



Dipartimento di Scienze e Innovazione Tecnologica- DISIT

Corso di Laurea in Biologia
Indirizzo biomedico e biomolecolare

ELABORATO FINALE

Valutazione di una metodica automatizzata per l'analisi in multiplex Real Time
PCR di biomarcatori urinari nel tumore della vescica

Relatore: Elia Ranzato

Candidata: Greta Cattaneo

Correlatore: Giulio Mengozzi

Anno Accademico 2022/2023

INDICE

CAPITOLO 1	4
1.1 Anatomia e fisiologia del sistema urinario.....	4
1.1.1 Anatomia e funzioni della vescica.....	4
1.1.2 Fisiologia e innervazione della vescica.....	7
1.2 Il tumore della vescica: introduzione ed epidemiologia.....	8
1.2.1 Classificazione e stadiazione dei tumori alla vescica.....	8
1.2.2 I fattori di rischio.....	11
1.2.3 Sintomi e diagnosi.....	12
1.3 Terapia del tumore alla vescica.....	14
1.3.1 Tumore della vescica non muscolo-invasivo (NMIBC).....	14
1.3.2 Terapia adiuvante.....	15
1.3.3 Trattamento Carcinoma <i>in situ</i> (Cis).....	17
1.3.4 Follow up.....	18
1.3.5 Fallimento della Terapia Intravesicale.....	19
1.3.5 Tumore della vescica muscolo-invasivo (MIBC).....	19
1.3.4 Chemioterapia neoadiuvante.....	20
1.3.5 Radioterapia neoadiuvante.....	21
1.3.6 Immunoterapia.....	22
1.4 Biomarcatori tumorali.....	25
1.4.1 Biomarcatori tumorali approvati dalla Food and Drug Administration (FDA).....	26
1.4.2 Biomarcatori tumorali non ancora approvati dalla Food and Drug Administration (FDA).....	28
1.4.3 Biomarcatori in fase di sperimentazione.....	30
1.4.4 Biomarcatori Genetici.....	35
1.4.5 Applicazione dei biomarcatori tumorali CK20, CK7 e TERT in diversi contesti clinici.....	36
CAPITOLO 2	38
2.1 Scopo della Tesi.....	38
CAPITOLO 3	39
MATERIALI E METODI	39
3.1 Popolazione considerata.....	39
3.2 Estrattore automatico Kairos-96.....	40
3.3 Real-Time PCR.....	44
3.4 Analisi statistica.....	48

CAPITOLO 4	49
RISULTATI	49
4.1 Analisi descrittiva.....	49
4.2 Accuratezza diagnostica.....	55
4.3 Combinazione dei tre biomarcatori	59
CAPITOLO 5	61
DISCUSSIONE	61
CAPITOLO 6	63
CONCLUSIONI	63
BIBLIOGRAFIA	64

CAPITOLO 1

1.1 Anatomia e fisiologia del sistema urinario

L'apparato urinario è costituito da sei organi: la vescica urinaria, due reni, due ureteri e l'uretra (Figura 1).

La funzione principale di questo sistema è l'escrezione, che è un processo che prevede l'estrazione di scorie dai liquidi dell'organismo e della loro eliminazione, prevenendo così l'intossicazione. Il sistema urinario ha inoltre, la funzione di mantenere il volume e la composizione dei fluidi corporei entro limiti adeguati, regolare la concentrazione dei vari elettroliti nei fluidi corporei, mantenere il controllo del pH del sangue, controllare la produzione di globuli rossi secernendo l'ormone eritropoietina e mantenere anche la pressione sanguigna secernendo l'enzima renina. [1]

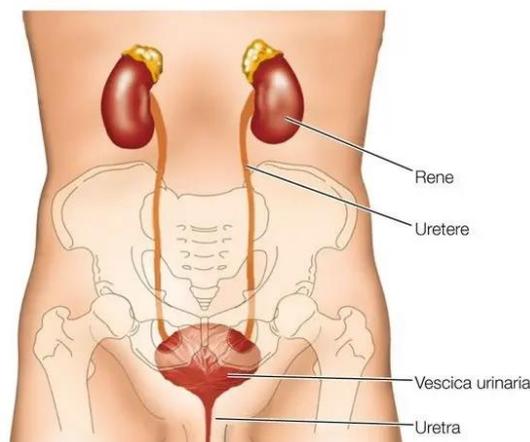


Figura 1 Componenti sistema urinario: vescica urinaria, i reni, gli ureteri e l'uretra

1.1.1 Anatomia e funzioni della vescica

La vescica urinaria è un serbatoio muscolare deputato alla raccolta dell'urina, si trova nello spazio extraperitoneale ed è situata sopra il pavimento pelvico, sotto al peritoneo e dietro alla sinfisi pubica. Al di sopra degli orifizi ureterici, la parte superiore è composta dall'apice e dal corpo, mentre la parte inferiore è costituita dal fondo, dal trigono vescicale e dal collo. Il trigono vescicale è costituito da tre aperture nel pavimento della vescica urinaria, di cui due provengono

dagli ureteri e formano la base del trigono, mentre la terza, all'apice del trigono, è l'apertura dell'uretra. Ci sono poi, piccoli lembi di mucosa che ricoprono queste aperture e fungono da valvole che permettono all'urina di entrare nella vescica, ma ne impediscono la risalita agli ureteri.[2]

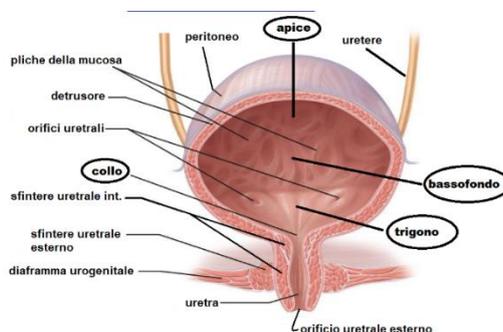


Figura 2 La vescica con le sue componenti anatomiche: nella parte superiore è presente l'apice e il corpo, mentre la parte inferiore è costituita dal fondo, dal trigono vescicale e dal collo

Le due funzioni principali della vescica urinaria sono l'immagazzinamento e l'eliminazione dell'urina. Le dimensioni e la forma variano in base alla quantità di urina e alla pressione che riceve dagli altri organi circostanti, inoltre, l'istologia specializzata della vescica urinaria consente una contrazione e un rilassamento coordinati per facilitare la sua funzione fisiologica.

La struttura microscopica della parete della vescica urinaria si organizza in diversi strati: a partire dall'interno è presente la tonaca mucosa costituita dall'epitelio di rivestimento di transizione chiamato urotelio. L'epitelio di transizione è un epitelio stratificato e le sue cellule cambiano forma a seconda del volume di urina presente nella vescica. Quando la vescica è vuota, le cellule dell'urotelio sono rotonde e grandi. Quando la vescica si riempie di urina, le cellule si trasformano in cellule più piatte per accogliere un volume maggiore di urina. L'urotelio è presente esclusivamente nelle strutture urinarie come l'uretere, la vescica urinaria e l'uretra prossimale ed è composto da tre differenti strati istologici (Figura 3):

- Lo strato apicale che è lo strato più interno e costituisce una barriera tra il lume vescicale e il tessuto sottostante. Si tratta di un singolo strato di cellule a forma di ombrello spesso binucleate. Queste cellule ad ombrello formano una barriera impermeabile. Le giunzioni strette tra le cellule riducono il flusso paracellulare, mentre uno strato glicoproteico di uroplachina sulla superficie delle cellule a ombrello forma una placca che ricopre l'area superficiale.
- Lo strato intermedio è formato da due o tre strati di cellule poligonali.
- Lo strato basale è formato da due o tre strati di piccole cellule cuboidali.

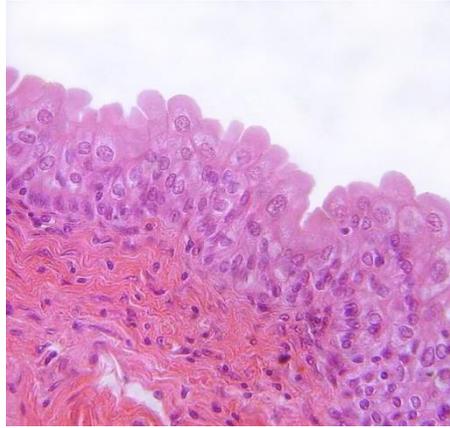


Figura 3 Epitelio di transizione con suddivisione dall'interno verso l'esterno degli strati istologici: lo strato apicale, costituito da un singolo strato di cellule a forma di ombrello, binucleate, lo strato intermedio costituito da due o tre strati di cellule poligonali e lo strato basale costituito da due o tre strati di cellule cuboidali

L'epitelio di transizione poggia su una lamina propria ricca di tessuto connettivo caratterizzato da una rete eterogenea di proteine e cellule strutturali, da una matrice extracellulare con fibre elastiche, capillari, vasi linfatici, cellule immunitarie, terminazioni nervose afferenti ed efferenti, fibroblasti e miofibroblasti, adipociti, cellule interstiziali di Cajal e cellule muscolari. Le cellule interstiziali di Cajal formano un sincizio con le cellule muscolari lisce e le terminazioni nervose. Queste cellule sono multifunzionali in diversi tessuti, infatti è nota la funzione pacemaker nell'intestino, nell'uretra e nella prostata, però fungono anche da trasduttori di segnali nervosi alle cellule muscolari della vescica.

Più in profondità è presente la tonaca *muscolare* nota anche come muscolo detrusore, il principale muscolo della vescica, costituito da tre strati di fibre muscolari lisce: nello strato più superficiale detto longitudinale interno le cellule si dispongono in fasci longitudinali, in quello intermedio assumono un andamento circolare e in quello più profondo nuovamente in fasci longitudinali. Questi strati sono ben definiti intorno al collo della vescica urinaria, ma sono allineati casualmente con il resto della parete della vescica.

Lo strato più esterno della vescica è la tonaca sierosa costituita da tessuto connettivo contenente vasi sanguigni di varie dimensioni in continuità con il peritoneo addominale.[3]

Il passaggio finale per il flusso di urina è l'uretra, un condotto a pareti sottili che convoglia l'urina dal pavimento della vescica verso l'esterno. Il muscolo detrusore è più spesso in corrispondenza dell'uretra dove costituisce lo sfintere uretrale interno, la cui funzione è quella di comprimere l'uretra e trattenere le urine nella vescica ed è costituito da muscolo liscio.

L'apertura che convoglia l'urina verso l'esterno è lo sfintere uretrale esterno che è costituito da muscolo scheletrico e circonda l'uretra nel punto in cui attraversa il pavimento pelvico.[4]

1.1.2 Fisiologia e innervazione della vescica

La vescica riceve l'innervazione attraverso una rete di fibre nervose parasimpatiche, simpatiche e somatiche. Le fibre parasimpatiche derivano dai nervi spinali sacrali (S2-S4) che si uniscono per formare i nervi splancnici pelvici. Il controllo simpatico proviene dai livelli spinali toracico inferiore e lombare superiore (T10-L2) sottoforma di plessi e nervi ipogastrici superiori e inferiori. Il nervo pudendo (S2-S4), un ramo del plesso sacrale, fornisce il controllo somatico volontario ai muscoli striati dello sfintere uretrale esterno. Queste fibre hanno origine nel corno ventrale del midollo spinale sacrale, chiamato nucleo di Onuf.[5]

La parete del muscolo detrusore contiene recettori muscarinici (M3) regolati sotto il controllo parasimpatico e contiene anche recettori beta-adrenergici sotto la regolazione simpatica.[6] Le informazioni sensoriali provenienti dalla parete superiore della vescica seguono il percorso dell'innervazione simpatica, mentre quelle provenienti dalla parte inferiore della vescica seguono i nervi parasimpatici.

Il centro della minzione, che regola il processo di riempimento e di espulsione della vescica, è situato nel centro pontino della minzione ed in generale, la risposta parasimpatica stimola lo svuotamento della vescica, mentre la risposta simpatica ne favorisce il riempimento. Infatti, i nervi parasimpatici stimolano il muscolo detrusore a contrarsi e lo sfintere uretrale interno a rilassarsi per consentire la minzione. La stimolazione simpatica consente il rilassamento o il riempimento del muscolo detrusore e la costrizione dello sfintere interno. I riflessi spinali locali regolano principalmente il processo di riempimento della vescica, mentre quello della minzione richiede l'azione del centro pontino della minzione nel tronco encefalico. Quando la vescica vuota si riempie di urina, i meccanocettori rilevano lo stiramento della parete del muscolo detrusore e inviano fibre afferenti lente al midollo spinale. Questo stimola la risposta simpatica sul detrusore e sullo sfintere interno attraverso i nervi ipogastrici, facendoli rispettivamente rilassare e restringere, mentre la risposta parasimpatica è inibita. Anche i segnali del nervo pudendo allo sfintere uretrale esterno vengono stimolati per mantenere l'uretra esterna contratta e chiusa. Quando la vescica si distende completamente, le fibre sensoriali arrivano al centro pontino della minzione, stimolando la risposta parasimpatica e inibendo il tono simpatico per consentire la contrazione del muscolo detrusore e il rilassamento dello sfintere interno. In tutto

questo, l'innervazione somatica allo sfintere uretrale esterno rimane tonicamente attiva per mantenere lo sfintere contratto.

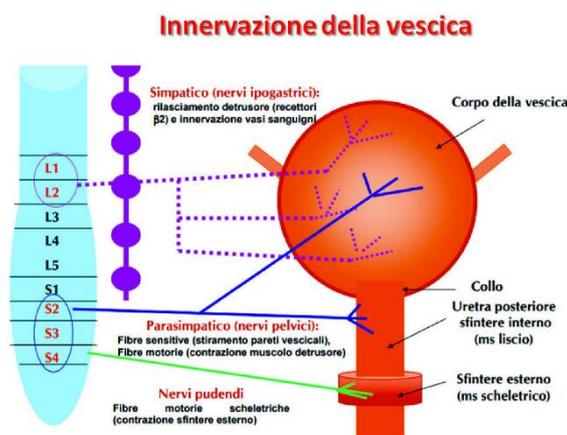


Figura 4 Innervazione della vescica consentita da fibre parasimpatiche, che sono implicate nello svuotamento della vescica, tramite la contrazione del muscolo detrusore e il rilassamento dello sfintere uretrale interno, le fibre simpatiche sono implicate nel riempimento della vescica tramite rilassamento del muscolo detrusore e contrazione dello sfintere uretrale interno.

