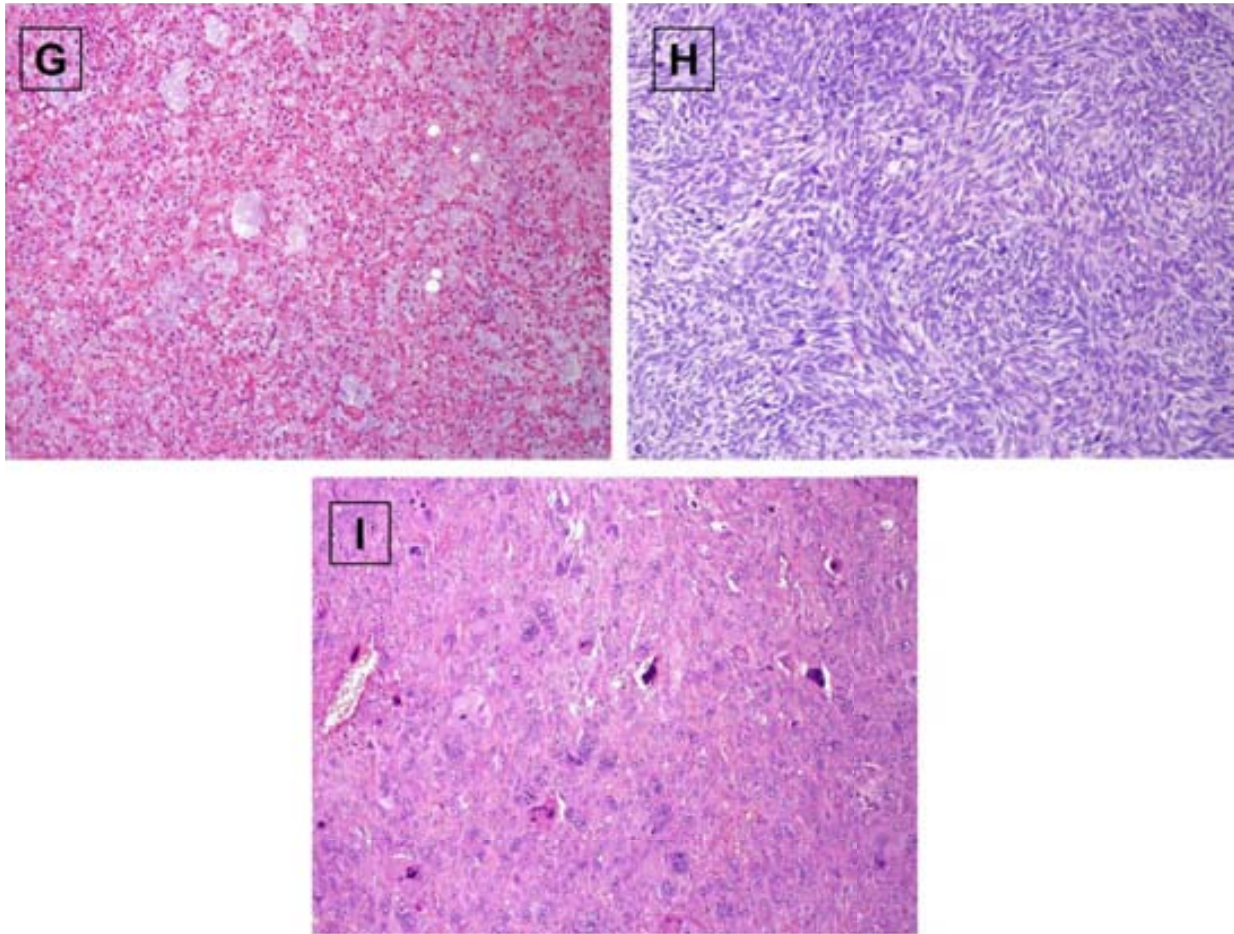


Figura 3 (continuación). Tinciones representativas de los sarcomas objeto de estudio. A) TMVNP; B) Leiomiosarcoma no uterino; C) Leiomiosarcoma uterino; D) Liposarcoma bien diferenciado; E) Liposarcoma desdiferenciado; F) Liposarcoma pleomórfico; G) Liposarcoma mixoide; H) Sarcoma sinovial; I) Sarcoma pleomórfico indiferenciado. Magnificación 10X, excepto en el sarcoma sinovial (20X).

### 5.1.2. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

La edad media de todos los pacientes de la muestra fue de 56,3 años (SD 18,93), y la edad mediana de 60 (rango de 15 a 96 años). Los tumores benignos fueron diagnosticados a una edad estadísticamente inferior (media=50,25 años) que los tumores malignos (media=60,4 años) ( $p < 0,001$  – t de Student de comparación de medias). La Tabla 10 condensa los datos descriptivos obtenidos para las variables categóricas clínico-patológicas de la presente tesis doctoral. De manera global hubo un predominio de mujeres en la muestra (56% frente a 39% de varones), siendo esta diferencia mucho más

llamativa en los tumores benignos (66% frente a 28% de varones) que en los malignos (48% y 46% respectivamente). En el 4% de los casos no se pudo conseguir este dato.

La mayor parte de los tumores estaban localizados en las extremidades (38%). En el caso de los tumores benignos, los tumores localizados en la pelvis fueron los más numerosos (35%) debido a la introducción de los leiomiomas uterinos y leiomiomas uterinos simplásticos. En cambio, un 50% de todos los sarcomas estaban localizados en las extremidades, seguidos por pelvis (13%), tronco (12%), cabeza y cuello (10%) y abdomen (8%).

Respecto al tratamiento, todos los pacientes menos uno (un paciente con sarcoma) fueron intervenidos quirúrgicamente en algún momento de la evolución. En el caso de los sarcomas, hasta en un 24% de los casos los márgenes fueron positivos o  $<1\text{mm}$ . El 57% de los sarcomas recibió radioterapia adyuvante a dosis estándar y el 23% quimioterapia adyuvante con antraciclinas e ifosfamida. Excepto en 9 pacientes, la gran mayoría de los sarcomas (90%) se encontraron localizados al diagnóstico (estadios I, II y III de la AJCC). No obstante, una proporción importante de pacientes presentaban criterios de mal pronóstico: hasta un 30% fueron diagnosticados ya como estadio III y un 50% fueron evaluados como Grado 3 (FNCLCC). El número medio de mitosis por 10 campos de gran aumento (CGA) fue de 15,2 (SD=21,9) y la mediana de 10 (rango=0-160). Por último, el tamaño medio del tumor al diagnóstico en el caso de patología benigna fue de 4,72 cm (SD=4,2), mientras que el de los sarcomas fue significativamente mayor 11,95 cm (SD=7,88) ( $p<0,001$ , t de Student de comparación de medias).

		Todos (N=166)		Benignos (N=68, 40.96%)		Malignos (N=98, 59.04%)		p-valor
		N	%	N	%	N	%	
Sexo	Masculino	65	39,16	19	27,94	46	46,94	<b>0.025</b>
	Femenino	93	56,02	45	66,18	48	48,98	
	Desconocido	8	4,82	4	5,88	4	4,08	
Localización	Cabeza y Cuello	18	10,84	8	11,76	10	10,20	<b>&lt;0.001</b>
	Extremidades	63	37,95	14	20,59	49	50,00	
	Tronco	17	10,24	5	7,35	12	12,24	
	Abdomen	15	9,04	7	10,29	8	8,16	
	Pelvis	37	22,29	24	35,29	13	13,27	
	Desconocido	16	9,64	10	14,71	6	6,12	
Cirugía	No	1	0,60	0	0,00	1	1,02	<b>0.986</b>
	Sí	158	95,18	68	100,00	90	91,84	
	Desconocido	7	4,22	0	0,00	7	7,14	
Radioterapia	No	102	61,45	0	0,00	34	34,69	-
	Sí	56	33,73	0	0,00	56	57,14	
	Desconocido	8	4,82	0	0,00	8	8,16	
Quimioterapia	No	133	80,12	0	0,00	65	66,33	-
	Sí	23	13,86	0	0,00	23	23,47	
	Desconocido	10	6,02	0	0,00	10	10,20	
Márgenes	Negativo	125	75,30	0	0,00	57	58,16	-
	Positivo	24	14,46	0	0,00	24	24,49	
	Desconocido	17	10,24	0	0,00	17	17,35	
Estadaje	I	15	15,31	0	0,00	15	15,31	-
	II	31	31,63	0	0,00	31	31,63	
	III	33	33,67	0	0,00	33	33,67	
	IV	9	9,18	0	0,00	9	9,18	
	Desconocido	10	10,20	0	0,00	10	10,20	
Grado	1	11	11,22	0	0,00	11	11,22	-
	2	33	33,67	0	0,00	33	33,67	
	3	53	54,08	0	0,00	53	54,08	
	Desconocido	1	1,02	0	0,00	1	1,02	
Recaída	No	32	52,04	0	0,00	32	32,65	-
	Sí	51	32,65	0	0,00	51	52,04	
	Desconocido	15	15,31	0	0,00	15	15,31	

Tabla 10. Descriptiva para las variables categóricas clínico-patológicas de todas la muestra del estudio, y de ésta separada según si se tratan de tumores benignos o malignos. El p-valor que se muestra es el obtenido mediante la prueba chi-cuadrado para ver si hay diferencias significativas entre categorías de las variables y tipo de tumor.

Un total de 51 pacientes con sarcoma (52%) recayó a lo largo de su evolución. 32 (33%) no recayeron y de 15 pacientes (15%) no disponemos de datos (Tabla 10). En cuanto a los pacientes que recayeron (Tabla 11), la localización de la recaída se distribuyó de manera similar entre los casos en los que la recaída fue exclusivamente local (n=24, 47%) y exclusivamente a distancia (n=23, 45%). Únicamente 4 pacientes presentaron recaída local y a distancia (n=4, 7%).

		N	%
<b>Recaída</b>	Sí	Local	24 24.49
		A distancia	23 23.47
		Local y a distancia	4 4.08
	No	32 32.65	
	Desconocido	15 15.31	

Tabla 11. Descriptiva de la recaída sólo para los tumores malignos (n=98).

Estudiando los sarcomas agrupados por subtipos (TMVNP, leiomiomas, liposarcomas, sarcomas sinoviales y SPI) (Tabla 12), identificamos diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su distribución: los leiomiomas, a diferencia del resto de sarcomas, se localizaban predominantemente en la pelvis debido al subgrupo específico de leiomiomas uterinos. La proporción de TMVNP, liposarcomas, sarcomas sinoviales y SPI en extremidades fue de 43%, 53%, 50% y 78% respectivamente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto al tratamiento realizado (cirugía y radioterapia y quimioterapia adyuvantes). Tampoco en cuanto a positividad de margen y recaída. En cambio, los patrones correspondientes al grado y al estadio tumoral fueron significativamente diferentes: predominaron los LPS con grado 1 (debido a la subpoblación de LPS-BD), mientras que sarcomas sinoviales y SPI fueron predominantemente grado 3 y localmente avanzados (estadio III).



		SUBTIPO DE SARCOMA					p-valor Chi-cuadrado
		TMVNP	LMS	LPS	SS	SPI	
		N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	
<b>Localización</b>	Cabeza y cuello	4 (28.57%)	1 (5.26%)	1 (5.88%)	1 (16.67%)	3 (8.33%)	<b>p&lt;0,0001</b>
	Extremidades	6 (42.86%)	3 (15.79%)	9 (52.94%)	3 (50%)	28 (77.78%)	
	Tronco	2 (14.29%)	1 (5.26%)	2 (11.76%)	2 (33.33%)	5 (13.89%)	
	Abdomen	1 (7.14%)	2 (10.53%)	5 (29.41%)	0 (0%)	0 (0%)	
	Pelvis	1 (7.14%)	12 (63.16%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Cirugía</b>	No	0 (0%)	1 (5.26%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	p=0,429
	Si	13 (100%)	18 (94.74%)	17 (100%)	6 (100%)	36 (100%)	
<b>Radioterapia</b>	No	2 (16.67%)	7 (36.84%)	7 (41.18%)	3 (50%)	15 (41.67%)	p=0,561
	Si	10 (83.33%)	12 (63.16%)	10 (58.82%)	3 (50%)	21 (58.33%)	
<b>Quimioterapia</b>	No	6 (60%)	18 (94.74%)	14 (82.35%)	4 (66.67%)	23 (63.89%)	p=0,094
	Si	4 (40%)	1 (5.26%)	3 (17.65%)	2 (33.33%)	13 (36.11%)	
<b>Márgenes</b>	Negativo	5 (41.67%)	11 (57.89%)	10 (58.82%)	4 (80%)	27 (75%)	p=0,138
	Positivo	5 (41.67%)	6 (31.58%)	3 (17.65%)	1 (20%)	9 (25%)	
	Desconocido	2 (16.67%)	2 (10.53%)	4 (23.53%)	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Grado</b>	1	1 (5.56%)	1 (5.26%)	9 (52.94%)	0 (0%)	0 (0%)	<b>p&lt;0,0001</b>
	2	14 (77.78%)	7 (36.84%)	4 (23.53%)	1 (14.29%)	7 (19.44%)	
	3	3 (16.67%)	11 (57.89%)	4 (23.53%)	6 (85.71%)	29 (80.56%)	
<b>Estadio</b>	I	0 (0%)	6 (31.58%)	9 (52.94%)	0 (0%)	0 (0%)	<b>p&lt;0,0001</b>
	II	7 (70%)	5 (26.32%)	4 (23.53%)	1 (16.67%)	14 (38.89%)	
	III	1 (10%)	2 (10.53%)	4 (23.53%)	4 (66.67%)	22 (61.11%)	
	IV	2 (20%)	6 (31.58%)	0 (0%)	1 (16.67%)	0 (0%)	
<b>Recaída</b>	No	4 (36.36%)	4 (30.77%)	10 (58.82%)	3 (42.86%)	12 (33.33%)	p=0,444
	Si	7 (63.64%)	9 (69.23%)	7 (41.18%)	4 (57.14%)	24 (66.67%)	

Tabla 12. Descriptiva para las variables categóricas clínico-patológicas de los sarcomas agrupados por subtipos. El p-valor que se muestra es el obtenido mediante la prueba chi-cuadrado para ver si existen diferencias significativas entre categorías de las variables y subgrupo tumoral.

## 5.2. Perfil de Expresión de Proteínas

### 5.2.1. Perfil de expresión de proteínas en toda la población

De todas las tinciones inmunohistoquímicas que se efectuaron en patología benigna y maligna con los 6 inmunomarcadores (n=996), en un 81,4% se evidenció cualquier grado de positividad (Hscore >0): un 76,7% de todos los tumores benignos y un 84,7% de todos los tumores malignos mostraron al menos un Hscore igual o superior a 1 (Tabla 13). La media y

mediana de expresión para cada proteína en todos los casos de la serie se encuentra en la Tabla 14.

De las 6 proteínas evaluadas representativas de las dos vías de señalización oncogénica más importantes en sarcomas, 5 de ellas se expresaban con unos niveles significativamente superiores en patología maligna en comparación con patología benigna; únicamente la expresión de pMAPK fue superior en los tumores benignos de partes blandas (Tabla 15 y Figura 4).

	N	p4e-BP1	4e-BP1	pMAPK	pS6	eiF-4E	peiF-4E	Total
T.Benigno	68	63,2%	91,2%	83,8%	67,6%	63,2%	91,2%	76,7%
Sarcomas	98	78,6%	92,9%	81,6%	84,7%	86,7%	83,7%	84,7%
TOTAL	166	72,3%	92,2%	82,5%	77,7%	77,1%	86,7%	81,4%

Tabla 13. Tabla-resumen con el porcentaje de casos positivos (Hscore>1) para los diferentes inmunomarcadores empleados en la presente tesis doctoral en patología benigna y maligna

	N	Media (Sd)	Mediana (p25 – p75)
p4E-BP1	160	31.19 (49.55)	10 (0 - 50)
4E-BP1	159	122.02 (89.68)	120 (40 - 190)
pMAPK	160	58.13 (73.83)	20 (1 - 100)
pS6	161	38.10 (60.75)	10 (1 - 60)
eiF-4E	156	46.97 (59.48)	20 (1 - 71)
peiF-4E	150	86.06 (72.23)	70 (24 - 140)

Tabla 14. Descriptiva de los biomarcadores para toda la muestra en estudio.

	Benignos			Malignos			p-valor
	N	Media (Sd)	Mediana (p25 – p75)	N	Media (Sd)	Mediana (p25 – p75)	
p4E-BP1	68	16.15 (29.82)	0 (0 - 20)	92	42.32 (57.81)	20 (1,5 - 60)	<0.001
4E-BP1	67	72.87 (62.08)	60 (20 - 160)	92	157.82 (89.97)	160 (100 - 239)	<0.001
pMAPK	65	68.34 (69.59)	40 (5 - 120)	95	51.15 (76.18)	15 (1 - 80)	0.041
pS6	66	20.82 (37.28)	5 (0 - 15)	95	50.11 (70.47)	10 (5 - 80)	<0.001
eiF-4E	65	22.22 (36.53)	5 (0 - 20)	91	64.65 (66.22)	40 (5 - 108)	<0.001
peiF-4E	65	63.72 (60.33)	40 (10 - 80)	85	103.15 (76.16)	91 (30 - 160)	0.001

Tabla 15. Descriptiva para los biomarcadores separada según si se tratan de tumores benignos o malignos. El p-valor que se muestra es el obtenido mediante la U de Mann-Whitney de comparación de medias para determinar si había diferencias significativas entre el tipo de tumor (benigno/maligno).

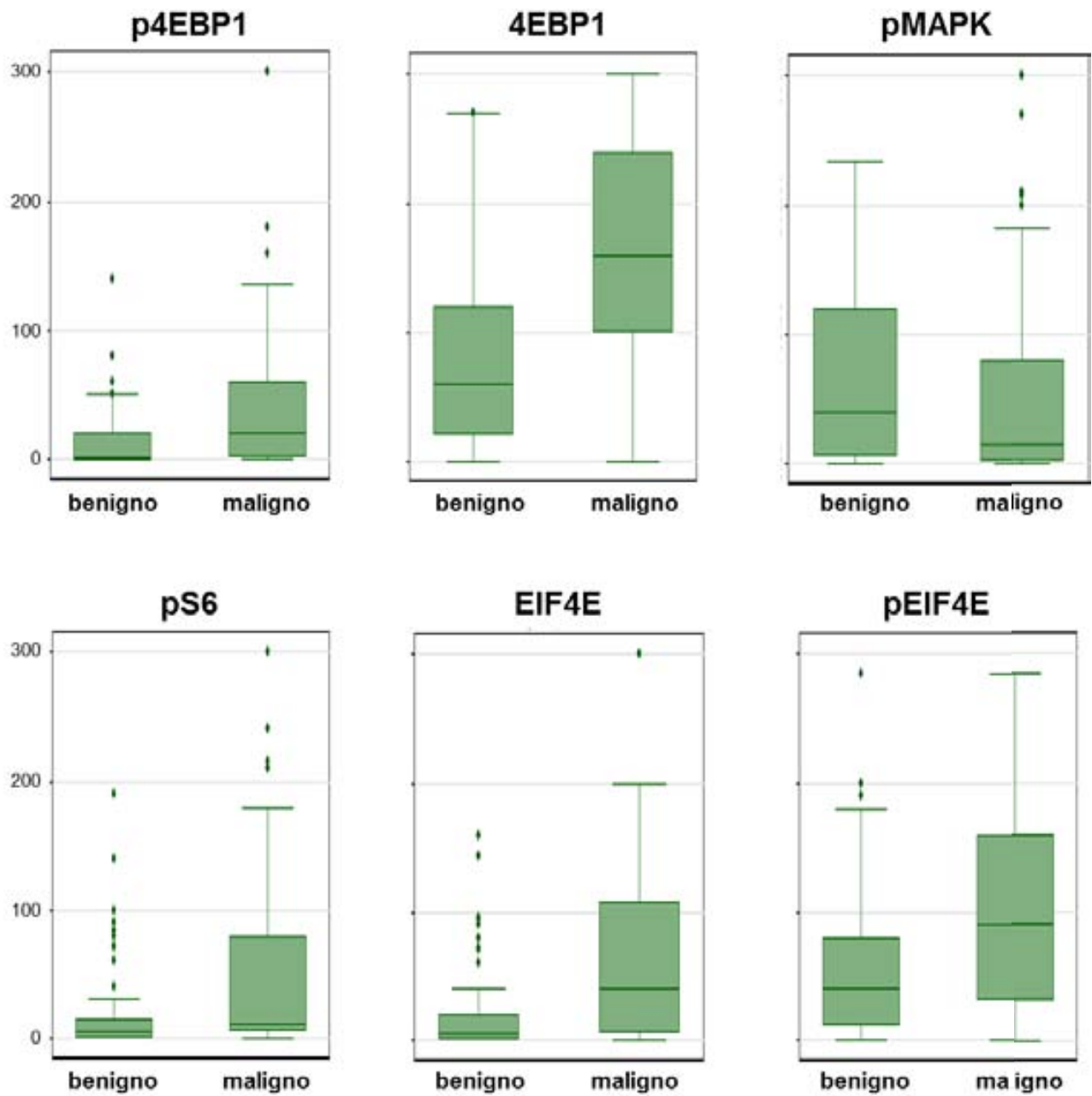


Figura 4. Descriptiva para los biomarcadores separada según si se tratan de tumores benignos o malignos mediante diagramas de caja. En todos los casos existen diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los diversos biomarcadores en patología benigna y maligna.

