

Scuola di scienze mediche e farmaceutiche
Scuola di specializzazione in Anatomia Patologica
Ospedale Policlinico San Martino – IRCCS
Hospital Universitario Reina Sofia - Córdoba

**Il ruolo di miR-138 e del cluster miR-99a/let-7c nel carcinoma
della vescica: significato prognostico e associazione con i
sottotipi molecolari**

Relatori

Prof.ssa Ana Maria Blanca Pedregosa

Prof. Michele Paudice

Candidata

Dott.ssa Margherita Concardi

Anno accademico 2025/2026

Sommario

Abstract.....	4
Introduzione.....	5
Materiali e metodi.....	12
Risultati.....	17
Discussione.....	29
Conclusioni.....	35
Bibliografia.....	36

Abstract

Objective

To evaluate the prognostic significance of miR-138 and the miR-99a/let-7c cluster and to investigate their association with molecular subtypes of bladder cancer (BC).

Material and methods

A retrospective cohort of 109 bladder tumor samples obtained by transurethral resection was analyzed. MicroRNA expression levels were quantified by RT-qPCR and correlated with clinicopathological variables, survival outcomes, and molecular subtypes.

Results

Higher miR-138 expression was significantly associated with low-stage and low-grade tumors. In contrast, increased expression of the miR-99a/let-7c cluster was observed in patients with carcinoma in situ and multifocal disease. Survival analysis showed that high miR-138 expression and low miR-let-7c levels were associated with longer progression-free survival ($p=0.012$ and $p=0.038$, respectively). Similarly, high miR-138 expression and low miR-99a/let-7c cluster levels were associated with improved cancer-specific survival ($p<0.0001$, $p=0.007$, and $p=0.001$, respectively). Furthermore, the luminal subtype, characterized by a favorable prognosis, was significantly associated with low expression of the miR-99a/let-7c cluster.

Conclusions

The results suggest that miR-138 and miR-99a/let-7c clusters may serve as relevant prognostic biomarkers in BC. Their expression patterns are associated with molecular subtypes, supporting their potential role in patient stratification and personalized management.

Keywords: Bladder cancer; microRNAs; Gene expression; Prognostic markers; Molecular subtypes.

Introduzione

Il carcinoma della vescica è il decimo tumore più comune a livello mondiale, rappresentando il 3-4% di tutte le neoplasie. L'isotipo più comune di tumore della vescica è il carcinoma uroteliale, che rappresenta oltre il 90% di tutti i tumori vescicali nei Paesi ad alto reddito. Nel tratto genitourinario il carcinoma uroteliale è il tumore più frequente, principalmente a sede vescico-uretrale ed in minor misura (5–10%) con origine dalle vie urinarie superiori (pelvi renale e/o uretere). La malattia colpisce principalmente gli anziani e gli uomini: negli uomini, infatti, rappresenta il quarto tumore più frequente dopo i 50 anni. Il fumo di tabacco è responsabile di circa l'80% dei casi. Seguono l'esposizione professionale a sostanze chimiche (ammine aromatiche) e l'età avanzata. Nonostante i progressi nella diagnosi e nel trattamento, il carcinoma della vescica rimane una malattia clinicamente eterogenea con esiti variabili a seconda di fattori clinici quali stadio del tumore, grado e caratteristiche molecolari [1-3].

Data la marcata differenza in termini di prognosi e trattamento, l'obiettivo principale della stadiazione clinicopatologica del carcinoma della vescica è distinguere tra carcinoma vescicale non muscolo-invasivo o non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC), in cui la malattia è confinata all'epitelio di transizione – includendo Ta e Tis secondo la classificazione TNM – o alla sottomucosa – T1 secondo TNM – e carcinoma vescicale muscolo-invasivo o muscle-invasive bladder cancer (MIBC), in cui la malattia coinvolge la tonaca muscolare o si estende oltre ad essa (stadi T2–T4 secondo TNM). Queste entità differiscono significativamente per comportamento biologico, prognosi e gestione terapeutica [3-5].

Al momento della diagnosi circa il 70% dei casi si presenta come malattia non muscolo invasiva (NMIBC), che si caratterizza per un tasso di sopravvivenza piuttosto elevato ma frequenti recidive tumorali, con un tasso di ricorrenza dopo resezione trans-uretrale (TURBT) di circa il 75% entro 5 anni, nonostante la chirurgia o le chemioterapie citotossiche. Inoltre, circa il 20% dei NMIBC progrediscono a malattia muscolo invasiva (MIBC) che si associa ad un rischio più elevato di progressione, metastatizzazione e mortalità cancro-specifica e che quindi presenta ancora attualmente una scarsa prognosi, con una sopravvivenza a 5 anni del 60% nei pazienti con malattia localizzata e inferiore al 10% nei pazienti con metastasi a distanza [3].

Accanto alla stadiazione patologica e al grading, che rappresentano i principali parametri prognostici tradizionalmente impiegati nella valutazione del carcinoma uroteliale, negli ultimi decenni è emersa una crescente consapevolezza anche riguardo all'importanza dell'eterogeneità morfologica di questa neoplasia [4] .

È infatti ormai ben documentato come carcinomi uroteliali appartenenti al medesimo stadio possano presentare comportamenti clinici profondamente differenti in termini di aggressività, pattern di progressione e risposta terapeutica [6, 7].

Il carcinoma uroteliale invasivo costituisce infatti un'entità estremamente complessa, caratterizzata da una notevole plasticità fenotipica e dalla capacità di sviluppare differenti pattern architetturali e citologici, espressione di peculiari alterazioni biologiche e molecolari. Sebbene la forma convenzionale rappresenti il pattern morfologico più frequentemente osservato, una quota significativa di carcinomi uroteliali invasivi presenta caratteristiche istologiche distintive che si manifestano sotto forma di differenziazioni divergenti o di specifici sottotipi istologici [6-8].

Le differenziazioni divergenti si riferiscono alla presenza, all'interno di una neoplasia di origine uroteliale, di componenti che acquisiscono caratteristiche morfologiche riconducibili ad altri tipi di differenziazione epiteliale, principalmente squamoso e ghiandolare, oppure più raramente trofoblastico. I sottotipi istologici, invece, comprendono una serie di varianti morfologiche caratterizzate da peculiari aspetti architetturali e citologici, tra cui le forme micropapillare, plasmacitoide, nested, large nested, sarcomatoide, microcistica e linfoepitelioma-simile [4, 9, 10].

La quinta edizione della classificazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO Classification of Urinary and Male Genital Tumours, 2022) ha sottolineato la rilevanza clinico-patologica di tali entità, suggerendone l'identificazione e segnalazione nel referto istopatologico, mediante la quantificazione percentuale delle componenti presenti, in considerazione delle loro implicazioni prognostiche e terapeutiche [4, 9]. Numerose evidenze hanno infatti dimostrato come alcune varianti istologiche siano associate a una maggiore aggressività biologica, a peculiari modalità di diffusione locale e metastatica e a una diversa sensibilità ai trattamenti sistemici [4, 9-11].

Anche a livello molecolare il MIBC è una malattia eterogenea e al fine di meglio definirlo, negli ultimi anni numerosi studi si sono concentrati sullo sviluppo di una classificazione molecolare in grado di fornire informazioni utili per stratificare categorie prognostiche

rilevanti o per definire il trattamento più appropriato per ciascun paziente. Nell'ultimo decennio sono state proposte diverse classificazioni molecolari del carcinoma uroteliale della vescica, generalmente basate su profili trascrittomici. Tuttavia, la loro applicazione nella pratica clinica è rimasta limitata a causa dell'elevata complessità e dei costi elevati delle tecnologie richieste [6-8, 12, 13].

Seguendo i principali sottotipi osservati nel carcinoma della mammella, il MIBC è stato classificato in due ampie categorie molecolari, luminale e basale, che differiscono per prognosi e sensibilità alle terapie attuali, con il sottotipo basale più aggressivo rispetto a quello luminale [6-8].

Alcune delle classificazioni proposte hanno ulteriormente suddiviso la categoria luminale in sottotipi, e in particolare la Consensus Molecular Classification del Bladder Cancer Molecular Taxonomy Group ha identificato tre categorie luminali, luminale-papillare (LumP), luminale-instabile (LumU) e luminale non specificato (LumNS), cui si associano poi le altre classi, rappresentate dalle forme stroma-rich, basale/squamoso (Ba/Sq) e neuroendocrino-like (NE-like). Queste sei classi differiscono per il meccanismo oncogenico sottostante, per il tipo di infiltrato di cellule stromali e infiammatorie e per le caratteristiche istologiche e cliniche, tra cui l'outcome [6, 8].

Sebbene tali categorie non siano ancora integrate nella pratica diagnostica routinaria, numerose evidenze dimostrano una significativa associazione tra specifici sottotipi istologici e particolari profili molecolari [6-8, 11].

In particolare, varianti quali il carcinoma con differenziazione squamosa e il carcinoma sarcomatoide risultano frequentemente associate al sottotipo molecolare basal/squamous, caratterizzato da espressione di marcatori basali, quali CK5, CK5/6, CK14, CD44 e p63, alterazioni TP53/RB1 ed elevata espressione di molecole immunoregatorie, quindi, secondo alcuni dati, maggiore sensibilità a chemioterapia e immunoterapia con inibitori di PD-1 e PD-L1 rispetto ai sottotipi luminali [6, 8].

Al contrario tumori uroteliali dello spettro luminale esprimono marcatori luminali come GATA3, FOXA1, PPARG, CK20 e hanno in genere prognosi più favorevole rispetto ai sottotipi basali, includendo sottogruppi come luminale-papillare (FGFR3-mutato, spesso associato a varianti papillari e potenzialmente trattabile con anti-FGFR3), luminale-instabile (più aggressivo, con instabilità genomica e associazione a forme come micropapillare e

plasmacitoide, spesso con alterazioni TP53 ed ERBB2) e luminale non specificato (eterogeneo, con significato prognostico meno definito) [6-8, 13].

Tali osservazioni supportano l'ipotesi che le differenti manifestazioni morfologiche del carcinoma uroteliale rappresentino l'espressione fenotipica di distinti programmi trascrittomici e di specifiche alterazioni molecolari. Negli ultimi anni, al fine di rendere più accessibile nella pratica clinica la classificazione molecolare, sono stati sviluppati approcci alternativi basati su tecnologie più semplici e riproducibili [6-8, 12, 13].