1.2 Il tumore della vescica: introduzione ed epidemiologia

Il carcinoma della vescica è il decimo più comune tumore nel mondo. Nel 2020 ci sono stati più di 573.000 nuovi casi di tumore alla vescica e la sua prevalenza sta aumentando gradualmente a livello globale, soprattutto nelle nazioni industrializzate.[7] Il tumore si manifesta più frequentemente tra i 60 e i 70 anni di età ed è il sesto tumore più comune nei maschi, mentre nelle donne è il diciassettesimo.[8] Si è inoltre registrato un aumento della sua incidenza, soprattutto in Asia, nel Nord Africa e nell'Europa Centrale. Previsioni future stimano che i maggiori aumenti in percentuale di tumore alla vescica dal 2020 al 2040 saranno prevalentemente in Africa, America Latina, Asia e Oceania. [9]

1.2.1 Classificazione e stadiazione dei tumori alla vescica

Il 95% dei tumori vescicali è di origine epiteliale, mentre il restante 5% è rappresentato da neoplasie di tipo mesenchimale. Tra i tipi epiteliali il 90% è costituito da tumori uroteliali. I tumori uroteliali sono classificati come carcinomi non muscolo-invasivi (NMIBC: Non Muscle Invasive Bladder Cancer) o muscolo-invasivi (MIBC: Muscle Invasive Bladder Cancer).

Il tumore NMIBC è un tipo di tumore in cui le cellule cancerose sono limitate alle strutture superficiali della parete vescicale e non hanno ancora invaso lo strato muscolare più profondo. Questo stadio è considerato precoce e rappresenta una parte significativa dei casi di tumore alla vescica. Essendo confinato agli strati superficiali, le opzioni di trattamento e le prospettive di successo tendono ad essere migliori rispetto ai tumori che hanno già invaso i tessuti muscolari o si sono diffusi a livello sistemico. Il tumore MIBC, è caratterizzato invece dall'invasione delle cellule cancerose nello strato muscolare della parete della vescica. E' considerato uno stadio più avanzato rispetto a quello NMIBC, infatti a causa della sua invasività, può presentare un rischio maggiore di diffusione a tessuti e organi circostanti o di metastasi a distanza. Il MIBC è solitamente diagnosticato *de novo* ma può derivare nel 10-20% dei casi dalla progressione dei tumori NMIBC. La MIBC è una malattia più aggressiva ed è associata ad un tasso di sopravvivenza a cinque anni del 60% per i pazienti con malattia localizzata e di meno del 10% per i pazienti con metastasi a distanza; inoltre è una malattia eterogenea, caratterizzata da instabilità genomica e da un alto tasso di mutazioni. [10]

Queste due categorie possono essere ulteriormente suddivise in base a fattori come lo stadio di avanzamento, il grado di differenziazione cellulare, la presenza di invasione muscolare e la presenza di metastasi. La diagnosi precisa e la classificazione del tumore alla vescica sono fondamentali per la pianificazione del trattamento e la gestione della malattia. Infatti, dal punto di vista macroscopico, possiamo distinguere forme papillari e forme non papillari. Le forme papillari presentano una crescita all'interno della parete vescicale, mentre le forme non papillari hanno una forma a placca e sono tra le forme più aggressive.

Tra le forme tumorali non muscolo-invasive, il carcinoma uroteliale papillare che non presenta invasione e che è confinato alla mucosa è classificato come stadio pTa; i tumori coinvolgenti la lamina propria senza estensione nella *muscularis propria* sono classificati come pT1. [11] Tra i tumori confinati alla mucosa ci sono anche i carcinomi *in situ* (CIS) che presentano una lesione uroteliale piatta di alto grado e indicano lo stato precoce del tumore in cui le cellule cancerose sono presenti solo nella superficie interna della vescica ma sono particolarmente maligne e con tendenza ad infiltrare lo strato muscolare. [12] Per quanto riguarda invece i tumori muscolo-invasivi lo stadio pT2, presenta l'invasione da parte del tumore della *muscularis propria*. I tumori così stadiati sono ulteriormente suddivisi in tumori che invadono la *muscularis propria* superficiale (cioè la metà interna) (pT2a) e tumori che invadono la *muscularis propria* profonda (cioè la metà esterna) (pT2b). [13]

Anche i tumori pT3 prevedono la suddivisione in tumori pT3a (tumori con estensione extravescicale microscopica) e pT3b (tumori con estensione extravescicale macroscopica). Da

alcuni studi effettuati, non è stata riscontrata alcuna differenza rispetto alla ripresa di malattia o alla sopravvivenza tra i pazienti con tumori pT3a e pT3b, mentre lo stato dei linfonodi e del margine chirurgico sono stati gli unici fattori associati alla prognosi dei pazienti. Infine con la classificazione pT4 si intende il carcinoma vescicale che coinvolge la prostata. [14]

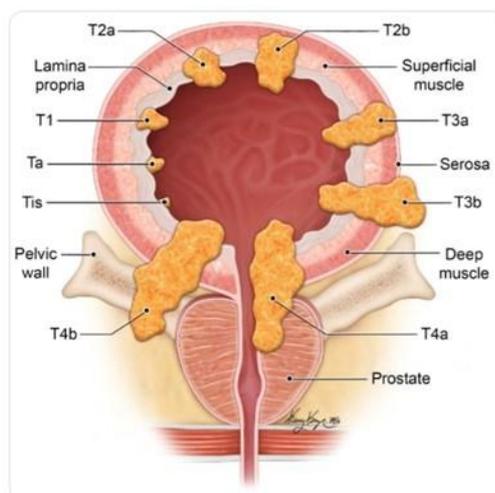


Figura 5 Rappresentazione dei gradi di profondità del tumore: pTa sono tumori confinati alla mucosa, pT1 sono tumori presenti nella lamina propria, pT2 sono tumori muscolo-invasivi che coinvolgono la *muscularis propria*, pT3 tumori con estensione extravescicale, pT4 carcinoma vescicale che coinvolge la prostata

Per quanto riguarda il grado di differenziazione cellulare, oltre alla classificazione TNM del 1973, che prevedeva la distinzione delle neoplasie in Grado 1, Grado 2 e Grado 3 è stata proposta e pubblicata dalla World Health Organization (WHO) nel 2004 la nuova classificazione che distingue il papilloma uroteliale (del tutto benigno) dalla neoplasia uroteliale a basso potenziale di malignità (PUNLMP) dai carcinomi uroteliali papillari di basso (LG) ed alto grado (HG). I tumori di basso grado presentano un aspetto complessivamente ordinato ma presentano una variabilità minima nell'architettura e/o nelle caratteristiche citologiche e hanno un basso rischio di progressione. I tumori di alto grado presentano invece un aspetto disordinato e presentano una marcata variabilità nell'architettura e/o nelle caratteristiche citologiche e hanno un alto rischio di progressione.[15]

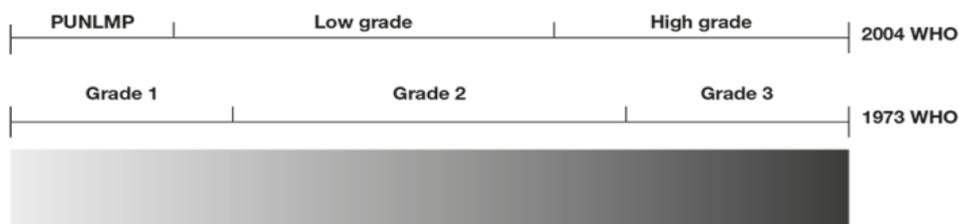


Figura 6 Confronto tra la classificazione del 1973 e quella del 2004

1.2.2 I fattori di rischio

Il principale fattore di rischio per il tumore vescicale è il tabagismo, che è responsabile di circa il 50-65% dei nuovi casi ogni anno. Il rischio relativo di mortalità per cancro alla vescica dovuto al fumo è secondo solo al cancro ai polmoni. Il fumo di tabacco contiene agenti cancerogeni noti come gli idrocarburi policiclici aromatici e la β -naftilammina. Il secondo fattore di rischio infatti, è l'esposizione agli idrocarburi policiclici aromatici, la β -naftilammina e le amine aromatiche, che portano alla formazione di addotti nel DNA e a mutazioni genetiche permanenti. I lavoratori più facilmente esposti a questo tipo di sostanze sono quelli impegnati nell'industria chimica, nell'industria tessile e del cuoio. Tali mutazioni possono attivare oncogeni o sopprimere i geni oncosoppressori. [16] [17]

Un ulteriore fattore di rischio è il genere, infatti in tutto il mondo, il cancro alla vescica è quattro volte più diagnosticato negli uomini rispetto alle donne, inoltre anche la mortalità è circa quattro volte maggiore. Anche il rischio relativo di morte per cancro alla vescica tra i fumatori è più elevato negli uomini rispetto alle donne. Molti studi hanno dimostrato che anche l'alcool potrebbe aumentare il rischio di sviluppare il cancro alla vescica, ma anche un alto consumo di carne rossa e di carni lavorate aumentano il rischio rispettivamente del 17% e del 10%. Anche il sovrappeso aumenta il rischio del 7% mentre l'obesità del 10%.

Il protozoo della schistosomiasi è un fattore di rischio per il carcinoma squamoso della vescica che è la seconda più comune forma di cancro nei paesi di basso e medio reddito, quindi principalmente Africa e Medio Oriente, e che causa all'anno circa 280.000 morti, il cui 3,5% riscontra problemi al sistema genitourinario. L'età media di incidenza del tumore in questi casi è tra i 40 e i 49 anni.[18] E' stato dimostrato che l'infezione da schistosoma nella vescica induce un'infezione batterica che genera molecole cancerogene come i composti N-nitrosi. L'infezione promuove anche l'infiammazione, inducendo la sintesi endogena di N-nitrosammine nonché di radicali liberi ossigenati dannosi per il DNA. Il carcinoma squamoso, è un tumore molto aggressivo che ha origine nelle cellule sottili e piatte che rivestono l'interno della vescica.[19]

1.2.3 Sintomi e diagnosi

La presenza di sangue nelle urine, definita ematuria, è il sintomo più comune del tumore alla vescica. Tra i sintomi meno comuni ci sono ad esempio la necessità di urinare con maggiore frequenza e la sensazione di bruciore durante la minzione; inoltre, se il tumore raggiunge uno stadio avanzato e diffuso, i sintomi possono includere il dolore pelvico, il dolore alle ossa e la perdita di peso. [20]

Gli attuali strumenti diagnostici per individuare il tumore della vescica sono principalmente la cistoscopia e la citologia urinaria. La cistoscopia è una metodica molto efficace, ma anche invasiva, perché consente di visualizzare le pareti interne dell'uretra e della vescica attraverso l'introduzione di un tubo molto sottile chiamato cistoscopio. La sensibilità e la specificità della metodica variano rispettivamente dal 62 all'84% e dal 43 al 98%, a seconda del tipo, dello stadio e del grado del tumore. La citologia urinaria è un metodo diagnostico non invasivo utilizzato nella pratica clinica, dove viene principalmente utilizzato un campione di urina casuale dalla minzione in modo che si possano andare a ricercare cellule tumorali esfoliate. La sensibilità complessiva varia dal 28 al 100% con una mediana del 44%, inoltre ha un'elevata sensibilità per i tumori di alto grado, ma una bassa sensibilità per i tumori di basso grado. Questo tipo di metodica è molto utile, soprattutto se utilizzata insieme alla cistoscopia, quando sono presenti neoplasie ad alto grado. Una citologia urinaria positiva indica la presenza di un tumore uroteliale in qualsiasi punto del tratto urinario. Tuttavia, una citologia negativa non esclude la presenza di un tumore, anche perché l'interpretazione citologica dipende anche dall'operatore e può essere ostacolata, ad esempio, da una bassa quantità cellulare, da infezioni del tratto urinario e da calcoli renali.[21]

Insieme alla cistoscopia, viene effettuata anche la biopsia o resezione transuretrale del tumore della vescica, che è la procedura standard per il tumore della vescica non muscolo-invasivo e che consiste nel prelevare una piccola quantità di tessuto da esaminare al microscopio. Questa procedura deve essere effettuata nella mucosa apparentemente normale per circa 1 cm intorno al tumore e alla base del tumore fino allo strato muscolare superficiale. I campioni, che vengono prelevati, devono essere esaminati per confermare l'assenza di reperti maligni. [22]

Dopo la diagnosi del tumore, vengono effettuati ulteriori esami per comprendere se il tumore della vescica si è diffuso ed ottenere informazioni riguardo alla stadiazione. Le informazioni

raccolte dal processo di stadiazione determinano lo stadio della malattia e il trattamento. Tra questi esami ad esempio c'è la TAC o tomografia computerizzata che consente di ottenere una serie di immagini dettagliate scattate da diverse angolazioni tramite i raggi X. La TAC può essere utilizzata per misurare le dimensioni del tumore e per identificare anche i linfonodi ingrossati, che possono indicare la diffusione del tumore. A volte, prima della scansione, viene somministrato un colorante, chiamato mezzo di contrasto, in modo da fornire maggiori dettagli all'immagine. Questo colorante può essere iniettato in vena al paziente, quindi per via endovenosa o somministrato sottoforma di liquido da ingerire.

C'è anche la risonanza magnetica, che utilizza campi magnetici per produrre immagini dettagliate del corpo e serve per misurare le dimensioni del tumore e per identificare i linfonodi, inoltre prima della scansione viene somministrato un colorante per creare un'immagine più chiara e dettagliata.

Viene utilizzata anche la tomografia a emissione di positroni che è di solito combinata con la TAC ed è una procedura per creare immagini di organi e tessuti all'interno del corpo. Una piccola quantità di sostanza radioattiva viene iniettata nel corpo del paziente e viene assorbita dalle cellule del corpo che utilizzano la maggior parte dell'energia, quindi il tumore, che tende ad utilizzare molti nutrienti, assorbe una gran quantità di sostanza radioattiva. Vengono utilizzati anche gli ultrasuoni, cioè le onde sonore riescono a creare un'immagine degli organi interni e servono a comprendere se i reni e gli ureteri sono ostruiti. In particolare, è stata introdotta la tecnica di micro-ultrasuoni ad alta risoluzione, che è stata proposta come metodo alternativo per la rilevazione del tumore e la differenziazione tra NMIBC e MIBC. Confrontando i risultati della risonanza magnetica e la tecnica di micro-ultrasuoni, la sensibilità e la specificità della prima erano del 76,3% e del 50% rispettivamente, mentre per la tecnica di micro-ultrasuoni erano entrambe dell'85%. [23]

L'ecografia è un metodo efficace per la rilevazione del tumore, in particolare è stata introdotta l'ecografia con contrasto, che è un'altra tecnica molto innovativa, utilizzata per differenziare il carcinoma uroteliale di alto e di basso grado, con una sensibilità dell'86% e una specificità del 90% per i tumori di alto grado ed una sensibilità dell'85% e una specificità dell'89% per i tumori a basso grado.[24]

1.3 Terapia del tumore alla vescica

Nell'ambito del trattamento del tumore vescicale, la raccomandazione prioritaria è quella di consigliare al paziente di interrompere il consumo di tabacco, sebbene le evidenze riguardanti la sopravvivenza specifica al cancro siano ancora oggetto di controversie.[25] Successivamente, conformemente alle indicazioni fornite dalle linee guida dell'EAU (European Association of Urology), è fondamentale distinguere tra le neoplasie Ta-T1 (NMIBC, Non Muscle Invasive Bladder Cancer) e le neoplasie \geq T2 (MIBC, Muscle Invasive Bladder Cancer).