### 5.2.2. PERFIL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN TUMORES BENIGNOS

La expresión de los distintos biomarcadores fue diferente según el subgrupo tumoral (tumores de origen neural, leiomiomas, lipomas) (Tabla 16, Figura 5) y el diagnóstico (schwannoma, neurofibroma, leiomioma no uterino, leiomioma uterino, leiomioma uterino simplástico, lipoma) (Tabla 17, Figura 6).

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de todas las proteínas excepto para 4EBP1. Aunque los bajos números por subgrupo impiden hacer un análisis entre los diversos tipos tumorales, sí que se puede observar diferencias por marcador.

p4EBP1. p4EBP1 se expresaba de manera predominante en lipomas y leiomiomas uterino y no uterino (pero no en los leiomiomas uterinos simplásticos), siendo el subgrupo de estirpe neural (schwannoma y neurofibroma) el que menos expresaba esta proteína.

4EBP1. No se encontraron diferencias en cuanto a la expresión de la proteína total.

pMAPK. Los lipomas fueron los tumores que más expresaban pMAPK, tanto por diagnóstico como por subgrupo tumoral. En cuanto a los leiomiomas, cabe señalar la diferencia de expresión entre leiomiomas no uterinos (alto pMAPK) y leiomiomas uterinos (bajo pMAPK) (Figura 7).

pS6. Los leiomiomas fueron el subgrupo con una mayor expresión de pS6, fundamentalmente a expensas de los leiomiomas extrauterinos, en los que había una mayor expresión comparados con los uterinos (Figura 8).

pEIF4E. No se detectaron diferencias significativas.

EIF4E. Se observó una expresión más baja de la forma total en schwannomas y neurofibromas.

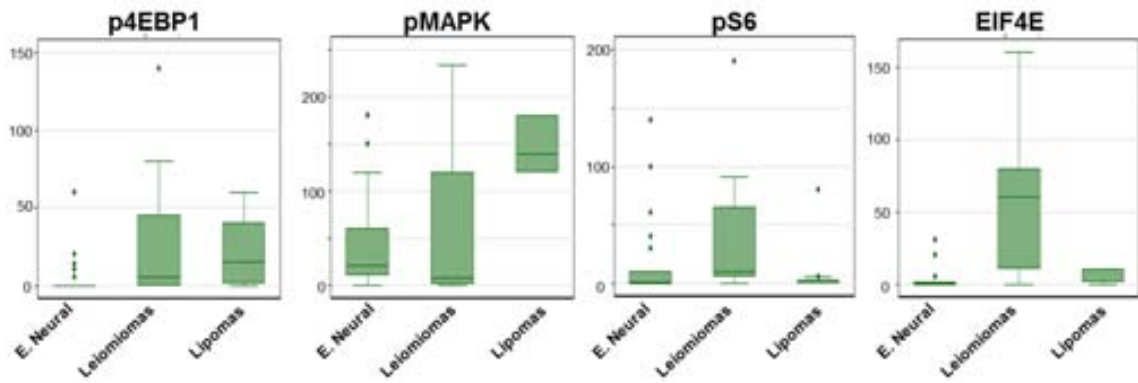


Figura 5. Descriptiva para los biomarcadores para tumores benignos según el subgrupo tumoral mediante diagramas de caja. Se han tomado las 4 tinciones más representativas.

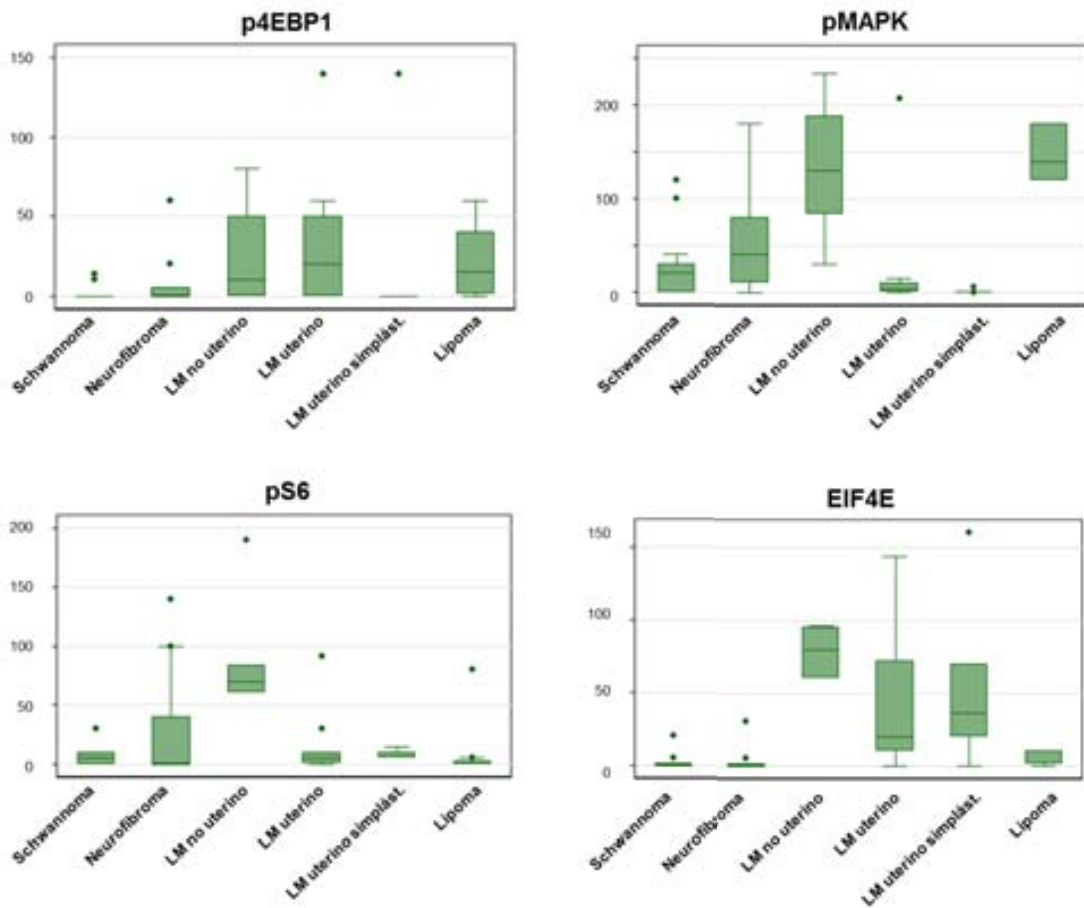


Figura 6. Descriptiva para los biomarcadores para tumores benignos según el diagnóstico mediante diagramas de caja. Se han tomado las 4 tinciones más representativas.

<b>SUBTIPO DE TUMOR BENIGNO</b>				
	<b>Neural (n=30)</b>	<b>Leiomiomas (n=24)</b>	<b>Lipoma (n=14)</b>	<b>p-valor</b>
	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	
<b>p4EBP1</b>	0 (0-0)	5 (0-45)	15 (1-40)	<b>&lt;0.001</b>
<b>4EBP1</b>	30 (5-140)	70 (40-114)	70 (40-105)	<b>0.175</b>
<b>pMAPK</b>	20 (10-60)	7,5 (1-120)	140 (120-180)	<b>&lt;0.001</b>
<b>pS6</b>	0 (0-10)	10 (5-65)	1 (0-2)	<b>0.001</b>
<b>EIF4E</b>	0 (0-1)	60 (10-80)	10 (1-10)	<b>&lt;0.001</b>
<b>pEIF4E</b>	65 (30-130)	70 (10-119)	15 (10-40)	<b>0.014</b>

Tabla 16. Descriptiva para los biomarcadores separados según subgrupo tumoral para tumores benignos. El p-valor que se muestra es el obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis para determinar si había diferencias significativas entre los 3 subgrupos.

<b>SUBTIPO DE TUMOR BENIGNO</b>							
	<b>Schwannoma (n=15)</b>	<b>Neurofibroma (n=15)</b>	<b>Leiomioma no uterino (n=7)</b>	<b>Leiomioma uterino (n=11)</b>	<b>Leiomioma uterino simplástico (n=6)</b>	<b>Lipoma (n=14)</b>	<b>p-valor</b>
	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	
<b>p4EBP1</b>	0 (0-0)	0 (0-5)	10 (0-50)	20 (0-50)	0 (0-0)	15 (1-40)	<b>0.002</b>
<b>4EBP1</b>	25 (0-60)	40 (10-140)	133 (90-144)	66 (40-91)	70 (30-91)	70 (40-105)	<b>0.068</b>
<b>pMAPK</b>	20 (0-30)	40 (10-80)	130 (84-189)	3,5 (1-10)	1 (1-1)	140 (120-180)	<b>&lt;0.001</b>
<b>pS6</b>	5 (0-10)	0 (0-40)	70 (60-84)	5 (1-10)	10 (5-10)	1 (0-2)	<b>0.001</b>
<b>EIF4E</b>	0 (0-1)	0 (0-1)	80 (60-95)	20 (10-72)	36 (20-70)	1 (1-10)	<b>&lt;0.001</b>
<b>pEIF4E</b>	40 (20-120)	70 (30-140)	80 (60-108)	50 (10-119)	46 (1-123,5)	15 (10-40)	<b>0.038</b>

Tabla 17. Descriptiva para los biomarcadores separados según diagnóstico para tumores benignos. El p-valor que se muestra es el obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis para determinar si había diferencias significativas entre los 6 diagnósticos.



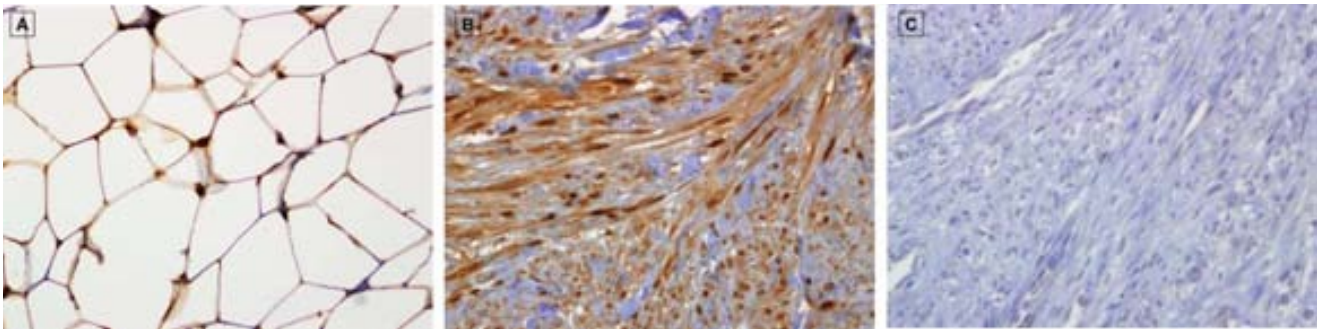


Figura 7. Expresión de pMAPK en tumores benignos. Se observa una alta expresión de pMAPK en lipoma (A) y leiomioma no uterino (B), pero baja en leiomioma uterino (C). Magnificación 40X.

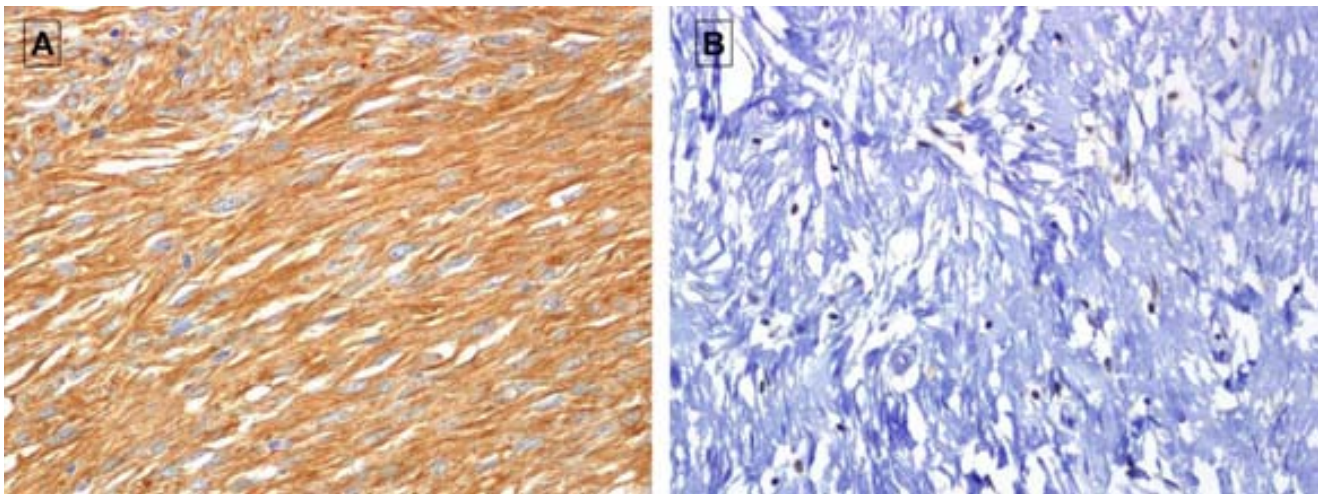


Figura 8. Expresión de pS6 en tumores benignos. Se observa una alta expresión de pS6 en leiomioma no uterino (A) y baja en leiomioma uterino (B). Magnificación 40X.

### 5.2.3. PERFIL DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN SARCOMAS

En la Figura 9 se pueden observar tinciones representativas de los diferentes anticuerpos evaluados. La expresión de los distintos biomarcadores de activación de las vías de PI3K/mTOR y RAS/MAPK también varió según el diagnóstico (TMVNP, LMS no uterino, LMS uterino, LPS-BD, LPS-M, LPS-D, LPS-P, SS y SPI) (Tabla 18, Figura 10) y el subgrupo tumoral (TMVNP, LMS, LPS, SS y SPI) (Tabla 19, Figura 11), aunque sí que se puede apreciar un menor grado de variación que la observada en los tumores benignos.



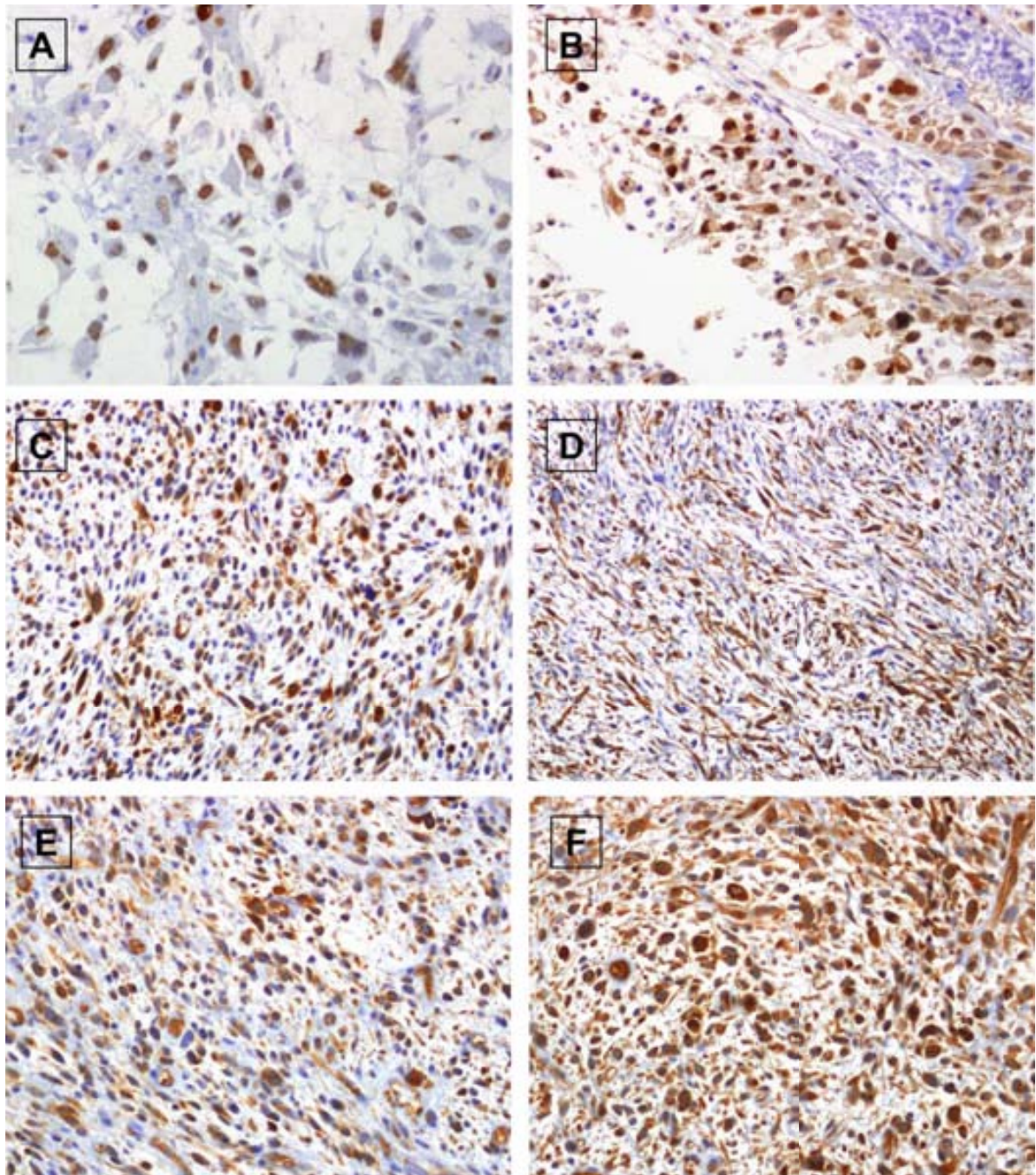


Figura 9. Tinciones representativas de la expresión de los marcadores estudiados en la tesis en sarcomas pleomórficos indiferenciados. A. p4EBP. B. 4EBP1. C. pMAPK. D. pS6. E. EIF4E. F. pEIF4E. Magnificación 40X.



No hubo diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de fosforilación de 4EBP1 ( $p=0,051$ ), MAPK ( $p=0,163$ ) y EIF4E ( $0,148$ ) entre los diferentes diagnósticos de sarcomas, si bien al agruparlos por subgrupos se pudo observar que los sarcomas sinoviales expresan en mayor grado p4EBP1, y los liposarcomas, pMAPK. Los niveles de 4EBP1 fueron más variables entre los diferentes diagnósticos, correspondiendo unos niveles más bajos a los SPI y en menor grado a los LMS, lo cual se corresponde con el análisis por subgrupos, aunque las diferencias fueron únicamente marginalmente significativas ( $p=0,087$ ). Los niveles más altos de 4EBP1 correspondieron a los LPS-M, LPS-D y LPS-P, mientras que la expresión en LPS-BD fue claramente inferior. Esta diferencia de expresión no fue tan manifiesta entre los leiomiomas uterinos y extrauterinos. Los niveles de pS6 se encontraron más elevados en TMVNP, LPS-D y SPI ( $p=0,026$ ). Cabe añadir que, tal y como se observa en la figura 5, en el resto de subtipos de LPS no se apreciaron unos niveles tan elevados de pS6. Al igual que ocurría con la forma total de 4EBP1, los niveles de la forma total de EIF4E fueron también variables entre los diversos diagnósticos, lo que refleja diferencias en la biología de los diversos sarcomas. También se pudo observar que los LPS-BD expresaban menos niveles de EIF4E que los otros 3 subtipos de liposarcoma. Los sarcomas sinoviales y el LPS-M fueron los tipos de sarcoma con una mayor expresión de esta proteína.

SUBTIPO DE SARCOMA										
	TMVNP (n=18)	LMS no uterino (n=8)	LMS uterino (n=11)	LPS-BD (n=6)	LPS-M (n=6)	LPS-D (n=4)	LPS-P (n=1)	SS (n=7)	SPI (n=37)	p-valor
	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	
p4EBP1	0 (0-10)	40 (10-70)	10 (5-30)	5 (1-30)	20 (10-50)	50 (20-60)	60 (60-60)	70 (40-80)	20 (6-75)	0,051
4EBP1	170 (120-270)	185 (107-239)	70 (20-140)	130 (120-160)	270 (240-285)	270 (172-300)	270 (270-270)	175 (120-190)	140 (40-200)	<b>0,009</b>
pMAPK	10 (0-20)	20 (1-85)	38 (20-92)	70 (40-120)	18 (10-120)	160 (2-200)	60 (60-60)	13 (0-30)	1 (1-60)	0,163
pS6	35 (5-80)	3 (1-50)	5 (1-10)	13 (1-30)	3 (0-5)	50 (10-130)	160 (160-160)	21 (0-40)	20 (10-120)	<b>0,026</b>
EIF4E	5 (0-30)	87 (40-116)	35 (10-64)	20 (5-40)	160 (140-180)	65 (55-135)	180 (180-180)	160 (120-180)	40 (5-180)	<b>&lt;0,001</b>
pEIF4E	50 (20-140)	48 (20-120)	113 (30-161)	40 (20-80)	69 (30-160)	80 (5-200)	270 (270-270)	140 (91-181)	128 (80-160)	0,148

Tabla 18. Descriptiva para los biomarcadores separados según diagnóstico para los tumores malignos. El p-valor que se muestra es el obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis para determinar si había diferencias significativas entre los 9 subtipos.