Tra questi va citato lo studio del gruppo di Lopez-Beltran et al. (2021) che ha valutato l'utilità della tecnologia NanoString, con l'obiettivo di sviluppare un approccio più facilmente applicabile nella pratica clinica rispetto alle analisi trascrittomiche globali [13]. Lo studio si basa sull'analisi dell'espressione genica mediante un pannello mirato di quattro geni tipicamente associati al sottotipo luminale (GATA3+/KRT20+) e al sottotipo basale (KRT5+/KRT14+) utilizzando la tecnologia NanoString e l'analisi nCounter in una serie di 91 casi di carcinoma della vescica [13].

La piattaforma NanoString (nCounter®) è una tecnologia di ibridazione diretta che consente la quantificazione digitale dell'espressione genica senza necessità di retrotrascrizione o amplificazione (a differenza della RT-PCR o dell'RNA-seq). Il sistema utilizza coppie di sonde specifiche per ciascun target: una capture probe e una reporter probe marcata con un codice a barre fluorescente univoco. Dopo l'ibridazione con l'RNA bersaglio, i complessi vengono immobilizzati e analizzati mediante imaging digitale, permettendo il conteggio diretto delle molecole di RNA presenti nel campione. Questo approccio garantisce elevata specificità, buona sensibilità e soprattutto un'elevata riproducibilità. Un vantaggio fondamentale della tecnologia NanoString è la possibilità di analizzare RNA anche degradato, come quello ottenuto da campioni FFPE, rendendola particolarmente adatta all'ambito diagnostico e alla ricerca traslazionale. Inoltre, consente l'analisi simultanea di un numero limitato ma altamente informativo di geni (pannelli mirati), riducendo tempi, costi e complessità rispetto alle tecnologie di sequenziamento globale [12, 13]. Questa nuova tecnologia ha determinato i sottotipi molecolari attraverso l'espressione di mRNA di GATA3 o KRT20 per il sottotipo luminale (71%) e di KRT5 o KRT14 per il sottotipo basale (21%) [13].

In linea con quanto riportato da altre classificazioni molecolari, i dati hanno evidenziato differenti sensibilità prognostiche e terapeutiche associate a entrambi i principali sottotipi [6,

8]. Riassumendo i risultati di tale studio, coerentemente con una bassa aggressività, il sottotipo molecolare luminale era maggiormente rappresentato da casi di NMIBC con morfologia di carcinoma uroteliale convenzionale, bassa espressione di PD-L1 e bassa mortalità cancro-specifica. Al contrario, coerentemente con un'elevata aggressività, il sottotipo molecolare basale era maggiormente rappresentato da casi di malattia pT2–T4 che presentavano varianti istologiche aggressive [13].

Questa categoria mostrava anche una maggiore espressione di PD-L1, suggerendo la possibilità che questi pazienti possano beneficiare di terapie con inibitori dei checkpoint immunitari (ICI) [13]. Una situazione paradossale si osserva nel sottotipo basale del MIBC: pur trattandosi di una malattia altamente aggressiva, può essere associata a una migliore sopravvivenza cancro-specifica (CSS) rispetto al sottotipo luminale, grazie alla buona risposta alle terapie attualmente disponibili [6, 8, 13]. Infine, l'assenza di espressione dei quattro marker ha permesso di identificare una terza categoria, il sottotipo null/"double negative" (DN), presente nell'8% dei casi analizzati [13].

Nel contesto della crescente attenzione verso i meccanismi molecolari alla base del carcinoma della vescica, un ruolo di particolare interesse è ricoperto dai microRNA (miRNA). I miRNA sono piccole molecole di RNA non codificante approssimativamente di 19-22 nucleotidi, in grado di regolare l'espressione genica a livello post-trascrizionale legandosi alla regione 3' non tradotta (3'-UTR) degli RNA messaggeri bersaglio. Questo processo determina la degradazione dell'mRNA o l'inibizione della sua traduzione, influenzando numerosi pathway cellulari fondamentali, tra cui proliferazione, apoptosi e differenziamento. In questo contesto, i miRNA possono agire sia come oncogeni sia come soppressori tumorali, a seconda dei geni bersaglio regolati [14-18].

Conoscere il meccanismo della biogenesi dei miRNA, seppure molto complesso, è importante per comprendere il loro potenziale ruolo come biomarcatori e/o terapeutico [14, 18]. La forma matura del miRNA viene generata attraverso un processo di clivaggio in due fasi di un lungo miRNA primario (pri-miRNA) dopo la sua trascrizione da parte della RNA polimerasi II [19]. Il pri-miRNA viene quindi processato in una struttura a forcina più corta di circa 70 nucleotidi (~70 nt), chiamata miRNA precursore (pre-miRNA), da un complesso chiamato Microprocessor, che comprende un enzima RNasi II (DROSHA) and DiGeorge syndrome critical region 8 (DGCR8) [14].

Successivamente, una proteina canale della membrana nucleare, Exportin-5 (EXPO5), trasporta il pre-miRNA nel citoplasma, dove viene ulteriormente clivato da un enzima, Dicer, generando un miRNA maturo. A questo punto, il miRNA forma un complesso di silenziamento indotto dall'RNA (RISC) e viene guidato verso la regione 3' UTR dell'mRNA bersaglio. Il complesso risultante miRNA/mRNA inibisce il complesso ribosomiale responsabile della sintesi proteica, bloccando efficacemente la traduzione dell'espressione genica [14, 18].

Una alterazione a qualunque livello nella complessa biogenesi dei mi-RNA può quindi potenzialmente portare ad una alterazione nei mRNA con conseguente deregolazione dell'espressione genica. Negli ultimi anni, numerose evidenze hanno dimostrato come un'alterata espressione dei miRNA sia strettamente associata allo sviluppo e alla progressione di diversi tumori, incluso il carcinoma della vescica [14, 15, 18-20] .

Inoltre, un elevato numero di studi ha dimostrato che il profilo di espressione dei miRNA risulta significativamente alterato non solo nei campioni tumorali, ma anche nelle urine e nel sangue dei pazienti affetti da carcinoma della vescica. Pertanto, alla luce di queste considerazioni, lo studio dei miRNA rappresenta un ambito di grande rilevanza nella ricerca oncologica attuale, essendo emersi come promettenti biomarcatori non invasivi e offrendo nuove prospettive sia per la comprensione dei meccanismi patogenetici del carcinoma della vescica sia per lo sviluppo di approcci diagnostici e terapeutici innovativi [15, 19, 20].

È stato riscontrato che centinaia di miRNA presentano un'espressione anomala nel carcinoma della vescica e nel 2007 Gottardo et al. sono stati i primi a descriverne una serie [21]. Tra questi, il miR-138 e il cluster miR-99a/let-7c hanno attirato notevole attenzione per il loro ruolo nella regolazione di importanti pathway cellulari coinvolti nell'oncogenesi e nella metastatizzazione [15, 19, 20, 22-25].

In particolare, alcuni studi hanno dimostrato che il miR-138 agisce con funzione oncosoppressiva su numerosi geni bersaglio regolando negativamente pathway associati a proliferazione, apoptosi, transizione epitelio-mesenchimale (EMT), invasività e migrazione. La sua espressione differenziale nel carcinoma uroteliale (UC) è stata associata all'aggressività del tumore e agli esiti clinici, suggerendo un suo potenziale impiego come biomarcatore prognostico [24, 26, 27].

Analogamente, il cluster miR-99a/let-7c, costituito da miR-99a e let-7c, svolge un ruolo chiave nella regolazione della transizione epitelio-mesenchimale (EMT), un processo

implicato nell'invasione e nella metastasi tumorale. La deregolazione di questo cluster è stata osservata in diversi tumori, incluso il carcinoma della vescica (BC), dove il suo pattern di espressione può consentire la stratificazione dei pazienti in distinti sottotipi molecolari con differenti implicazioni prognostiche.[22, 23, 25, 28, 29]

Un'analisi approfondita delle interazioni tra miR-138 e il cluster miR-99a/let-7c con i sottotipi molecolari del carcinoma della vescica può portare a una comprensione più completa della malattia e rappresenta una prospettiva promettente per il progresso della medicina personalizzata. Pertanto, un'analisi sistematica come quella presentata nel presente studio su miR-138 e sul cluster miR-99a/let-7c, potrà contribuire allo sviluppo di nuovi strumenti prognostici e strategie terapeutiche mirate alle caratteristiche molecolari dei singoli pazienti affetti da carcinoma della vescica.

Materiali e metodi

Pazienti e raccolta dei campioni

È stato condotto uno studio retrospettivo su una coorte di 109 tumori della vescica ottenuti mediante resezione transuretrale della vescica (TUR) tra il 2005 e il 2014 presso il Dipartimento di Urologia dell'Ospedale Universitario Reina Sofia di Córdoba. Lo studio è stato approvato dal comitato etico e da tutti i pazienti è stato ottenuto il consenso informato.

Dopo la procedura TUR, i frammenti di tessuto vescicale sono stati fissati in formalina per la diagnosi patologica di routine. I frammenti rimanenti sono stati conservati a -80°C fino alle analisi successive. Sono stati inclusi nello studio i casi con volume tumorale adeguato e RNA totale di elevata qualità idoneo all'analisi. I campioni con materiale insufficiente o bassa cellularità sono stati esclusi. Le caratteristiche patologiche sono state rivalutate da un patologo dedicato (ALB) secondo la più recente classificazione 2022 dei tumori urologici dell'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) e l'8ª edizione dell'American Joint Committee for Cancer (AJCC) [4, 5].

Il follow-up clinico dei pazienti, definito come il numero di mesi intercorrenti tra la data dell'intervento chirurgico e la data dell'ultima cistoscopia, dell'ultima visita o del decesso, ha avuto una mediana di 71,92 mesi ($\text{DS} \pm 42,53$). Dopo la diagnosi di carcinoma della vescica (BC), 69 pazienti (63,3%) erano deceduti: 28 (25,7%) a causa del tumore vescicale e 41 (37,6%) per altre cause. La recidiva, definita come la ricomparsa del tumore dopo il trattamento iniziale con almeno un intervallo libero da malattia documentato mediante cistoscopia, è stata osservata in 53 pazienti (48,6%) con tumore vescicale non muscolo-invasivo (NMIBC). La progressione dello stadio tumorale, definita come il passaggio a uno stadio superiore (T1-T2-T3) nei tumori recidivanti o la comparsa di metastasi, è stata riscontrata in 18 pazienti (16,5%) con NMIBC. La sopravvivenza cancro-specifica (CSS) è stata definita come il periodo compreso tra la diagnosi e il decesso dovuto al carcinoma della vescica. La multifocalità è stata considerata positiva in presenza di due o più lesioni papillari nell'urotelio vescicale. Per quanto riguarda le dimensioni tumorali, i tumori sono stati classificati come ≤ 3 cm e > 3 cm, in considerazione delle differenze nel comportamento biologico.