1.3.1 Tumore della vescica non muscolo-invasivo (NMIBC)

La TURBT o asportazione trans-uretrale del tumore è la pietra miliare per la diagnosi e il trattamento del tumore della vescica infatti permette di valutare la stadiazione in modo da fornire informazioni che guideranno alla terapia più corretta.

La TURBT è riservata alle neoplasie che non coinvolgono lo strato muscolare e l'obiettivo principale è la completa resezione di tumori visibili, ad eccezione del carcinoma in situ (Cis). La procedura prevede l'inserimento di un resectoscopio attraverso l'uretra fino alla vescica. Attraverso questo strumento, il chirurgo esamina l'interno della vescica, individua e rimuove le lesioni tumorali. Esistono diversi metodi di asportazione endoscopica, come la resezione mono o bipolare e l'asportazione tramite laser.[26]

La strategia di resezione varia in base alle dimensioni della lesione, ma è stato dimostrato che effettuare una resezione separata delle lesioni più estese fornisce maggiori dettagli sull'estensione orizzontale e verticale della neoformazione, associandosi ad una maggiore radicalità dell'intervento. La presenza del muscolo detrusore nel muscolo asportato è importante per garantire la completezza dell'intervento, poiché l'assenza è correlata ad un aumento del rischio di patologia recidiva precoce. [27]

Per poter ridurre la probabilità di recidiva e di malattia residua alla prima TURBT, si raccomanda una seconda TURBT, chiamata re-TURBT. In particolare, per le lesioni di stadio T1, si osserva un rischio di malattia residua compreso tra il 33% e il 55%, mentre per i tumori di stadio Ta questo rischio si attesta intorno al 41,14%. La re-TURBT si presenta come un

intervento in grado di mitigare il problema della sotto-stadiazione delle lesioni associato alla TURBT primaria. Nel caso di una lesione muscolo-invasiva, la sua identificazione con la seconda resezione di un iniziale T1 si verifica nel 1,5-25% dei casi. Tale percentuale aumenta al 45% in situazioni in cui manca la tonaca muscolare o la sua quantità risulta insufficiente durante la prima resezione. [28]

Questa seconda resezione deve essere effettuata entro due-sei settimane dalla prima TURBT nei pazienti che presentano invasione tumorale nella lamina propria o in quelli in cui la resezione è considerata incompleta. [29] La re-TURBT è invasiva, però si associa ad un aumento della sopravvivenza del paziente e da alcuni studi, è stato dimostrato che il maggior beneficio è stato ottenuto da pazienti con tumore T1, mentre i pazienti con tumori di alto grado hanno avuto maggiore recidiva e progressione. [30]

Ad oggi ci sono prove che la re-TURBT possa essere risparmiata in alcuni casi a favore di trattamenti conservativi come la terapia intravesicale o la terapia farmacologica, o trattamenti radicali immediati come la cistectomia parziale o radicale, la radioterapia; infatti ci si sta sempre più avvicinando alla medicina di precisione, in cui i trattamenti sono personalizzati in base alle caratteristiche dei pazienti e dei tumori. [31]

1.3.2 Terapia adiuvante

Chemioterapia intravesicale

Nonostante la TURB sia molto efficace, a volte questi tumori vengono trattati con terapie a sostegno del trattamento in modo da ridurre il rischio di recidiva ed avere una miglior prognosi.

Il tumore NMIBC di solito non è immediatamente pericoloso per la vita, a differenza della sua controparte muscolo-invasiva, ma è caratterizzato da tassi significativi di recidiva che vanno dal 50% all'80%, con un potenziale di progressione tra il 10% e il 45%. Per ridurre questo rischio si utilizza la terapia intravesicale che prevede o l'immunoterapia con bacillo di Calmette-Guérin (BCG) o la chemioterapia. [32]

L'immunoterapia con il BCG è un metodo che coinvolge il sistema immunitario del paziente e che ha come obiettivo quello di modificare o aumentare i meccanismi di difesa contro il tumore in via di sviluppo. Il bacillo Calmette Guérin, è un ceppo indebolito di *Mycobacterium bovis* ed è somministrato ai pazienti con malattia moderata o ad alto grado. Diversi studi hanno dimostrato che l'uso della terapia BCG in seguito alla resezione

transuretrale dei tumori della vescica, riduce il rischio di recidiva rispetto all'utilizzo della sola resezione transuretrale. Attualmente, la terapia intravesicale con BCG è una pratica standard nel trattamento del tumore alla vescica non muscolo invasivo (NMIBC), tra cui anche il carcinoma *in situ* e i tumori vescicali T1G3. Il meccanismo di azione del vaccino BCG non è stato ancora pienamente compreso, ciò che però è certo, è che provoca una forte risposta immunitaria innata che porta all'immunità adattativa a lungo termine. La terapia BCG provoca una reazione infiammatoria che coinvolge diversi sottoinsiemi di cellule immunitarie quali linfociti CD4+ e CD8+, le cellule NK, i granulociti, i macrofagi e le cellule dendritiche, che uccidono le cellule tumorali per citotossicità diretta dovuta alla secrezione di composti tossici, come il ligando che induce il fattore di necrosi tumorale.

L'immunoterapia BCG fornisce un'alta percentuale di risposta positiva che è circa il 55-65% per i tumori papillari ad alto rischio e il 70-75% per il carcinoma *in situ*. Purtroppo, il 25-45% dei pazienti non trae beneficio dalla terapia con BCG e circa il 40% dei pazienti ha una ricaduta nonostante i successi iniziali con il BCG. [33]

La chemioterapia prevede l'utilizzo di farmaci che servono per bloccare la crescita delle cellule tumorali. Un'unica somministrazione di chemioterapico nel periodo immediatamente successivo all'intervento chirurgico potrebbe svolgere una duplice funzione: eliminare le cellule neoplastiche disperse durante l'asportazione e anche distruggere eventuali cellule residue nel sito operatorio. In particolare, si è notato che l'applicazione singola di chemioterapico dopo una resezione transuretrale della vescica potrebbe ridurre il rischio di recidiva del 11,7-13% rispetto alla sola resezione transuretrale della vescica. Tra i chemioterapici intravesicali attualmente in uso ci sono la Pirarubicina, l'Epirubicina, la Gemcitabina.

La Pirarubicina (THP) ha un forte effetto citotossico, infatti può eliminare tumori residui, cellule tumorali esfoliate e ridurre il tasso di recidiva. Alcuni studi hanno dimostrato che la Pirarubicina può agire con rapida diffusione ed assorbimento selettivamente sulle cellule tumorali, ma viene raramente assorbita dai tessuti normali. Inoltre, ha molti meno effetti collaterali come cardiotossicità e disfunzione gastrointestinale rispetto ad altri farmaci.

L'Epirubicina (EPI) appartiene alla classe dei farmaci antitumorali delle antracicline ed è un farmaco antitumorale non specifico. Il principio dell'Epirubicina è controllare innanzitutto la DNA polimerasi e quindi prevenire la replicazione e la trascrizione del DNA tumorale. L'Epirubicina ha una forte attività antitumorale, e una velocità di diffusione rapida, induce una

minore farmaco-resistenza, e pochi effetti collaterali tra cui pollachiuria e dolore durante la minzione.

La Gemcitabina è un farmaco antitumorale antimetabolita pirimidinico che interrompe la replicazione cellulare e agisce sulla fase S del ciclo cellulare. Dopo essere entrato nella cellula, viene attivato dalla deossicitidina chinasi e convertito in Gemcitabina difosfato e Gemcitabina trifosfato nella cellula. La Gemcitabina difosfato può promuovere il legame competitivo della Gemcitabina trifosfato al DNA attraverso l'effetto sinergico per impedire l'ulteriore sintesi del DNA ed esercitare il suo effetto antitumorale. Il meccanismo d'azione della Gemcitabina è diverso da quello dell'EPI e del THP, ma entrambi esercitano effetti antitumorali interferendo con la normale divisione delle cellule tumorali.[34]

La tempistica di somministrazione del chemioterapico è cruciale e dovrebbe avvenire entro la prima ora dall'intervento, poiché le cellule diventano meno suscettibili dopo poche ore, essendo già saldamente impiantate e protette dalla matrice extracellulare. La necessità di ulteriori instillazioni sarà determinata in base alla classe di rischio del paziente, infatti nei pazienti a basso rischio, la singola applicazione è considerata il trattamento standard e spesso sufficiente. Una vasta meta-analisi ha evidenziato che l'uso della chemioterapia adiuvante rispetto alla sola TURB riduce del 44% il rischio di recidiva a un anno. Tuttavia, a differenza del BCG, non sembra associato a una diminuzione del rischio di progressione.[35]

Quindi, si tratta del trattamento clinico più comunemente utilizzato per prevenire la recidiva, aumentare il tasso di sopravvivenza del paziente, prevenire l'infiltrazione e la metastatizzazione. La quantità di farmaco somministrata, la frequenza delle dosi e la durata del ciclo di trattamento sono tutti fattori che influenzano l'efficacia del trattamento. Solo all'interno di un intervallo adeguato è possibile esercitare il massimo effetto terapeutico. In caso contrario, non solo si riduce l'effetto clinico, ma aumentano anche gli effetti collaterali tossici. Pertanto, ci sono ancora alcune controversie riguardo al tipo, al dosaggio, al corso del trattamento e alla scelta del metodo di infusione della chemioterapia intravesicale.[36]

1.3.3 Trattamento Carcinoma *in situ* (Cis)

Durante la cistoscopia, il carcinoma *in situ* (Cis) di solito appare come un'area vellutata ed eritematosa e di difficile distinzione da un processo infiammatorio o potrebbe non essere visibile affatto. Per questo motivo, si consigliano di eseguire biopsie multiple sulla mucosa di aspetto normale, soprattutto in presenza di una citologia urinaria positiva o sospetto di neoplasia

ad alto rischio. [37] Laddove disponibile, l'adozione di un esame fotodinamico (PDD) può essere sfruttata per migliorare l'orientamento delle biopsie nel mapping. Nel contesto di neoplasie localizzate nel trigono o nel collo vescicale, tumori Cis o lesioni multiple, è consigliata una biopsia dell'uretra prostatica. [38] [39]

L'approccio endoscopico da solo risulta insufficiente per trattare il carcinoma in situ (Cis), che per definizione è una neoplasia di alto grado. E' necessario integrare il trattamento con BCG o chemioterapia, la quale fornisce una risposta completa nel 48% dei casi, mentre il BCG aumenta tale percentuale al 72-93%. [40] Tuttavia, fino al 50% dei pazienti con risposta completa può sviluppare recidive a rischio di progressione o manifestazioni di malattia al di fuori della vescica.[41]

In una metanalisi, è stato dimostrato che il BCG riduce il rischio di progressione del 35% rispetto alla chemioterapia o ad altre immunoterapie, però il trattamento combinato del BCG con il chemioterapico non ha mostrato vantaggi rispetto al solo trattamento con BCG. [42] I pazienti con Cis presentano maggiore rischio di coinvolgimento al di fuori della vescica e dell'uretra prostatica. Riguardo alla prostata, le cellule tumorali possono localizzarsi solo nell'epitelio che riveste l'uretra prostatica o entrare nei dotti prostatici. [43] In questo caso, possono essere eseguite instillazioni di BCG, e eventualmente una resezione transuretrale della prostata per favorire il contatto del BCG con le cellule neoplastiche.[44]

1.3.4 Follow up

Data la possibilità di recidiva e progressione del tumore vescicale, è molto importante gestire attentamente la malattia nel tempo, stabilendo un piano di follow-up. In particolare, è cruciale rilevare e trattare prontamente eventuali recidive in caso di lesioni ad alto grado, poiché ritardi possono influire negativamente sulla sopravvivenza del paziente, a differenza dei tumori a basso rischio. [45] Inoltre, l'esito della prima cistoscopia di controllo, programmata a tre mesi dall'intervento in regime ambulatoriale, costituisce un significativo fattore prognostico per recidiva e progressione.[46]

La durata del follow-up varia in base all'aggressività del tumore: per lesioni a basso rischio, è possibile interrompere i controlli o sostituire la cistoscopia con esami meno invasivi dopo cinque anni liberi da malattia. [47] Al contrario, per lesioni di alto grado, considerando la possibilità di recidiva anche dopo 10 anni di sopravvivenza libera da malattia e la forte

correlazione con neoplasie dell'alta via urinaria, è consigliato continuare i controlli per tutta la vita. [48] Attualmente, nessun metodo non invasivo può sostituire efficacemente la cistoscopia.

1.3.5 Fallimento della Terapia Intravesicale

La terapia mediante chemioterapico o BCG può manifestare insuccessi. Nel caso di una recidiva dopo la terapia con chemioterapico, si potrebbe considerare l'utilizzo di installazioni di BCG, poiché l'immunoterapia non risulterebbe influenzata dal precedente trattamento. Più complesso è affrontare il fallimento della terapia con BCG, che si verifica in presenza delle seguenti condizioni:

- Documentazione di una progressione verso una forma muscolo-invasiva
- Insorgenza di una neoplasia non infiltrante di alto grado o di carcinoma in situ (Cis) entro tre mesi dalla conclusione del ciclo di induzione
- Sviluppo di una neoplasia di alto grado durante il trattamento con BCG
- Qualsiasi deterioramento dei fattori prognostici durante il trattamento, come la riduzione dell'intervallo libero tra le recidive, l'incremento dello stadio o del grado, o la comparsa di Cis in modo indipendente dalla risposta iniziale.

In tali casi, la risposta a trattamenti successivi è spesso limitata, e la cistectomia diventa la terapia di elezione. Tuttavia, alcuni studi suggeriscono che un ciclo aggiuntivo di BCG potrebbe ottenere una risposta completa in oltre il 50% dei pazienti con neoplasie persistenti a tre mesi, sia in caso di neoplasie papillari che di Cis.