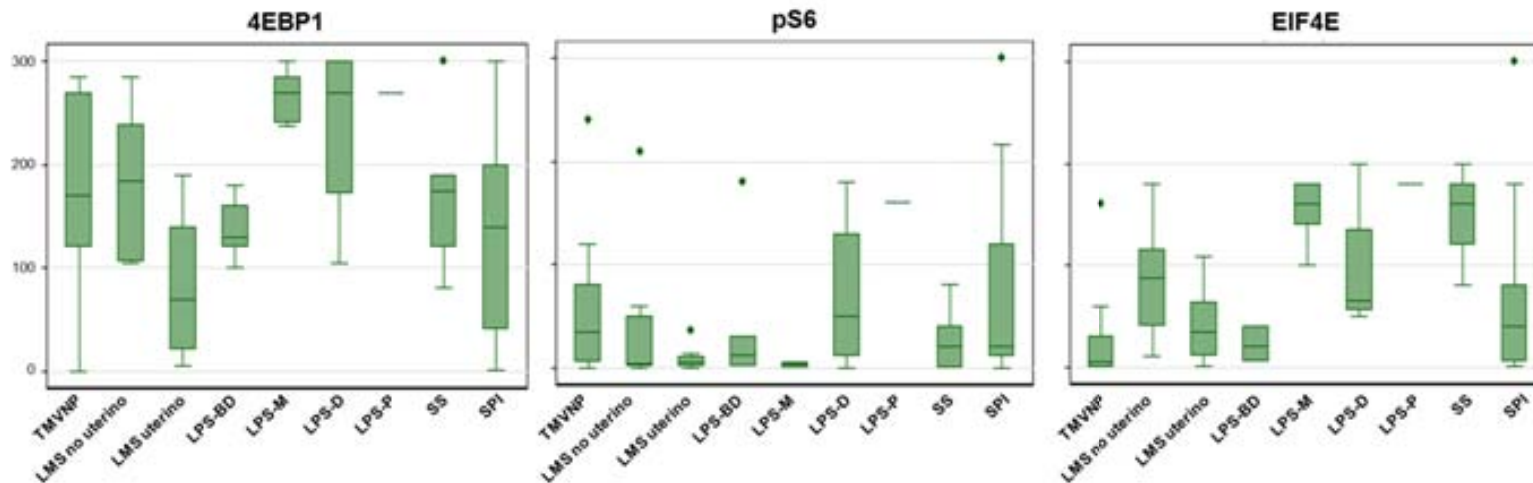


Figura 10. Descriptiva de los biomarcadores mediante diagramas de caja en todos los subtipos de sarcomas separados según el diagnóstico. Se han tomado las 3 tinciones que resultaron estadísticamente significativas.

SUBGRUPO DE SARCOMA						
	TMVNP (n=18)	LMS (n=19)	LPS (n=17)	SS (n=7)	SPI (n=37)	p-valor
	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	Mediana (p25-p75)	
p4EBP1	0 (0-10)	30 (5-160)	30 (5-60)	70 (40-80)	20 (6-75)	<b>0,015</b>
4EBP1	170 (120-270)	108 (70-190)	239 (130-278)	175 (120-190)	140 (40-200)	0,087
pMAPK	10 (0-20)	27 (7-90)	50 (13-150)	13 (0-30)	1 (1-60)	<b>0,041</b>
pS6	35 (5-80)	5 (1-13)	5 (1-30)	21 (0-40)	20 (10-120)	<b>0,039</b>
EIF4E	5 (0-30)	45 (10-90)	120 (50-180)	160 (120-180)	40 (5-80)	<b>&lt;0,001</b>
pEIF4E	50 (20-140)	64 (30-156)	80 (24-160)	140 (91-180)	128 (80-160)	0,218

Tabla 19. Descriptiva para los biomarcadores separados según subgrupo tumoral para sarcomas. El p-valor que se muestra es el obtenido mediante el test de Kruskal-Wallis para determinar si había diferencias significativas entre los 5 subgrupos.

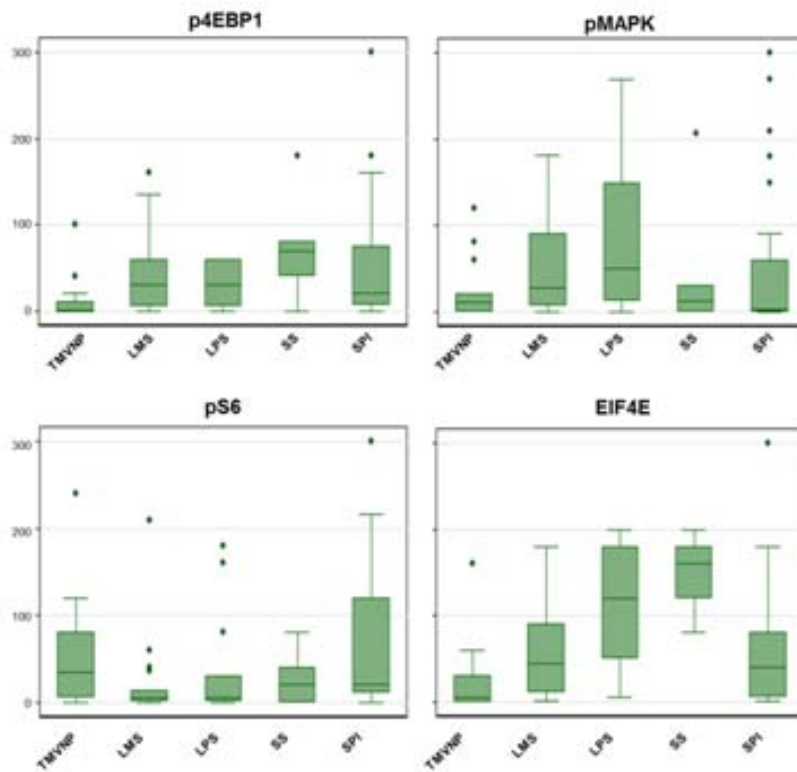


Figura 11. Descriptiva para los biomarcadores para sarcomas según el subgrupo tumoral mediante diagramas de caja. Se muestran los resultados de las 4 tinciones en los que se aprecian diferencias estadísticamente significativas.

### 5.3. Asociación entre Variables Clínico-Patológicas y Perfil de Expresión de Proteínas

Hemos analizado la relación entre la expresión de los distintos marcadores (p4EBP1, 4EBP1, pMAPK, pS6, EIF4E, pEIF4E) como variables continuas y las siguientes características clínico-patológicas:

- A) En tumores benignos: edad al diagnóstico, sexo, localización y tamaño tumoral.
- B) En sarcomas: edad al diagnóstico, sexo, localización, tamaño tumoral, número de mitosis, márgenes, estadio tumoral, grado y recaída (si/no).

En ningún caso hemos hallado asociación entre la expresión de las proteínas objeto de estudio con ninguna característica clínico-patológica en tumores benignos (Figura 12) ni en tumores malignos (Figura 13).

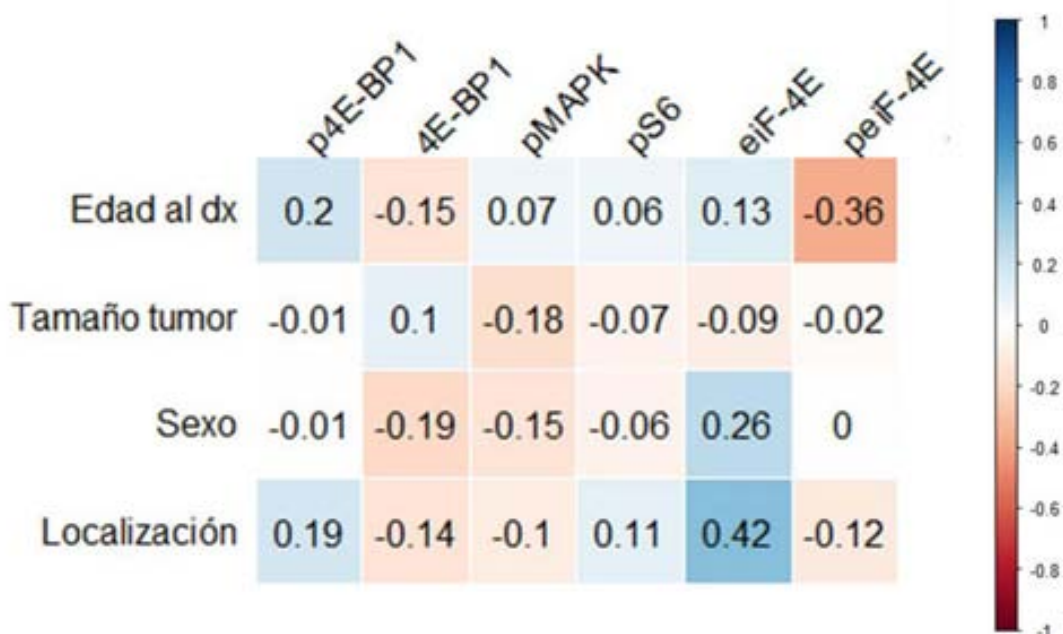


Figura 12. Estudio de correlación entre los niveles de expresión proteica y variables clínico-patológicas consideradas de interés en tumores benignos. El test estadístico empleado ha sido la Correlación de Pearson.

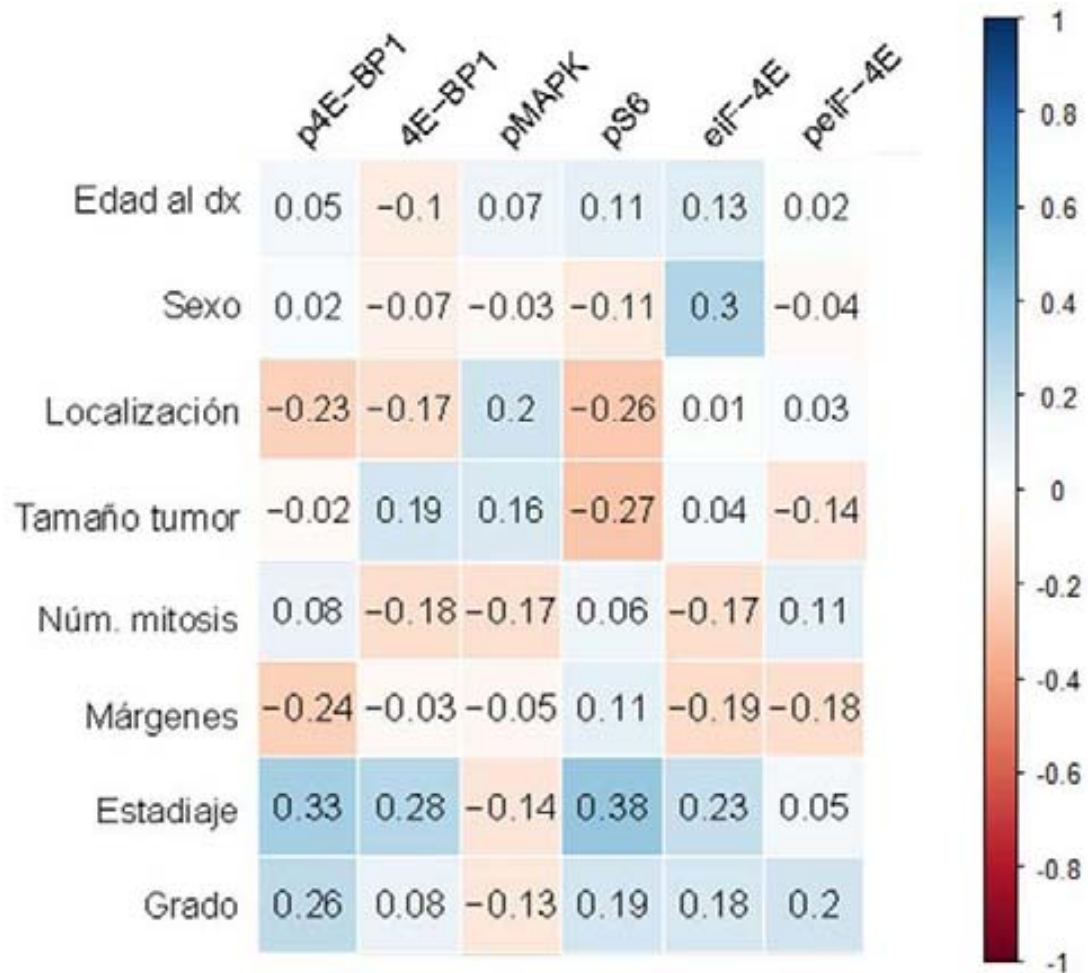


Figura 13. Estudio de correlación entre los niveles de expresión proteica y variables clínico-patológicas consideradas de interés en sarcomas. El test estadístico empleado ha sido coeficiente rho de Spearman.

## 5.4. Estudio de la expresión de las proteínas como factores pronósticos clínico-patológicos en sarcomas

### 5.4.1. SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

Con una mediana de seguimiento de 30,9 meses, un 61% de los pacientes recayó localmente, a distancia o en ambos (ver Sección 5.1.2. Características Clínico-Patológicas); la mediana de la SLE fue de 31,2 meses (p25-p75: 9,1-111,5 meses). La SLE de todos los sarcomas a 1, 2 y 5 años fue del 71,5%, 51,6% y 40% respectivamente.

#### 5.4.1.1. Análisis Univariante

##### Características Clínico-Patológicas y SLE

###### *Variables clínicas.*

Ni edad ( $p=0,080$ ), ni sexo ( $p=0,199$ ) ni la localización del sarcoma ( $p=0,572$ ) se asociaron con la SLE. No obstante, la edad fue marginalmente significativa ( $p=0,080$ ), aunque con una HR baja ( $HR=1,01$ ) (Tabla 20).

En cuanto al tratamiento inicial de los sarcomas, la radioterapia y la quimioterapia adyuvantes no influyeron en las recaídas (Tabla 21). El status de los márgenes post-cirugía tampoco demostró asociación estadística, aunque sí que fue marginalmente significativa ( $p=0,138$ ).

Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
Edad		1,01	1,00-1,03	0,080
Sexo	Masculino	1,00		0,199
	Femenino	0,68	0,38-1,22	
Localización	Extremidades	1,00		0,572
	Tronco	1,65	0,71-3,84	
	Abdomen	1,37	0,47-3,99	
	Pelvis	0,86	0,35-2,12	
	Cabeza y cuello	1,82	0,68-4,83	

Tabla 20. Variables clínicas y SLE. Los HR ajustados han sido estimados con el modelo de regresión de Cox.

Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
Cirugía	Sí	1		1,000
	No	N.V.		
Márgenes	Positivos	1		0,138
	Negativos	1,65	0,85-3,22	
Radioterapia	Sí	1		0,678
	No	0,88	0,47-1,63	
Quimioterapia	Sí	1		0,379
	No	1,33	0,70-2,53	

Tabla 21. Variables clínicas (tratamiento) y SLE. Los HR ajustados han sido estimados con el modelo de regresión de Cox.

#### *Variables patológicas.*

Tal y como se puede observar en la Tabla 22, tanto un elevado grado histológico (sistema FNCLCC) como estadios tumoral más avanzados (AJCC) se asociaron con una menor SLE ( $p=0,005$  y  $p=0,031$  respectivamente). La HR para grado 3 fue de 3,38 (IC 95% 1,17-9,77), y la del estadio III de 2,37 (IC 95% 1,02-5,47). El subtipo histológico de sarcoma no influyó en la SLE ( $p=0,137$ ), al igual que el tamaño del tumor ( $p=0,657$ ).

Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
Histología	TMVNP	1		0,137
	LMS	1,15	0,38-3,45	
	LPS	0,75	0,23-2,41	
	SS	2,26	0,60-8,56	
	SPI	1,99	0,74-5,35	
Tamaño AP		0,99	0,95-1,03	0,657
Grado	1	1		0,005
	2	1,25	0,39-4,05	
	3	3,38	1,17-9,77	
Estadio	I	1		0,031
	II	1,09	0,44-2,68	
	III	2,37	1,02-5,47	

Tabla 22. Variables patológicas y SLE. Los HR ajustados han sido estimados con el modelo de regresión de Cox.

## Expresión de las proteínas y SLE

Ninguno de los 6 inmunomarcadores evaluados en el presente estudio se asoció en el análisis univariante con SLE (Tabla 23). Únicamente la expresión elevada de pMAPK ( $\geq 50$ ) resultó marginalmente significativa ( $p=0,101$ ), mostrando una tendencia hacia una menor SLE.

Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
p4EBP1	<30	1		0,309
	$\geq 30$	1,35	0,76-2,41	
4EBP1	<140	1		0,562
	$\geq 140$	0,84	0,47-1,51	
pMAPK	< 50	1		0,101
	$\geq 50$	1,69	0,90-3,17	
pS6	< 20	1		0,638
	$\geq 20$	0,99	0,99-1,03	
EIF4E	< 100	1		0,217
	$\geq 100$	0,99	0,99-1,04	
pEIF4E	< 126	1		0,614
	$\geq 126$	1,16	0,65-2,07	

Tabla 23. Expresión de las diferentes proteínas y SLE. Los HR ajustados han sido estimados con el modelo de regresión de Cox.

### **5.4.1.2. Análisis Multivariante**

El análisis multivariante se ha realizado siguiendo el modelo proporcional de Cox, para evaluar el valor predictivo independiente de la expresión de los diversos biomarcadores (positivo Vs negativo) en la SLE. En el análisis se han incluido, además de los 6 biomarcadores, las variables clínico-patológicas que se considera que pueden tener carácter pronóstico para así evitar también factores de confusión (edad, localización, grado, estadio, histología).

En nuestra serie, pMAPK es un predictor independiente de recaída; la expresión elevada de pMAPK ( $\geq 50$ ) fue la única que se asoció de manera independiente con una menor SLE (Tabla 24).



Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
pMAPK	≥ 50	3,44	1,37-8,66	<0,001

Tabla 24. Modelo multivariante efectuado mediante el modelo proporcional de Cox en “stepwise”. pMAPK fue la única variable que quedó al final del modelo.

#### 5.4.2. SUPERVIVENCIA GLOBAL

Del total de 98 pacientes con sarcomas, disponemos de datos de mortalidad de 82 pacientes. De estos 82 pacientes, 44 murieron a lo largo del seguimiento, siendo la tasa de mortalidad global del 52,7%. Del total de pacientes que fallecieron, 36 (81,8%) fueron causa-específica. La supervivencia global a 1, 2 y 5 años fue, respectivamente, de 94,3%, 75,9% y 58,2%.

##### 5.4.2.1. Análisis Univariante

#### Características Clínico-Patológicas y SLE

##### *Variables clínicas.*

Dentro de las variables clínicas (edad, sexo y localización), únicamente la edad ( $p=0,040$ ) se asoció significativamente a una menor supervivencia global, aunque esta asociación fue débil dada una HR de 1,02 (IC 95% 1,00-1,04) (Tabla 25).

La radioterapia y la quimioterapia adyuvantes tampoco impactaron en la supervivencia global ( $p=0,353$  y  $p=0,541$  respectivamente). Sin embargo, aquellos pacientes con márgenes positivos tras la cirugía sí que presentaron una menor supervivencia global ( $p= 0,003$ ; HR 3,27, IC 95% 1,49-7,14) (Tabla 26).

Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
Edad		1,02	1,00-1,04	<b>0,040</b>
Sexo	Masculino	1		0,932
	Femenino	1,03	0,52-2,03	
Localización	Extremidades	1		0,102
	Tronco	2,01	0,71-5,71	
	Abdomen	2,25	0,72-7,00	
	Pelvis	2,72	1,12-6,61	
	Cabeza y cuello	3,55	1,11-11,31	

Tabla 25. Variables clínicas y SG. Los HR ajustados han sido estimados con el modelo de regresión de Cox.

Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
Cirugía	Sí	1		0,218
	No	0,28	0,04-2,11	
Márgenes	Positivos	1		<b>0,003</b>
	Negativos	3,27	1,49-7,14	
Radioterapia	Sí	1		0,353
	No	0,72	0,36-1,44	
Quimioterapia	Sí	1		0,541
	No	1,26	0,60-2,66	

Tabla 26. Variables clínicas (tratamiento) y SG. Los HR ajustados han sido estimados con el modelo de regresión de Cox.

### *Variables patológicas.*

Tal y como se puede observar en la Tabla 27, y al igual que ocurría con la SLE, tanto un elevado grado histológico como estadios tumoral más avanzados se asociaron con una menor SLE ( $p=0,024$  y  $p=0,001$  respectivamente). La HR para grado 3 fue de 4,15 (IC 95% 0,98-17,60), y la del estadio IV de 2,61 (IC 95% 1,70-18,55). A diferencia de lo que ocurría con la SLE, el subtipo histológico de sarcoma sí que influyó en la SG ( $p=0,049$ ); concretamente, el subtipo leiomioma fue el que demostró tener un mayor riesgo (HR 5,40; IC 95% 1,14-25,71). Concretamente, los leiomiomas no uterinos tuvieron una supervivencia media de 41,9 meses (SD=38 meses) y mediana de 29 meses ( $p_{25}-p_{75}=7,8-82,3$ ), mientras que en los

leiomiomas uterinos fue inferior, presentando una supervivencia media y mediana de 31,1 (SD=31 meses) y 20 (p25-p75=12-36) meses respectivamente.

Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
Histología	TMVNP	1		<b>0,049</b>
	LMS	5,40	1,14-25,71	
	LPS	1,33	0,25-6,99	
	SS	2,67	0,35-20,17	
	SPI	2,58	0,54-12,29	
Tamaño AP		1,02	0,98-1,07	0,391
Grado	1	1		<b>0,024</b>
	2	1,62	0,33-7,87	
	3	4,15	0,98-17,60	
Estadio	I	1		<b>0,001</b>
	II	0,97	0,34-2,73	
	III	1,77	0,65-4,80	
	IV	5,61	1,70-18,55	

Tabla 27. Variables patológicas y SG. Los HR ajustados han sido estimados con el modelo de regresión de Cox.

### Expresión de las proteínas y SG

Ninguno de los 6 inmunomarcadores evaluados en el presente estudio se asoció en el análisis univariante con SG (Tabla 28). Al igual que ocurría en la SLE, únicamente la expresión elevada de pMAPK ( $\geq 50$ ) resultó marginalmente significativa ( $p=0,058$ ), mostrando una tendencia hacia una menor SG con una HR = 2,08 (IC 95% 0,98-4,42).

Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
p4EBP1	<30	1		0,679
	≥ 30	1,15	0,59-2,24	
4EBP1	<140	1		0,078
	≥ 140	0,55	0,28-1,07	
pMAPK	< 50	1		0,058
	≥ 50	2,08	0,98-4,42	
pS6	< 20	1		0,972
	≥ 20	1,00	0,99-1,05	
EIF4E	< 100	1		0,342
	≥ 100	0,99	0,99-1,03	
pEIF4E	< 126	1		0,399
	≥ 126	0,75	0,38-1,47	

Tabla 28. Expresión de las diferentes proteínas y SG. Los HR ajustados han sido estimados con el modelo de regresión de Cox.

#### 5.4.2.2. Análisis Multivariante

En el análisis multivariante realizado para evaluar el valor predictivo independiente de la expresión de los diversos biomarcadores (positivo Vs negativo) en la SG, se han incluido también las mismas variables clínico-patológicas potencialmente pronósticas utilizadas en el análisis multivariante de la SLE (Sección 5.4.1.2: edad, localización, grado, estadio, histología).

En nuestra serie, los leiomiomas uterinos, una elevada expresión de pMAPK (≥50) y la presencia de márgenes positivos en la cirugía fueron predictores independientes de una menor SG (Tabla 29). Los leiomiomas no uterinos no entraron en el modelo multivariante final (HR= 2,83, IC 95% 0,48-16,58). En la Figura 14 se pueden observar tinciones representativas de pMAPK en varios sarcomas objeto de estudio.

Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
Leiomioma	Uterino	22,60	3,16-161,71	0,011
pMAPK	≥ 50	6,67	1,87-23,74	<0,001
Márgenes	Positivos	2,59	1,09-6,18	0,032

Tabla 29. Modelo multivariante efectuado mediante el modelo proporcional de Cox en “stepwise”. Los leiomiomas uterinos, un nivel alto de pMAPK y la presencia de márgenes quirúrgicos positivos fue el modelo multivariante estadísticamente significativo.

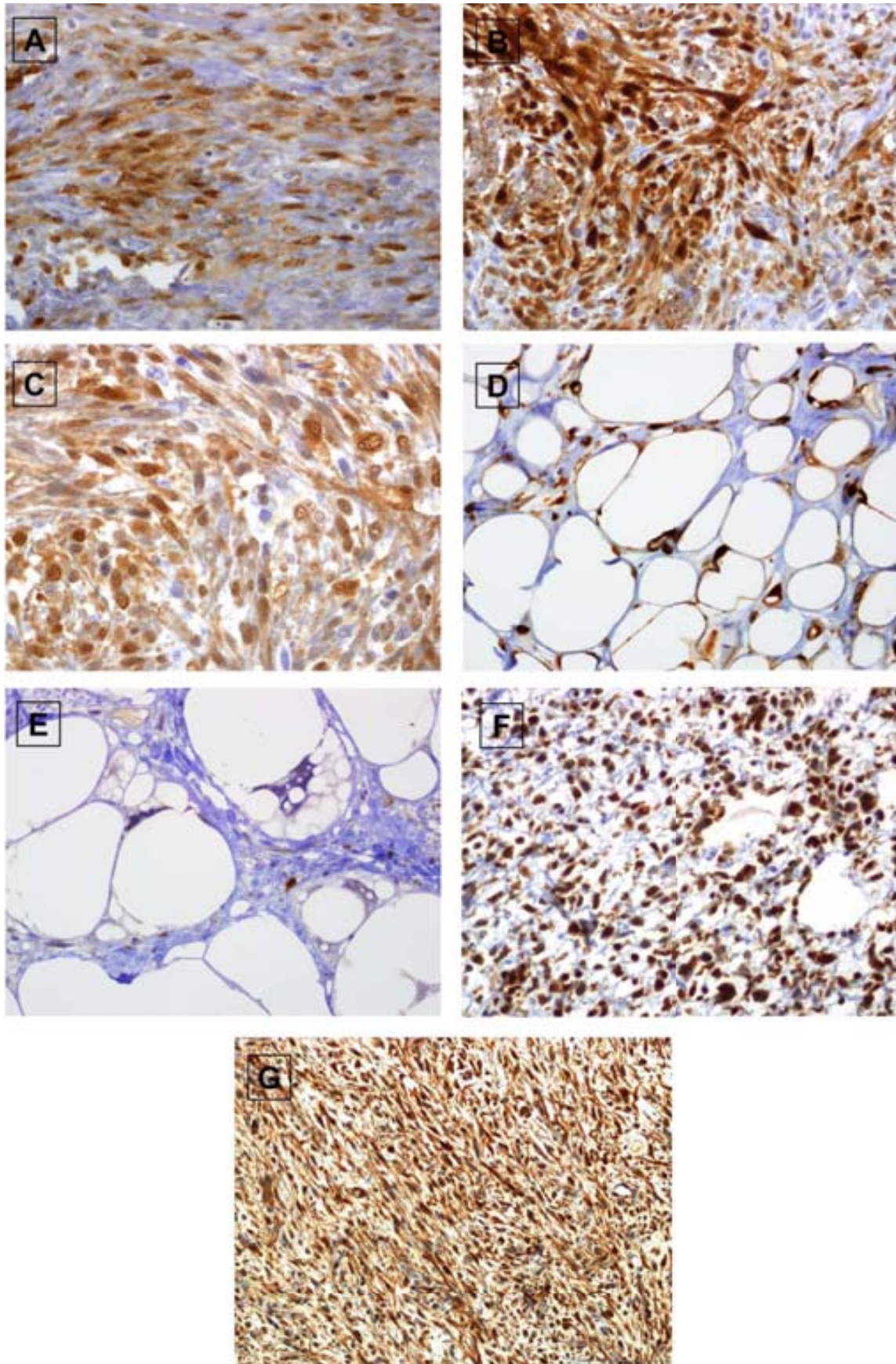


Figura 14. Tinciones representativas de la expresión de pMAPK en: A. TMVNP. B. Leiomiocarcinoma no uterino. C. Leiomiocarcinoma uterino. D. Liposarcinoma bien diferenciado. E. Liposarcinoma pleomórfico. F. Liposarcinoma mixoide. G. Sarcoma pleomórfico indiferenciado. Magnificación 40X.

## 5.5. Sarcomas Pleomórficos Indiferenciados

A pesar de la heterogeneidad fenotípica y molecular existente entre los distintos subtipos de sarcomas, hemos encontrado en la presente tesis doctoral factores comunes implicados en el pronóstico y posiblemente en el tratamiento. No se han podido efectuar análisis dentro de los diferentes subgrupos dado que el bajo número de casos no permite aplicar pruebas con la suficiente potencia estadística. La única excepción la constituye el subgrupo de SPI. Por un lado, es el grupo más numeroso (37 casos), constituyendo además una serie homogénea que incluye únicamente casos localizados o localmente avanzados. Por otro lado, existe un interés particular por determinar en este subgrupo sin alteraciones moleculares recurrentes y sin dianas terapéuticas identificadas, factores pronósticos que ayuden a su manejo clínico y moléculas frente a las cuales se puedan dirigir nuevas estrategias terapéuticas. Para ello, además de estudiar los distintos nodos más relevantes pertenecientes a las vías de PI3K/mTOR y RAS/MAPK (4EBP1, p4EBP1, pMAPK, pS6, EIF4E, pEIF4E), extendimos el análisis a otros nodos relevantes del ciclo celular. El racional para ello se fundamenta en 1) la presencia de alteraciones en el ciclo celular (vías de p53 y RB1) observada en casi la totalidad de los sarcomas citogenéticamente complejos, lo cual se encuentra detallado en la Sección 1.3, Biología de los Sarcomas; y 2) existen proteínas con funciones críticas en el ciclo celular con validada función pronóstica reportada en la literatura. Para estudiar la vía de p53, se realizaron tinciones inmunohistoquímica de p53, y para estudiar la vía de RB1, se estudiaron p16 y Ciclina D1. Se añadió, además, KI67 como marcador de actividad del ciclo celular.

En la Tabla 30 se muestra la descriptiva de la evolución de los pacientes con SPI. De los 37 pacientes con SPI, un 64,8% (n=24) recayeron; 58,3% lo hicieron localmente (n=14) y 41,7% a distancia (n=10). A lo largo de todo el seguimiento, un 46% de los pacientes falleció como consecuencia de la enfermedad.

		(N=37)	
		n	%
Recaída	No	12	32.43
	Sí	24	64.86
	Desconocido	1	1.70
Localización de la recaída	Local	14	58.33
	Distancia	10	41.67
Muerte causa-específica	No	13	35.14
	Si	17	45.95
	Desconocido	7	18.92

Tabla 30. Descriptiva de las características de la evolución de los pacientes del subgrupo SPI.

## 5.5.1. SUPERVIVENCIA LIBRE DE ENFERMEDAD

### 5.5.1.1. Análisis Univariante

#### Características Clínico-Patológicas y SLE

##### *Variables clínicas.*

En la Tabla 31 se puede ver el análisis estadístico para las variables clínicas. Ninguna variable clínica (edad, sexo, localización) ni relacionada con el tratamiento (márgenes quirúrgicos, radioterapia, quimioterapia) resultó significativa. La falta de tratamiento radioterápico adyuvante tuvo un significación marginal con un intervalo de recaída más corto ( $p=0,09$ ).

Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
Edad		0,99	0,97-1,02	0,801
Sexo	Masculino	1		0,188
	Femenino	0,56	0,23-1,33	
Localización	Extremidades	1		0,204
	Tronco	2,64	0,86-8,08	
	Cabeza y cuello	0,68	0,09-5,13	
Márgenes	Positivos	1		0,264
	Negativos	1,71	0,67-4,39	
Radioterapia	Sí	1		0,091
	No	0,47	0,19-1,13	
Quimioterapia	Sí	1		0,743
	No	0,87	0,37-2,03	

Tabla 31. Variables clínicas y SLE. Los HR ajustados han sido estimados con el modelo de regresión de Cox.

#### *Variables patológicas.*

En el subgrupo de SPI únicamente se observaron tumores con grados 2 (n=7) y 3 (n=29), y estadios II (n=14) y III (n=22). Ninguna de las tres variables patológicas analizadas (tamaño quirúrgico, grado histológico y estadio tumoral) se asoció de manera significativa con la SLE (Tabla 32).

Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
Tamaño AP		1,02	0,95-1,09	0,585
Grado	1			0,138
	2	1		
	3	2,52	0,74-8,55	
Estadio	I			0,219
	II	1		
	III	1,80	0,70-4,62	

Tabla 32. Variables patológicas y SLE. Los HR ajustados han sido estimados con el modelo de regresión de Cox.



## Expresión de las proteínas y SLE

De los 6 inmunomarcadores relacionados con las vías de PI3K/mTOR y RAS/MAPK una expresión elevada de pMAPK ( $\geq 50$ ) se asoció significativamente con una menor SLE ( $p=0,036$ ), siendo la HR = 3,32 (IC 95% 1,08-10,20). Ninguno de los 4 marcadores del ciclo celular analizados se asoció con la SLE (Figura 15, Tabla 33).

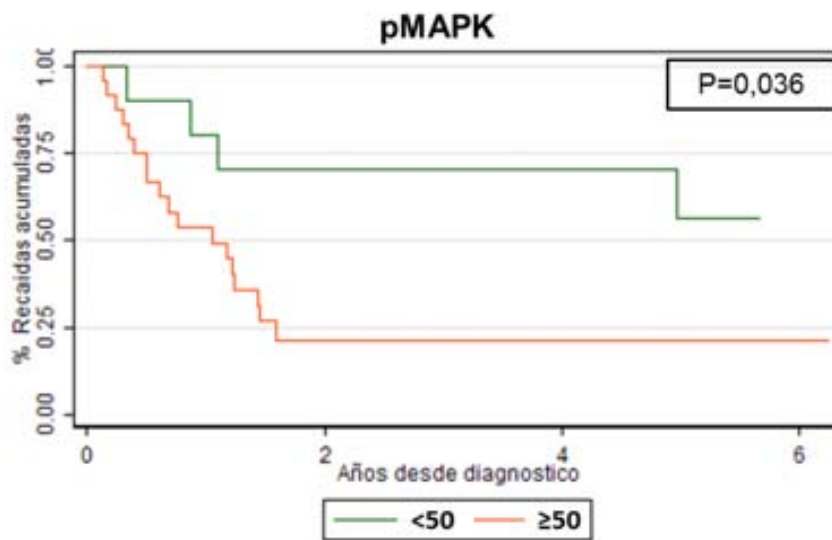


Figura 15. Análisis mediante Kaplan-Meier de la expresión de pMAPK (baja Vs alta) y su relación con la SLE.

Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
p4EBP1	<30	1		0,255
	≥ 30	1,63	0,70-3,80	
4EBP1	<140	1		0,253
	≥ 140	0,61	0,26-1,42	
pMAPK	< 50	1		<b>0,036</b>
	≥ 50	3,32	1,08-10,20	
pS6	< 20			0,860
	≥ 20	1	0,99-1,05	
EIF4E	< 100	1		0,315
	≥ 100	0,57	0,19-1,70	
pEIF4E	< 126	1		0,423
	≥ 126	0,70	0,29-1,67	
p53	< 5	1		0,778
	≥ 5	1,14	0,46-2,80	
KI67	< 30	1		0,468
	≥ 30	1,38	0,58-3,32	
p16	< 40	1		0,689
	≥ 40	1,19	0,51-2,74	
Ciclina D1	< 10	1		0,319
	≥ 10	1,55	0,66-3,64	

Tabla 33. Expresión de las diferentes proteínas y SLE. Los HR ajustados han sido estimados con el modelo de regresión de Cox.

### 5.5.1.2. Análisis Multivariante

En el análisis multivariante realizado para evaluar el valor predictivo independiente de la expresión de los diversos biomarcadores (positivo Vs negativo) en la SLE, se han incluido también las mismas variables clínico-patológicas potencialmente pronósticas utilizadas en el análisis multivariante de todos los sarcomas (edad, localización, grado, estadio, histología).

En nuestra serie una elevada expresión de pMAPK (≥50) fue el único predictor independientes de una menor intervalo libre de enfermedad (Tabla 34).

Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
pMAPK	≥ 50	3,32	1,08-10,20	0,036

Tabla 34. Modelo multivariante efectuado mediante el modelo proporcional de Cox en “stepwise”. Únicamente un nivel alto de pMAPK fue el modelo multivariable estadísticamente significativo.

## 5.5.2. SUPERVIVENCIA GLOBAL

### 5.5.2.1. Análisis Univariante

#### Características Clínico-Patológicas y SLE

##### *Variables clínicas.*

En la Tabla 35 se exponen los análisis correspondientes a las variables clínicas. Ni la edad al diagnóstico ni el sexo resultaron asociadas con significación estadística a la SG ( $p=0,990$  y  $p=0,909$  respectivamente). La localización tumoral resultó marginalmente significativa ( $p=0,095$ ), mostrando una tendencia a una mayor SG los SPI localizados en las extremidades.

Respecto a las variables clínicas relacionadas con el tratamiento, todos los pacientes con SPI fueron resecados quirúrgicamente. Ni la radioterapia adyuvante ni la quimioterapia adyuvante tuvieron impacto en la SG ( $p=0,456$  y  $p=0,433$  respectivamente). Sin embargo, y al igual que ocurría con todos los sarcomas considerados en conjunto, la presencia de márgenes positivos en la cirugía se asoció con una menor SG ( $p=0,047$ ; HR=3,19; IC 95% 1,02-9,99).

Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
Edad		1,000	0,968-1,033	0,990
Sexo	Masculino	1		0,909
	Femenino	0,94	0,30-2,88	
Localización	Extremidades	1		0,095
	Tronco	2,91	0,84-10,01	
	Cabeza y cuello	4,40	0,85-22,83	
Márgenes	Negativos	1		<b>0,047</b>
	Positivos	3,19	1,02-9,99	
Radioterapia	Sí	1		0,456
	No	0,66	0,22-1,97	
Quimioterapia	Sí	1		0,433
	No	1,55	0,52-4,64	

Tabla 35. Variables clínicas y SG. Los HR ajustados han sido estimados con el modelo de regresión de Cox.

#### *Variables patológicas.*

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre las variables anatomo-patológicas objeto de estudio (tamaño, grado, estadio) y la SG (Tabla 36).

Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
Tamaño AP		1,03	0,93-1,13	0,589
Grado	1			0,390
	2	1		
	3	2,45	0,32-19,05	
Estadio	I			0,524
	II	1		
	III	1,47	0,45-4,79	

Tabla 36. Variables patológicas y SG. Los HR ajustados han sido estimados con el modelo de regresión de Cox.

#### Expresión de las proteínas y SLE

De los 6 inmunomarcadores relacionados con las vías de PI3K/mTOR y RAS/MAPK, únicamente una expresión elevada de pMAPK ( $\geq 50$ ) tuvo una asociación marginalmente significativa con una menor SG ( $p=0,087$ ). Respecto

a los 4 marcadores asociados al ciclo celular se pudo comprobar que los pacientes con una mayor expresión de KI67 ( $\geq 10\%$ ) tenían una menor SG (Tabla 37 y Figura 16).

Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
p4EBP1	<30	1		0,913
	$\geq 30$	1,07	0,35-3,28	
4EBP1	<140	1		0,506
	$\geq 140$	0,69	0,23-2,07	
pMAPK	< 50	1		0,087
	$\geq 50$	3,77	0,83-17,20	
pS6	< 20	1		0,546
	$\geq 20$	0,99	0,98-1,07	
EIF4E	< 100	1		0,182
	$\geq 100$	0,25	0,03-1,92	
pEIF4E	< 126	1		0,736
	$\geq 126$	0,82	0,25-2,67	
p53	< 5	1		0,886
	$\geq 5$	1,09	0,35-3,36	
KI67	< 30	1		<b>0,031</b>
	$\geq 30$	5,29	1,16-24,09	
p16	< 40	1		0,331
	$\geq 40$	1,72	0,57-5,16	
Ciclina D1	< 10	1		0,968
	$\geq 10$	1,02	0,34-3,12	

Tabla 37. Expresión de las diferentes proteínas y SG. Los HR ajustados han sido estimados con el modelo de regresión de Cox.

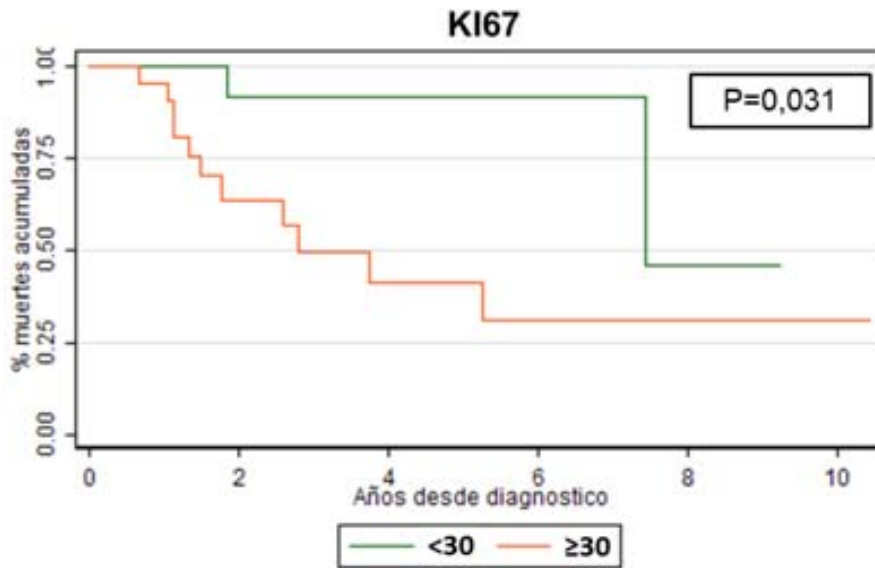


Figura 16. Análisis mediante Kaplan-Meier de la expresión de KI67 (baja Vs alta) y su relación con la SG.

### 5.5.2.2. Análisis Multivariante

En el análisis multivariante realizado para evaluar el valor predictivo independiente de la expresión de los diversos biomarcadores (positivo Vs negativo) en la SG, se han incluido también las mismas variables clínico-patológicas potencialmente pronósticas utilizadas en el análisis multivariante de todos los sarcomas (edad, localización, grado, estadio, histología).

En nuestra serie se pudo determinar que a presencia de márgenes quirúrgicos positivos es el único predictor independiente de una menor supervivencia global (Tabla 38).