Estrazione dei microRNA

L'RNA totale, inclusi i microRNA, è stato estratto (dopo omogeneizzazione o polverizzazione del tessuto tumorale) utilizzando il kit miRNeasy Mini Kit (Qiagen, CA) secondo le raccomandazioni del produttore.

L'estrazione di RNA prevede la lisi cellulare, la separazione da DNA e proteine, e la purificazione, utilizzando metodi come il reagente TRIzol (metodo al fenolo-cloroformio), kit basati su colonne di silice o sfere magnetiche. È fondamentale operare in condizioni RNasi-free per evitare la degradazione dell'acido ribonucleico.

Il miRNeasy Mini Kit combina la lisi dei campioni a base di fenolo/guanidina e la purificazione dell'RNA totale mediante membrana di silice.

Il reagente di lisi QIAzol, incluso nel kit, è una soluzione monofasica di fenolo e tiocianato di guanidina progettata per facilitare la lisi dei tessuti, inibire le RNasi e rimuovere la maggior parte del DNA e delle proteine cellulari dal lisato tramite estrazione organica. Le cellule o i campioni di tessuto vengono omogeneizzati nel reagente di lisi QIAzol. Dopo l'aggiunta di cloroformio, la centrifugazione separa l'omogeneato in fase acquosa e fase organica. L'RNA si distribuisce nella fase acquosa superiore, mentre il DNA si distribuisce nella fase intermedia e le proteine nella fase organica inferiore o nella fase intermedia. La fase acquosa superiore viene estratta e si aggiunge etanolo per fornire condizioni di legame appropriate per tutte le molecole di RNA a partire da 18 nucleotidi (nt). Il campione viene quindi applicato alla colonna RNeasy Mini spin, dove l'RNA totale si lega alla membrana e il fenolo e altri contaminanti vengono efficacemente eliminati mediante lavaggio. L'RNA di alta qualità viene quindi eluito in acqua priva di RNasi. L'RNA eluito viene trattato con un kit Ambion TURBO DNA-free per rimuovere il DNA contaminante. Una fase finale di purificazione mediante precipitazione con etanolo rimuove le tracce di tampone DNasi e di enzima per evitare effetti sulle applicazioni a valle, come la trascrizione inversa dell'RNA in cDNA.

La concentrazione dell'RNA totale è stata quantificata mediante spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific), misurando l'assorbanza alle lunghezze d'onda di 260, 280 e 230 nm.

Il NanoDrop ND-1000 è uno spettrofotometro UV-Vis che consente la quantificazione e la valutazione della purezza di acidi nucleici e proteine utilizzando microvolumi di campione

(circa 1 μ L), senza la necessità di cuvette o diluizioni preliminari. Lo strumento determina la concentrazione del campione misurando la quantità di radiazione ultravioletta assorbita dalle molecole presenti in soluzione.

Il principio di funzionamento si basa sulla Legge di Beer-Lambert, secondo la quale l'assorbanza (A) è direttamente proporzionale alla concentrazione della sostanza analizzata (C), al cammino ottico (l) e al coefficiente di estinzione molare (ϵ):

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l$$

dove A rappresenta l'assorbanza, C la concentrazione della sostanza in soluzione, l il cammino ottico attraversato dalla luce ed ϵ il coefficiente di estinzione molare, caratteristico della sostanza e della lunghezza d'onda considerata.

Gli acidi nucleici assorbono in modo massimo la radiazione UV a 260 nm grazie alla presenza delle basi azotate. Pertanto, l'assorbanza misurata a questa lunghezza d'onda è direttamente proporzionale alla concentrazione di RNA presente nel campione. Convenzionalmente, per l'RNA a singolo filamento (ssRNA), un valore di assorbanza pari a 1 ($A_{260} = 1$) corrisponde a una concentrazione di 40 μ g/Ml.

Oltre alla quantificazione, la spettrofotometria permette di valutare la purezza del campione mediante il calcolo dei rapporti A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} . Il rapporto A_{260}/A_{280} fornisce un'indicazione della contaminazione proteica, poiché le proteine assorbono prevalentemente a 280 nm; per campioni di RNA puro tale valore è generalmente compreso tra 1,8 e 2,2. Valori inferiori possono indicare la presenza di proteine o altri contaminanti.

Il rapporto A_{260}/A_{230} rappresenta invece un indice secondario di purezza e consente di rilevare eventuali contaminazioni dovute a composti organici o reagenti residui derivanti dalla procedura di estrazione, quali fenolo, sali di guanidina o altri solventi. Per campioni di buona qualità, i valori attesi sono compresi tra 2,0 e 2,2.

Determinazione dei livelli di espressione dei microRNA

I livelli di espressione di hsa-miR-138-5p, hsa-miR-99a-5p, hsa-let-7c-5p e U6 (utilizzato come controllo endogeno) nel tessuto tumorale sono stati quantificati mediante RT-qPCR utilizzando gli EPIK™ miRNA Select Assays (Bioline, Londra, Regno Unito), seguendo le istruzioni del produttore. Sono stati utilizzati 100 ng di RNA in un volume finale di 6 μ L per

ottenere il cDNA, successivamente diluito con un rapporto di 1:10. Il cDNA è stato quindi miscelato con il SensiSMART™ PCR Mix e i primer PCR in un volume finale di 20 µL. Tutti gli esperimenti di RT-qPCR sono stati eseguiti utilizzando il software CFX Manager (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

I valori di fluorescenza sono stati acquisiti e analizzati mediante il software CFX Manager (Bio-Rad), che ha consentito la determinazione del valore di cycle threshold (Ct) per ciascun campione. Il Ct rappresenta il numero di cicli di amplificazione necessari affinché il segnale di fluorescenza superi una soglia prestabilita, risultando inversamente proporzionale alla quantità iniziale di acido nucleico presente nel campione: valori di Ct più bassi indicano livelli di espressione più elevati del target analizzato.

Al termine della reazione di amplificazione è stata eseguita l'analisi della curva di melting (melting curve) per verificare la specificità dei prodotti di RT-qPCR. Tale analisi si basa sul monitoraggio della diminuzione della fluorescenza durante l'aumento graduale della temperatura, consentendo di determinare la temperatura di melting (T_m) dei prodotti amplificati. La presenza di un singolo picco nella curva di melting è indicativa di un'amplificazione specifica, mentre la comparsa di picchi multipli o di profili anomali può suggerire la presenza di prodotti aspecifici o di dimeri di primer.

Ogni campione di paziente è stato analizzato in duplicato. Sono stati eseguiti 40 cicli di amplificazione e i valori di Ct ottenuti per tutti i microRNA e per l'U6 snRNA sono stati calcolati come media delle due misurazioni. I valori di Ct sono stati successivamente normalizzati utilizzando l'U6 snRNA come controllo endogeno (gene housekeeping), mediante il calcolo del ΔCt ottenuto sottraendo il valore di Ct dell'U6 snRNA da quello del microRNA bersaglio. L'espressione relativa è stata quindi rappresentata come $40 - \Delta Ct$, in modo che valori più elevati corrispondessero a una maggiore espressione del microRNA analizzato.

Classificazione dei campioni nei sottotipi molecolari

Un sottogruppo di 79 casi, precedentemente classificati in tre sottotipi molecolari (luminale, basale e doppio negativo), è stato analizzato per i livelli di espressione dei microRNA.

La classificazione molecolare dei campioni si è basata su precedenti studi del gruppo [13]: utilizzando la tecnologia NanoString si è andati a valutare l'espressione genica (mRNA) di quattro marcatori: GATA3 e KRT20 (definienti il sottotipo molecolare luminale) e KRT5 e

KRT14 (definiti il sottotipo basale). L'assenza o la ridotta espressione di tutti e quattro i marcatori è stata classificata come sottotipo nullo o doppio negativo (DN).

Analisi statistica

Tutte le analisi statistiche sono state eseguite con SPSS 25.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) e MedCalc Statistical Software versione 17.6 (MedCalc Software bvba, Ostenda, Belgio). La piattaforma MetaboAnalyst 5.0 è stata utilizzata per generare le heatmap e i grafici a barre. Le caratteristiche cliniche e patologiche dei pazienti sono state riassunte mediante numeri assoluti e percentuali. L'espressione relativa di ciascun microRNA è stata descritta come media ($\pm$ DS) e sono stati utilizzati test parametrici (t-test o ANOVA) per valutare le differenze nei livelli di microRNA tra le diverse caratteristiche clinicopatologiche. Lo studio delle correlazioni tra microRNA è stato effettuato mediante il coefficiente di correlazione di Pearson. Il test del chi-quadrato è stato utilizzato per confrontare le proporzioni.

I tassi di sopravvivenza libera da recidiva, libera da progressione e cancro-specifica in relazione all'espressione dei microRNA sono stati valutati mediante curve di sopravvivenza di Kaplan–Meier e test del log-rank. Per le analisi di sopravvivenza, l'espressione dei microRNA è stata dicotomizzata utilizzando curve ROC e l'indice di Youden in funzione della sopravvivenza cancro-specifica (CSS). Le differenze tra le variabili sono state considerate statisticamente significative per valori di $*p* < 0,05$.

Risultati

Popolazione dello studio

La Tabella 1 riassume le principali caratteristiche clinicopatologiche, molecolari e di follow-up della coorte di studio. La coorte comprendeva 109 tumori della vescica, di cui 88 carcinomi vescicali non muscolo-invasivi (NMIBC) e 21 carcinomi vescicali muscolo-invasivi (MIBC). Tra i NMIBC, 28 casi erano Ta a basso grado, 17 Ta ad alto grado, 3 T1 a basso grado e 40 T1 ad alto grado; tutti i MIBC erano carcinomi ad alto grado in stadio T2–T4.