Esistono inoltre strategie alternative mirate a evitare o ritardare l'intervento chirurgico, classificate in approcci chemioterapici, immunoterapici, terapie device-assistite, terapie combinate. Tuttavia, attualmente, tali strategie sono considerate meno efficaci.

1.3.5 Tumore della vescica muscolo-invasivo (MIBC)

Le malattie non muscolo-invasive possono progredire e diventare neoplasie muscolo invasive, sulle quali si può intervenire tramite un intervento chirurgico per rimuovere la vescica (cistectomia radicale), tramite la chemioterapia e la radioterapia radicale. Le opzioni terapeutiche per i pazienti con MIBC sono quindi dirette sia alla vescica che alla possibile diffusione della malattia ai linfonodi.[49]

La cistectomia radicale è il trattamento standard contro il MIBC ed è indicata come terapia di prima linea. Viene raccomandata nei casi di tumore con stadio T2-T4a, senza coinvolgimento dei linfonodi (N0-Nx), e senza metastasi (M0). È indicata inoltre, per i tumori della vescica NMIBC ad alto rischio di recidiva, nei casi di carcinoma in situ refrattario al trattamento con BCG, nei tumori di stadio T1G3. [50] Questa procedura prevede la rimozione di parte della vescica, dei linfonodi e degli organi vicini che presentano il tumore. Nei maschi prevede la rimozione della prostata e delle vescicole seminali mentre nelle femmine possono essere rimossi anche gli organi riproduttivi (ovaie, utero e parte anteriore della vagina). La cistectomia radicale può essere eseguita per la malattia ad alto rischio. È stato riportato che l'incidenza delle complicanze dopo questo intervento chirurgico è compresa tra il 30% e il 70%, e sono complicanze gastrointestinali (29%), infettive (25%), cardiache (11%) e genito-urinarie (11%).[51]

La tecnica è stata perfezionata nel tempo, ma i tassi di complicanze e la morbilità rimangono alti dopo la cistectomia radicale. Sono state sviluppate tecniche minimamente invasive, tra cui la cistectomia radicale laparoscopica assistita da robotica, ma i risultati non hanno ancora avuto un impatto significativo sulla qualità di vita del paziente.[52]

1.3.4 Chemioterapia neoadiuvante

Il trattamento standard per il tumore della vescica MIBC è la cistectomia radicale. Tuttavia, questa procedura presenta un tasso di sopravvivenza a 5 anni del 50%. Al fine di migliorare questi risultati, è stata proposta la chemioterapia neoadiuvante, importante per ridurre le dimensioni del tumore e per l'eradicazione delle metastasi, che, secondo una metanalisi, contribuirebbe ad aumento del 5% nella sopravvivenza a 5 anni. Ulteriori studi hanno confermato l'efficacia della terapia neoadiuvante, mostrando un incremento complessivo della sopravvivenza dell'8% e fino all'11% nel sottogruppo T3. Da alcuni studi effettuati su pazienti con carcinoma della vescica si è visto che il tasso di sopravvivenza è del 57% per quei pazienti che hanno ricevuto tre cicli di chemioterapia neoadiuvante seguiti da cistectomia rispetto al 43% dei pazienti sottoposti alla sola cistectomia. In particolare, le diverse analisi hanno confermato che la chemioterapia neoadiuvante di cisplatino con la chirurgia ha un modesto beneficio sulla sopravvivenza di circa il 5%. [53]

I benefici del trattamento neoadiuvante sono molteplici: consente di affrontare l'intervento chirurgico con una percentuale notevolmente ridotta di micro-metastasi, c'è maggiore adesione

del paziente alla terapia e una migliore tollerabilità dell'intervento. Per quanto riguarda gli svantaggi, al momento non esistono studi che dimostrino l'influenza negativa nel ritardare una cistectomia dopo una terapia neoadiuvante. Questo tipo di terapia dovrebbe essere proposta esclusivamente a pazienti responsivi al Cisplatino, poiché studi che non includono questo farmaco sembrano essere meno efficaci. La risposta a due cicli di terapia sembra influire significativamente sull'esito finale, ma attualmente né la PET, né la RM sono riuscite a predire la risposta del paziente.

Attualmente, solo la combinazione di Cisplatino e un secondo agente chemioterapico come Vinblastina, Metotrexato, ha dimostrato di offrire un beneficio terapeutico significativo. Si stanno sviluppando approcci più moderni con combinazioni di farmaci alternativi, come Gemcitabina e Cisplatino, ma non sono ancora stati testati in un numero sufficiente di studi clinici.

In sintesi, la terapia neoadiuvante dovrebbe essere presa in considerazione per i pazienti con neoplasia di stadio T2-T4a, cN0M0, scegliendo tra i vari schemi che includono il Cisplatino, ma solo per quei pazienti che rispondono a questo farmaco. Tuttavia, nonostante diversi studi dimostrino il beneficio della chemioterapia a base di cisplatino combinata con la cistectomia, l'implementazione pratica di questo approccio è stata limitata, anche se l'uso è aumentato notevolmente dal 2010. La chemioterapia neoadiuvante standard è stata sostituita da regimi meno tossici come la gemcitabina-cisplatino, con una sopravvivenza specifica a cinque anni dell'87% e una sopravvivenza libera da malattia del 58%. [54]

1.3.5 Radioterapia neoadiuvante

La radioterapia è un trattamento alternativo, che ha portato a risultati buoni, soprattutto per pazienti troppo fragili per sottoporsi alla cistectomia o che rifiutano l'intervento. [55] Nella maggior parte dei casi, la radioterapia viene utilizzata in pazienti con malattia progressiva o in recidiva, dopo molte resezioni transuretrali di tumori della vescica (TURB) combinati o no con la terapia intravescicale. Non ci sono prove che la radioterapia offra una maggiore probabilità di conservazione della vescica urinaria rispetto ad altri trattamenti. Quindi, la resezione trans-uretrale seguita da radioterapia potrebbe essere un trattamento alternativo per i tumori invasivi. Tra i pazienti con MIBC non è stata osservata alcuna differenza di sopravvivenza tra quelli trattati con radioterapia e quelli sottoposti a cistectomia. La sopravvivenza specifica a cinque anni dei pazienti trattati con radioterapia è stata del 41%. Ci

sono poi diversi tipi di radioterapia, ad esempio è molto utilizzata la radioterapia preoperatoria che è utilizzata prima dell'intervento chirurgico per ridurre la possibilità di diffusione della malattia, nonché di eradicare i centri microscopici del tumore che avrebbero potuto essere oltre i margini di resezione. All'inizio, molti studi hanno dimostrato un reale beneficio nell'uso della radioterapia rispetto alla cistectomia con un beneficio di sopravvivenza a cinque anni del 5% rispetto alla sola chirurgia. Ci sono però stati anche risultati contrastanti, quindi si è arrivati alla conclusione che la radioterapia pre-operatoria non è raccomandata nel trattamento del carcinoma urinario invasivo della vescica. Anche la radioterapia post-operatoria, dopo la cistectomia radicale, viene raramente somministrata, perché ci sono stati gravi effetti collaterali legati all'irradiazione nel periodo post-chirurgico. I tassi di complicazione variano intorno al 20% e questo tipo di radioterapia deve essere considerata solo in situazioni particolari come le recidive.

Fino allo sviluppo delle moderne tecniche chirurgiche per l'esecuzione della cistectomia, la radioterapia era ampiamente usata come modalità di trattamento radicale ed esclusiva. Al giorno d'oggi, la radioterapia deve essere usata solo in pazienti che presentano un alto rischio di complicanze durante l'intervento chirurgico o con malattia avanzata. [56]

1.3.6 Immunoterapia

Nel complesso, il tumore della vescica è una malattia geneticamente eterogenea, con un alto tasso di mutazioni somatiche, compresi i geni coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, nella regolazione della cromatina e nelle vie di segnalazione. Le proteine di morte cellulare programmata 1 (PD-1) espresse sui linfociti e i loro ligandi PD-L1 e PD-L2 fanno parte di un checkpoint del sistema immunitario, che regola negativamente il sistema immunitario per indebolire la sua risposta. Il legame PD-1 a PD-L1 blocca l'attivazione delle cellule T, riducendo così la produzione di IL-2 e interferon-gamma. Ciò garantisce l'auto-tolleranza impedendo al sistema immunitario di attaccare le cellule del corpo, ma può anche impedire al sistema immunitario di attaccare le cellule tumorali che esprimono PD-L1. Gli inibitori PD-1/PD-L1 sono anticorpi che bloccano una di queste due molecole, annullando l'attività dei checkpoint e quindi attivando le cellule T. Sono stati introdotti per la prima volta come terapia di seconda linea, ma si stanno lentamente affermando come terapia di prima linea. Attualmente ci sono tre inibitori PD-L1 e due inibitori PD-1 approvati dalla FDA. [57]

Il primo è Atezolizumab, un anticorpo umanizzato che è stato il primo inibitore del checkpoint PD-1/PD-L1 e che è raccomandato per i pazienti con malattia avanzata o metastatica, in cui il trattamento con derivati del platino è stato inefficace.

L'Avelumab è un anticorpo IgG1 diretto contro il PD-L1, che è stato approvato solo nel 2017 per il carcinoma uroteliale. Questo anticorpo ha indotto una risposta antitumorale persistente in pazienti che precedentemente erano stati sottoposti alla chemioterapia a base di platino.

Il Durvalumab è un anticorpo monoclonale IgG1k approvato solo nel 2017. Alcuni studi hanno confermato l'efficacia di Durvalumab: il 20,4% dei pazienti ha mostrato una risposta immunitaria al farmaco e il 4,9% ha mostrato la scomparsa completa del tumore, inoltre sono state riscontrate delle risposte maggiori soprattutto nei pazienti con elevata espressione di PD-L1.

Nivolumab è un anticorpo monoclonale umano di tipo IgG4 approvato nel 2017 con un tasso di risposta completa o parziale del 20%, però sono stati riscontrati anche nel 59% dei pazienti delle reazioni avverse e il 10% ha manifestato eventi avversi gravi.

Il Pembrolizumab è un anticorpo monoclonale umanizzato IgG4/K utilizzato nel trattamento di vari tipi di tumore. L'uso di questo farmaco ha comportato una sopravvivenza media più lunga di circa tre mesi ed è stato anche notato un profilo di sicurezza migliore rispetto agli altri farmaci. È stata osservata una relazione tra l'efficacia del farmaco e l'abitudine tabagica, che può suggerire un elevato carico mutazionale nei fumatori, inoltre è stato confermato essere una terapia razionale per pazienti con difetti nella riparazione del DNA.

Compound	Nome commerciale	La società	Il target	Data di approvazione	La sperimentazione clinica che porta all'approvazione
Atezolizumab	Il Tecentriq di Tecentriq	Il dio di Genentech	PD-L1	Il 2016	IMVigor210 [48]
Avelumab	Il Bavencio	La Merck	PD-L1	Nel 2017	JAVELIN [49]
Testa di Durvalumab	I di Imfinzi	AstraZeneca	PD-L1	Nel 2017	Studio 1108 [50]
A sangue di Nivolumab	Opdivo	Bristol-Meyers Squibb	La PD-1	Nel 2017	CheckMate 275 [51]
Il Pembrolizumab	Il Keytruda	La Merck	La PD-1	Il 2019	KEYNOTE-057 [52]
: Ipilimumab	A Yervoy - La	Bristol-Meyers Squibb	CTLA-4	Il 2019	"term-id":"NCT01524991"-NCT01524991 [53]

Tabella 1 Elenco degli anticorpi inibitori del checkpoint approvati utilizzati nel trattamento del tumore alla vescica: Atezolizumab anticorpo inibitore del checkpoint PD-L1, Avelumab anticorpo inibitore del checkpoint PD-L1, Durvalumab anticorpo inibitore del checkpoint PD-L1, Nivolumab anticorpo inibitore del checkpoint PD-1, Pembrolizumab anticorpo inibitore del checkpoint PD-1, Ipilimumab anticorpo inibitore di CTLA-4

L'Ipilimumab è un anticorpo monoclonale anti-CTLA-4, utilizzato inizialmente per il trattamento del melanoma, però può essere utilizzato anche con Nivolumab per il trattamento del carcinoma renale avanzato di diversi tipi di tumore del colon-retto metastatico. La proteina 4 associata ai linfociti T citotossici (CTLA-4) è una molecola di superficie espressa dalle cellule T attivate ed è inoltre, il co-stimolante necessario per la loro attivazione.[58]

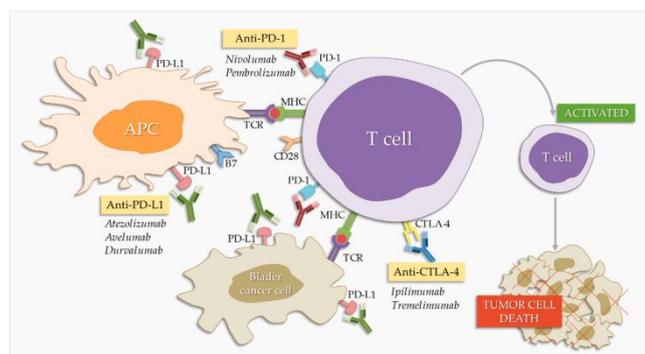


Figura 7 Effetti degli inibitori del checkpoint nel trattamento del cancro alla vescica. I bloccanti PD-1/PD-L1 e CTLA-4 interferiscono con le molecole inibitorie del checkpoint inibitorie del sistema immunitario portando all'attivazione delle cellule T e alla morte delle cellule tumorali.

1.4 Biomarcatori tumorali

Nel corso degli anni, sono state condotte diverse indagini sui biomarcatori tumorali con l'obiettivo di identificare un nuovo strumento diagnostico. Questo dovrebbe essere utilizzabile anche nel follow-up, al fine di risolvere alcune delle principali sfide associate alle tecniche attualmente impiegate. L'obiettivo primario è sviluppare un test non invasivo, economico e con una specificità e sensibilità pari o superiori a quelle delle metodiche attualmente in uso. Infatti, rispetto alla citologia e alla cistoscopia, i biomarcatori studiati fino ad ora, hanno una buona sensibilità, anzi molti studi hanno evidenziato che la combinazione tra due o più biomarcatori porta ad una sensibilità del 100% e ad un'accuratezza del 95%. Tuttavia, è importante notare che, nonostante l'alta sensibilità e accuratezza, la specificità dei biomarcatori è molto più bassa rispetto alla citologia urinaria, che mantiene una specificità del 100%, contro la specificità dell'85% dei marcatori.[59]

L'uso dei biomarcatori mirerebbe a ridurre i costi, specialmente per quanto riguarda il follow-up, e a superare la limitata sensibilità della citologia, soprattutto nei tumori di basso grado, e della cistoscopia, particolarmente per quanto riguarda l'identificazione dei Carcinomi in situ (Cis). Fino a questo momento, nessun marcatore è stato in grado di soddisfare appieno tali requisiti e di essere integrato nella pratica clinica. Il limitato uso in ambito diagnostico può renderli utili in circostanze specifiche, ad esempio nei casi in cui la citologia urinaria risulti di difficile interpretazione. Inoltre, questi biomarcatori sono facilmente influenzabili da patologie benigne e trattamenti precedenti, come il BCG.