Variables		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de Confianza (95%)	P valor
Margen	Positivo	3,19	1,02-9,99	0,047

Tabla 38. Modelo multivariante efectuado mediante el modelo proporcional de Cox en "stepwise". La presencia de márgenes quirúrgicos positivos fue el único predictor independiente de mal pronóstico y constituye el modelo multivariable estadísticamente significativo.

# 6

## Discusión

### 6.1. Justificación del estudio

De un 25 a un 50% de los pacientes con SPB recaerá a distancia a pesar de haber realizado un correcto manejo del tumor primario (24, 26, 27, 215), con lo que la mortalidad de los SPB a los 5 años del diagnóstico llega a ser de un 30-40% (4, 102). En nuestra serie un 61% de los pacientes recayó localmente, a distancia o en ambos, y un 53% falleció a lo largo de todo el seguimiento. Una vez que la enfermedad es metastásica, el tratamiento se considera paliativo; en esta situación el pronóstico es infausto: la respuesta a la quimioterapia es inferior al 20% y la mediana de supervivencia desde el diagnóstico de las metástasis se sitúa en torno a un año (270, 271). Los sarcomas siguen por lo tanto un curso natural agresivo semejante al de otros tipos de cáncer pero que, dada su heterogeneidad (1), las herramientas pronósticas y terapéuticas de las que disponemos en la actualidad adolecen de precisión y eficiencia debido en parte a la tendencia a agrupar entidades biológica y clínicamente distintas, o bien debido a la dificultad para extraer conclusiones al estudiar subgrupos o entidades diagnósticas con bajo número de pacientes.

Esta heterogeneidad es evidente, no sólo a nivel clínico y morfológico, sino también a nivel molecular (150, 188). No obstante, la presencia de anomalías en las vías de transducción de señales es prácticamente ubicua en sarcomas y su estudio puede proporcionar aspectos específicos de su biología que sean relevantes para el pronóstico y/o para el tratamiento. Las dos

principales vías de transducción en SPB implican, por un lado, a los reguladores del ciclo celular (vías de p53 y de RB1), y por otro, a las vías de señalización de factores de crecimiento (140). Mientras que las primeras han sido extensamente estudiadas en las dos décadas pasadas (ver Tabla 7), las vías de señalización de factores crecimiento han emergido como un campo activo de investigación y de tratamiento en cáncer en general y en SPB en particular. Específicamente, las vías de RAS/MAPK y de PI3K/mTOR son de especial interés dado que constituyen un punto de convergencia de los factores de crecimiento en SPB (140), por lo que su estudio puede revelarnos nodos con función pronóstica y/o terapéutica con independencia del subtipo específico.

Para nuestro estudio hemos empleado pMAPK (Thr 202/ Tyr 204) como marcador de activación de la vía de RAS/MAPK y pS6 (Ser 240/244) como marcador de activación de la vía de PI3K/mTOR. Además, dado que el grupo en el que he desarrollado mi tesis doctoral puso de relieve en cáncer el concepto de factor embudo o funnel factor (260-263), incluimos también en el estudio transductores que canalizaran la señalización de las vías de RAS/MAPK y PI3K/mTOR: p4EBP1, 4EBP1, pEIF4E y EIF4E.

## **6.2. La expresión de los marcadores de activación de PI3K/mTOR, pero no los de RAS/MAPK, es superior en patología maligna que en patología benigna**

Los 6 marcadores de activación de RAS/MAPK y de PI3K/mTOR se hallaron expresados en aproximadamente tres cuartas partes de todos los tumores, y sus niveles fueron estadísticamente superiores en sarcomas en comparación con los tumores benignos de partes blandas, con excepción de pMAPK, que fue superior en los tumores benignos. Existe, por lo tanto, una activación oncogénica constitutiva en SPB responsable, al menos en parte, de su comportamiento maligno. Es posible que el menor grado de expresión de estos marcadores en patología benigna pueda corresponder a niveles fisiológicos, dado que se considera que los sarcomas aparecen *de novo*,



siendo excepcional la transformación maligna salvo en casos muy concretos (63). Al contrario de lo que cabría esperar, la activación de RAS/MAPK, evaluada mediante pMAPK, fue superior en patología benigna. En células normales RAS activa las diferentes quinasas RAF. Cuando RAF se activa fosforila MEK, el cual a su vez fosforila MAPK. MAPK ejerce su función regulando la expresión de múltiples factores de transcripción. La activación de la vía de RAS/MAPK en cáncer ocurre debido a la activación de receptores tirosina-quinasa o de componentes a lo largo de la vía (249), y dado que MAPK está al final de la transducción de señales, su expresión se utiliza ampliamente como marcador de activación oncogénica. El hecho de que los niveles de pMAPK sean, en conjunto, inferiores en SPB en comparación con su patología benigna correspondiente puede explicarse de dos maneras: 1) la vía de RAS/MAPK es prescindible en SPB y los niveles observados son fisiológicos y no corresponden a una activación constitutiva oncogénica, o 2) pMAPK no está reflejando el verdadero nivel de activación de la vía. Lo más plausible es que se trate de esta segunda opción ya que recientemente se ha demostrado mediante estudios de expresión de ARN (*gene expression profiling*) que la activación oncogénica de RAS/MAPK es superior a lo que predice pMAPK (272) debido a la presencia de vías de retroalimentación negativa (*negative feedback loops*) que disminuyen la fosforilación de MAPK (273).

La activación, tanto de ambas vías como de los factores embudo, varió entre los diferentes subgrupos y entre cada entidad diagnóstica. En cuanto a patología benigna se pudo comprobar que la activación de RAS/MAPK en lipomas fue superior a la de los otros tumores benignos, tanto considerados en subgrupos o como subtipos. Es llamativa también la diferencia de expresión de pMAPK en leiomiomas no uterinos en comparación con leiomiomas uterinos. La activación de la vía de PI3K/mTOR fue superior globalmente en leiomiomas. Al igual que ocurría también con pMAPK, la expresión de pS6 fue superior en leiomiomas no uterinos que en uterinos, lo cual revela comportamientos biológicos subyacentes distintos a pesar de ser tumores benignos derivados del músculo liso.

En los sarcomas se observó una activación de pMAPK y p4EBP1 más homogénea en todos los diagnósticos, aunque sí que se pudo ver una predominancia de expresión de pMAPK en liposarcomas y de p4EBP1 en sarcomas sinoviales. En el resto de marcadores hubo bastante variabilidad entre subgrupos y entidades, lo cual refleja que, aunque las vías de RAS/MAPK y PI3K/mTOR estén sobreactivadas, las consecuencias biológicas y las redes específicas de señalización pueden ser muy distintas, aunque también hay que tener en cuenta que parte de esta variabilidad puede deberse a que los grupos son pequeños. Por otro lado, y al contrario de lo que ocurre en neoplasias de origen epitelial (260), no se observa en SPB que aquellos tumores con hiperactivación de ambas vías conlleve una mayor expresión de los factores embudo canalizadores de su estímulo (4EBP1, p4EBP1, EIF4E, pEIF4E), aunque faltaría comprobar su relevancia biológica mediante estudios funcionales.

### **6.3. La hiperactivación de la vía de RAS/MAPK es un factor independiente de mal pronóstico en sarcomas de partes blandas del adulto**

Tras determinar la distribución de la expresión de los 6 marcadores correspondientes a la activación de las vías de señalización en tumores benignos y partes blandas, se procedió a la evaluación de su asociación con características clínico-patológicas de interés y su función como factores pronósticos en sarcomas. En nuestro estudio se ha evidenciado que la hiperactivación de RAS/MAPK en SPB es un factor independiente predictor de mal pronóstico. La vía canónica de señalización RAS/MAPK es crítica en cáncer (245, 246) y su activación oncogénica se asocia principalmente con proliferación e invasión (248). De ahí su doble interés pronóstico y terapéutico. Se han publicado hasta la fecha varios estudios en los que se demuestra que una expresión elevada de pMAPK es un factor pronóstico adverso, asociándose principalmente a recaída precoz. Una alta expresión de pMAPK en cáncer de mama hormon sensible predice resistencia al tratamiento

hormonal con inhibidores de aromatasa, mientras que cuando RAS/MAPK no estaba activada o su activación era baja se incrementaban las posibilidades de lograr respuestas completas (274). En cáncer de mama triple negativo también se ha asociado alta expresión, además de con recaída precoz, con una menor supervivencia global (275, 276). La reactivación de la señalización de RAS/MAPK en modelos dependientes de esta vía, como melanoma o cáncer de colon con mutación en BRAF, produce resistencia terapéutica y progresión de la enfermedad (277-279). Los datos proporcionados en la presente tesis doctoral ponen en relieve, por primera vez, la importancia de la activación de RAS/MAPK en el pronóstico de los SPB. Una alta expresión de pMAPK representa un HR de 3,44 de presentar una recaída más temprana, tanto localmente como a distancia (IC 95% 1,37-8,66), y de 6,67 (IC 95% 1,87-23,34) de morir precozmente debido a la enfermedad. Además, existen en la actualidad numerosos ensayos clínicos en los que se está estudiando si la inhibición de la vía de RAS/MAPK con inhibidores de MEK impacta en la supervivencia libre de enfermedad y en la supervivencia global en pacientes con todo tipo de cáncer (280), o específicamente en sarcomas (281). Los datos proporcionados aquí revelan la importancia de esta vía en sarcomas de partes blandas del adulto para ser evaluada como candidata a inhibición terapéutica independientemente del subtipo de sarcoma de partes blandas.

La vía de PI3K/mTOR se encuentra hiperactivada en sarcomas, pero en nuestra serie no hemos observado que se asocie con un peor pronóstico. Cuatro estudios han demostrado que la hiperactivación de esta vía es un factor pronóstico adverso en sarcomas. Tres de ellos (132-134) valoraban subgrupos específicos: leiomioma, TMVNP y sarcoma sinovial, respectivamente. Los estudios de Setsu N y col. en leiomioma y sarcoma sinovial empleaban p4EBP1 o una combinación de diversos nodos relevantes en PI3K/mTOR como factor pronóstico. En cambio, en el estudio de Endo M y col. pS6 resultó ser el factor independiente de mal pronóstico. A diferencia de los dos primeros estudios en los que se emplean como marcadores p4EBP1 (activado por distintas vías de señalización, no sólo por PI3K/mTOR) o un conjunto de moléculas en la misma vía, en esta tesis se ha considerado pS6 como el marcador de activación de PI3K/mTOR más adecuado, dado que es el

transductor final de la señal de esta vía antes de la translación proteica (219), y también por su amplio uso en clínica como marcador de inhibición de esta vía (269). Esto puede explicar, al menos en parte, las diferencias observadas con los estudios en los que pS6 no ha sido el biomarcador. Además, hay que considerar que la homogeneidad correspondiente a las entidades diagnósticas analizadas en los estudios en leiomiomasarcoma, TMVNP y sarcoma sinovial permite evaluar mejor subgrupos que en nuestra serie. Un cuarto estudio (135) en el que se evaluaban 93 pacientes con sarcomas de partes blandas en adultos demostró que un incremento de la fosforilación de AKT (pero no de la fosforilación de MAPK) se asociaba con peor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global, unos hallazgos que son opuestos a los de nuestra serie. Es posible que las diferencias metodológicas entre ambos estudios expliquen la divergencia en los resultados. Tomita y col. consideraron como positiva la expresión de pAKT para la vía de PI3K/mTOR y la de pMAPK para la de RAS/MAPK. Ya se ha mencionado anteriormente los motivos por los que se escogió pS6 en lugar de pAKT como marcador de la vía de mTOR, y que pueden explicar la diferencia de los resultados. Por otro lado, mientras que Tomita y col. valoraron como positiva la expresión citoplasmática de pMAPK, en esta tesis doctoral hemos considerado positiva su expresión nuclear porque MAPK se localiza en condiciones normales en el citoplasma y se transloca al núcleo para ejercer su función al activarse mediante estímulos mitogénicos (282, 283).

Los factores embudo analizados en esta serie (4EBP1, p4EBP1, EIF4E, pEIF4E) no se asociaron estadísticamente con un peor pronóstico, a diferencia de los estudios publicados en tumores de origen epitelial (ver Sección 1.3. Biología de los Sarcomas). No obstante, es posible que en entidades particulares sí que puedan ser relevantes de cara al pronóstico, como en los leiomiomasarcomas (134), pero la casuística de esta tesis no ha permitido analizar subgrupos independientemente. Dado que no se han llevado a cabo estudios funcionales, tampoco se puede conocer si son relevantes o no para la biología de los sarcomas.

Por último los principales factores clínicos pronósticos reconocidos en SPB (márgenes, grado, estadio y subtipo tumoral) resultaron significativos en los análisis univariante o multivariante

#### **6.4. La hiperactivación de la vía de RAS/MAPK predice independientemente la recaída precoz en sarcomas pleomórficos indiferenciados.**

Los SPI son el subtipo diagnóstico más numeroso en esta serie (37 casos), constituyendo además una serie homogénea de pacientes post-operados. Además, y tal como está aclarado en la Sección 5.5, existe un interés particular por determinar en este subgrupo sin alteraciones moleculares recurrentes y sin dianas terapéuticas identificadas, factores pronósticos que ayuden a su manejo clínico y moléculas frente a las cuales se puedan dirigir nuevas estrategias terapéuticas. Por ello, además de estudiar los distintos nodos más relevantes pertenecientes a las vías de PI3K/mTOR y RAS/MAPK (4EBP1, p4EBP1, pMAPK, pS6, EIF4E, pEIF4E), extendimos el análisis a otros nodos relevantes del ciclo celular (p53, p16, ciclina D1 y Ki67).

Al igual que ocurría en el conjunto de pacientes con SPB, en este subtipo de sarcoma se confirma que la hiperactivación de la vía de RAS/MAPK es el único factor pronóstico adverso e independiente asociado a un menor intervalo libre de enfermedad. Aquellos pacientes con un Hscore de pMAPK mayor o igual a 50 tenían una HR de 3,32. pMAPK en cambio no apareció en el análisis multivariante como predictor de baja supervivencia. Ki67 predecía en el análisis univariante una baja supervivencia global, pero perdió su significación en el análisis multivariante, en el que la presencia de márgenes positivos fue el único factor que predecía de manera independiente un peor pronóstico.

## **6.5. Limitaciones**

### **6.5.1. SELECCIÓN DE CASOS**

Una limitación de este estudio es que los casos han sido obtenidos en un hospital de referencia, como es el Vall d'Hebron, y que por lo tanto la muestra puede no ser representativa de lo que se observa en la comunidad. No obstante, las características clínico-patológicas como localización, subtipo histológico, grado o estadio son similares a las de otros estudios clásicos (48, 52). Al tratarse de un hospital de referencia, hubo <10% de los casos seleccionados para este estudio que fueron referidos de otros centros con información clínica incompleta, pero con material de buena calidad, y que se decidieron incluir en la tesis doctoral para enriquecer las muestras de diagnósticos por subtipos. Estos casos explican que haya ciertas variables catalogadas como "desconocido".

Por otro lado, las diferentes entidades diagnósticas que conforman esta serie contienen un número medio de casos que no son superiores a los 15, lo cual impide realizar análisis por subgrupos en una patología (SPB de adultos) heterogénea.

### **6.5.2. METODOLOGÍA DE LA INMUNOHISTOQUÍMICA**

La estabilidad de las fosfoproteínas constituye una limitación a este tipo de estudios. Existe fluctuación dependiendo del tiempo que va desde la resección hasta el inicio de la fijación y sobre el tipo de muestra (mayor pérdida de fosforilación en piezas de resección en comparación con biopsia) (284, 285). En general asumimos que hay pérdida de epítomos de las diferentes fosfoproteínas que hemos analizado en nuestra serie. No obstante, el grupo en el que he desarrollado la tesis doctoral ha validado previamente las condiciones de los anticuerpos en inmunohistoquímica en comparación con inmunoblot en muestras de tejido fresco de cáncer de mama (261).

# 7

## Conclusiones

1. Las proteínas pertenecientes a las vías de RAS/MAPK y PI3K/mTOR (4EBP1, p4EBP1, pMAPK, pS6, EIF4E, pEIF4E) se encuentran expresadas en patología mesenquimal benigna y maligna.
2. Los niveles de expresión de las proteínas estudiadas difieren entre los distintos subgrupos tumorales y entidades diagnósticas benignas y malignas analizadas.
3. Existe una mayor expresión de todas las moléculas estudiadas pertenecientes a ambas vías en sarcomas en comparación con la patología mesenquimal benigna, exceptuando pMAPK, cuya expresión es superior en patología benigna.

4. En nuestra serie no hemos demostrado asociación entre las proteínas objeto de estudio (4EBP1, p4EBP1, pMAPK, pS6, EIF4E, pEIF4E) y las características clínico-patológicas analizadas.
  
5. La hiperactivación de la vía de RAS/MAPK determinada mediante la expresión de pMAPK predice de manera independiente menor supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global en el conjunto de sarcomas estudiado. En los sarcomas pleomórficos indiferenciados, la hiperactivación de la vía de RAS/MAPK predice de manera independiente menor supervivencia libre de enfermedad.



# 8

## Referencias

1. Fletcher CDM BJ, Hogendoorn PCW, Mertens F, editors. WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone. Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone. 2013.
2. Miller RW, Young JL, Jr., Novakovic B. Childhood cancer. *Cancer*. 1995;75(1 Suppl):395-405. Epub 1995/01/01.
3. Horner MJ RL, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlader N, Altekruse SF, Feuer EJ, Huang L, Mariotto A, Miller BA, Lewis DR, Eisner MP, Stinchcomb DG, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006,. National Cancer Institute. Bethesda, MD2009.
4. DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, Siegel RL, Stein KD, Kramer JL, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014;64(4):252-71. Epub 2014/06/04.
5. Stiller CA, Trama A, Serraino D, Rossi S, Navarro C, Chirlaque MD, et al. Descriptive epidemiology of sarcomas in Europe: report from the RARECARE project. *Eur J Cancer*. 2013;49(3):684-95. Epub 2012/10/20.
6. MP Curado BE, HR Shin, H Storm, J Ferlay, M Heanue, P Boyle. *Cancer Incidence in Five Continents: International Agency for Research on Cancer*; 2007.
7. Ducimetiere F, Lurkin A, Ranchere-Vince D, Decouvellaere AV, Peoc'h M, Istier L, et al. Incidence of sarcoma histotypes and molecular subtypes in a prospective epidemiological study with central pathology review and molecular testing. *PloS one*. 2011;6(8):e20294. Epub 2011/08/10.
8. Lawrence W, Jr., Donegan WL, Natarajan N, Mettlin C, Beart R, Winchester D. Adult soft tissue sarcomas. A pattern of care survey of the American College of Surgeons. *Annals of surgery*. 1987;205(4):349-59. Epub 1987/04/01.
9. Clark MA, Fisher C, Judson I, Thomas JM. Soft-tissue sarcomas in adults. *The New England journal of medicine*. 2005;353(7):701-11. Epub 2005/08/19.
10. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr., Nelson CE, Kim DH, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 1990;250(4985):1233-8. Epub 1990/12/10.

11. Ognjanovic S, Olivier M, Bergemann TL, Hainaut P. Sarcomas in TP53 germline mutation carriers: a review of the IARC TP53 database. *Cancer*. 2012;118(5):1387-96. Epub 2011/08/13.
12. Kleinerman RA, Tucker MA, Tarone RE, Abramson DH, Seddon JM, Stovall M, et al. Risk of new cancers after radiotherapy in long-term survivors of retinoblastoma: an extended follow-up. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(10):2272-9. Epub 2005/04/01.
13. Yu CL, Tucker MA, Abramson DH, Furukawa K, Seddon JM, Stovall M, et al. Cause-specific mortality in long-term survivors of retinoblastoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2009;101(8):581-91. Epub 2009/04/09.
14. Kleinerman RA, Tucker MA, Abramson DH, Seddon JM, Tarone RE, Fraumeni JF, Jr. Risk of soft tissue sarcomas by individual subtype in survivors of hereditary retinoblastoma. *Journal of the National Cancer Institute*. 2007;99(1):24-31. Epub 2007/01/05.
15. DeClue JE, Papageorge AG, Fletcher JA, Diehl SR, Ratner N, Vass WC, et al. Abnormal regulation of mammalian p21ras contributes to malignant tumor growth in von Recklinghausen (type 1) neurofibromatosis. *Cell*. 1992;69(2):265-73. Epub 1992/04/17.
16. Brems H, Beert E, de Ravel T, Legius E. Mechanisms in the pathogenesis of malignant tumours in neurofibromatosis type 1. *The Lancet Oncology*. 2009;10(5):508-15. Epub 2009/05/05.
17. Brady MS, Gaynor JJ, Brennan MF. Radiation-associated sarcoma of bone and soft tissue. *Arch Surg*. 1992;127(12):1379-85. Epub 1992/12/01.
18. Lander JJ, Stanley RJ, Sumner HW, Boswell DC, Aach RD. Angiosarcoma of the liver associated with Fowler's solution (potassium arsenite). *Gastroenterology*. 1975;68(6):1582-6. Epub 1975/06/01.
19. Lee FI, Smith PM, Bennett B, Williams DM. Occupationally related angiosarcoma of the liver in the United Kingdom 1972-1994. *Gut*. 1996;39(2):312-8. Epub 1996/08/01.
20. Wingren G, Fredrikson M, Brage HN, Nordenskjold B, Axelson O. Soft tissue sarcoma and occupational exposures. *Cancer*. 1990;66(4):806-11. Epub 1990/08/15.
21. Stewart FW, Treves N. Classics in oncology: lymphangiosarcoma in postmastectomy lymphedema: a report of six cases in elephantiasis chirurgica. *CA: a cancer journal for clinicians*. 1981;31(5):284-99. Epub 1981/09/01.
22. McClain KL, Leach CT, Jenson HB, Joshi VV, Pollock BH, Parmley RT, et al. Association of Epstein-Barr virus with leiomyosarcomas in children with AIDS. *The New England journal of medicine*. 1995;332(1):12-8. Epub 1995/01/05.
23. Johnson CJ, Pynsent PB, Grimer RJ. Clinical features of soft tissue sarcomas. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*. 2001;83(3):203-5. Epub 2001/07/04.
24. Christie-Large M, James SL, Tiessen L, Davies AM, Grimer RJ. Imaging strategy for detecting lung metastases at presentation in patients with soft tissue sarcomas. *Eur J Cancer*. 2008;44(13):1841-5. Epub 2008/07/22.
25. Potter DA, Glenn J, Kinsella T, Glatstein E, Lack EE, Restrepo C, et al. Patterns of recurrence in patients with high-grade soft-tissue sarcomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1985;3(3):353-66. Epub 1985/03/01.