Table 1. Descriptive clinicopathological, molecular, and outcome characteristics of the study cohort

Variable	Category	N=109 (%)
Gender	Female	10 (9.2%)
	Male	99 (90.8%)
Age group (median)**	≤74 years	58 (53.2%)
	>74 years	51 (46.8%)
Tumor stage	Ta	45 (41.3%)
	T1	43 (39.4%)
	T2–T4	21 (19.3%)
Clinical stage group	NMIBC	88 (80.7%)
	MIBC	21 (19.3%)
Tumor grade	Low grade	31 (28.4%)
	High grade	78 (71.6%)
Concomitant CIS	No	101 (92.7%)
	Yes	8 (7.3%)
Tumor size	< 3cm	72 (66.1%)
	≥ 3cm	37 (33.9%)
Multifocality	Unique	58 (53.2%)
	Multiple	51 (46.8%)
Histological type	Conventional urothelial carcinoma (CUC)	81 (74.3%)
	Urothelial carcinoma with variant histology (UCVH)	28 (25.7%)
Combined stage-histology group	Ta-CUC	45 (41.3%)
	T1-CUC	29 (26.6%)

		6%)
	T1-UCVH	14 (12.8%)
	T2–T4-CUC	7 (6.4%)
	T2–T4-UCVH	14 (12.9%)
Variant histology pattern †	Pure variant	22/28 (78.6%)
	Mixed variant	6/28 (21.4%)
Main variant type †	Squamous differentiation	6/28 (21.4%)
	Nested variant	4/28 (14.3%)
	Micropapillary variant	2/28 (7.1%)
	Plasmacytoid variant	2/28 (7.1%)
	Glandular differentiation	2/28 (7.1%)
	Sarcomatoid variant	2/28 (7.1%)
	Neuroid variant	2/28 (7.1%)
	Other variants	8/28 (28.6%)
Intravesical treatment	No treatment	61 (56.0%)
	BCG	38 (34.9%)
	Mitomycin	10 (9.2%)
NMIBC risk category	Low risk	12/88 (13.6%)
	Intermediate risk	26/88 (29.5%)
	High risk	40/88 (45.5%)
	Very high risk	10/88 (11.4%)
Recurrence in NMIBC	No	35/88 (39.8%)
	Yes	53/88 (60.2%)
Progression in NMIBC	No	70/88 (79.5%)
	Yes	18/88 (20.5%)
Molecular subtype §	Luminal	64/79 (81.0%)
	Basal	10/79 (12.7%)
	Null / double negative	5/79 (6.3%)
miR-138 expression	Low expression	55 (50.5%)
	High expression	54 (49.5%)
miR-99a expression	Low expression	55 (50.5%)
	High expression	54 (49.5%)
miR-let7c expression	Low expression	55 (50.5%)
	High expression	54 (49.5%)
Clinical outcome	Alive	40 (36.7%)

Dead from bladder cancer	28 (25.7%)
Dead from other causes	41 (37.6%)

** Patients were dichotomized according to the median age.

†Percentages calculated among tumors with variant histology, N=28.

‡Percentages calculated among NMIBC cases, N=88.

§Molecular subtype analysis was available in 79 cases.

NMIBC, non-muscle-invasive bladder cancer; MIBC, muscle-invasive bladder cancer; CIS, carcinoma in situ; BCG, Bacillus Calmette-Guérin

Complessivamente, 81 carcinomi (74,3%) mostravano un'istologia convenzionale (CUC), mentre 28 casi (25,7%) presentavano una differenziazione divergente o un sottotipo istologico (UCVH). Tutti i tumori Ta erano carcinomi uroteliali convenzionali (Ta-CUC: 45 casi, 41,3%). Tra i tumori T1, 29 casi (26,6%) presentavano istologia convenzionale e 14 casi (12,8%) mostravano una variante istologica. Tra i tumori T2–T4, 7 casi (6,4%) erano CUC e 14 casi (12,9%) UCVH. Tra i 28 casi con variante istologica, 22 (78,6%) presentavano una variante pura e 6 (21,4%) varianti miste.

Associazione tra caratteristiche clinicopatologiche e gruppo di stadio clinico

Dopo la descrizione generale della coorte, è stata effettuata un'analisi comparativa tra i tumori vescicali non muscolo-invasivi (NMIBC) e quelli muscolo-invasivi (MIBC), al fine di valutare eventuali differenze nelle principali caratteristiche clinicopatologiche, molecolari e di outcome. Come riportato nella Tabella 2, i due gruppi differivano significativamente per grado tumorale, dimensioni del tumore, tipo istologico, sottotipo molecolare e sopravvivenza, mentre non sono state osservate differenze significative in relazione a sesso, età, presenza di CIS concomitante e multifocalità. L'età media era di 72,28 ($\pm 10,91$) anni per i pazienti con NMIBC e di 75,52 ($\pm 8,68$) anni per i pazienti con MIBC.

Table 2. Association between clinicopathological variables and clinical stage group.

Variables	Overall (Ta-T4) N= 109	NMIBC (Ta/T1) N=88 (%)	MIBC (T2-T4) N=21 (%)	p-value
Gender				0.613*
Female	10	8 (80)	2 (20)	
Male	99	80 (80.8)	19 (19.9)	
Age, (median$\pm$SD)	109	72.28 $\pm$ 10.91	75.52 $\pm$ 8.68	0.208#

Tumor grade				<0.001*
Low grade	31	31 (100)	0 (0)	
High grade	78	57 (73.1)	21 (26.9)	
Concomitant CIS				0.180*
No	101	83 (82.2)	18 (17.8)	
Yes	8	5 (62.5)	3 (37.5)	
Tumor size				0.044*
< 3cm	72	62 (86.1)	10 (13.9)	
≥ 3cm	37	26 (70.3)	11 (29.7)	
Multifocality				0.260*
Unique	58	45 (77.6)	13 (22.4)	
Multiple	51	43 (84.3)	8 (15.7)	
Histological type				
CUC	81	74 (91.4)	7 (8.6)	<0.001
UCVH	28	14 (50.0)	14 (50.0)	
Molecular subtype				
by NanoString§				
Luminal	64	58 (90.6)	6 (9.4)	0.001
Basal	10	6 (60.0)	4 (40.0)	
Null / double-negative	5	2 (40.0)	3 (60.0)	
Survival				<0.001&
Alive	40	39 (97.5)	1 (2.5)	
Dead, bladder cancer	28	12 (42.9)	16 (57.1)	
Dead, other causes	41	37 (90.2)	4 (9.8)	

* Fisher test; # t-test; & ANOVA test

§Molecular subtype analysis was available in 79 cases.

Studio di correlazione di Pearson tra miR-138, miR-99a e miR-let7c

È stato effettuato uno studio di correlazione tra i diversi microRNA per determinarne il coefficiente di correlazione. Questa analisi ha evidenziato una correlazione positiva e statisticamente significativa (coefficiente di correlazione di Pearson = 0,8622; $p < 0,001$) tra i livelli di espressione di miR-let7c e miR-99a, confermando che miR-let7c e miR-99a formano un cluster, come già indicato da miRBase (<https://www.mirbase.org>). Al contrario, lo studio di correlazione tra miR-138 e i due microRNA, miR-99a e miR-let7c, non ha mostrato risultati statisticamente significativi (Figura 1).

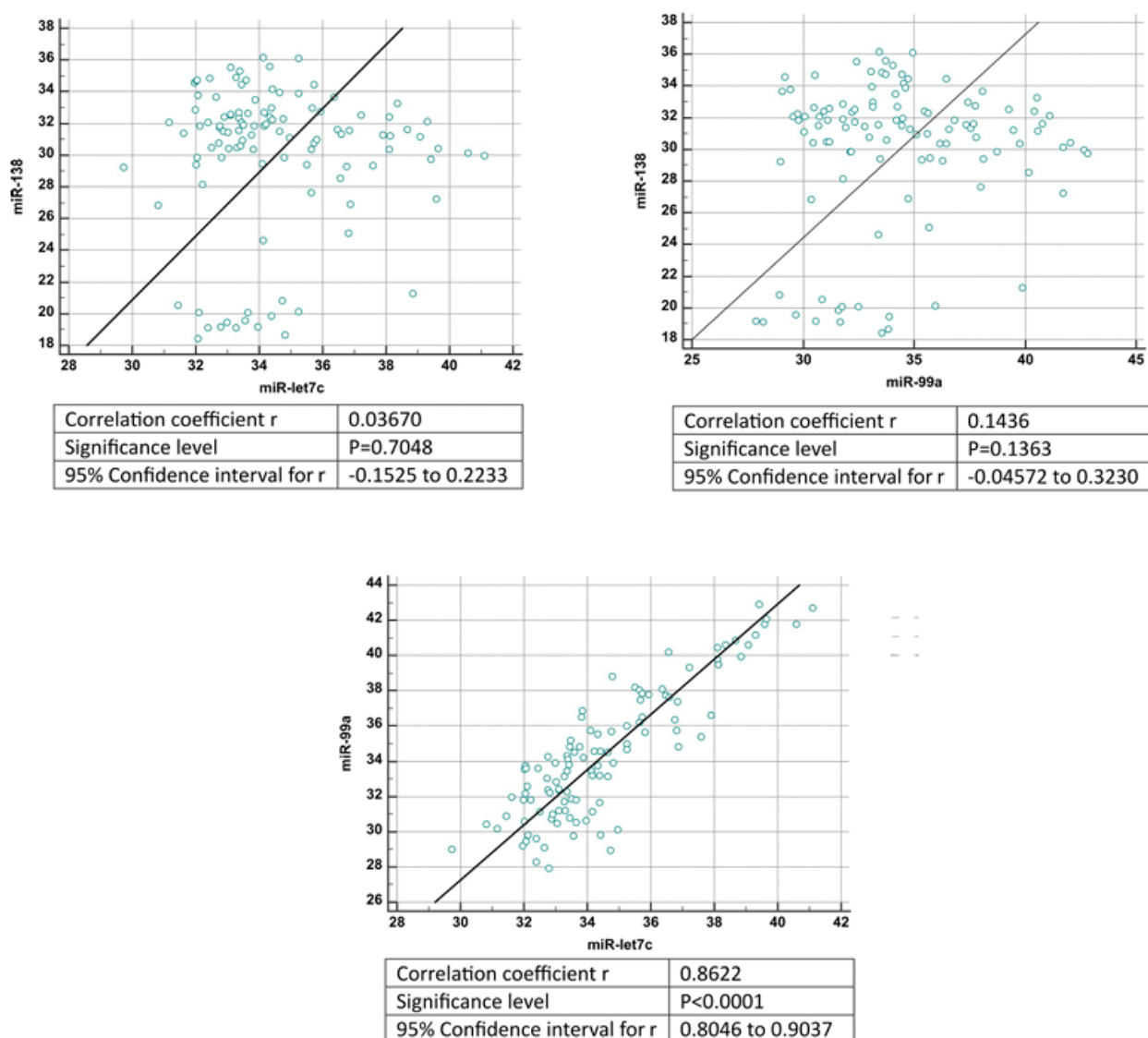


Figure 1. Correlation between levels of the different microRNAs represented by scatter plot.

Livelli di espressione di miR-138 e del cluster miR-99a/let-7c nel carcinoma della vescica e loro relazione con le variabili clinicopatologiche e gli esiti della malattia

Per investigare il ruolo prognostico di miR-138 e del cluster miR-let7c/miR-99a nel carcinoma della vescica (BC), i loro livelli di espressione sono stati valutati mediante RT-qPCR e associati agli esiti clinici dei pazienti. L'analisi di confronto delle medie mediante il test t di Student ha mostrato livelli di espressione aumentati di miR-138 associati a tumori non invasivi e a basso grado ($p = 0,011$ e $p = 0,014$, rispettivamente). Analogamente, una minore espressione del cluster miR-99a/let7c è risultata associata all'assenza di carcinoma in situ (CIS) ($p = 0,001$ e $p = 0,036$, rispettivamente) e alla presenza di tumori unici ($p = 0,065$, significatività marginale, e $p = 0,045$, rispettivamente).