I test che valutano diversi biomarcatori in combinazione possono trovare impiego come test di screening, metodica di indagine in pazienti che presentano ematuria o altri sintomi associati al carcinoma vescicale o nella sorveglianza post-diagnosi del NMIBC. Tuttavia, al di fuori degli studi clinici, l'esecuzione di tali test non è raccomandata perché nessuno di essi ha attualmente raggiunto i livelli di accuratezza necessari per l'applicazione pratica in ambito clinico.

Marker	Sensibilità %	Specificità %
Urovysion	40,8-75,6	84,8-87,8
BTA stat	58	73
NMP22	47-100	58-98
Immunocyt/uCyt+	87	78
Xpert	93,5	95,5
Bladder Epicheck	91,7	88
Uromonitor	87,2	99,2
CX Bladder	82	85
Citocheratine	12-88	73-95
Survivina	86	94
TERT	47	100
Test Rapido	64	64
Fibrinogeno	66-85	66-85
VEGF	68-83	83-97
Clusterina	70-87	83-97
sFas	88	89
Antigene CD44	50-86	72-79
Telomerasi	90	88
Ialuronidasi test	91-100	84-90
Fibronectina	81	80
Metabolomica	91-100	93-100
BLCA-1	80	87
BLCA-4	89-96	90-100
FGFR-3	50-90	60-90
AURKA (FISH)	87	97
AURKA (PCR)	84	65
miRNA	100	100
Microsatelliti	79-84	85-100
Metilazione	82-89	94-100

Tabella 2 Biomarcatori tumorali e relativa sensibilità e specificità

1.4.1 Biomarcatori tumorali approvati dalla Food and Drug Administration (FDA)

- Urovysion:** è uno tra i test approvati dalla FDA inizialmente per la sorveglianza del tumore ricorrente e successivamente esteso alla rilevazione del tumore della vescica in pazienti con ematuria. È stato più volte confrontato con la citologia urinaria, che è altamente specifica per la rilevazione di tumori di alto grado, ma presenta bassa sensibilità, specialmente nei casi di basso grado. L'Urovysion è stato progettato per rilevare le comuni anomalie cromosomiche osservate nel tumore alla vescica, cioè polisomie per i cromosomi 3,7, 17 e 9p21 nei campioni di urina mediante *fluorescence in situ hybridization* (FISH). Nonostante l'uso di UroVysion

come supplemento alla citologia urinaria sia stato generalmente visto favorevolmente, gli studi hanno mostrato che la sensibilità e la specificità di UroVysion erano rispettivamente del 75,6% e dell'84,8% per tumori di alto grado e 40,8% e 87,8%, rispettivamente per tumori di basso grado, a causa di un elevato numero di falsi positivi, dovuto alla presenza di gruppi di cellule ad ombrello (potrebbero essere cellule tetraploidi uniformi) e infezione virale da poliovirus umano. Gli studi hanno dimostrato che i pazienti con test UroVysion positivo post BCG presentano fallimento del trattamento rispetto a quelli con risultato negativo e sono a più alto rischio di progressione verso la malattia invasiva muscolare. Pertanto, i pazienti con test UroVysion positivo ma citologia negativa, avevano maggiori probabilità di incorrere in future recidive.[60]

- **Bladder tumor-associated antigen (BTA):** questo è un tipo di test qualitativo rapido, non invasivo che rileva la proteina correlata al fattore di complemento H nelle urine. È utilizzato per la diagnosi ed il follow-up, e comprende BTA stat (test immunocromatografico) e BTA 31 TRAK (kit ELISA), che hanno sensibilità e specificità rispettivamente del 58 e 73%. L'analisi BTA è approvata dalla FDA per il monitoraggio del tumore della vescica con cistoscopia, ma non per lo screening iniziale. [61] È limitato l'impiego di questo marcatore soprattutto a causa della presenza di molti falsi positivi dovuti a presenza di infezioni urinarie, cistiti, trattamento con BCG.[62]
- **Nuclear Matrix Protein 22 (NMP22):** è un marcatore tumorale della matrice nucleare, di cui esistono due formati di analisi, vale a dire: NMP22 Bladder Cancer ELISA e il test NMP22 BladderChek point of care (POC) nel rilevamento e nel follow-up del tumore alla vescica.[63] BladderChek è un test immunologico specifico per la proteina dell'apparato mitotico nucleare (NuMA), un componente abbondante della matrice nucleare, che può essere sovra-espresso nel nucleo di diverse cellule tumorali in cui l'aneuploidia è un fattore comune nel guidare la progressione tumorale. Inoltre, questo test ha una bassa sensibilità, ma un'elevata specificità, caratteristiche importanti per la diagnosi precoce. [64]
- **ImmunoCyt:** test che utilizza tre anticorpi monoclonali M344, LDQ10 e 19A211 per ricercare tre antigeni differenti specifici del carcinoma a cellule transizionali nelle cellule uroteliali esfoliate. [65] È stata riscontrata rispetto alla citologia urinaria, una maggiore sensibilità ed è stato proposto anche l'uso combinato di queste due tecniche per migliorare la sensibilità nella rilevazione del tumore alla vescica. Questo test presenta una sensibilità dell'87% e una specificità del 78%, inoltre può fornire informazioni in caso di ematuria, in particolare in

pazienti con cistoscopia negativa ma con citologia atipica. Dato che può essere altamente influenzato da infezioni, non è consigliato l'uso diagnostico. [66]

1.4.2 Biomarcatori tumorali non ancora approvati dalla Food and Drug Administration (FDA)

Recentemente alcuni nuovi test per il monitoraggio e il rilevamento del tumore vescicale si sono resi disponibili commercialmente tra cui Xpert bladder cancer (Cepheid; Sunnyvale, California, USA), Bladder EpiCheck (Nucleix; Rehovot, Israel), Uromonitor (U-Monitor; Porto, Portugal) e Cxbladder Monitor. [67] Uno studio di metanalisi ha dimostrato che questi test implementano l'accuratezza della citologia nel monitoraggio di pazienti con pregresso tumore vescicale. I dati relativi alla loro accuratezza relativamente alla diagnosi sono invece ancora preliminari perché sarebbero necessarie validazioni su ampie coorti di pazienti. [68]

- **Xpert:** è un test che si basa sulla rilevazione di cinque mRNA target: ABL1, una tirosin-chinasi che si trova espressa nella progressione di diversi tumori solidi; UPK1B (uroplakin) è una proteina strutturale delle cellule uroteliali che può essere molto elevata nei pazienti con tumore alla vescica. CRH è secreta dall'ipotalamo e regola la risposta biologica e psicologica allo stress, svolgendo un ruolo nella regolazione dello sviluppo di diversi tumori; ANXA10 è un membro della famiglia di proteine leganti fosfolipidi calcio-dipendenti e svolge un ruolo nella regolazione della crescita cellulare. IGF2 è sovra-espresso nei pazienti con tumore della vescica. Questo test utilizza la reazione a catena di trascrizione-polimerasi in tempo reale (RT-PCR) ed è utile soprattutto nei pazienti con recidiva; inoltre, presenta una sensibilità maggiore rispetto alla citologia urinaria, che ancora presenta la massima specificità. L'uso combinato di questi due test sembra possa migliorare la sensibilità, infatti alcuni studi hanno mostrato una sensibilità del 54,2% dei due test combinati, rispetto al solo X-pert del 52,4%. [69]
- **Bladder Epicheck:** è un marcatore urinario di recente sviluppo basato sui cambiamenti di metilazione del DNA e analizza quindici biomarcatori potenzialmente associati alla presenza o l'assenza di tumore alla vescica. La metilazione del DNA è un processo ben studiato in molti tumori, in particolare quello della vescica, perché altera l'espressione genica che coinvolge tipicamente oncogeni e oncosoppressori, un processo già correlato alla progressione della malattia in NMIBC. La metilazione del DNA nel tumore della vescica è stata descritta e convalidata per la correlazione alla progressione di tumori primari della vescica pTa alla

malattia muscolo-invasivo. La metilazione è stata anche segnalata come utile nei pazienti affetti da ematuria per ridurre le cistoscopie diagnostiche. Sono state confrontate la sensibilità e la specificità di questo test con la citologia urinaria e si è evinto che la sensibilità del test era maggiore alla citologia, mentre la specificità era sempre maggiore nella citologia urinaria. Con questo test si è riscontrata una sensibilità del 91,7% e una specificità dell'88%, quindi questo test potrebbe servire come test di esclusione e contribuire a evitare procedure cistoscopiche inutili nel follow-up del NMIBC, dato che la recidiva di alto grado verrebbe individuata con elevata probabilità.[70]

- **Uromonitor:** è un test che rileva le mutazioni in tre geni: TERT, FGFR3 e KRAS per la valutazione della recidiva della malattia. Inoltre, presenta una sensibilità dell'87,2% e una specificità del 99,2%. Questo test presenta un ottimo potenziale come alternativa o complemento all'attuale programma di follow-up, anche quando si osservano lesioni dubbie o equivoche durante la cistoscopia. Uromonitor potrebbe essere utilizzato non solo come complemento dei metodi attuali, ma anche come strumento di stratificazione del rischio per valutare l'aggressività del tumore e guidare la pianificazione del trattamento. Nei pazienti affetti da NMIBC a rischio basso e intermedio, l'Uromonitor potrebbe alleviare in modo significativo l'impatto oneroso del follow-up, riducendo il disagio del paziente, la morbilità e i costi sostanziali associati alla cistoscopia. Quindi, grazie all'elevata sensibilità, specificità e riproducibilità è uno strumento affidabile per l'individuazione delle recidive della malattia in pazienti sottoposti a sorveglianza di routine, indipendentemente dallo stadio e dal grado, inoltre, fornisce risultati rapidi e un'opzione non invasiva. [71]
- **CX Bladder:** è un test che utilizza biomarcatori di mRNA nelle urine in modo da classificare i pazienti con ematuria in quelli con alta/bassa probabilità di carcinoma uroteliale. In particolare è disponibile il CX Bladder Triage (CxbT) che è un test di esclusione con elevata sensibilità per identificare i pazienti con bassa probabilità di tumore alla vescica, in questo modo si evitano indagini invasive non necessarie. Il CX Bladder Detect (CxbD) presenta un'elevata sensibilità e specificità per pazienti che necessitano di ulteriori accertamenti per il tumore della vescica. Il CX Bladder Resolve (CxbR) è stato sviluppato per essere utilizzato dopo i primi due, per segregare accuratamente i pazienti che risultano positivi al test e che quindi possono avere tumori ad alto grado. Questi tre test si utilizzano in maniera sequenziale, infatti CxbT e CxbD massimizzano l'esclusione sicura dei pazienti a bassa probabilità di malattia (sulla base di sensibilità e NPV elevati), mentre CxbR segrega i pazienti ad alta probabilità di tumore ad alto

impatto (sulla base di sensibilità e specificità elevate). Uno studio ha dimostrato che l'utilizzo della CxbT nel percorso clinico ha ridotto del 44% l'uso della cistoscopia e del 20% quella della tomografia computerizzata. [72]

1.4.3 Biomarcatori in fase di sperimentazione

Nel corso degli anni sono stati studiati tantissimi nuovi biomarcatori sia per la diagnosi che per il monitoraggio del tumore vescicale ma ad oggi nessuno è entrato a far parte della pratica clinica. Numerose sono infatti le problematiche legate alla definizione delle performances dei marcatori. Spesso i metodi analitici non consentono l'utilizzo routinario dei test sia a causa della mancanza di automazione sia per la necessità di lunghe procedure pre-analitiche; la conseguenza è che i biomarcatori possono essere validati solo su un esiguo numero di campioni. Inoltre, i campioni urinari utilizzati negli studi hanno dimostrato un altro grado di variabilità intra ed inter-individuale dovuta sicuramente a fattori biologici legati ad esempio alla dieta, all'età e alla salute del paziente ma anche ai metodi di conservazione e raccolta delle urine. È stato poi ormai ampiamente dimostrato che l'utilizzo di un solo marcatore non fornisce delle performances sufficienti, quindi la ricerca si sta indirizzando verso la realizzazione di modelli predittivi che contemplino l'uso di pannelli di biomarcatori associati alle variabili cliniche. In aggiunta è noto che indagini di laboratorio molto specializzate che utilizzano tecniche complesse e che consentono di effettuare test di alta qualità, sono limitate a centri specializzati e sono molto costose mentre metodiche più semplici sono meno costose e più facilmente realizzabili ma i risultati dei test hanno un valore limitato a causa della bassa specificità.