26. Lindberg RD, Martin RG, Romsdahl MM, Barkley HT, Jr. Conservative surgery and postoperative radiotherapy in 300 adults with soft-tissue sarcomas. *Cancer*. 1981;47(10):2391-7. Epub 1981/05/15.
27. Weitz J, D'Angelica M, Gonen M, Klimstra D, Coit DG, Brennan MF, et al. Interaction of splenectomy and perioperative blood transfusions on prognosis of patients with proximal gastric and gastroesophageal junction cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(24):4597-603. Epub 2003/12/16.
28. Hussein R, Smith MA. Soft tissue sarcomas: are current referral guidelines sufficient? *Annals of the Royal College of Surgeons of England*. 2005;87(3):171-3. Epub 2005/05/20.
29. Aisen AM, Martel W, Braunstein EM, McMillin KI, Phillips WA, Kling TF. MRI and CT evaluation of primary bone and soft-tissue tumors. *AJR American journal of roentgenology*. 1986;146(4):749-56. Epub 1986/04/01.
30. Demas BE, Heelan RT, Lane J, Marcove R, Hajdu S, Brennan MF. Soft-tissue sarcomas of the extremities: comparison of MR and CT in determining the extent of disease. *AJR American journal of roentgenology*. 1988;150(3):615-20. Epub 1988/03/01.
31. Panicek DM, Go SD, Healey JH, Leung DH, Brennan MF, Lewis JJ. Soft-tissue sarcoma involving bone or neurovascular structures: MR imaging prognostic factors. *Radiology*. 1997;205(3):871-5. Epub 1997/12/11.
32. Sundaram M, McGuire MH, Herbold DR. Magnetic resonance imaging of soft tissue masses: an evaluation of fifty-three histologically proven tumors. *Magnetic resonance imaging*. 1988;6(3):237-48. Epub 1988/05/01.
33. Fong Y, Coit DG, Woodruff JM, Brennan MF. Lymph node metastasis from soft tissue sarcoma in adults. Analysis of data from a prospective database of 1772 sarcoma patients. *Annals of surgery*. 1993;217(1):72-7. Epub 1993/01/01.
34. Mohammed TL, Chowdhry A, Reddy GP, Amorosa JK, Brown K, Dyer DS, et al. ACR Appropriateness Criteria(R) screening for pulmonary metastases. *Journal of thoracic imaging*. 2011;26(1):W1-3. Epub 2011/01/25.
35. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23 Suppl 7:vii92-9. Epub 2012/11/20.
36. Garcia Del Muro X, Martin J, Maurel J, Cubedo R, Bague S, de Alava E, et al. [Soft tissue sarcomas: clinical practice guidelines]. *Medicina clinica*. 2011;136(9):408 e1-8. Epub 2011/03/18. Guia de practica clinica en los sarcomas de partes blandas.
37. von Mehren M, Randall RL, Benjamin RS, Boles S, Bui MM, Casper ES, et al. Soft tissue sarcoma, version 2.2014. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 2014;12(4):473-83. Epub 2014/04/11.
38. Bastiaannet E, Groen H, Jager PL, Cobben DC, van der Graaf WT, Vaalburg W, 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 treatment reviews*. 2004;30(1):83-101. Epub 2004/02/10.
39. Schuetze SM. Imaging and response in soft tissue sarcomas. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2005;19(3):471-87, vi. Epub 2005/06/09.

40. Roberge D, Hickeson M, Charest M, Turcotte RE. Initial McGill experience with fluorodeoxyglucose pet/ct staging of soft-tissue sarcoma. *Curr Oncol*. 2010;17(6):18-22. Epub 2010/12/15.
41. Strauss DC, Qureshi YA, Hayes AJ, Thway K, Fisher C, Thomas JM. The role of core needle biopsy in the diagnosis of suspected soft tissue tumours. *Journal of surgical oncology*. 2010;102(5):523-9. Epub 2010/09/28.
42. Hau A, Kim I, Kattapuram S, Hornicek FJ, Rosenberg AE, Gebhardt MC, et al. Accuracy of CT-guided biopsies in 359 patients with musculoskeletal lesions. *Skeletal radiology*. 2002;31(6):349-53. Epub 2002/06/20.
43. Landa J, Schwartz LH. Contemporary imaging in sarcoma. *The oncologist*. 2009;14(10):1021-38. Epub 2009/10/01.
44. Heslin MJ, Lewis JJ, Nadler E, Newman E, Woodruff JM, Casper ES, et al. Prognostic factors associated with long-term survival for retroperitoneal sarcoma: implications for management. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1997;15(8):2832-9. Epub 1997/08/01.
45. Hoeber I, Spillane AJ, Fisher C, Thomas JM. Accuracy of biopsy techniques for limb and limb girdle soft tissue tumors. *Annals of surgical oncology*. 2001;8(1):80-7. Epub 2001/02/24.
46. Markhede G, Angervall L, Stener B. A multivariate analysis of the prognosis after surgical treatment of malignant soft-tissue tumors. *Cancer*. 1982;49(8):1721-33. Epub 1982/04/15.
47. Myhre-Jensen O, Kaae S, Madsen EH, Sneppen O. Histopathological grading in soft-tissue tumours. Relation to survival in 261 surgically treated patients. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica Section A, Pathology*. 1983;91(2):145-50. Epub 1983/03/01.
48. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1996;14(3):859-68. Epub 1996/03/01.
49. Tomita Y, Morooka T, Hoshida Y, Zhang B, Qiu Y, Nakamichi I, et al. Reassessment of the 1993 Osaka grading system for localized soft tissue sarcoma in Japan. *Anticancer research*. 2006;26(6C):4665-9. Epub 2007/01/12.
50. van Unnik JA, Coindre JM, Contesso C, Albus-Lutter CE, Schioldt T, Sylvester R, et al. Grading of soft tissue sarcomas: experience of the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. *Eur J Cancer*. 1993;29A(15):2089-93. Epub 1993/01/01.
51. Costa J, Wesley RA, Glatstein E, Rosenberg SA. The grading of soft tissue sarcomas. Results of a clinicohistopathologic correlation in a series of 163 cases. *Cancer*. 1984;53(3):530-41. Epub 1984/02/01.
52. Coindre JM, Terrier P, Guillou L, Le Doussal V, Collin F, Ranchere D, et al. Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: a study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *Cancer*. 2001;91(10):1914-26. Epub 2001/05/11.
53. Trojani M, Contesso G, Coindre JM, Rouesse J, Bui NB, de Mascarel A, et al. Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1984;33(1):37-42. Epub 1984/01/15.

54. Guillou L, Coindre JM, Bonichon F, Nguyen BB, Terrier P, Collin 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1997;15(1):350-62. Epub 1997/01/01.
55. Kilpatrick SE. Histologic prognostication in soft tissue sarcomas: grading versus subtyping or both? A comprehensive review of the literature with proposed practical guidelines. *Annals of diagnostic pathology*. 1999;3(1):48-61. Epub 1999/02/17.
56. Zagars GK, Ballo MT, Pisters PW, Pollock RE, Patel SR, Benjamin RS, et al. Prognostic factors for patients with localized soft-tissue sarcoma treated with conservation surgery and radiation therapy: an analysis of 1225 patients. *Cancer*. 2003;97(10):2530-43. Epub 2003/05/07.
57. Fletcher CD, Gustafson P, Rydholm A, Willen H, Akerman M. Clinicopathologic re-evaluation of 100 malignant fibrous histiocytomas: prognostic relevance of subclassification. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2001;19(12):3045-50. Epub 2001/06/16.
58. Fletcher CD. Pleomorphic malignant fibrous histiocytoma: fact or fiction? A critical reappraisal based on 159 tumors diagnosed as pleomorphic sarcoma. *The American journal of surgical pathology*. 1992;16(3):213-28. Epub 1992/03/01.
59. Matushansky I, Hernando E, Socci ND, Mills JE, Matos TA, Edgar MA, et al. Derivation of sarcomas from mesenchymal stem cells via inactivation of the Wnt pathway. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(11):3248-57. Epub 2007/10/20.
60. M M. *Modern Soft Tissue Pathology. Tumors and Non-Neoplastic Conditions*: Cambridge University Press; 2010.
61. Hashimoto H, Tsuneyoshi M, Enjoji M. Malignant smooth muscle tumors of the retroperitoneum and mesentery: a clinicopathologic analysis of 44 cases. *Journal of surgical oncology*. 1985;28(3):177-86. Epub 1985/03/01.
62. Gustafson P. Soft tissue sarcoma. Epidemiology and prognosis in 508 patients. *Acta orthopaedica Scandinavica Supplementum*. 1994;259:1-31. Epub 1994/06/01.
63. Weiss SW GJ. *Enzinger and Weiss's Soft Tissue Tumors*: MOSBY. Elsevier; 2007.
64. Evans HL. Liposarcoma: a study of 55 cases with a reassessment of its classification. *The American journal of surgical pathology*. 1979;3(6):507-23. Epub 1979/12/01.
65. Weiss SW, Rao VK. Well-differentiated liposarcoma (atypical lipoma) of deep soft tissue of the extremities, retroperitoneum, and miscellaneous sites. A follow-up study of 92 cases with analysis of the incidence of "dedifferentiation". *The American journal of surgical pathology*. 1992;16(11):1051-8. Epub 1992/11/01.
66. Kilpatrick SE, Doyon J, Choong PF, Sim FH, Nascimento AG. The clinicopathologic spectrum of myxoid and round cell liposarcoma. A study of 95 cases. *Cancer*. 1996;77(8):1450-8. Epub 1996/04/15.
67. Gebhard S, Coindre JM, Michels JJ, Terrier P, Bertrand G, Trassard M, et al. Pleomorphic liposarcoma: clinicopathologic, immunohistochemical, and

- follow-up analysis of 63 cases: a study from the French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group. *The American journal of surgical pathology*. 2002;26(5):601-16. Epub 2002/04/30.
68. Henricks WH, Chu YC, Goldblum JR, Weiss SW. Dedifferentiated liposarcoma: a clinicopathological analysis of 155 cases with a proposal for an expanded definition of dedifferentiation. *The American journal of surgical pathology*. 1997;21(3):271-81. Epub 1997/03/01.
69. Hornick JL, Bosenberg MW, Mentzel T, McMenamin ME, Oliveira AM, Fletcher CD. Pleomorphic liposarcoma: clinicopathologic analysis of 57 cases. *The American journal of surgical pathology*. 2004;28(10):1257-67. Epub 2004/09/17.
70. Evans DG, Baser ME, McGaughran J, Sharif S, Howard E, Moran A. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1. *Journal of medical genetics*. 2002;39(5):311-4. Epub 2002/05/16.
71. Ducatman BS, Scheithauer BW, Piepgras DG, Reiman HM, Ilstrup DM. Malignant peripheral nerve sheath tumors. A clinicopathologic study of 120 cases. *Cancer*. 1986;57(10):2006-21. Epub 1986/05/15.
72. Kransdorf MJ. Benign soft-tissue tumors in a large referral population: distribution of specific diagnoses by age, sex, and location. *AJR American journal of roentgenology*. 1995;164(2):395-402. Epub 1995/02/01.
73. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(6):1471-4. Epub 2010/02/25.
74. Kawaguchi N, Ahmed AR, Matsumoto S, Manabe J, Matsushita Y. The concept of curative margin in surgery for bone and soft tissue sarcoma. *Clinical orthopaedics and related research*. 2004(419):165-72. Epub 2004/03/17.
75. Gronchi A, Lo Vullo S, Colombo C, Collini P, Stacchiotti S, Mariani L, et al. Extremity soft tissue sarcoma in a series of patients treated at a single institution: local control directly impacts survival. *Annals of surgery*. 2010;251(3):506-11. Epub 2010/02/05.
76. Enneking WF, Spanier SS, Goodman MA. A system for the surgical staging of musculoskeletal sarcoma. 1980. *Clinical orthopaedics and related research*. 2003(415):4-18. Epub 2003/11/13.
77. Bonvalot S, Raut CP, Pollock RE, Rutkowski P, Strauss DC, Hayes AJ, et al. Technical considerations in surgery for retroperitoneal sarcomas: position paper from E-Surge, a master class in sarcoma surgery, and EORTC-STBSG. *Annals of surgical oncology*. 2012;19(9):2981-91. Epub 2012/04/06.
78. Bonvalot S, Miceli R, Berselli M, Causeret S, Colombo C, Mariani L, et al. Aggressive surgery in retroperitoneal soft tissue sarcoma carried out at high-volume centers is safe and is associated with improved local control. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(6):1507-14. Epub 2010/04/16.
79. Gronchi A, Miceli R, Colombo C, Stacchiotti S, Collini P, Mariani L, et al. Frontline extended surgery is associated with improved survival in retroperitoneal low- to intermediate-grade soft tissue sarcomas. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2012;23(4):1067-73. Epub 2011/07/19.
80. Gronchi A, Miceli R, Shurell E, Eilber FC, Eilber FR, Anaya DA, et al. Outcome prediction in primary resected retroperitoneal soft tissue sarcoma: histology-specific overall survival and disease-free survival nomograms built on major sarcoma center data sets. *Journal of clinical oncology : official journal of*

- the American Society of Clinical Oncology. 2013;31(13):1649-55. Epub 2013/03/27.
81. Hassan I, Park SZ, Donohue JH, Nagorney DM, Kay PA, Nasciemento AG, et al. Operative management of primary retroperitoneal sarcomas: a reappraisal of an institutional experience. *Annals of surgery*. 2004;239(2):244-50. Epub 2004/01/28.
82. Lewis JJ, Leung D, Woodruff JM, Brennan MF. Retroperitoneal soft-tissue sarcoma: analysis of 500 patients treated and followed at a single institution. *Annals of surgery*. 1998;228(3):355-65. Epub 1998/09/22.
83. Yang JC, Chang AE, Baker AR, Sindelar WF, Danforth DN, Topalian SL, et al. Randomized prospective study of the benefit of adjuvant radiation therapy in the treatment of soft tissue sarcomas of the extremity. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1998;16(1):197-203. Epub 1998/01/24.
84. O'Sullivan B, Davis AM, Turcotte R, Bell R, Catton C, Chabot P, et al. Preoperative versus postoperative radiotherapy in soft-tissue sarcoma of the limbs: a randomised trial. *Lancet*. 2002;359(9325):2235-41. Epub 2002/07/10.
85. Davis AM, O'Sullivan B, Turcotte R, Bell R, Catton C, Chabot P, et al. Late radiation morbidity following randomization to preoperative versus postoperative radiotherapy in extremity soft tissue sarcoma. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2005;75(1):48-53. Epub 2005/06/11.
86. Ballo MT, Zagars GK, Pollock RE, Benjamin RS, Feig BW, Cormier JN, et al. Retroperitoneal soft tissue sarcoma: an analysis of radiation and surgical treatment. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2007;67(1):158-63. Epub 2006/11/07.
87. Pawlik TM, Ahuja N, Herman JM. The role of radiation in retroperitoneal sarcomas: a surgical perspective. *Current opinion in oncology*. 2007;19(4):359-66. Epub 2007/06/05.
88. Gronchi A, Frustaci S, Mercuri M, Martin J, Lopez-Pousa A, Verderio P, et al. Short, full-dose adjuvant chemotherapy in high-risk adult soft tissue sarcomas: a randomized clinical trial from the Italian Sarcoma Group and the Spanish Sarcoma Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(8):850-6. Epub 2012/02/09.
89. Gronchi A, Verderio P, De Paoli A, Ferraro A, Tendero O, Majo J, et al. Quality of surgery and neoadjuvant combined therapy in the ISG-GEIS trial on soft tissue sarcomas of limbs and trunk wall. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24(3):817-23. Epub 2012/11/01.
90. Billingsley KG, Burt ME, Jara E, Ginsberg RJ, Woodruff JM, Leung DH, et al. Pulmonary metastases from soft tissue sarcoma: analysis of patterns of diseases and postmetastasis survival. *Annals of surgery*. 1999;229(5):602-10; discussion 10-2. Epub 1999/05/11.
91. Blackmon SH, Shah N, Roth JA, Correa AM, Vaporciyan AA, Rice DC, et al. Resection of pulmonary and extrapulmonary sarcomatous metastases is associated with long-term survival. *The Annals of thoracic surgery*. 2009;88(3):877-84; discussion 84-5. Epub 2009/08/25.
92. Choong PF, Pritchard DJ, Rock MG, Sim FH, Frassica FJ. Survival after pulmonary metastasectomy in soft tissue sarcoma. Prognostic factors in 214 patients. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 1995;66(6):561-8. Epub 1995/12/01.

93. van Geel AN, Pastorino U, Jauch KW, Judson IR, van Coevorden F, Buesa JM, et al. Surgical treatment of lung metastases: The European Organization for Research and Treatment of Cancer-Soft Tissue and Bone Sarcoma Group study of 255 patients. *Cancer*. 1996;77(4):675-82. Epub 1996/02/15.
94. Antman K, Crowley J, Balcerzak SP, Rivkin SE, Weiss GR, Elias A, 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1993;11(7):1276-85. Epub 1993/07/01.
95. Eriksson M. Histology-driven chemotherapy of soft-tissue sarcoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010;21 Suppl 7:vii270-6. Epub 2010/10/15.
96. Jones RL, Fisher C, Al-Muderis O, Judson IR. Differential sensitivity of liposarcoma subtypes to chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2005;41(18):2853-60. Epub 2005/11/18.
97. Rosen G, Forscher C, Lowenbraun S, Eilber F, Eckardt J, Holmes C, et al. Synovial sarcoma. Uniform response of metastases to high dose ifosfamide. *Cancer*. 1994;73(10):2506-11. Epub 1994/05/15.
98. Sleijfer S. Management of aggressive fibromatosis: can we unravel the maze of treatment options? *Eur J Cancer*. 2009;45(17):2928-9. Epub 2009/10/07.
99. Spillane AJ, A'Hern R, Judson IR, Fisher C, Thomas JM. Synovial sarcoma: a clinicopathologic, staging, and prognostic assessment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2000;18(22):3794-803. Epub 2000/11/15.
100. Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Oosterhuis JW, Mouridsen H, Crowther D, Somers R, et al. Prognostic factors for the outcome of chemotherapy in advanced soft tissue sarcoma: an analysis of 2,185 patients treated with anthracycline-containing first-line regimens--a European Organization for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999;17(1):150-7. Epub 1999/08/24.
101. van der Graaf WT, Blay JY, Chawla SP, Kim DW, Bui-Nguyen B, Casali PG, et al. Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet*. 2012;379(9829):1879-86. Epub 2012/05/19.
102. Sant M, Allemani C, Santaquilani M, Knijn A, Marchesi F, Capocaccia R. EURO CARE-4. Survival of cancer patients diagnosed in 1995-1999. Results and commentary. *Eur J Cancer*. 2009;45(6):931-91. Epub 2009/01/28.
103. Suit HD, Mankin HJ, Wood WC, Gebhardt MC, Harmon DC, Rosenberg A, et al. Treatment of the patient with stage M0 soft tissue sarcoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1988;6(5):854-62. Epub 1988/05/01.
104. Ramanathan RC, A'Hern R, Fisher C, Thomas JM. Modified staging system for extremity soft tissue sarcomas. *Annals of surgical oncology*. 1999;6(1):57-69. Epub 1999/02/25.
105. Borden EC, Baker LH, Bell RS, Bramwell V, Demetri GD, Eisenberg BL, et al. Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science. *Clinical*



- cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2003;9(6):1941-56. Epub 2003/06/11.
106. Kattan MW, Leung DH, Brennan MF. Postoperative nomogram for 12-year sarcoma-specific death. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(3):791-6. Epub 2002/02/01.
107. Stojadinovic A, Leung DH, Hoos A, Jaques DP, Lewis JJ, Brennan MF. Analysis of the prognostic significance of microscopic margins in 2,084 localized primary adult soft tissue sarcomas. *Annals of surgery*. 2002;235(3):424-34. Epub 2002/03/08.
108. Trovik CS, Bauer HC, Alvegard TA, Anderson H, Blomqvist C, Berlin O, et al. Surgical margins, local recurrence and metastasis in soft tissue sarcomas: 559 surgically-treated patients from the Scandinavian Sarcoma Group Register. *Eur J Cancer*. 2000;36(6):710-6. Epub 2000/04/14.
109. Farshadpour F, Schaapveld M, Suurmeijer AJ, Wymenga AN, Otter R, Hoekstra HJ. Soft tissue sarcoma: why not treated? *Critical reviews in oncology/hematology*. 2005;54(1):77-83. Epub 2005/03/23.
110. Biau DJ, Ferguson PC, Turcotte RE, Chung P, Isler MH, Riad S, et al. Adverse effect of older age on the recurrence of soft tissue sarcoma of the extremities and trunk. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(30):4029-35. Epub 2011/09/21.
111. Boden RA, Clark MA, Neuhaus SJ, A'Hern J R, Thomas JM, Hayes AJ. Surgical management of soft tissue sarcoma in patients over 80 years. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2006;32(10):1154-8. Epub 2006/07/29.
112. Lahat G, Dhuka AR, Lahat S, Lazar AJ, Lewis VO, Lin PP, et al. Complete soft tissue sarcoma resection is a viable treatment option for select elderly patients. *Annals of surgical oncology*. 2009;16(9):2579-86. Epub 2009/06/27.
113. Chibon F, Lagarde P, Salas S, Perot G, Brouste V, Tirode F, et al. Validated prediction of clinical outcome in sarcomas and multiple types of cancer on the basis of a gene expression signature related to genome complexity. *Nature medicine*. 2010;16(7):781-7. Epub 2010/06/29.
114. Heslin MJ, Cordon-Cardo C, Lewis JJ, Woodruff JM, Brennan MF. Ki-67 detected by MIB-1 predicts distant metastasis and tumor mortality in primary, high grade extremity soft tissue sarcoma. *Cancer*. 1998;83(3):490-7. Epub 1998/08/05.
115. Levine EA, Holzmayer T, Bacus S, Mechetner E, Mera R, Bolliger C, et al. Evaluation of newer prognostic markers for adult soft tissue sarcomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1997;15(10):3249-57. Epub 1997/10/23.
116. Skytting BT, Bauer HC, Perfekt R, Nilsson G, Larsson O. Ki-67 is strongly prognostic in synovial sarcoma: analysis based on 86 patients from the Scandinavian Sarcoma group register. *British journal of cancer*. 1999;80(11):1809-14. Epub 1999/09/01.
117. Kawai A, Noguchi M, Beppu Y, Yokoyama R, Mukai K, Hirohashi S, et al. Nuclear immunoreaction of p53 protein in soft tissue sarcomas. A possible prognostic factor. *Cancer*. 1994;73(10):2499-505. Epub 1994/05/15.
118. Kim SH, Kim JW, Kim YT, Kim JH, Yoon BS, Ryu HS. Prognostic factors and expression of p53 and mdm-2 in uterine sarcomas. *International journal of*

- gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics. 2006;95(3):272-7. Epub 2006/08/26.
119. Taubert H, Meye A, Wurl P. Prognosis is correlated with p53 mutation type for soft tissue sarcoma patients. *Cancer research*. 1996;56(18):4134-6. Epub 1996/09/15.
120. Wurl P, Meye A, Schmidt H, Lautenschlager C, Kalthoff H, Rath FW, et al. High prognostic significance of Mdm2/p53 co-overexpression in soft tissue sarcomas of the extremities. *Oncogene*. 1998;16(9):1183-5. Epub 1998/04/07.
121. Dreinhofer KE, Akerman M, Willen H, Anderson C, Gustafson P, Rydholm A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in high-grade malignant fibrous histiocytoma: prognostic value in 48 patients. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1994;59(3):379-82. Epub 1994/11/01.
122. Oda Y, Hashimoto H, Takeshita S, Tsuneyoshi M. The prognostic value of immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen in synovial sarcoma. *Cancer*. 1993;72(2):478-85. Epub 1993/07/15.
123. Kim SH, Cho NH, Tallini G, Dudas M, Lewis JJ, Cordon-Cardo C. Prognostic role of cyclin D1 in retroperitoneal sarcomas. *Cancer*. 2001;91(2):428-34. Epub 2001/02/17.
124. Kim SH, Lewis JJ, Brennan MF, Woodruff JM, Dudas M, Cordon-Cardo C. Overexpression of cyclin D1 is associated with poor prognosis in extremity soft-tissue sarcomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 1998;4(10):2377-82. Epub 1998/10/31.
125. Brinck U, Schlott T, Storber S, Stachura J, Bortkiewicz P, Nagel WD, et al. Alterations of the retinoblastoma and p16 pathway correlate with promoter methylation in malignant fibrous histiocytomas. *Anticancer research*. 2006;26(5A):3461-5. Epub 2006/11/11.
126. Endo M, Kobayashi C, Setsu N, Takahashi Y, Kohashi K, Yamamoto H, et al. Prognostic significance of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a inactivation in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(11):3771-82. Epub 2011/01/26.
127. Kawaguchi K, Oda Y, Saito T, Yamamoto H, Tamiya S, Takahira T, et al. Mechanisms of inactivation of the p16INK4a gene in leiomyosarcoma of soft tissue: decreased p16 expression correlates with promoter methylation and poor prognosis. *The Journal of pathology*. 2003;201(3):487-95. Epub 2003/11/05.
128. Knosel T, Altendorf-Hofmann A, Lindner L, Issels R, Hermeking H, Schuebbe G, et al. Loss of p16(INK4a) is associated with reduced patient survival in soft tissue tumours, and indicates a senescence barrier. *Journal of clinical pathology*. 2014;67(7):592-8. Epub 2014/04/22.
129. D'Angelo E, Espinosa I, Ali R, Gilks CB, Rijn M, Lee CH, et al. Uterine leiomyosarcomas: tumor size, mitotic index, and biomarkers Ki67, and Bcl-2 identify two groups with different prognosis. *Gynecologic oncology*. 2011;121(2):328-33. Epub 2011/02/15.
130. Lusby K, Savannah KB, Demicco EG, Zhang Y, Ghadimi MP, Young ED, et al. Uterine leiomyosarcoma management, outcome, and associated molecular biomarkers: a single institution's experience. *Annals of surgical oncology*. 2013;20(7):2364-72. Epub 2013/01/22.

131. Tsiatis AC, Herceg ME, Keedy VL, Halpern JL, Holt GE, Schwartz HS, et al. Prognostic significance of c-Myc expression in soft tissue leiomyosarcoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2009;22(11):1432-8. Epub 2009/07/28.
132. Endo M, Yamamoto H, Setsu N, Kohashi K, Takahashi Y, Ishii T, et al. Prognostic significance of AKT/mTOR and MAPK pathways and antitumor effect of mTOR inhibitor in NF1-related and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2013;19(2):450-61. Epub 2012/12/05.
133. Setsu N, Kohashi K, Fushimi F, Endo M, Yamamoto H, Takahashi Y, et al. Prognostic impact of the activation status of the Akt/mTOR pathway in synovial sarcoma. *Cancer.* 2013;119(19):3504-13. Epub 2013/07/19.
134. Setsu N, Yamamoto H, Kohashi K, Endo M, Matsuda S, Yokoyama R, et al. The Akt/mammalian target of rapamycin pathway is activated and associated with adverse prognosis in soft tissue leiomyosarcomas. *Cancer.* 2012;118(6):1637-48. Epub 2011/08/13.
135. Tomita Y, Morooka T, Hoshida Y, Zhang B, Qiu Y, Nakamichi I, et al. Prognostic significance of activated AKT expression in soft-tissue sarcoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2006;12(10):3070-7. Epub 2006/05/19.
136. Ahlen J, Wejde J, Brosjo O, von Rosen A, Weng WH, Girnita L, et al. Insulin-like growth factor type 1 receptor expression correlates to good prognosis in highly malignant soft tissue sarcoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2005;11(1):206-16. Epub 2005/01/27.
137. Yudoh K, Kanamori M, Ohmori K, Yasuda T, Aoki M, Kimura T. Concentration of vascular endothelial growth factor in the tumour tissue as a prognostic factor of soft tissue sarcomas. *British journal of cancer.* 2001;84(12):1610-5. Epub 2001/06/13.
138. Saito T, Oda Y, Sakamoto A, Tamiya S, Kinukawa N, Hayashi K, et al. Prognostic value of the preserved expression of the E-cadherin and catenin families of adhesion molecules and of beta-catenin mutations in synovial sarcoma. *The Journal of pathology.* 2000;192(3):342-50. Epub 2000/10/31.
139. Ottaiano A, De Chiara A, Perrone F, Botti G, Fazioli F, De Rosa V, et al. Prognostic value of CD40 in adult soft tissue sarcomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2004;10(8):2824-31. Epub 2004/04/23.
140. Helman LJ, Meltzer P. Mechanisms of sarcoma development. *Nature reviews Cancer.* 2003;3(9):685-94. Epub 2003/09/03.
141. Mitelman F. Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutation research.* 2000;462(2-3):247-53. Epub 2000/04/18.
142. Barr FG. Translocations, cancer and the puzzle of specificity. *Nature genetics.* 1998;19(2):121-4. Epub 1998/06/10.
143. Ladanyi M, Bridge JA. Contribution of molecular genetic data to the classification of sarcomas. *Human pathology.* 2000;31(5):532-8. Epub 2000/06/03.
144. de Alava E, Kawai A, Healey JH, Fligman I, Meyers PA, Huvos AG, et al. EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. *Journal of clinical oncology : official journal of*

- the American Society of Clinical Oncology. 1998;16(4):1248-55. Epub 1998/04/29.
145. Ladanyi M, Antonescu CR, Leung DH, Woodruff JM, Kawai A, Healey JH, et al. Impact of SYT-SSX fusion type on the clinical behavior of synovial sarcoma: a multi-institutional retrospective study of 243 patients. *Cancer research*. 2002;62(1):135-40. Epub 2002/01/10.
146. Sorensen PH, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, et al. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma: a report from the children's oncology group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2002;20(11):2672-9. Epub 2002/06/01.
147. Demicco EG, Lazar AJ. Clinicopathologic considerations: how can we fine tune our approach to sarcoma? *Seminars in oncology*. 2011;38 Suppl 3:S3-18. Epub 2011/11/30.
148. Lee CH, Ou WB, Marino-Enriquez A, Zhu M, Mayeda M, Wang Y, et al. 14-3-3 fusion oncogenes in high-grade endometrial stromal sarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(3):929-34. Epub 2012/01/10.
149. Robinson DR, Wu YM, Kalyana-Sundaram S, Cao X, Lonigro RJ, Sung YS, et al. Identification of recurrent NAB2-STAT6 gene fusions in solitary fibrous tumor by integrative sequencing. *Nature genetics*. 2013;45(2):180-5. Epub 2013/01/15.
150. Barretina J, Taylor BS, Banerji S, Ramos AH, Lagos-Quintana M, Decarolis PL, et al. Subtype-specific genomic alterations define new targets for soft-tissue sarcoma therapy. *Nature genetics*. 2010;42(8):715-21. Epub 2010/07/06.
151. McDermott KM, Zhang J, Holst CR, Kozakiewicz BK, Singla V, Tlsty TD. p16(INK4a) prevents centrosome dysfunction and genomic instability in primary cells. *PLoS biology*. 2006;4(3):e51. Epub 2006/02/09.
152. Shen WH, Balajee AS, Wang J, Wu H, Eng C, Pandolfi PP, et al. Essential role for nuclear PTEN in maintaining chromosomal integrity. *Cell*. 2007;128(1):157-70. Epub 2007/01/16.
153. Meza-Zepeda LA, Kresse SH, Barragan-Polania AH, Bjerkehagen B, Ohnstad HO, Namlos HM, et al. Array comparative genomic hybridization reveals distinct DNA copy number differences between gastrointestinal stromal tumors and leiomyosarcomas. *Cancer research*. 2006;66(18):8984-93. Epub 2006/09/20.
154. Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, et al. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature*. 2000;406(6796):641-5. Epub 2000/08/19.
155. Ohali A, Avigad S, Naumov I, Goshen Y, Ash S, Yaniv I. Different telomere maintenance mechanisms in alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. *Genes, chromosomes & cancer*. 2008;47(11):965-70. Epub 2008/07/30.
156. Ulaner GA, Hoffman AR, Otero J, Huang HY, Zhao Z, Mazumdar M, et al. Divergent patterns of telomere maintenance mechanisms among human sarcomas: sharply contrasting prevalence of the alternative lengthening of telomeres mechanism in Ewing's sarcomas and osteosarcomas. *Genes, chromosomes & cancer*. 2004;41(2):155-62. Epub 2004/08/03.

157. Lafferty-Whyte K, Cairney CJ, Will MB, Serakinci N, Daidone MG, Zaffaroni N, et al. A gene expression signature classifying telomerase and ALT immortalization reveals an hTERT regulatory network and suggests a mesenchymal stem cell origin for ALT. *Oncogene*. 2009;28(43):3765-74. Epub 2009/08/18.
158. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88(3):323-31. Epub 1997/02/07.
159. Creager AJ, Cohen JA, Geradts J. Aberrant expression of cell-cycle regulatory proteins in human mesenchymal neoplasia. *Cancer detection and prevention*. 2001;25(2):123-31. Epub 2001/05/09.
160. Abudu A, Mangham DC, Reynolds GM, Pynsent PB, Tillman RM, Carter SR, et al. Overexpression of p53 protein in primary Ewing's sarcoma of bone: relationship to tumour stage, response and prognosis. *British journal of cancer*. 1999;79(7-8):1185-9. Epub 1999/03/31.
161. Antonescu CR, Leung DH, Dudas M, Ladanyi M, Brennan M, Woodruff JM, et al. Alterations of cell cycle regulators in localized synovial sarcoma: A multifactorial study with prognostic implications. *The American journal of pathology*. 2000;156(3):977-83. Epub 2000/03/07.
162. 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. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2001;7(12):3977-87. Epub 2001/12/26.
163. de Alava E, Antonescu CR, Panizo A, Leung D, Meyers PA, Huvos AG, et al. Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer*. 2000;89(4):783-92. Epub 2000/08/22.
164. Lopez-Guerrero JA, Pellin A, Noguera R, Carda C, Llombart-Bosch A. Molecular analysis of the 9p21 locus and p53 genes in Ewing family tumors. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2001;81(6):803-14. Epub 2001/06/15.
165. Wei G, Antonescu CR, de Alava E, Leung D, Huvos AG, Meyers PA, et al. Prognostic impact of INK4A deletion in Ewing sarcoma. *Cancer*. 2000;89(4):793-9. Epub 2000/08/22.
166. Sharpless NE, Ferguson DO, O'Hagan RC, Castrillon DH, Lee C, Farazi PA, et al. Impaired nonhomologous end-joining provokes soft tissue sarcomas harboring chromosomal translocations, amplifications, and deletions. *Molecular cell*. 2001;8(6):1187-96. Epub 2002/01/10.
167. Mandahl N, Hoglund M, Mertens F, Rydholm A, Willen H, Brosjo O, et al. Cytogenetic aberrations in 188 benign and borderline adipose tissue tumors. *Genes, chromosomes & cancer*. 1994;9(3):207-15. Epub 1994/03/01.
168. Sreekantaiah C, Leong SP, Karakousis CP, McGee DL, Rappaport WD, Villar HV, et al. Cytogenetic profile of 109 lipomas. *Cancer research*. 1991;51(1):422-33. Epub 1991/01/01.
169. Willen H, Akerman M, Dal Cin P, De Wever I, Fletcher CD, Mandahl N, et al. Comparison of chromosomal patterns with clinical features in 165 lipomas: a report of the CHAMP study group. *Cancer genetics and cytogenetics*. 1998;102(1):46-9. Epub 1998/04/08.

170. Petit MM, Mols R, Schoenmakers EF, Mandahl N, Van de Ven WJ. LPP, the preferred fusion partner gene of HMGIC in lipomas, is a novel member of the LIM protein gene family. *Genomics*. 1996;36(1):118-29. Epub 1996/08/15.
171. Petit MM, Schoenmakers EF, Huysmans C, Geurts JM, Mandahl N, Van de Ven WJ. LHFP, a novel translocation partner gene of HMGIC in a lipoma, is a member of a new family of LHFP-like genes. *Genomics*. 1999;57(3):438-41. Epub 1999/05/18.
172. Sandberg AA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: leiomyoma. *Cancer genetics and cytogenetics*. 2005;158(1):1-26. Epub 2005/03/18.
173. Mehine M, Kaasinen E, Makinen N, Katainen R, Kampjarvi K, Pitkanen E, et al. Characterization of uterine leiomyomas by whole-genome sequencing. *The New England journal of medicine*. 2013;369(1):43-53. Epub 2013/06/07.
174. Mertens F, Dal Cin P, De Wever I, Fletcher CD, Mandahl N, Mitelman F, et al. Cytogenetic characterization of peripheral nerve sheath tumours: a report of the CHAMP study group. *The Journal of pathology*. 2000;190(1):31-8. Epub 2000/01/21.
175. Rey JA, Bello MJ, de Campos JM, Benitez J, Sarasa JL, Boixados JR, et al. Cytogenetic clones in a recurrent neurofibroma. *Cancer genetics and cytogenetics*. 1987;26(1):157-63. Epub 1987/05/01.
176. Stenman G, Kindblom LG, Johansson M, Angervall L. Clonal chromosome abnormalities and in vitro growth characteristics of classical and cellular schwannomas. *Cancer genetics and cytogenetics*. 1991;57(1):121-31. Epub 1991/11/01.
177. Morrison H, Sperka T, Manent J, Giovannini M, Ponta H, Herrlich P. Merlin/neurofibromatosis type 2 suppresses growth by inhibiting the activation of Ras and Rac. *Cancer research*. 2007;67(2):520-7. Epub 2007/01/20.
178. Martuza RL, Eldridge R. Neurofibromatosis 2 (bilateral acoustic neurofibromatosis). *The New England journal of medicine*. 1988;318(11):684-8. Epub 1988/03/17.
179. Serra E, Rosenbaum T, Winner U, Aledo R, Ars E, Estivill X, et al. Schwann cells harbor the somatic NF1 mutation in neurofibromas: evidence of two different Schwann cell subpopulations. *Human molecular genetics*. 2000;9(20):3055-64. Epub 2000/12/15.
180. Zhu Y, Ghosh P, Charnay P, Burns DK, Parada LF. Neurofibromas in NF1: Schwann cell origin and role of tumor environment. *Science*. 2002;296(5569):920-2. Epub 2002/05/04.
181. El-Rifai W, Sarlomo-Rikala M, Knuutila S, Miettinen M. DNA copy number changes in development and progression in leiomyosarcomas of soft tissues. *The American journal of pathology*. 1998;153(3):985-90. Epub 1998/09/15.
182. Gibault L, Perot G, Chibon F, Bonnin S, Lagarde P, Terrier P, et al. New insights in sarcoma oncogenesis: a comprehensive analysis of a large series of 160 soft tissue sarcomas with complex genomics. *The Journal of pathology*. 2011;223(1):64-71. Epub 2010/12/03.
183. Serrano C, George S. Leiomyosarcoma. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2013;27(5):957-74. Epub 2013/10/08.
184. Dei Tos AP, Maestro R, Doglioni C, Piccinin S, Libera DD, Boiocchi M, et al. Tumor suppressor genes and related molecules in leiomyosarcoma. *The American journal of pathology*. 1996;148(4):1037-45. Epub 1996/04/01.

185. Cordon-Cardo C, Latres E, Drobnyak M, Oliva MR, Pollack D, Woodruff JM, et al. Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas. *Cancer research*. 1994;54(3):794-9. Epub 1994/02/01.
186. Beck AH, Lee CH, Witten DM, Gleason BC, Edris B, Espinosa I, et al. Discovery of molecular subtypes in leiomyosarcoma through integrative molecular profiling. *Oncogene*. 2010;29(6):845-54. Epub 2009/11/11.
187. Mills AM, Beck AH, Montgomery KD, Zhu SX, Espinosa I, Lee CH, et al. Expression of subtype-specific group 1 leiomyosarcoma markers in a wide variety of sarcomas by gene expression analysis and immunohistochemistry. *The American journal of surgical pathology*. 2011;35(4):583-9. Epub 2011/03/18.
188. Nielsen TO, West RB, Linn SC, Alter O, Knowling MA, O'Connell JX, et al. Molecular characterisation of soft tissue tumours: a gene expression study. *Lancet*. 2002;359(9314):1301-7. Epub 2002/04/20.
189. Horvai AE, DeVries S, Roy R, O'Donnell RJ, Waldman F. Similarity in genetic alterations between paired well-differentiated and dedifferentiated components of dedifferentiated liposarcoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2009;22(11):1477-88. Epub 2009/09/08.
190. Rosai J, Akerman M, Dal Cin P, DeWever I, Fletcher CD, Mandahl N, et al. Combined morphologic and karyotypic study of 59 atypical lipomatous tumors. Evaluation of their relationship and differential diagnosis with other adipose tissue tumors (a report of the CHAMP Study Group). *The American journal of surgical pathology*. 1996;20(10):1182-9. Epub 1996/10/01.
191. Dal Cin P, Kools P, Sciort R, De Wever I, Van Damme B, Van de Ven W, et al. Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization investigation of ring chromosomes characterizing a specific pathologic subgroup of adipose tissue tumors. *Cancer genetics and cytogenetics*. 1993;68(2):85-90. Epub 1993/07/15.
192. Pedeutour F, Forus A, Coindre JM, Berner JM, Nicolo G, Michiels JF, et al. Structure of the supernumerary ring and giant rod chromosomes in adipose tissue tumors. *Genes, chromosomes & cancer*. 1999;24(1):30-41. Epub 1999/01/19.
193. Szymanska J, Mandahl N, Mertens F, Tarkkanen M, Karaharju E, Knuutila S. Ring chromosomes in parosteal osteosarcoma contain sequences from 12q13-15: a combined cytogenetic and comparative genomic hybridization study. *Genes, chromosomes & cancer*. 1996;16(1):31-4. Epub 1996/05/01.
194. Pilotti S, Della Torre G, Lavarino C, Di Palma S, Sozzi G, Minoletti F, et al. Distinct mdm2/p53 expression patterns in liposarcoma subgroups: implications for different pathogenetic mechanisms. *The Journal of pathology*. 1997;181(1):14-24. Epub 1997/01/01.
195. Schneider-Stock R, Walter H, Radig K, Rys J, Bosse A, Kuhnen C, et al. MDM2 amplification and loss of heterozygosity at Rb and p53 genes: no simultaneous alterations in the oncogenesis of liposarcomas. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1998;124(10):532-40. Epub 1998/11/26.
196. Singer S, Socci ND, Ambrosini G, Sambol E, Decarolis P, Wu Y, et al. Gene expression profiling of liposarcoma identifies distinct biological types/subtypes and potential therapeutic targets in well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma. *Cancer research*. 2007;67(14):6626-36. Epub 2007/07/20.