Inoltre, il test One-way ANOVA ha evidenziato differenze significative nell'espressione di miR-138 tra i gruppi combinati per stadio e istologia ($p=0,001$). L'espressione più bassa di miR-138 è stata osservata nei tumori convenzionali con invasione muscolare (T2–T4-CUC), mentre l'espressione più elevata è stata riscontrata nei tumori Ta-CUC e T1-variante. Non sono state osservate differenze significative tra i gruppi per quanto riguarda il miR-99a ($p=0,252$) o il miR-let7c ($p=0,173$). (Tabella 3)

Table 3. Association of microRNAs expression with clinicopathological variables.

Variables	miR-138 mean±SD	p value	miR-99a mean±SD	p value	miR-let7c mean±SD	p- value
Gender		0.094		0.380		0.316
Female	32.31± 1.02		35.29± 3.64		35.23± 2.42	
Male	29.73± 4.80		34.23± 3.62		34.64± 2.29	
Age, years		0.659		0.791		0.481
≤74	30.15± 4.68		34.41±3.43		34.38± 2.07	
>74	29.76± 4.63		37.43±3.85		34.70± 2.56	
Clinical Subtype		0.011		0.887		0.352
NMIBC	30.51±4.51		34.30±3.72		34.43±2.33	
MIBC	27.68±4.57		34.43±3.25		34.95±2.21	
Combined stage- histology group		0.001		0.252		0.173
Ta-CUC	31.54 ± 3.79		35.04 ± 3.69		34.90 ± 2.40	
T1-CUC	28.52 ± 5.78		33.46 ± 3.30		34.11 ± 1.87	

T1-UCVH	31.37 ± 1.64	33.72 ± 4.42	33.60 ± 2.77
T2-T4-CUC	25.36 ± 4.64	33.02 ± 3.04	34.16 ± 2.37
T2-T4-UCVH	28.85 ± 4.24	35.14 ± 3.23	35.36 ± 2.11
Tumor Grade	0.014	0.790	0.896
Low grade	31.70± 3.71	34.48± 3.21	34.58± 1.99
High grade	29.28± 4.81	34.27± 3.79	34.51± 2.43
Concomitant CIS	0.568	0.001	0.036
No	29.90± 4.80	34.02± 3.51	34.40± 2.25
Yes	30.88± 1.32	38.20± 2.70	36.18± 2.48
Tumor size	0.924	0.737	0.582
< 3cm	29.94 ± 4.94	34.41 ± 3.62	34.62 ± 2.24
≥ 3cm	30.03 ± 4.05	34.16 ± 3.65	34.36 ± 2.45
Multifocality	0.160	0.065	0.045
Unique	29.38 ± 5.06	33.73 ± 3.25	34.12 ± 2.07
Multiple	30.64 ± 4.06	35.01 ± 3.91	35.01 ± 2.48

T-test and ANOVA test

Analisi di Kaplan–Meier dell’espressione di miR-138 e del cluster miR-99a/let7c in relazione alla sopravvivenza libera da recidiva, libera da progressione e specifica per cancro

I valori soglia (cut-off), calcolati mediante indice Youden, per miR-138, miR-99a e miR-let7c sono stati fissati rispettivamente a 31,57, 35,49 e 34,66. L’analisi di Kaplan-Meier e il test log-rank hanno evidenziato una riduzione della sopravvivenza libera da progressione (log-rank = 6,3226; p = 0,012) e della sopravvivenza specifica per cancro (log-rank = 20,9888; p < 0,0001) associata a una diminuzione dell’espressione di miR-138.

Inoltre, una maggiore espressione del cluster miR-99a/let7c è risultata associata a una peggiore sopravvivenza specifica per cancro (log-rank = 7,2766; p = 0,007 e log-rank = 10,1893; p = 0,012, rispettivamente). Inoltre, miR-let7c è risultato associato a una minore sopravvivenza libera da progressione (log-rank = 4,2863; p = 0,038). Tuttavia, l’espressione dei microRNA non è risultata associata alla sopravvivenza libera da recidiva (Figura 2).

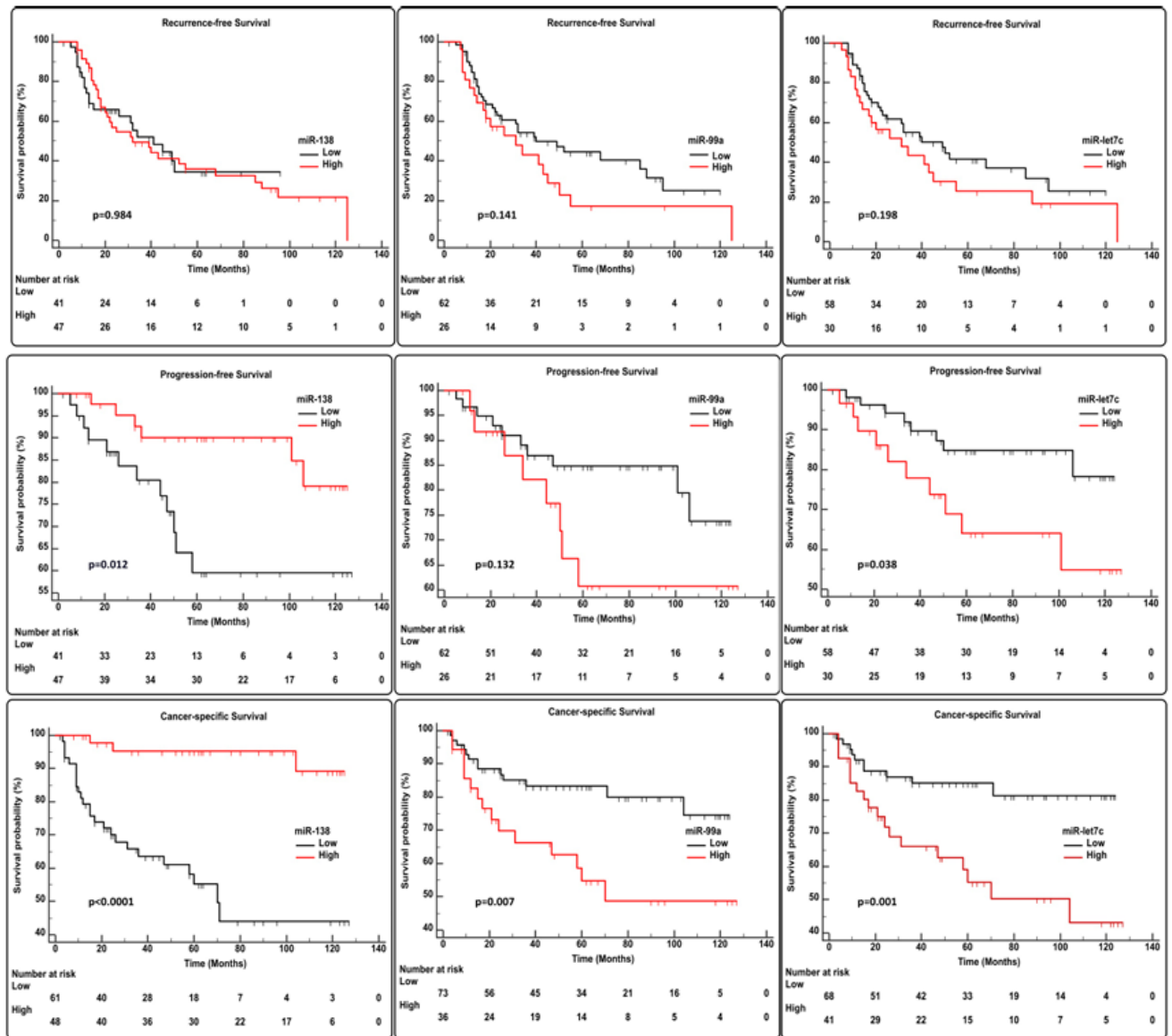


Figure 1. Kaplan-Meier analysis of the association between the expression of miR-138 and the miR-99a/let-7c cluster and recurrence-free survival, progression-free survival, and cancer-specific survival

Classificazione molecolare del carcinoma della vescica e sua associazione con le variabili clinicopatologiche e gli esiti della malattia

È stato condotto uno studio di associazione tra i sottotipi molecolari del carcinoma della vescica e le variabili clinicopatologiche. A tal fine, è stato selezionato un sottogruppo composto da 79 pazienti per i quali era disponibile la classificazione molecolare. Di questi 79 pazienti, 64 erano stati classificati come luminali, 10 come basali e 5 null/double-negative, utilizzando l'analisi di espressione genica mediante la tecnologia NanoString. Lo studio di associazione ha mostrato che il sottotipo luminale è associato a variabili prognostiche favorevoli (Tabella 4). L'analisi di Kaplan-Meier mostra un'apparente riduzione della sopravvivenza specifica per cancro nei pazienti con sottotipi molecolari basale e null/DN (log-rank = 16,2165; $p < 0,001$) (Figura 3).

Table 4. Association of molecular subtypes with clinicopathological and follow-up variables.