- **Citocheratine:** sono proteine intracellulari. Se ne conoscono circa venti, appartengono ai filamenti intermedi del citoscheletro che si rilevano nelle urine dopo la morte cellulare. [73] Tra queste è importante ricordare la CK20 che è una citocheratina acida a basso peso molecolare, la cui espressione fisiologica è limitata alle cellule ad ombrello nel normale urotelio. Quindi l'analisi di espressione di CK20 immunostochimica è diventata anche una procedura di routine per la valutazione delle biopsie della vescica e anche per migliorare l'identificazione delle cellule uroteliali neoplastiche. La CK20 presenta un'elevata sensibilità e la sua espressione aumenta soprattutto con il grado nei tumori non muscolo-invasivi ed è inoltre associata alla recidiva, mentre diminuisce quando si verifica la crescita muscolo-invasiva. [74] La CK7 è una citocheratina basica, la cui colorazione immunostochimica con la CK20 ha dimostrato di essere un utile aiuto diagnostico per differenziare l'origine dei tumori vescicali, specialmente nei tumori metastatici. Quindi, in sintesi, CK20 è osservata nelle metastasi del tumore primario alla vescica, mentre la CK7 è espressa sia nel tumore della vescica primario

che nel tumore metastatico. [75] Inoltre, la CK7 è altamente espressa in una grande varietà di tumori. Recenti studi che hanno utilizzato il profilo di espressione genica di tumori uroteliali primari non invasivi, come le biopsie di neoplasia uroteliale (stadio Ta), hanno dimostrato che CK7 presenta un cambiamento precoce nell'espressione genica, che è risultata altamente aumentata rispetto alle biopsie normali. Di conseguenza, è stato suggerito che questa espressione potrebbe essere rilevata nei sedimenti urinari dei pazienti affetti da tumore della vescica. In un altro studio, il livello di espressione di questo gene nelle cellule circolanti di pazienti sottoposti a cistectomia radicale per tumore è stato collegato a un aumento del rischio di recidiva e di morte. La sensibilità della rilevazione di CK7 per i tumori di basso e alto grado era rispettivamente del 90 e del 95%, rispetto al 15 e all'80% ottenuto dalla citologia. Inoltre, la sensibilità della rilevazione di CK7 per gli stadi precoci del tumore (Ta e T1) è elevata quanto quella per i tumori in fase avanzata (T2 e T3).[76]

- **Survivina:** è un inibitore dell'apoptosi con un singolo dominio BIR N-terminale e un dominio Coiled-Coil nella porzione C-terminale. È un regolatore critico della mitosi, promuove la proliferazione delle cellule tumorali, induce l'angiogenesi e quindi aumenta la capacità di invasione dei tumori. Questi risultati hanno rivelato che l'espressione della survivina può essere associata al grado di malignità del tumore della vescica, anche se il suo ruolo nella metastasi e nella progressione del tumore rimane poco chiaro. La sensibilità e la specificità sono risultate rispettivamente di 86% e 94%, indicando che l'analisi dell'espressione urinaria di survivina tramite RT-PCR era accurata. In sintesi, l'espressione urinaria dell'mRNA di survivina può servire come marcatore di screening per la diagnosi del tumore alla vescica. La rilevazione della survivina tramite la RT-PCR può essere usata come metodo aggiuntivo per la cistoscopia negli screening precoci e nel post-operatorio per monitorare il tumore della vescica. La rilevazione della positività della survivina nelle urine di pazienti è associata ad una prognosi grave.[77] Sono stati effettuati degli studi su due SNP (Single Nucleotide Polymorphism) della survivina: il primo è C-31G che si trova nel promotore e in alcuni pazienti, si è riscontrato un maggior rischio di tumore per chi presentava l'allele C; il secondo è A9194G presenta una modifica di un aminoacido da Lys a Glu nel codone 129 dell'esone 4, che è localizzato al C-terminale e anche in questo caso si è riscontrato un rischio maggiore di tumore in pazienti con allele A. Quindi, i risultati di alcuni studi affermano che questi due polimorfismi esercitano un'importante e combinata influenza nello sviluppo del tumore alla vescica. Inoltre, la survivina è coinvolta nella resistenza alla chemioterapia, quindi questi due polimorfismi, ovviamente con ulteriori altri studi, potranno aiutare nell'identificare pazienti con tumore alla vescica resistenti alla chemioterapia. [78]

- **TERT:** si tratta della telomerasi trascrittasi inversa ed è un ottimo marcatore per la diagnosi precoce dei tumori alla vescica in pazienti sintomatici, avendo anche la stessa specificità della citologia urinaria, ma una più elevata sensibilità, mentre dalla combinazione di questi due, si è vista aumentare la sensibilità al 95%. Le mutazioni del promotore TERT sono chiamate C228T e C250T, e si trovano spesso in diversi tipi di tumore e vengono rilevate ad alta frequenza (60-85%) in tutte le fasi e gradi del tumore della vescica. Queste mutazioni sono considerate come un evento precoce nello sviluppo del tumore e sono state riscontrate nel DNA urinario da cellule esfoliate dell'urotelio di campioni di urina che sono stati raccolti sia al momento della diagnosi clinica che durante il follow-up post chirurgico. Inoltre, presenta un'elevata sensibilità e specificità per tutti i tipi di tumori alla vescica, essendo anche molto più performante rispetto alla citologia urinaria, proprio perché riesce a rilevare anche condizioni precoci di questo tipo di tumore. L'abilità di rilevare queste mutazioni in campioni di urina fino a dieci anni prima della diagnosi del tumore della vescica presenta una specificità al 100% e sensibilità del 47%. Tutto questo ha evidenziato che le mutazioni dei promotori del TERT urinario possono presentare il potenziale per essere utilizzate come biomarcatori non invasivi semplici ed economici per la diagnosi precoce del tumore alla vescica. [79]
- **Test rapido:** questo test consente di individuare le citocheratine 8 e 18 attraverso un test POC (point of care) (con risultati qualitativi in 10 minuti) o mediante ELISA (con risultati quantitativi). [80] In uno studio, si è scoperto che la sensibilità e la specificità del test rapido sono entrambe del 64%. [81] Tuttavia, includendo successivamente nella coorte i potenziali falsi positivi, rappresentati da condizioni benigne o maligne del tratto urinario, la sensibilità e la specificità sono scese rispettivamente al 79% e al 49%, rendendo l'efficacia del test inferiore rispetto ad altri biomarcatori come il BTA. [82]
- **Fibrinogeno e fosfoproteine:** studi precedenti hanno dimostrato che elevati livelli urinari di fibrina sono associati alla presenza di tumore alla vescica, poiché il tumore della vescica ha un'aumentata permeabilità vascolare, le proteine come il plasminogeno e il fibrinogeno passano nelle urine. L'urochinasi converte il plasminogeno in plasmina che converte il fibrinogeno in fibrina. Di qui ne deriva che i soggetti con tumore della vescica possono avere aumentati livelli di fibrina-fibrinogeno; inoltre, più recentemente, elevati livelli di fibrinogeno urinario a catena β (FBC) sono stati correlati a uno stadio tumorale più elevato nei pazienti con questa tipologia

di tumore. Un elevato livello di fibrinogeno e D-dimero è stato recentemente dimostrato nei tumori urologici, non solo in caso di tumori muscolari invasivi, ma anche nel plasma di pazienti con tumori localizzati, infatti un aumento dei fattori della coagulazione è tipico di questi tumori e sono stati associati anche alla progressione metastatica; in effetti la deposizione di fibrina e di altre proteine adesive nella matrice cellulare favorisce l'adesione, la proliferazione e la migrazione dei tumori. Il fibrinogeno presenta comunque un'elevata sensibilità e specificità tra il 66% e l'85%, inoltre è di facile accessibilità e di costi ridotti. Alcuni studi hanno dimostrato che la presenza di tirosine fosforilate (UPY) possono aiutare a differenziare tra pazienti con il tumore della vescica e i controlli sani, presentando una sensibilità dell'80.4% e una specificità del 78.8% per la diagnosi del tumore alla vescica. Si è scoperto che combinando sia FBC che UPY, di cui il primo è indice dello stato di coagulazione del paziente e della progressione del tumore e il secondo è indice di aggressività, si è raggiunta la massima accuratezza diagnostica, mentre prendendo singolarmente solo UPY presentava un'accuratezza dell'87%. Questo è stato un risultato molto importante che nel futuro, potrebbe essere utilizzato per lo screening di popolazioni ad alto rischio. [83]

Biomarcatori correlati all'angiogenesi

- **Interleuchine:** le piccole proteine coinvolte nel processo infiammatorio, come ad esempio IL-8, possono essere rilevate mediante il test ELISA. Nei pazienti affetti da neoplasia vescicale, si registra un aumento significativo dei livelli urinari di IL-8. Entrambe le interleuchine IL-8 e IL-6 si sono dimostrate indicatori predittivi di recidiva dopo il trattamento con BCG.[84] Tuttavia, è essenziale notare che, nonostante l'associazione con l'infiammazione legata al tumore, le interleuchine non sono comunemente consigliate come biomarcatori specifici per il tumore uroteliale. [85]
- **VEGF:** mediatore dell'angiogenesi prodotto dalle cellule tumorali e può essere rilevato nelle urine attraverso il test ELISA. I livelli di questo marcatore sono correlati alla presenza di tumore uroteliale e mostrano un aumento proporzionale all'incremento dello stadio della malattia. [86]

Biomarcatori correlati all'apoptosi

- **Clusterina:** la glicoproteina secretoria multifunzionale, con un potenziale ruolo nello sviluppo e nella progressione di diversi tumori, può essere misurata mediante un test ELISA. Nei pazienti affetti da tumore uroteliale, si osserva un significativo aumento dei livelli di questa glicoproteina.[87]

- **Isoforme solubili di Fas (sFas):** proteine anti-apoptotiche, generate e rilasciate dalle cellule tumorali, possono essere rilevate tramite un test ELISA. È stato dimostrato che i livelli urinari di tali proteine costituiscono un fattore predittivo indipendente per la recidiva tumorale. [88]

Biomarcatori correlati a proliferazione ed invasione

- **Test della ialuronidasi urinaria:** l'acido ialuronico e la ialuronidasi sono molecole coinvolte nei processi di adesione e proliferazione cellulare, e entrambe mostrano un aumento nei campioni di urine provenienti da individui affetti da tumore della vescica. I test combinati hanno dimostrato un'elevata sensibilità (91-100%) e specificità (84-90%), tuttavia, sono necessari ulteriori studi per determinarne la rilevanza clinica. [89]
- **Telomerasi:** la trascrittasi inversa è responsabile dell'aggiunta di sequenze ripetitive alle estremità dei cromosomi per garantirne la stabilità genomica, e la sua attività è aumentata in molti tipi di tumori. Nel caso specifico del tumore uroteliale, i test hanno mostrato una sensibilità e specificità elevate (90% e 88%), tuttavia l'applicazione clinica è limitata a causa dell'instabilità delle telomerasi nelle urine e dalla mancanza di standardizzazione. [90]
- **Antigene CD44:** è una glicoproteina coinvolta nell'adesione cellulare, nella proliferazione e nella migrazione. La sua variante 6 rilevabile nelle urine attraverso RT-qPCR, è correlata alla presenza di tumore uroteliale. [91] [92]
- **Fibronectina:** è una glicoproteina strutturale coinvolta nella migrazione e nell'adesione cellulare. In presenza di tumore, le proteine della matrice extracellulare, come la fibronectina, subiscono degradazione da parte di proteasi. Una metanalisi ha evidenziato la sensibilità e la specificità dell'81% e 80%, ma ulteriori studi sono necessari anche in questo caso. [93] [94]

Metabolomica: prevede l'esplorazione dei metaboliti prodotti in quantità anomale dalle cellule uroteliali maligne rispetto a quelle sane. Per questa analisi, vengono impiegate diverse piattaforme basate su metodi cromatografici e spettrometria di massa. Un pannello composto da 3 a 15 metaboliti ha dimostrato una sensibilità del 91%-100% e una specificità del 93%-100%. [95]

BLCA-1 e BLCA-4: sono fattori di trascrizione nucleari espressi nelle prime fasi dello sviluppo del carcinoma uroteliale. Il BLCA-4 è rilevato sia nel tessuto tumorale che nell'urotelio benigno circostante la neoplasia. [96] La sua espressione non sembra essere influenzata da condizioni benigne come le patologie infiammatorie, ma sembra piuttosto essere condizionata da affezioni del midollo spinale. [97]

1.4.4 Biomarcatori Genetici

- **Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR-3):** è stato evidenziato mediante PCR e questo recettore presenta mutazioni nelle urine del 50% dei pazienti affetti da neoplasia uroteliale. Le mutazioni sono più comuni nei tumori di basso grado, costituendo così un indicatore prognostico positivo.[98] La sensibilità di questa metodica varia tra il 50% e il 90%, mentre la specificità si situa tra il 60% e il 90%. Quando combinato con la citologia urinaria, la sensibilità complessiva raggiunge il 76%. [99]
- **La chinasi Aurora A (AURKA):** è una serina-treonina chinasi coinvolta nella regolazione della stabilità genica durante la mitosi. La sua elevata espressione può essere valutata mediante la tecnica FISH o RT-qPCR. [100]
- **miRNA:** sono sequenze di RNA non codificanti che hanno la capacità di degradare o impedire la traduzione degli mRNA, influenzando così la produzione di proteine. [101] Queste sequenze, non regolate adeguatamente nella neoplasie uroteliale, possono essere quantificate tramite PCR e utilizzate come test di screening, indicatori prognostici e per l'identificazione di nuovi target terapeutici. La down-regulation dei miRNA, ad esempio, è associata ad un aumento dell'espressione di FGFR-3, una modifica coinvolta nello sviluppo dei tumori uroteliali a basso grado, mentre l'aumento dell'espressione dei miRNA regolatori di p53 è stato osservato nei tumori di alto grado muscolo-invasivi. [102] [103] In uno studio sono stati esaminati fino a 15 miRNA e la combinazione di 4 di essi ha classificato correttamente il 100% dei campioni come malati o sani. E' stata dimostrata anche la capacità che questi miRNA hanno di differenziare i pazienti con tumori T1 in alto e basso rischio di progressione, però sono necessari ulteriori studi di validazione.[104]
- **Metilazione del DNA:** molti geni soggetti a cambiamenti epigenetici attraverso la metilazione del DNA sono stati identificati in relazione all'insorgenza di neoplasie. Le sensibilità e specificità provenienti dagli studi condotti fino ad ora variano rispettivamente dal 65% al 100% e dal 77% al 100%. [105] In uno studio che coinvolgeva 184 pazienti, si è dimostrata una sensibilità tra l'82% e l'89% ed una specificità dal 94% al 100%. [106]
- **Analisi dei microsatelliti:** sequenze di DNA non codificante contraddistinte dalla ripetizione di unità molto brevi, derivanti da errori nel sistema di riparazione del mismatch del DNA, possono essere utilizzate come biomarcatori di loci genici e della carcinogenesi. La sensibilità oscilla tra il 79% e l'84%, aumentando in relazione al grado tumorale, mentre la specificità si attesta tra l'85% e il 100%.
- **Cellule tumorali circolanti:** l'analisi delle cellule tumorali nel sangue del paziente si è dimostrata predittiva di una recidiva di malattia più precoce.[107] In particolare, questo test

può essere impiegato per identificare i pazienti che potrebbero beneficiare di terapie più aggressive e di un monitoraggio più attento.[108] Nei pazienti con malattia metastatica, la presenza di cellule tumorali circolanti è associata ad una sopravvivenza inferiore ad un anno, mentre non si riscontrano differenze nella sopravvivenza tra pazienti positivi o negativi al test e affetti da neoplasia localizzata. [109]

- **Microarray Gene Expression Profiling:** i microarray possono essere impiegati per individuare specifiche firme molecolari che caratterizzano gradi o stadi patologici. Essi hanno dimostrato la capacità di identificare una malattia con potenziale progressione verso la forma muscolo-invasiva.[110]

1.4.5 Applicazione dei biomarcatori tumorali CK20, CK7 e TERT in diversi contesti clinici

La classificazione genetica molecolare dei tumori sta entrando sempre più nella pratica clinica quotidiana per il trattamento dei pazienti poiché consente di ottenere informazioni per una diagnosi tempestiva, dati prognostici durante il decorso della malattia ed indicazioni per strategie di trattamento personalizzate. Tuttavia, per poter includere l'utilizzo di biomarcatori tumorali nella diagnostica di routine è richiesta una loro accurata validazione su un elevato numero di campioni. La mancanza di questa validazione complica la convalida dei risultati ottenuti e impedisce decisioni tempestive riguardo alla gestione clinica dei pazienti con tumori, e la selezione dei protocolli di trattamento più appropriati. Relativamente al carcinoma vescicale non è ancora stato trovato un biomarcatore potenziale che potesse essere rilevato con tecnologie ad alta produttività, economiche e facili da implementare.