197. Crozat A, Aman P, Mandahl N, Ron D. Fusion of CHOP to a novel RNA-binding protein in human myxoid liposarcoma. *Nature*. 1993;363(6430):640-4. Epub 1993/06/17.
198. Kuroda M, Ishida T, Takanashi M, Satoh M, Machinami R, Watanabe T. Oncogenic transformation and inhibition of adipocytic conversion of preadipocytes by TLS/FUS-CHOP type II chimeric protein. *The American journal of pathology*. 1997;151(3):735-44. Epub 1997/09/01.
199. Nilbert M, Rydholm A, Willen H, Mitelman F, Mandahl N. MDM2 gene amplification correlates with ring chromosome in soft tissue tumors. *Genes, chromosomes & cancer*. 1994;9(4):261-5. Epub 1994/04/01.
200. Crew AJ, Clark J, Fisher C, Gill S, Grimer R, Chand A, et al. Fusion of SYT to two genes, SSX1 and SSX2, encoding proteins with homology to the Kruppel-associated box in human synovial sarcoma. *The EMBO journal*. 1995;14(10):2333-40. Epub 1995/05/15.
201. Haldar M, Hancock JD, Coffin CM, Lessnick SL, Capecchi MR. A conditional mouse model of synovial sarcoma: insights into a myogenic origin. *Cancer cell*. 2007;11(4):375-88. Epub 2007/04/10.
202. Glover TW, Stein CK, Legius E, Andersen LB, Brereton A, Johnson S. Molecular and cytogenetic analysis of tumors in von Recklinghausen neurofibromatosis. *Genes, chromosomes & cancer*. 1991;3(1):62-70. Epub 1991/01/01.
203. Upadhyaya M, Spurlock G, Monem B, Thomas N, Friedrich RE, Kluwe L, et al. Germline and somatic NF1 gene mutations in plexiform neurofibromas. *Human mutation*. 2008;29(8):E103-11. Epub 2008/05/20.
204. Johannessen CM, Reczek EE, James MF, Brems H, Legius E, Cichowski K. The NF1 tumor suppressor critically regulates TSC2 and mTOR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(24):8573-8. Epub 2005/06/07.
205. Legius E, Dierick H, Wu R, Hall BK, Marynen P, Cassiman JJ, et al. TP53 mutations are frequent in malignant NF1 tumors. *Genes, chromosomes & cancer*. 1994;10(4):250-5. Epub 1994/08/01.
206. Gladdy RA, Qin LX, Moraco N, Edgar MA, Antonescu CR, Alektiar KM, et al. Do radiation-associated soft tissue sarcomas have the same prognosis as sporadic soft tissue sarcomas? *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(12):2064-9. Epub 2010/03/24.
207. Laskin WB, Silverman TA, Enzinger FM. Postradiation soft tissue sarcomas. An analysis of 53 cases. *Cancer*. 1988;62(11):2330-40. Epub 1988/12/01.
208. Mertens F, Fletcher CD, Dal Cin P, De Wever I, Mandahl N, Mitelman F, et al. Cytogenetic analysis of 46 pleomorphic soft tissue sarcomas and correlation with morphologic and clinical features: a report of the CHAMP Study Group. *Chromosomes and Morphology*. *Genes, chromosomes & cancer*. 1998;22(1):16-25. Epub 1998/05/20.
209. Mairal A, Terrier P, Chibon F, Sastre X, Lecesne A, Aurias A. Loss of chromosome 13 is the most frequent genomic imbalance in malignant fibrous histiocytomas. A comparative genomic hybridization analysis of a series of 30 cases. *Cancer genetics and cytogenetics*. 1999;111(2):134-8. Epub 1999/05/29.



210. Cantley LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 2002;296(5573):1655-7. Epub 2002/06/01.
211. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, et al. Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science*. 1998;279(5351):710-4. Epub 1998/02/21.
212. Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, et al. Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science*. 1997;277(5325):567-70. Epub 1997/07/25.
213. Toker A, Newton AC. Akt/protein kinase B is regulated by autophosphorylation at the hypothetical PDK-2 site. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(12):8271-4. Epub 2000/03/18.
214. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology*. 2002;4(9):648-57. Epub 2002/08/13.
215. Potter CJ, Pedraza LG, Xu T. Akt regulates growth by directly phosphorylating Tsc2. *Nature cell biology*. 2002;4(9):658-65. Epub 2002/08/13.
216. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*. 2004;18(16):1926-45. Epub 2004/08/18.
217. Kim DH, Sarbassov DD, Ali SM, King JE, Latek RR, Erdjument-Bromage H, et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002;110(2):163-75. Epub 2002/08/02.
218. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 2005;307(5712):1098-101. Epub 2005/02/19.
219. Martin DE, Hall MN. The expanding TOR signaling network. *Current opinion in cell biology*. 2005;17(2):158-66. Epub 2005/03/23.
220. Rikhsaf B, de Jong S, Suurmeijer AJ, Meijer C, van der Graaf WT. The insulin-like growth factor system and sarcomas. *The Journal of pathology*. 2009;217(4):469-82. Epub 2009/01/17.
221. Werner H, Roberts CT, Jr. The IGF1 receptor gene: a molecular target for disrupted transcription factors. *Genes, chromosomes & cancer*. 2003;36(2):113-20. Epub 2003/01/01.
222. LeRoith D, Roberts CT, Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer letters*. 2003;195(2):127-37. Epub 2003/05/28.
223. Gloudemans T, Pospiech I, Van Der Ven LT, Lips CJ, Schneid H, Den Otter W, et al. Expression and CpG methylation of the insulin-like growth factor II gene in human smooth muscle tumors. *Cancer research*. 1992;52(23):6516-21. Epub 1992/12/01.
224. Vu TH, Yballe C, Boonyanit S, Hoffman AR. Insulin-like growth factor II in uterine smooth-muscle tumors: maintenance of genomic imprinting in leiomyomata and loss of imprinting in leiomyosarcomata. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1995;80(5):1670-6. Epub 1995/05/01.
225. Chang Q, Li Y, White MF, Fletcher JA, Xiao S. Constitutive activation of insulin receptor substrate 1 is a frequent event in human tumors: therapeutic implications. *Cancer research*. 2002;62(21):6035-8. Epub 2002/11/05.
226. Hernando E, Charytonowicz E, Dudas ME, Menendez S, Matushansky I, Mills J, et al. The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas. *Nature medicine*. 2007;13(6):748-53. Epub 2007/05/15.

227. de Bruijn DR, Allander SV, van Dijk AH, Willemse MP, Thijssen J, van Groningen JJ, et al. The synovial-sarcoma-associated SS18-SSX2 fusion protein induces epigenetic gene (de)regulation. *Cancer research*. 2006;66(19):9474-82. Epub 2006/10/05.
228. Sun Y, Gao D, Liu Y, Huang J, Lessnick S, Tanaka S. IGF2 is critical for tumorigenesis by synovial sarcoma oncoprotein SYT-SSX1. *Oncogene*. 2006;25(7):1042-52. Epub 2005/10/26.
229. Xie Y, Skytting B, Nilsson G, Brodin B, Larsson O. Expression of insulin-like growth factor-1 receptor in synovial sarcoma: association with an aggressive phenotype. *Cancer research*. 1999;59(15):3588-91. Epub 1999/08/14.
230. Yang J, Ylipaa A, Sun Y, Zheng H, Chen K, Nykter M, et al. Genomic and molecular characterization of malignant peripheral nerve sheath tumor identifies the IGF1R pathway as a primary target for treatment. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(24):7563-73. Epub 2011/11/02.
231. Olmos D, Tan DS, Jones RL, Judson IR. Biological rationale and current clinical experience with anti-insulin-like growth factor 1 receptor monoclonal antibodies in treating sarcoma: twenty years from the bench to the bedside. *Cancer J*. 2010;16(3):183-94. Epub 2010/06/09.
232. Wesche J, Haglund K, Haugsten EM. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. *The Biochemical journal*. 2011;437(2):199-213. Epub 2011/06/30.
233. Zhang K, Chu K, Wu X, Gao H, Wang J, Yuan YC, et al. Amplification of FRS2 and activation of FGFR/FRS2 signaling pathway in high-grade liposarcoma. *Cancer research*. 2013;73(4):1298-307. Epub 2013/02/09.
234. Ishibe T, Nakayama T, Okamoto T, Aoyama T, Nishijo K, Shibata KR, et al. Disruption of fibroblast growth factor signal pathway inhibits the growth of synovial sarcomas: potential application of signal inhibitors to molecular target therapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(7):2702-12. Epub 2005/04/09.
235. Sato O, Wada T, Kawai A, Yamaguchi U, Makimoto A, Kokai Y, et al. Expression of epidermal growth factor receptor, ERBB2 and KIT in adult soft tissue sarcomas: a clinicopathologic study of 281 cases. *Cancer*. 2005;103(9):1881-90. Epub 2005/03/18.
236. Holtkamp N, Malzer E, Zietsch J, Okuducu AF, Mucha J, Mawrin C, et al. EGFR and erbB2 in malignant peripheral nerve sheath tumors and implications for targeted therapy. *Neuro-oncology*. 2008;10(6):946-57. Epub 2008/07/25.
237. Perrone F, Da Riva L, Orsenigo M, Losa M, Jocolle G, Millefanti C, et al. PDGFRA, PDGFRB, EGFR, and downstream signaling activation in malignant peripheral nerve sheath tumor. *Neuro-oncology*. 2009;11(6):725-36. Epub 2009/02/28.
238. Tawbi H, Thomas D, Lucas DR, Biermann JS, Schuetze SM, Hart AL, et al. Epidermal growth factor receptor expression and mutational analysis in synovial sarcomas and malignant peripheral nerve sheath tumors. *The oncologist*. 2008;13(4):459-66. Epub 2008/05/02.
239. Baird K, Davis S, Antonescu CR, Harper UL, Walker RL, Chen Y, et al. Gene expression profiling of human sarcomas: insights into sarcoma biology. *Cancer research*. 2005;65(20):9226-35. Epub 2005/10/19.

240. Cote GM; Butrynski J; Shen BMJDZDADPNGSHFDGHDRC, editor. GENOMIC ANALYSIS OF OVER 400 SARCOMAS. 18th Annual Meeting CTOS; 2013; New York (EEUU).
241. Gregorian C, Nakashima J, Dry SM, Nghiemphu PL, Smith KB, Ao Y, et al. PTEN dosage is essential for neurofibroma development and malignant transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(46):19479-84. Epub 2009/10/23.
242. Gutierrez A, Snyder EL, Marino-Enriquez A, Zhang YX, Sioletic S, Kozakewich E, et al. Aberrant AKT activation drives well-differentiated liposarcoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(39):16386-91. Epub 2011/09/21.
243. Johansson G, Mahller YY, Collins MH, Kim MO, Nobukuni T, Perentesis J, et al. Effective in vivo targeting of the mammalian target of rapamycin pathway in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Molecular cancer therapeutics*. 2008;7(5):1237-45. Epub 2008/05/17.
244. Levard A, Tassy L, Cassier PA. Emerging therapies for soft-tissue sarcomas. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2013;27(5):1063-78. Epub 2013/10/08.
245. Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, Buday L, Sizeland AM, Weinberg RA. Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature*. 1993;363(6424):45-51. Epub 1993/05/06.
246. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(6):459-65. Epub 2003/06/05.
247. Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene*. 2013;513(1):1-13. Epub 2012/11/06.
248. De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, Pergameno M, Normanno N. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. *Expert opinion on therapeutic targets*. 2012;16 Suppl 2:S17-27. Epub 2012/03/27.
249. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current opinion in cell biology*. 1997;9(2):180-6. Epub 1997/04/01.
250. Klein EA, Assoian RK. Transcriptional regulation of the cyclin D1 gene at a glance. *Journal of cell science*. 2008;121(Pt 23):3853-7. Epub 2008/11/21.
251. Basu TN, Gutmann DH, Fletcher JA, Glover TW, Collins FS, Downward J. Aberrant regulation of ras proteins in malignant tumour cells from type 1 neurofibromatosis patients. *Nature*. 1992;356(6371):713-5. Epub 1992/04/23.
252. Bottillo I, Ahlquist T, Brekke H, Danielsen SA, van den Berg E, Mertens F, et al. Germline and somatic NF1 mutations in sporadic and NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumours. *The Journal of pathology*. 2009;217(5):693-701. Epub 2009/01/15.
253. Hirbe AC, Pekmezci M, Dahiya S, Apicelli AJ, Van Tine BA, Perry A, et al. BRAFV600E mutation in sporadic and neurofibromatosis type 1-related malignant peripheral nerve sheath tumors. *Neuro-oncology*. 2014;16(3):466-7. Epub 2013/12/25.
254. Serrano C, Simonetti S, Hernandez-Losa J, Valverde C, Carrato C, Bague S, et al. BRAF V600E and KRAS G12S mutations in peripheral nerve sheath tumours. *Histopathology*. 2013;62(3):499-504. Epub 2012/11/30.
255. Dodd RD, Mito JK, Eward WC, Chitalia R, Sachdeva M, Ma Y, et al. NF1 deletion generates multiple subtypes of soft-tissue sarcoma that respond to

MEK inhibition. *Molecular cancer therapeutics*. 2013;12(9):1906-17. Epub 2013/07/17.

256. Kirsch DG, Dinulescu DM, Miller JB, Grimm J, Santiago PM, Young NP, et al. A spatially and temporally restricted mouse model of soft tissue sarcoma. *Nature medicine*. 2007;13(8):992-7. Epub 2007/08/07.

257. Maertens O, Prenen H, Debiec-Rychter M, Wozniak A, Sciot R, Pauwels P, et al. Molecular pathogenesis of multiple gastrointestinal stromal tumors in NF1 patients. *Human molecular genetics*. 2006;15(6):1015-23. Epub 2006/02/08.

258. Futreal PA, Coin L, Marshall M, Down T, Hubbard T, Wooster R, et al. A census of human cancer genes. *Nature reviews Cancer*. 2004;4(3):177-83. Epub 2004/03/03.

259. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. Epub 2000/01/27.

260. Armengol G, Rojo F, Castellvi J, Iglesias C, Cuatrecasas M, Pons B, et al. 4E-binding protein 1: a key molecular "funnel factor" in human cancer with clinical implications. *Cancer research*. 2007;67(16):7551-5. Epub 2007/08/19.

261. Rojo F, Najera L, Lirola J, Jimenez J, Guzman M, Sabadell MD, et al. 4E-binding protein 1, a cell signaling hallmark in breast cancer that correlates with pathologic grade and prognosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(1):81-9. Epub 2007/01/04.

262. Castellvi J, Garcia A, Rojo F, Ruiz-Marcellan C, Gil A, Baselga J, et al. Phosphorylated 4E binding protein 1: a hallmark of cell signaling that correlates with survival in ovarian cancer. *Cancer*. 2006;107(8):1801-11. Epub 2006/09/20.

263. Benavente S, Verges R, Hermosilla E, Fumanal V, Casanova N, Garcia A, et al. Overexpression of phosphorylated 4E-BP1 predicts for tumor recurrence and reduced survival in cervical carcinoma treated with postoperative radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009;75(5):1316-22. Epub 2009/04/14.

264. O'Reilly KE, Warycha M, Davies MA, Rodrik V, Zhou XK, Yee H, et al. Phosphorylated 4E-BP1 is associated with poor survival in melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(8):2872-8. Epub 2009/04/02.

265. Heesom KJ, Gampel A, Mellor H, Denton RM. Cell cycle-dependent phosphorylation of the translational repressor eIF-4E binding protein-1 (4E-BP1). *Current biology : CB*. 2001;11(17):1374-9. Epub 2001/09/13.

266. Proud CG, Denton RM. Molecular mechanisms for the control of translation by insulin. *The Biochemical journal*. 1997;328 ( Pt 2):329-41. Epub 1998/01/24.

267. Rousseau D, Kaspar R, Rosenwald I, Gehrke L, Sonenberg N. Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(3):1065-70. Epub 1996/02/06.

268. She QB, Halilovic E, Ye Q, Zhen W, Shirasawa S, Sasazuki T, et al. 4E-BP1 is a key effector of the oncogenic activation of the AKT and ERK signaling pathways that integrates their function in tumors. *Cancer cell*. 2010;18(1):39-51. Epub 2010/07/09.

269. Tabernero J, Rojo F, Calvo E, Burris H, Judson I, Hazell K, et al. Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(10):1603-10. Epub 2008/03/12.
270. Judson I, Verweij J, Gelderblom H, Hartmann JT, Schoffski P, Blay JY, et al. Doxorubicin alone versus intensified doxorubicin plus ifosfamide for first-line treatment of advanced or metastatic soft-tissue sarcoma: a randomised controlled phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2014;15(4):415-23. Epub 2014/03/13.
271. Krikelis D, Judson I. Role of chemotherapy in the management of soft tissue sarcomas. *Expert review of anticancer therapy*. 2010;10(2):249-60. Epub 2010/02/06.
272. Pratilas CA, Taylor BS, Ye Q, Viale A, Sander C, Solit DB, et al. (V600E)BRAF is associated with disabled feedback inhibition of RAF-MEK signaling and elevated transcriptional output of the pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(11):4519-24. Epub 2009/03/03.
273. Sasaki A, Taketomi T, Kato R, Saeki K, Nonami A, Sasaki M, et al. Mammalian Sprouty4 suppresses Ras-independent ERK activation by binding to Raf1. *Nature cell biology*. 2003;5(5):427-32. Epub 2003/04/30.
274. Generali D, Buffa FM, Berruti A, Brizzi MP, Campo L, Bonardi S, et al. Phosphorylated ERalpha, HIF-1alpha, and MAPK signaling as predictors of primary endocrine treatment response and resistance in patients with breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(2):227-34. Epub 2008/12/10.
275. Bartholomeusz C, Gonzalez-Angulo AM, Liu P, Hayashi N, Lluch A, Ferrer-Lozano J, et al. High ERK protein expression levels correlate with shorter survival in triple-negative breast cancer patients. *The oncologist*. 2012;17(6):766-74. Epub 2012/05/16.
276. Hashimoto K, Tsuda H, Koizumi F, Shimizu C, Yonemori K, Ando M, et al. Activated PI3K/AKT and MAPK pathways are potential good prognostic markers in node-positive, triple-negative breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2014. Epub 2014/07/11.
277. Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, et al. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature*. 2010;468(7326):968-72. Epub 2010/11/26.
278. Maertens O, Johnson B, Hollstein P, Frederick DT, Cooper ZA, Messiaen L, et al. Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer discovery*. 2013;3(3):338-49. Epub 2012/11/23.
279. Prahallad A, Sun C, Huang S, Di Nicolantonio F, Salazar R, Zecchin D, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF(V600E) inhibition through feedback activation of EGFR. *Nature*. 2012;483(7387):100-3. Epub 2012/01/28.
280. Britten CD. PI3K and MEK inhibitor combinations: examining the evidence in selected tumor types. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2013;71(6):1395-409. Epub 2013/02/28.
281. Eroglu Z TH, Hu J, Guan M, Frankel PH, Ruel N, Wilczynski S, Christensen S, Gandara DR, Chow WA, editor. NCI #8412: A randomized

phase II trial of AZD6244 alone and AZD6244 plus temsirolimus for soft-tissue sarcomas. 2014 ASCO Annual Meeting; 2014; Chicago, IL 8EEUU).

282. Chen RH, Sarnecki C, Blenis J. Nuclear localization and regulation of erk- and rsk-encoded protein kinases. *Molecular and cellular biology*. 1992;12(3):915-27. Epub 1992/03/01.

283. Gonzalez FA, Seth A, Raden DL, Bowman DS, Fay FS, Davis RJ. Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *The Journal of cell biology*. 1993;122(5):1089-101. Epub 1993/09/01.

284. Baker AF, Dragovich T, Ihle NT, Williams R, Fenoglio-Preiser C, Powis G. Stability of phosphoprotein as a biological marker of tumor signaling. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(12):4338-40. Epub 2005/06/17.

285. Espina V, Edmiston KH, Heiby M, Pierobon M, Sciro M, Merritt B, et al. A portrait of tissue phosphoprotein stability in the clinical tissue procurement process. *Molecular & cellular proteomics : MCP*. 2008;7(10):1998-2018. Epub 2008/08/01.