Variables	Overall N=79 (100%)	Luminal (n=64)	Basal (n=10)	Null/DN (n=5)	P value
Gender					0.647
Female	7	5 (71.4)	1 (14.3)	1 (14.3)	
Male	72	59 (81.9)	9 (12.5)	4 (5.6)	
Age					0.273
≤74	43	36 (83.7)	6 (14)	1 (2.3)	
>74	36	28 (77.8)	4 (11.1)	4 (11.1)	
Clinical Subtype					0.001
NMIBC	66	58 (87.9)	6 (9.1)	2 (3)	
MIBC	13	6 (46.2)	4 (30.8)	3 (23)	
Tumor Grade					0.259
Low grade	24	22 (91.7)	1 (4.2)	1 (4.2)	
High grade	55	42 (76.4)	9 (16.4)	4 (7.3)	
Concomitant					0.001
CIS					
No	72	61 (84.7)	6 (8.3)	5 (6.9)	
Yes	7	3 (42.9)	4 (57.1)	0 (0)	

Tumor size					0.926
≤ 3cm	52	42 (80.8)	7 (13.5)	3 (5.8)	
> 3cm	27	22 (81.5)	3 (11.1)	2 (7.4)	
Multifocality					0.017
Unique	40	37 (92.5)	1 (2.5)	2 (5)	
Multiple	39	27 (69.2)	9 (23.1)	3 (7.7)	
Recurrence					0.475
(NMIBC; n=66)					
No	26	24 (92.3)	2 (7.7)	0 (0)	
Yes	40	34 (85.0)	4 (10)	2 (5)	
Progression					0.014
(NMIBC; N=66)					
No	56	52 (92.9)	3 (5.4)	1 (1.8)	
Yes	10	6 (60)	3 (30)	1 (10)	
Survival					<0.001
Alive/DOC	62	56 (90.3)	4 (6.5)	2 (3.2)	
DBC	17	8 (47.1)	6 (35.3)	3 (17.6)	

*Chi-square test

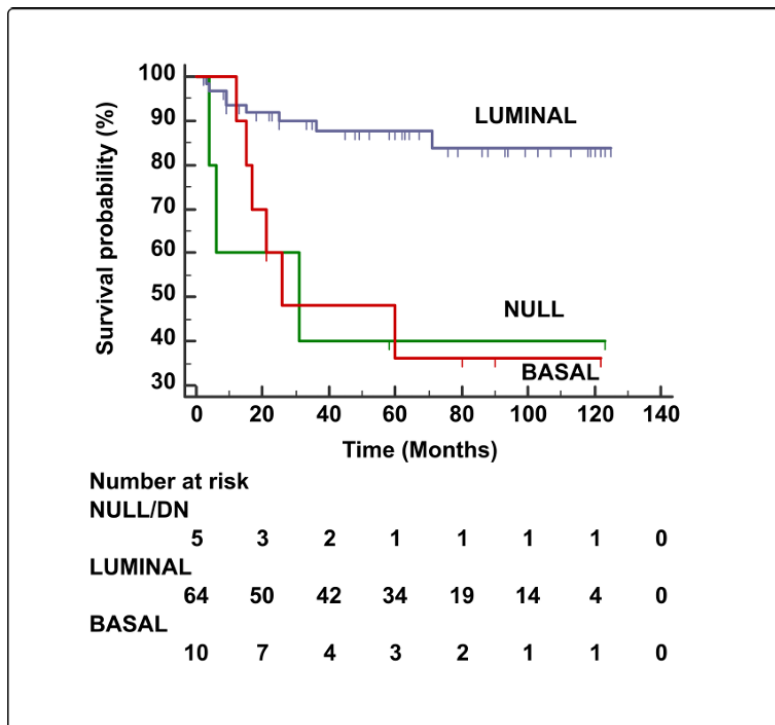


Figure 2. Kaplan–Meier analysis of cancer-specific survival according to molecular subtype.

Associazione dell'espressione di miR-138 e del cluster miR-99a/let7c con i sottotipi molecolari

I livelli di espressione dei microRNA sono stati analizzati in relazione ai sottotipi molecolari del carcinoma della vescica. Questa analisi ha mostrato che il sottotipo luminale era significativamente associato a bassi livelli di espressione di miR-99a ($p = 0,020$) e miR-let7c ($p = 0,001$). Tuttavia, confrontando l'espressione media dei sottotipi molecolari con quella di miR-138, non sono state riscontrate differenze statisticamente significative (Tabella 5 e Figura 4 e 5).

Table 5. Association of microRNA expression and molecular subtypes.

Variable	miR-138	P value	miR-99a	P value	miR-let7c	P value
	mean $\pm$ SD		mean $\pm$ SD		mean $\pm$ SD	
Molecular Subtypes		0.714		0.020		0.001
Luminal	30.15 $\pm$ 4.94		33.26 $\pm$ 2.83		33.82 $\pm$ 1.63	
Basal	29.55 $\pm$ 5.39		36.16 $\pm$ 4.55		36.20 $\pm$ 2.32	
Null/DN	28.33 $\pm$ 5.85		35.23 $\pm$ 4.59		34.96 $\pm$ 3.76	

* ANOVA test

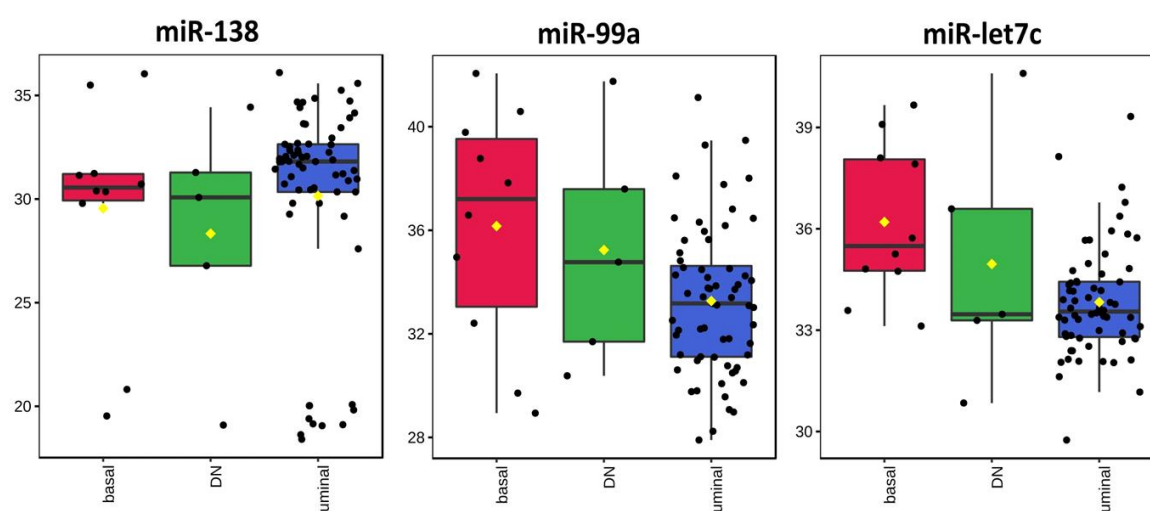


Figure 3. Heatmap representation of the expression of microRNAs grouped into different molecular subtypes (basal, DN, and luminal).

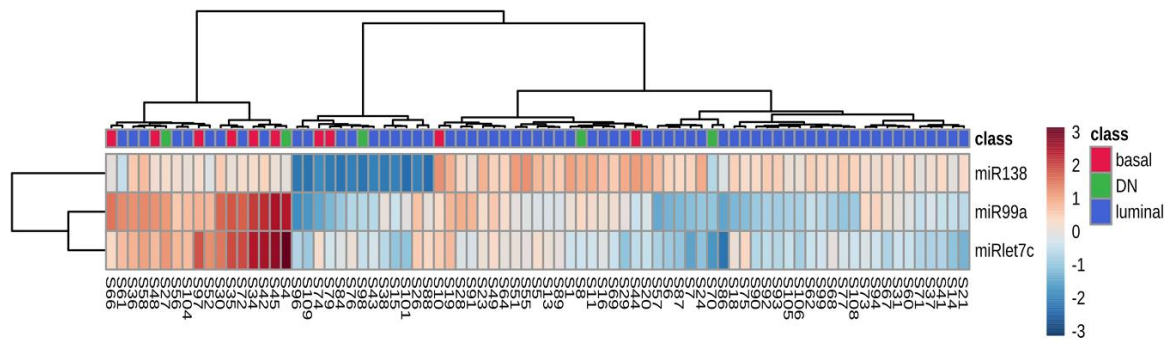


Figure 4. Box plot representation of the expression of microRNAs (miR-138, miR-99a, and miR-let7c) grouped into the different molecular subtypes (basal, DN, and luminal).

Discussione

Il carcinoma della vescica (BC) rappresenta un gruppo eterogeneo di tumori con distinte categorie istologiche e molecolari, caratterizzate da variabilità clinica, patologica e genetica [3, 14]. Le evidenze attuali, basate principalmente su analisi di espressione genica, indicano che i microRNA sono fondamentali nella regolazione di diversi processi oncologici, agendo su vari geni, sia soppressori tumorali sia coinvolti nella tumorigenesi [14-18]. Una delle caratteristiche più interessanti dei microRNA è la loro capacità di modulare simultaneamente più geni e di contribuire allo sviluppo di nuove classi di farmaci per la medicina personalizzata [14, 18]. Nel carcinoma della vescica, la deregolazione dei microRNA e le alterazioni della loro espressione sono eventi frequenti, rilevati nei tessuti tumorali e nei campioni biologici dei pazienti, e sono stati associati a caratteristiche patologiche e cliniche della malattia [15, 19, 20]. Tuttavia, sono state riscontrate alcune discrepanze nei livelli di espressione, probabilmente dovute principalmente alle differenze nelle caratteristiche delle coorti di campioni e nei metodi di rilevamento utilizzati [19, 20].

Sebbene lo stadio tumorale e il grado istologico rimangano i principali parametri prognostici utilizzati nella pratica clinica, essi non sono sempre sufficienti a predire in modo accurato l'evoluzione della malattia nei singoli pazienti. Per questo motivo, negli ultimi anni è cresciuto l'interesse verso l'identificazione di biomarcatori molecolari in grado di migliorare la stratificazione prognostica e di contribuire allo sviluppo di strategie terapeutiche più personalizzate. [19, 20]

Le discrepanze osservate possono dipendere da diversi fattori, tra cui la dimensione e la composizione delle coorti analizzate, la diversa proporzione di tumori non muscolo-invasivi e muscolo-invasivi, l'eterogeneità istologica, le differenti piattaforme di analisi utilizzate, i metodi di normalizzazione e i criteri statistici adottati per definire i livelli di alta o bassa espressione. Pertanto, ulteriori studi su coorti ben caratterizzate sono necessari per chiarire il significato biologico e clinico dei singoli microRNA nel carcinoma vescicale [19, 20].

In questo studio, abbiamo valutato miR-138 e il cluster miR-99a/miR-let-7c, le cui funzioni molecolari e i relativi mRNA target sono stati precedentemente analizzati e identificati [19, 26, 29-32]. Le evidenze suggeriscono che essi possano svolgere un ruolo cruciale nella carcinogenesi vescicale [19, 20]. L'obiettivo principale del presente lavoro è stato quindi quello di analizzare il significato prognostico di questi microRNA e la loro associazione con le principali caratteristiche clinicopatologiche, gli esiti clinici e i sottotipi molecolari del carcinoma della vescica.