La real-time RT-PCR combina i vantaggi di elevata sensibilità e accuratezza a partire da una bassa quantità iniziale di materiale ed è stata utilizzata per la ricerca di mutazioni, per lo studio della malattia minima residua nei linfonodi e nel sangue di pazienti con neoplasie ematologiche e nella valutazione quantitativa del rischio di micrometastasi nel sangue e nel midollo di pazienti con tumori della mammella e gastrointestinali.[111] [112] Sono stati anche effettuati studi per la ricerca attraverso real-time RT-PCR di cellule tumorali nelle urine dei pazienti con il carcinoma della vescica. Questi studi indicano che la real-time RT-PCR è un metodo molto sensibile, quantitativo, specifico e rapido per la ricerca di cellule tumorali libere nell'urina con un buon potenziale per il monitoraggio delle recidive dei carcinomi uroteliali a cellule transizionali.[113] Risulta ancora più promettente l'utilizzo di una firma di biomarcatori da

analizzare con la PCR quantitativa multiplex, dal momento che l'associazione di più biomarcatori consente di migliorare notevolmente i valori di accuratezza.[114]

L'espressione combinata di CK7 e CK20 è stata rilevata in diversi tumori, ad esempio nel tumore del polmone. In uno studio si è utilizzata la RT-PCR e si è visto un aumento significativo della espressione di CK7 e CK20 nei tessuti tumorali, confermato anche dall'analisi immunohistochimica. L'espressione combinata di questi due biomarcatori è stata correlata alla progressione tumorale nelle cellule epiteliali, suggerendo un legame con la formazione e la progressione del cancro polmonare. Altri studi recenti indicano che questi due biomarcatori promuovono la progressione maligna, con espressione più elevate nei tessuti tumorali maligni rispetto ai tessuti normali. Sempre dallo studio retrospettivo, sono stati notati dei risultati significativi per quanto riguarda l'espressione dei marcatori. Infatti CK20 era espresso in diversi stadi clinici e sottogruppi, mentre CK7 era associata a diverse età, metastasi linfonodali ed invasione. Parametri come CK7, età, fumo, metastasi linfonodali, invasione, dimensioni e stadio clinico potrebbero essere considerati fattori predittivi preziosi per la prognosi dei pazienti. La sopravvivenza globale nei pazienti con espressioni positive di CK7 e CK20 era significativamente più bassa rispetto ai pazienti con espressione negativa; quindi tali biomarcatori possono essere di supporto come indicatori prognostici nel cancro polmonare.[115] Sono stati effettuati anche degli studi sull'espressione di questi due biomarcatori nei carcinomi uroteliali primari e nelle loro metastasi coesistenti. Si è visto che CK20 era espresso nel 46% dei tumori della vescica primaria, mentre CK7 è stato riscontrato sia nei tumori della vescica primari che nelle metastasi. Quindi, l'uso combinato di questi due biomarcatori ha consentito la differenziazione degli adenocarcinomi di diverse origini. L'espressione combinata di questi due marcatori, dunque, può essere utile per la diagnosi differenziale e nel rilevare focolai metastatici nei linfonodi. [116]

TERT è un marcatore specifico, che è stato riscontrato in diversi tumori. Può presentare diversi tassi di mutazione: basso livello come tumore del polmone, del seno, del tratto gastrointestinale, della prostata e del rene, livello intermedio come il cancro della tiroide, il carcinoma epatocellulare e il carcinoma urinario ed infine ad alto tasso di mutazione nel caso di glioblastoma, melanoma maligno e tumori della vescica.

In uno studio si è analizzato TERT, espresso nel carcinoma epatico tramite la PCR. Sono state rilevate mutazioni somatiche del gene TERT nella regione promotore e il mR-122 circolante. L'analisi ha rilevato mutazioni significative, correlandosi anche con i livelli di α -fetoproteina (AFP) per identificare l'epatocarcinoma (HCC) tra i pazienti affetti da epatite B (HBV) cronica.

Dunque, l'utilizzo combinato di mutazioni del promotore TERT, espressione di miR-122 e livelli sierologici di AFP è stato considerato un potenziale biomarcatore per assistere nella diagnosi di HCC nei pazienti con infezione cronica da HBV. L'utilizzo in tempo reale di questi biomarcatori può consentire una diagnosi più rapida e informata durante le procedure diagnostiche. Tuttavia, è importante considerare la variabilità biologica e la necessità di validare costantemente l'efficacia di questi biomarcatori in contesti specifici.[117]

CAPITOLO 2

2.1 Scopo della Tesi

La tesi si propone di sviluppare e validare un protocollo diagnostico in Real Time RT-PCR multiplex per l'analisi automatizzata e combinata dei biomarcatori tumorali CK7, CK20 e TERT nelle urine di pazienti con tumore della vescica, al fine di valutarne il possibile utilizzo in ambito clinico.. Lo studio è effettuato utilizzando l'estrattore automatico di acidi nucleici Kairos 96 (Nurex Srl, Sassari, Italia) in linea con lo strumento per Real Time RT- PCR CFX (Bio-Rad Srl, Milano, Italia) per la rilevazione di tali biomarcatori con l'obiettivo di mettere a punto una metodica pratica, accurata e riproducibile per la diagnosi precoce e la caratterizzazione dei tumori vescicali.

Lo studio pilota sarà effettuato su urine provenienti da soggetti sani e soggetti con tumore di vescica ad alto grado e successivamente su un alto numero di controlli ospedalieri al fine di definire possibili interferenti. Attraverso opportune analisi statistiche si definiranno quindi le performances dei singoli biomarcatori e dei biomarcatori combinati per stabilire la migliore accuratezza.

CAPITOLO 3

MATERIALI E METODI

3.1 Popolazione considerata

Sono stati analizzati campioni urinari provenienti da 371 soggetti. Lo studio pilota è stato fatto su 40 campioni provenienti da volontari sani e 41 campioni provenienti da pazienti con tumore della vescica ad alto grado T1G3. Successivamente, sono stati raccolti 290 campioni urinari di scarto presso il Laboratorio Baldi e Riberi del Presidio Molinette della A.O.U. Città della Salute e della Scienza di Torino provenienti dai reparti ospedalieri escludendo i reparti di urologia e i pazienti di età inferiore ai 50 anni

Di tutti i 290 pazienti sono state ricercate le diagnosi e dall'analisi, si è notata una popolazione molto eterogenea. Infatti, sono stati individuati pazienti affetti da altri tipi di tumori, da patologie infiammatorie, da sepsi, da patologie della prostata e del fegato. Questa ampia eterogeneità ha consentito la suddivisione dei 290 pazienti in sottogruppi in base alle patologie di riferimento, che sono stati utilizzati per studiare le interferenze di altre patologie sulle performances dei biomarcatori tumorali oggetto del presente lavoro.

Prima di essere analizzati per i biomarcatori tumorali i campioni urinari sono stati analizzati per il sedimento urinario nel sediMAX conTRUST (Menarini Diagnostics). Il campione rimanente è stato lasciato sedimentare per 30 minuti a temperatura ambiente, in seguito è stato eliminato il surnatante lasciandone 1 mL e al campione è stato aggiunto 1 mL di guanidinio, agente caotropico che mantiene stabile l'RNA. Il campione è stato agitato su vortex per 15 secondi e successivamente è stato conservato ad una temperatura di -80° C fino al momento dell'analisi per i biomarcatori urinari

3.2 Estrattore automatico Kairos-96

L'estrazione degli acidi nucleici è stata fatta utilizzando l'estrattore automatico KAIROS 96 (Nurex Srl, Sassari), su cui si possono inserire fino ad un massimo di 96 campioni, incluso il controllo positivo. Lo strumento è stato progettato per estrarre e purificare gli acidi nucleici garantendo un'elevata purezza. Lo strumento inoltre è in grado di dispensare i campioni estratti e la miscela di reazione per la retrotrascrizione e l'amplificazione nella piastra da PCR.



Figura 8 Kairos-96 prodotto dall'azienda Nurex Srl, costituito da un estrattore automatico e da RT-PCR

Nella Figura 9 sono mostrati i vari componenti dell'estrattore:

Code	Description	Compatibility	Test number	Content	Storage	Preparation
MS-ONCOTRACK-BC-EXT	Oncotrack-BC-Extraction Kit	Kairos 96	960 (96 per session)	(2x) Solution A, B, C, D (in 1000 ml bottles)	T. Environment	Ready to use
				Elution Solution (20 tubes) Magnetic Beads (20 tubes)	+4°C	Shake with vortex before use
				Consumables (extraction cartridges, PCR plates, seals and tips)	T. Environment	

Figura 9 Estrattore del Kairos-96: è costituito da 4 diverse soluzioni: soluzione A è il guanidinio che serve per stabilizzare l'RNA, la soluzione B contiene alcol etilico che consente i lavaggi durante la fase di estrazione, la soluzione C contiene metanolo che serve per la purificazione, la soluzione D è un detergente che serve per il lavaggio del macchinario, oltre a questo sono presenti anche puntali, piastre PCR, cartucce, resina e soluzione di eluizione.

Il tempo impiegato per l'estrazione di 96 campioni è di circa 120 minuti.

Il piano di lavoro di Kairos-96 è mostrato in Figura 10.

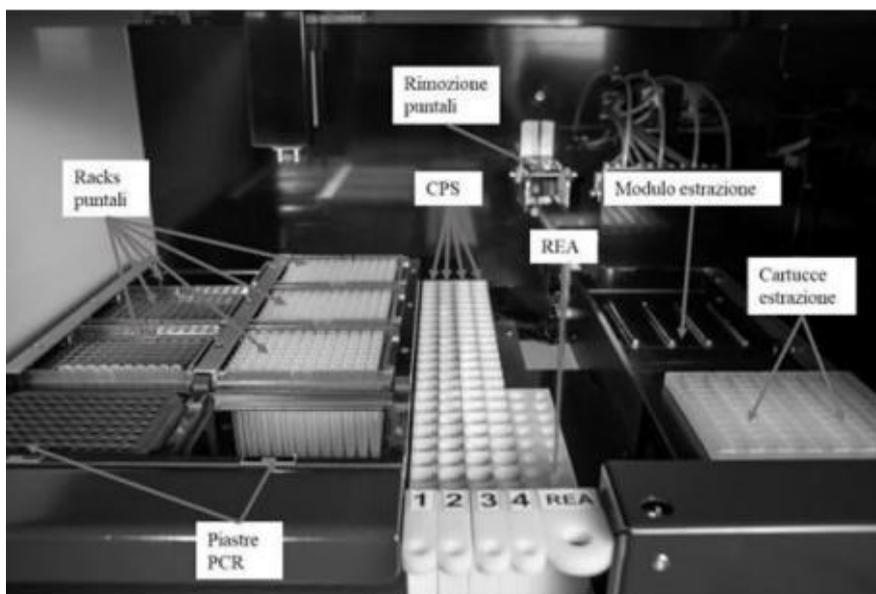


Figura 10 Piano di lavoro Kairos-96: sulla sinistra sono presenti i rack dei puntali e le piastre PCR, al centro ci sono i rack per i campioni e per i reagenti, a destra sono presenti le cartucce di estrazione.

A sinistra del piano di lavoro, è presente un cassetto con 6 alloggiamenti per i portapuntali e due alloggiamenti per inserire le piastre da PCR. La corretta posizione dei portapuntali è verificata da un apposito sensore. Per sostituire i rack di puntali, basta semplicemente rimuovere il blocco magnetico che si trova sulla destra del rack.

Nella parte centrale del piano di lavoro sono posizionati i quattro rack per i campioni (CPS) come mostrato in Figura 11;

SAMPLE24	SAMPLE 48		
SAMPLE23	SAMPLE 47		
SAMPLE22	SAMPLE 46		
SAMPLE21	SAMPLE 45		
SAMPLE20	SAMPLE 44		
SAMPLE19	SAMPLE 43		
SAMPLE18	SAMPLE 42		
SAMPLE17	SAMPLE 41		
SAMPLE16	SAMPLE 40		
SAMPLE15	SAMPLE 39		
SAMPLE14	SAMPLE 38		
SAMPLE13	SAMPLE 37		
SAMPLE12	SAMPLE 36		
SAMPLE11	SAMPLE 35		
SAMPLE10	SAMPLE 34		
SAMPLE9	SAMPLE 33		
SAMPLE8	SAMPLE 32		
SAMPLE7	SAMPLE 31		
SAMPLE6	SAMPLE 30		
SAMPLE5	SAMPLE 29		
SAMPLE4	SAMPLE 28		
SAMPLE3	SAMPLE 27		
SAMPLE2	SAMPLE 26		
SAMPLE1	SAMPLE 25		
CPS1	CPS2	CPS3	CPS4

Figura 11 Disposizione dei campioni nei rack: si parte dal rack 1 (CPS1) disponendo i campioni in ordine crescente dal basso verso l'alto, si procede nello stesso modo anche per gli altri rack

Anche qui il corretto posizionamento dei campioni è verificato da alcuni sensori. A destra dei rack per i campioni, è presente un rack per i reagenti (REA) del kit Oncotrack (Nurex srl). In questo rack sono inseriti:

- La soluzione di eluizione Oncotrack-BC 1 inserita nel primo posto del rack. Questa soluzione è utilizzata per rompere le interazioni leganti tra l'RNA e le particelle magnetiche senza compromettere la qualità e l'integrità dell'RNA. Questa soluzione è di solito alcalina, contiene agenti caotropici che contribuiscono a rompere le interazioni leganti e a mantenere la stabilità dell'RNA, inoltre, può includere un agente chelante per rimuovere eventuali ioni metallici. Deve essere riposta nel frigorifero a 4 °C.
- La resina magnetica (0,9 mL) che contiene particelle che riescono a legare gli acidi nucleici; durante l'estrazione le particelle possono essere manipolate con una barra magnetica che è presente all'interno dello strumento, che attrae le particelle magnetiche e rilascia l'RNA estratto con la soluzione di eluizione. Questo semplifica la manipolazione durante i passaggi di lavaggio e di eluizione, riducendo il rischio di contaminazione e migliorando la purezza del campione. La resina prima dell'utilizzo deve essere agitata sul vortex e deve essere poi conservata in frigorifero a 4 °C.
- Il controllo positivo che è costituito da 10.000 cellule di una linea di tumore vescicale solubilizzate in guanidinio e che deve essere scongelato e posizionato in prima posizione in CPS-1 insieme ai campioni.