Nel nostro studio, abbiamo osservato una forte correlazione positiva tra i livelli di espressione di miR-let-7c e miR-99a. Questo risultato statisticamente significativo conferma che miR-let-7c e miR-99a formano un cluster, come già indicato da miRBase, un database completo per i microRNA, supportando l'ipotesi del loro clustering funzionale [28, 29]. La presenza di un'espressione correlata suggerisce che questi due microRNA possano essere coinvolti in programmi biologici comuni o complementari nel carcinoma della vescica. Tuttavia, abbiamo osservato che miR-138 non mostra una relazione forte o consistente con miR-99a e miR-let-7c in termini di livelli di espressione, suggerendo che miR-138 possa agire attraverso vie o meccanismi differenti nel contesto del carcinoma della vescica. L'assenza di una correlazione significativa tra miR-138 e il cluster miR-99a/let-7c rafforza l'ipotesi che miR-138 possa contribuire alla biologia tumorale attraverso pathway indipendenti, probabilmente legati a meccanismi differenti di progressione, invasione e regolazione della sopravvivenza cellulare.

Inoltre, i nostri risultati forniscono importanti informazioni sul potenziale prognostico di miR-138, che sembra essere un possibile biomarcatore per l'identificazione di forme meno aggressive di BC, data la sua maggiore espressione nei tumori non invasivi e a basso grado. Inoltre, nella nostra casistica, la riduzione dell'espressione di miR-138 è risultata correlata a una minore sopravvivenza libera da progressione e a una peggiore sopravvivenza specifica per cancro, suggerendo che bassi livelli di miR-138 possano indicare un rischio maggiore di progressione di malattia e sottolineando il suo potenziale ruolo come marcatore prognostico della sopravvivenza globale nel BC. Studi precedenti su miR-138 hanno dimostrato una sua espressione aberrante in diversi tumori, indicando che esso agisce come oncosoppressore e influenza la sensibilità tumorale alla chemioterapia, in particolare nel carcinoma polmonare non a piccole cellule, dove contribuisce alla resistenza al cisplatino, un farmaco frequentemente utilizzato nel trattamento del BC. Esso regola pathway come ZEB2 e Survivin, influenzando lo sviluppo del carcinoma vescicale [26]. Studi precedenti del nostro gruppo hanno evidenziato che un'aumentata espressione di miR-138 nel carcinoma della vescica non muscolo-invasivo (NMIBC) è associata a un fenotipo non aggressivo, tumori Ta di basso grado e una migliore sopravvivenza libera da recidiva [32, 33]. Data la sua funzione multifattoriale, miR-138 ha potenziale non solo come biomarcatore per diagnosi precoce e prognosi, ma anche come bersaglio terapeutico per migliorare la sensibilità alla chemioterapia e contrastare la resistenza ai farmaci nel BC [32, 33]. Queste osservazioni sono coerenti con il ruolo oncosoppressivo attribuito a miR-138 in diversi tumori. La

riduzione della sua espressione potrebbe contribuire alla perdita di controllo su pathway coinvolti nella proliferazione cellulare, nell'invasione e nella transizione epitelio-mesenchimale [24]. In questo senso, miR-138 potrebbe rappresentare non solo un marcatore prognostico, ma anche un indicatore biologico di minore aggressività tumorale.

Pertanto, la riduzione dell'espressione di miR-138 potrebbe contribuire non solo a un fenotipo tumorale più aggressivo, ma anche a una diversa risposta ai trattamenti sistemici. Ulteriori studi funzionali saranno necessari per chiarire se miR-138 possa avere anche un valore predittivo di risposta terapeutica nel carcinoma della vescica [24, 32, 33].

Un ulteriore aspetto emerso dal nostro studio riguarda l'analisi dei gruppi combinati per stadio e istologia. In questo contesto, l'espressione di miR-138 è risultata significativamente differente tra i gruppi analizzati, con i livelli più bassi osservati nei carcinomi uroteliali convenzionali muscolo-invasivi (T2–T4-CUC). Questo dato suggerisce che la riduzione di miR-138 possa essere maggiormente correlata all'acquisizione di un fenotipo invasivo piuttosto che alla sola presenza di una variante istologica. Tuttavia, considerando il numero limitato di casi con varianti istologiche e l'eterogeneità dei sottotipi inclusi, questi risultati devono essere interpretati con cautela e richiedono validazione in casistiche più ampie [4, 9, 11].

Nel presente studio, il cluster miR-99a/let-7c mostra potenziale come marcatore dell'assenza di CIS. Bassi livelli di questi microRNA potrebbero indicare un minor rischio di caratteristiche tumorali aggressive, fornendo ulteriori informazioni prognostiche. Poiché la presenza di CIS e la multifocalità rappresentano fattori associati a un rischio più elevato di recidiva e progressione nei tumori vescicali [3], questi risultati suggeriscono che una maggiore espressione del cluster miR-99a/let-7c possa essere correlata a un fenotipo biologicamente più aggressivo [28].

Livelli più elevati del cluster miR-99a/let-7c sono stati associati a una peggiore sopravvivenza specifica per cancro. Questo suggerisce che livelli elevati di questo cluster possano indicare una prognosi sfavorevole per gli esiti oncologici. Inoltre, una maggiore espressione di miR-let-7c è risultata associata alla presenza di tumori multipli e a una ridotta sopravvivenza libera da progressione, indicando che un aumento dell'espressione di miR-let-7c potrebbe essere un marcatore di comportamento tumorale più aggressivo o di resistenza al trattamento in termini di progressione di malattia. Tuttavia, tale risultato deve

essere interpretato con cautela, considerando la complessità funzionale della famiglia let-7 e la presenza di dati non sempre concordanti in letteratura [25, 28]

MiR-let-7c è stato associato alla risposta alla chemioterapia neoadiuvante a base di platino nei pazienti con MIBC, suggerendo che questo microRNA possa predire la risposta al trattamento [25]. Inoltre, l'espressione del cluster let-7c è stata proposta come potenziale strumento non invasivo per valutare il rischio di progressione nei pazienti con NMIBC ad alto grado [28].

È interessante notare che i livelli di espressione dei microRNA non hanno mostrato associazioni significative con la sopravvivenza libera da recidiva (RFS). Questo suggerisce che, sebbene i microRNA possano influenzare la progressione della malattia e la sopravvivenza specifica per cancro, il loro effetto sulla recidiva potrebbe essere mediato da meccanismi differenti o da fattori non considerati in questa analisi. La recidiva nel carcinoma vescicale, soprattutto nel NMIBC, è un evento biologicamente complesso e può essere influenzata da molteplici fattori, tra cui la multifocalità, l'effetto di campo dell'urotelio, la persistenza di alterazioni molecolari nella mucosa apparentemente normale, la qualità della resezione transuretrale e i trattamenti intravesicali [3]. Pertanto, è possibile che i microRNA studiati siano maggiormente correlati ai meccanismi di progressione e aggressività tumorale piuttosto che alla semplice ricomparsa locale della malattia.

MiR-99a è frequentemente down-regolato in diversi tumori, incluso il BC, con importanti implicazioni funzionali. L'espressione aberrante di miR-99a si verifica più frequentemente delle mutazioni di FGFR3, suggerendo che tali alterazioni possano determinare l'up-regolazione di FGFR3 prima dell'insorgenza di mutazioni geniche [34]; esso agisce come oncosoppressore, inibendo la crescita delle cellule tumorali vescicali e promuovendo l'apoptosi attraverso il targeting di mTOR [22, 35]. I risultati presenti in letteratura riguardo alla sopravvivenza e al significato prognostico sono contraddittori. È stato riportato che un aumento dell'espressione di miR-99a-5p è associato a una maggiore sopravvivenza globale [22]. Al contrario, altri autori indicano che bassi livelli di espressione di miR-99a sono associati a una maggiore invasione muscolare, a tumori vescicali di basso grado e a una maggiore sopravvivenza [36, 37]. Queste differenze possono essere dovute a vari fattori, come la dimensione del campione, i criteri di selezione e/o le caratteristiche della popolazione studiata.

In questo studio abbiamo inoltre valutato l'associazione tra l'espressione dei miRNA e le varianti istologiche, considerate in combinazione con lo stadio tumorale. L'analisi ha evidenziato una riduzione significativa dell'espressione di miR-138 nei tumori convenzionali con invasione muscolare (T2–T4). Tale risultato è coerente con quanto riportato in letteratura, secondo cui livelli più elevati di miR-138 sono associati a una prognosi più favorevole e a neoplasie di basso grado [26]. La valutazione integrata di stadio, istologia e profilo molecolare è particolarmente rilevante nel carcinoma uroteliale, poiché diverse varianti istologiche sono associate a comportamento clinico aggressivo e a specifici profili molecolari [4, 9, 11]. Tuttavia, nella nostra coorte, l'associazione più evidente è stata osservata tra ridotta espressione di miR-138 e invasione muscolare nei tumori convenzionali. Questo dato suggerisce che miR-138 possa rappresentare un indicatore di aggressività biologica anche indipendentemente dalla presenza di varianti istologiche riconosciute.

Nel presente studio, abbiamo inoltre analizzato i livelli di espressione di miR-138 e del cluster miR-99a/let-7c in relazione ai sottotipi molecolari del carcinoma della vescica, evidenziando che il sottotipo luminale è risultato significativamente associato a bassi livelli di espressione di miR-99a e miR-let-7c. Ciò suggerisce che questi microRNA possano contribuire a distinguere il sottotipo luminale dagli altri sottotipi molecolari del BC [23]. Il sottotipo luminale, caratterizzato da bassa espressione del cluster miR-99a/let-7c, potrebbe presentare caratteristiche biologiche o risposte terapeutiche differenti rispetto agli altri sottotipi. I nostri risultati indicano inoltre che il sottotipo più frequente è quello luminale, associato a una maggiore sopravvivenza specifica per cancro, confermando la sua prognosi relativamente favorevole [8, 13]. La bassa espressione del cluster miR-99a/let-7c nei tumori luminali potrebbe quindi rappresentare una caratteristica molecolare aggiuntiva di questo sottotipo, potenzialmente utile per comprenderne meglio la biologia.

Questi risultati sono coerenti con studi precedenti del nostro gruppo e con le osservazioni di altri gruppi di ricerca [12, 38, 39]. Al contrario, i sottotipi basale e null/double-negative hanno mostrato un profilo clinico più sfavorevole, con maggiore associazione a malattia muscolo-invasiva, progressione e mortalità cancro-specifica. Sebbene il numero di casi basali e null/DN nella nostra coorte sia limitato, i risultati ottenuti sono in linea con il comportamento più aggressivo generalmente attribuito a questi sottotipi [8, 12, 38, 39].

Studi precedenti hanno osservato che miR-99a, insieme a miR-125b, miR-223 e miR-212, che bersagliano FGFR2 e FGFR3, sembra svolgere un ruolo nella biologia luminale dei

carcinomi vescicali muscolo-invasivi (MIBC) [23]. Per quanto riguarda miR-let-7c, metanalisi di studi indipendenti hanno identificato un'elevata espressione di specifici microRNA, tra cui miR-let-7c, miR-let-7f e miR-10a, associati al sottotipo luminale A del carcinoma mammario [38]. Tuttavia, ad oggi non sono ancora stati condotti studi sul ruolo di miR-let-7c in relazione ai sottotipi molecolari nel carcinoma della vescica. Nel complesso, i nostri dati supportano l'ipotesi che miR-138 e il cluster miR-99a/let-7c possano fornire informazioni complementari nella valutazione biologica e prognostica del carcinoma della vescica. MiR-138 sembra associarsi a caratteristiche favorevoli e a una migliore prognosi, confermando un possibile ruolo oncosoppressivo. Al contrario, nella nostra coorte, una maggiore espressione del cluster miR-99a/let-7c si associa a caratteristiche più aggressive, peggiore sopravvivenza cancro-specifica e sottotipi molecolari non luminali. Questi risultati suggeriscono che l'analisi combinata di più microRNA potrebbe migliorare la stratificazione prognostica rispetto alla valutazione di singoli marcatori isolati.

Il presente studio presenta tuttavia alcune limitazioni. In primo luogo, si tratta di uno studio retrospettivo condotto su una coorte relativamente limitata, soprattutto per quanto riguarda i casi MIBC, i sottotipi molecolari basale e null/DN e le singole varianti istologiche. In secondo luogo, la classificazione molecolare era disponibile solo per un sottogruppo di pazienti, riducendo la potenza statistica delle analisi di associazione con i sottotipi molecolari. Inoltre, l'espressione dei microRNA è stata valutata su tessuto tumorale e non su campioni liquidi, come urine o sangue, che potrebbero avere maggiore applicabilità in ambito diagnostico non invasivo [15, 19, 28]. Infine, non sono state eseguite analisi funzionali in vitro o in vivo per confermare direttamente i meccanismi biologici suggeriti dai dati di espressione.

Nonostante queste limitazioni, il nostro studio presenta alcuni punti di forza. La coorte è stata caratterizzata in modo dettagliato dal punto di vista clinicopatologico, con revisione istologica secondo criteri aggiornati e disponibilità di dati di follow-up a lungo termine. Inoltre, l'analisi integrata dei livelli di espressione dei microRNA con variabili istologiche, prognostiche e molecolari consente di fornire una visione più completa del possibile ruolo di miR-138 e del cluster miR-99a/let-7c nella biologia del carcinoma vescicale. Questi risultati, se validati in coorti indipendenti e prospettiche, potrebbero contribuire allo sviluppo di modelli prognostici integrati basati su parametri morfologici, molecolari e di espressione microRNA [8, 13, 23].

Conclusioni

Alla luce di queste evidenze, la moderna classificazione del carcinoma uroteliale si configura sempre più come un sistema integrato, nel quale la valutazione morfologica convenzionale viene affiancata dalle informazioni immunofenotipiche e molecolari.

Questo studio fornisce una migliore comprensione del ruolo di miR-138, miR-99a e miR-let7c come biomarcatori prognostici del carcinoma della vescica. Un'elevata espressione di miR-138 è associata a caratteristiche clinicopatologiche favorevoli e a una prognosi positiva. Al contrario, una maggiore espressione del cluster miR-99a/let-7c è associata a caratteristiche più aggressive e a una prognosi peggiore. Inoltre, i pazienti con il sottotipo Luminal, generalmente associato a variabili clinicopatologiche favorevoli e a buoni esiti clinici, presentano una bassa espressione del cluster miR-99a/let-7c. Questo risultato evidenzia l'importanza dei microRNA non solo nella valutazione prognostica, ma anche nella potenziale stratificazione dei pazienti ai fini di terapie più personalizzate.

Bibliografia

1. Inamura, K., *Bladder Cancer: New Insights into Its Molecular Pathology*. Cancers, 2018. **10**: p. 100.
2. Siegel, R.L., et al., *Cancer Statistics, 2021*. CA Cancer J Clin, 2021. **71**(1): p. 7-33.
3. Kamat, A.M., et al., *Bladder cancer*. Lancet, 2016. **388**(10061): p. 2796-2810.
4. Netto, G.J., et al., *The 2022 World Health Organization Classification of Tumors of the Urinary System and Male Genital Organs*; Part B: Prostate and Urinary Tract Tumors. European Urology, 2022. **82**(5): p. 469-482.
5. Brierley, J., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours*. Eighth edition. ed. 2017, Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc. p.
6. Robertson, A.G., et al., *Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer*. Cell, 2017. **171**(3): p. 540-556.e25.
7. Zhu, S., et al., *Traditional Classification and Novel Subtyping Systems for Bladder Cancer*. Frontiers in Oncology, 2020. **10**.
8. Kamoun, A., et al., *A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer*. Eur Urol, 2020. **77**(4): p. 420-433.
9. Amin, M.B., *Histological variants of urothelial carcinoma: diagnostic, therapeutic and prognostic implications*. Mod Pathol, 2009. **22 Suppl 2**: p. S96-S118.
10. Lopez-Beltran, A. and L. Cheng, *Histologic variants of urothelial carcinoma: differential diagnosis and clinical implications*. Hum Pathol, 2006. **37**(11): p. 1371-88.
11. Downes, M.R., *Invasive Urothelial Carcinoma: Subtypes and Divergent Differentiation*, in *Urologic Cancers*, N. Barber and A. Ali, Editors. 2022: Brisbane (AU).
12. Kardos, J., et al., *Development and validation of a NanoString BASE47 bladder cancer gene classifier*. PLoS One, 2020. **15**(12): p. e0243935.
13. Lopez-Beltran, A., et al., *Molecular Classification of Bladder Urothelial Carcinoma Using NanoString-Based Gene Expression Analysis*. Cancers (Basel), 2021. **13**(21).
14. Annese, T., et al., *microRNAs Biogenesis, Functions and Role in Tumor Angiogenesis*. Frontiers in Oncology, 2020. **10**.
15. Braicu, C., et al., *Connecting the dots between different networks: miRNAs associated with bladder cancer risk and progression*. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 2019. **38**(1): p. 433.
16. Kim, J., et al., *MicroRNAs and metastasis: small RNAs play big roles*. Cancer metastasis reviews, 2018. **37**(1): p. 5-15.
17. Niveditha, D., et al., *Common and Unique microRNAs in Multiple Carcinomas Regulate Similar Network of Pathways to Mediate Cancer Progression*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 2331.
18. Peng, Y. and C.M. Croce, *The role of MicroRNAs in human cancer*. Signal Transduction and Targeted Therapy, 2016. **1**(1): p. 15004.
19. Blanca, A., et al., *Mirna Expression in Bladder Cancer and Their Potential Role in Clinical Practice*. Curr Drug Metab, 2017. **18**(8): p. 712-722.
20. Dong, F., et al., *Dysregulation of miRNAs in bladder cancer: altered expression with aberrant biogenesis procedure*. Oncotarget, 2017. **8**(16): p. 27547-27568.
21. Gottardo, F., et al., *Micro-RNA profiling in kidney and bladder cancers*. Urol Oncol, 2007. **25**(5): p. 387-92.
22. Liu, Y., et al., *MiR-99a-5p inhibits bladder cancer cell proliferation by directly targeting mammalian target of rapamycin and predicts patient survival*. J Cell Biochem, 2019. **120**(12): p. 19330-19337.

23. Ochoa, A.E., et al., *Specific micro-RNA expression patterns distinguish the basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer*. *Oncotarget*, 2016. **7**(49): p. 80164-80174.
24. Sun, D.K., et al., *MicroRNA-138 Regulates Metastatic Potential of Bladder Cancer Through ZEB2*. *Cell Physiol Biochem*, 2015. **37**(6): p. 2366-74.
25. Vinall, R.L., et al., *Decreased expression of let-7c is associated with non-response of muscle-invasive bladder cancer patients to neoadjuvant chemotherapy*. *Genes Cancer*, 2016. **7**(3-4): p. 86-97.
26. Blanca, A., et al., *Expression of miR-100 and miR-138 as prognostic biomarkers in non-muscle-invasive bladder cancer*. *APMIS*, 2019. **127**(8): p. 545-553.
27. Yang, R., et al., *miR-138-5p contributes to cell proliferation and invasion by targeting Survivin in bladder cancer cells*. *Molecular Cancer*, 2016. **15**(1): p. 82.
28. Spagnuolo, M., et al., *Urinary expression of let-7c cluster as non-invasive tool to assess the risk of disease progression in patients with high grade non-muscle invasive bladder Cancer: a pilot study*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020. **39**(1): p. 68.
29. Truini, A., et al., *Downregulation of miR-99a/let-7c/miR-125b miRNA cluster predicts clinical outcome in patients with unresected malignant pleural mesothelioma*. *Oncotarget*, 2017. **8**.
30. Spagnuolo, M., et al., *Urinary expression of let-7c cluster as non-invasive tool to assess the risk of disease progression in patients with high grade non-muscle invasive bladder Cancer: A pilot study*. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2020. **39**.
31. Zhou, H., et al., *A panel of eight-miRNA signature as a potential biomarker for predicting survival in bladder cancer*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015. **34**: p. 53.
32. Sha, H.H., et al., *MiR-138: A promising therapeutic target for cancer*. *Tumour Biol*, 2017. **39**(4): p. 1010428317697575.
33. Yeh, M., et al., *Pivotal role of microRNA-138 in human cancers*. *Am J Cancer Res*, 2019. **9**(6): p. 1118-1126.
34. Catto, J.W.F., et al., *Distinct MicroRNA Alterations Characterize High- and Low-Grade Bladder Cancer*. *Cancer Research*, 2009. **69**(21): p. 8472-8481.
35. Tsai, T.F., et al., *miR-99a-5p acts as tumor suppressor via targeting to mTOR and enhances RAD001-induced apoptosis in human urinary bladder urothelial carcinoma cells*. *Onco Targets Ther*, 2018. **11**: p. 239-252.
36. Feng, Y., et al., *microRNA-99a acts as a tumor suppressor and is down-regulated in bladder cancer*. *BMC Urology*, 2014. **14**(1): p. 50.
37. Li, D., X. Hao, and Y. Song, *An integrated analysis of key microRNAs, regulatory pathways and clinical relevance in bladder cancer*. *Onco Targets Ther*, 2018. **11**: p. 3075-3085.
38. Kudela, E., et al., *miRNA Expression Profiles in Luminal A Breast Cancer-Implications in Biology, Prognosis, and Prediction of Response to Hormonal Treatment*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(20).
39. Lindskrog, S.V., et al., *An integrated multi-omics analysis identifies prognostic molecular subtypes of non-muscle-invasive bladder cancer*. *Nat Commun*, 2021. **12**(1): p. 2301.