- La MIX che si ottiene mescolando la provetta ONCOTRACK BC 2 (470 μ L), dove sono presenti i primers e le sonde per i biomarcatori TERT, CK7 e CK20 nelle concentrazioni presentate in tabella, con ONCOTRACK-1 (335 μ L), dove sono presenti l'enzima trascrittasi inversa e la DNA polimerasi. La MIX-1 deve essere agitata sul vortex prima dell'inserimento nello strumento.

CK20 for e rev	200 nM
CK20 probe	100 nM
TERT for e rev	400 nM
TERT probe	200 nM
CK7 for e rev	60 nM
CK7 probe	32 nM

Tabella 3 Concentrazioni dei primers e delle sonde dei 3 marcatori

Sulla destra del piano del piano di lavoro c'è il modulo di estrazione, dove come si può notare dall'immagine sono presenti le cartucce di estrazione.

I vari campioni saranno quindi dispensati nei vari pozzetti delle cartucce con una sequenza ben precisa come indicato nella Figura 12.

SAMPLE23	SAMPLE47	SAMPLE23	SAMPLE47		SAMPLE24	SAMPLE48	SAMPLE24	SAMPLE48
SAMPLE21	SAMPLE45	SAMPLE21	SAMPLE45		SAMPLE22	SAMPLE46	SAMPLE22	SAMPLE46
SAMPLE19	SAMPLE43	SAMPLE19	SAMPLE43		SAMPLE20	SAMPLE44	SAMPLE20	SAMPLE44
SAMPLE17	SAMPLE41	SAMPLE17	SAMPLE41		SAMPLE18	SAMPLE42	SAMPLE18	SAMPLE42
SAMPLE15	SAMPLE39	SAMPLE15	SAMPLE39		SAMPLE16	SAMPLE40	SAMPLE16	SAMPLE40
SAMPLE13	SAMPLE37	SAMPLE13	SAMPLE37		SAMPLE14	SAMPLE38	SAMPLE14	SAMPLE38
SAMPLE11	SAMPLE35	SAMPLE11	SAMPLE35		SAMPLE12	SAMPLE36	SAMPLE12	SAMPLE36
SAMPLE9	SAMPLE33	SAMPLE9	SAMPLE33		SAMPLE10	SAMPLE34	SAMPLE10	SAMPLE34
SAMPLE7	SAMPLE31	SAMPLE7	SAMPLE31		SAMPLE8	SAMPLE32	SAMPLE8	SAMPLE32
SAMPLE5	SAMPLE29	SAMPLE5	SAMPLE29		SAMPLE6	SAMPLE30	SAMPLE6	SAMPLE30
SAMPLE3	SAMPLE27	SAMPLE3	SAMPLE27		SAMPLE4	SAMPLE28	SAMPLE4	SAMPLE28
SAMPLE1	SAMPLE25	SAMPLE1	SAMPLE25		SAMPLE2	SAMPLE26	SAMPLE2	SAMPLE26
CARTUCCIA ESTRAZIONE SINISTRA					CARTUCCIA ESTRAZIONE DESTRA			

Figura 12 Dispensazione campioni nelle cartucce di estrazione: ciascun campione viene dispensato nei pozzetti delle varie cartucce seguendo questo schema, insieme alla soluzione di eluizione e alla resina magnetica

Lo strumento inizialmente dispensa la resina in tutti i pozzetti della cartuccia di estrazione, successivamente dispensa i campioni nei pozzetti. La resina si lega agli acidi nucleici in maniera selettiva. Successivamente, una barra magnetica attrae la resina magnetica insieme agli acidi nucleici, consentendo la rimozione delle altre componenti del campione. Successivamente viene aggiunta la soluzione di eluizione per liberare gli acidi nucleici dalla resina. A questo

punto i campioni sono dispensati nella piastra da PCR (nella quale era stata precedentemente dispensata la mix) seguendo la disposizione della Figura 13.

PCR												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SAMPLE1	SAMPLE5	SAMPLE25	SAMPLE29	SAMPLE9	SAMPLE13	SAMPLE33	SAMPLE37	SAMPLE17	SAMPLE21	SAMPLE41	SAMPLE45
B	SAMPLE1	SAMPLE5	SAMPLE25	SAMPLE29	SAMPLE9	SAMPLE13	SAMPLE33	SAMPLE37	SAMPLE17	SAMPLE21	SAMPLE41	SAMPLE45
C	SAMPLE2	SAMPLE6	SAMPLE26	SAMPLE30	SAMPLE10	SAMPLE14	SAMPLE34	SAMPLE38	SAMPLE18	SAMPLE22	SAMPLE42	SAMPLE46
D	SAMPLE2	SAMPLE6	SAMPLE26	SAMPLE30	SAMPLE10	SAMPLE14	SAMPLE34	SAMPLE38	SAMPLE18	SAMPLE22	SAMPLE42	SAMPLE46
E	SAMPLE3	SAMPLE7	SAMPLE27	SAMPLE31	SAMPLE11	SAMPLE15	SAMPLE35	SAMPLE39	SAMPLE19	SAMPLE23	SAMPLE43	SAMPLE47
F	SAMPLE3	SAMPLE7	SAMPLE27	SAMPLE31	SAMPLE11	SAMPLE15	SAMPLE35	SAMPLE39	SAMPLE19	SAMPLE23	SAMPLE43	SAMPLE47
G	SAMPLE4	SAMPLE8	SAMPLE28	SAMPLE32	SAMPLE12	SAMPLE16	SAMPLE36	SAMPLE40	SAMPLE20	SAMPLE24	SAMPLE44	SAMPLE48
H	SAMPLE4	SAMPLE8	SAMPLE28	SAMPLE32	SAMPLE12	SAMPLE16	SAMPLE36	SAMPLE40	SAMPLE20	SAMPLE24	SAMPLE44	SAMPLE48

Figura 13 Disposizione campioni nella piastra PCR: dopo la fase di estrazione, i vari campioni sono disposti nei vari pozzetti della piastra PCR.

3.3 Real-Time PCR

Lo studio sui biomarcatori è stato fatto in Real-Time RT-PCR multiplex utilizzando lo strumento CFX di Bio-Rad in linea con Kairos 96. La PCR (la reazione a catena della polimerasi) è stata scoperta nel 1983 da Kary Mullis, è una tecnica che permette di selezionare un particolare tratto di interesse ed amplificarlo in un grandissimo numero di copie. Si tratta di una replicazione *in vitro* mediante una DNA polimerasi, due oligonucleotidi lunghi circa 20-30 nt che fungono da primer, i dNTPs (deossinucleoside trifosfati), che sono i quattro nucleotidi trifosfati e ioni magnesio nel tampone. La reazione avviene tramite tre passaggi:

1. La denaturazione: 30 sec a 95°C per denaturare il DNA
2. Associazione (annealing): 30 sec a 40-60 °C per favorire l'associazione specifica degli inneschi
3. Sintesi: 2 min a 72°C che è la temperatura ottimale per la polimerasi che estende i primer incorporando i dNTPs.

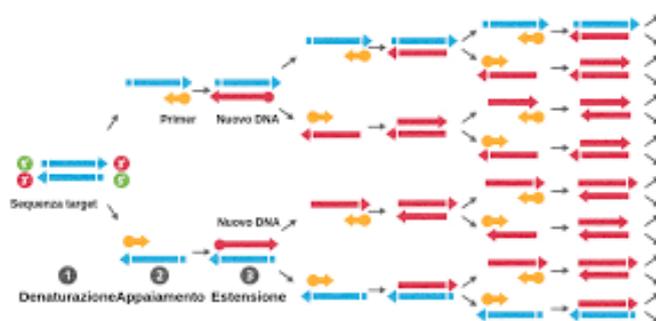


Figura 14 Fasi della PCR: 1 denaturazione della doppia elica, 2 annealing per associazione dei primers 3 sintesi da parte della polimerasi

La variante utilizzata in questo lavoro è la Real Time RT-PCR, importante per lo studio dell'espressione genica. In questo caso, l'RNA dopo l'estrazione, viene convertito in DNA complementare (cDNA) mediante l'enzima trascrittasi inversa. Poi il cDNA viene denaturato e nella fase di annealing, si aggiungono i primers e le sonde specifici per ogni marcatore che si legano alle regioni di interesse del DNA e poi la DNA polimerasi allunga il filamento formando una nuova catena di DNA complementare alla sequenza bersaglio.

La Real Time-PCR permette di monitorare l'incremento della quantità di prodotto durante ogni ciclo di amplificazione. Questo avviene in tempo reale, consentendo l'identificazione della fase esponenziale attraverso l'utilizzo di sistemi di sensing. [118] Questi sistemi si basano sull'uso di fluorofori legati alle sonde specifiche per i diversi marcatori. L'aumento progressivo delle molecole amplificate genera un segnale di fluorescenza, che viene monitorato in tempo reale e correlato direttamente alla quantità di RNA iniziale. Questo offre elevata sensibilità e specificità, eliminando la necessità di analisi post-amplificazione. Durante la PCR, i campioni vengono esposti a una fonte luminosa per eccitare i fluorofori, che, una volta eccitati, emettono un segnale fluorescente che è poi rilevato tramite un detector. [119] Nello studio sono stati utilizzati tre tipi di fluorofori per identificare i biomarcatori tumorali, come mostrato in Figura 15.

Fluorofori	Target
FAM	CK20
HEX	TERT
Cy5	CK7

Tabella 4 Fluorofori utilizzati nella RT-PCR: FAM è 6-carbossifluorescina il cui target è CK20, HEX è l'esaclorofluorescina, il cui target è TERT, Cy5 è Invitrogen cianina 5, il cui target è CK7

FAM (6-carbossifluorescina) è il colorante fluorescente più comunemente utilizzato per le sonde durante la reazione di PCR, è molto reattivo, solubile in acqua e ha un massimo di 492 nm di assorbimento e un massimo di emissione a 517 nm. HEX (Esaclorofluorescina) presenta un massimo di assorbimento a 535 nm e un massimo di emissione a 556 nm. Cy5 (Invitrogen cianina 5) è un colorante rosso-fluorescente con eccitazione massima intorno ai 647 nm e massima emissione intorno ai 665 nm.

Il massimo picco di fluorescenza si verifica durante la fase di estensione, cioè quando la molecola coniugata al fluoroforo si intercala nei frammenti amplificati. Successivamente, durante la fase di denaturazione il segnale fluorescente diminuisce rapidamente poiché la sonda con il fluoroforo è rilasciata in soluzione a causa della dissociazione dei filamenti del DNA a seguito dell'aumento della temperatura. La quantità di prodotto amplificato si misura attraverso l'emissione del segnale dei fluorofori, alla fine di ciascun ciclo di amplificazione.[120]

Con la Real Time PCR si riesce ad identificare il ciclo di amplificazione in cui la reazione inizia la fase esponenziale. Questo viene fatto rilevando il ciclo in cui si è accumulata una quantità di prodotto di amplificazione sufficiente per generare un segnale fluorescente al di sopra di una soglia predefinita, rappresentando il livello minimo di fluorescenza significativo. Questo accade durante la fase esponenziale e il numero di cicli in cui ciò si verifica è definito come ciclo soglia (Cycle Threshold). L'aumento della fluorescenza durante la fase esponenziale può essere misurato attraverso l'analisi di una curva di fluorescenza, nota come Curva di Amplificazione, come mostrato in Figura 16.

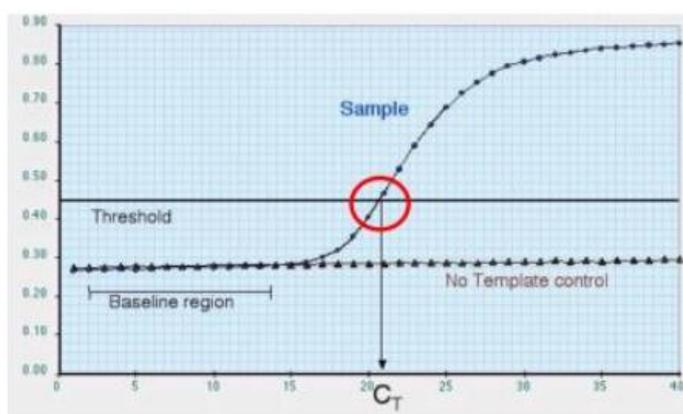


Figura 15 Esempio curva di amplificazione: curva sigmoide che serve per identificare il ciclo di amplificazione, in cui si è accumulata una quantità tale da generare un segnale fluorescente

La curva di amplificazione è di forma sigmoide: nei primi cicli, la fluorescenza non è rilevata, successivamente cresce esponenzialmente, entrando poi in una fase lineare prima di raggiungere il plateau. Nella valutazione della Curva di Amplificazione, vengono presi in considerazione tre parametri: la baseline (regione iniziale), la linea soglia e il ciclo soglia, indicati rispettivamente come "Baseline region", "Threshold" e "CT". La baseline rappresenta il livello del segnale durante i primi cicli, quando il segnale fluorescente è relativamente basso e può essere considerato simile al rumore di fondo.

La linea soglia, d'altra parte, è il livello del segnale fluorescente che indica un aumento statisticamente significativo rispetto alla baseline. Spesso viene fissato a un valore pari a 10 volte la deviazione standard del valore di fluorescenza della baseline, garantendo così una soglia robusta e significativa.[121]

Il ciclo soglia (CT) rappresenta il numero di cicli in cui il segnale fluorescente della reazione attraversa la soglia prestabilita. Questo parametro è utilizzato per quantificare il numero iniziale di molecole di DNA ed è inversamente correlato alla quantità iniziale del bersaglio: un valore CT più basso corrisponde a una maggiore quantità di campione iniziale e viceversa.

La Real Time PCR consente l'esecuzione di due tipi di analisi: qualitativa e quantitativa. Per le analisi qualitative, i risultati positivi o negativi generati dai campioni vengono convalidati mediante l'uso di controlli di qualità, positivi e negativi. Questi controlli aiutano a identificare la presenza di falsi positivi o falsi negativi. Un controllo positivo indica la certezza della presenza della sequenza bersaglio, mentre un controllo negativo indica l'assenza della stessa. In caso di mancato amplificato dal controllo positivo (CT non determinato), potrebbero esserci problemi a livello di reagenti, preparazione della reazione o strumentazione, generando potenziali risultati "falsi negativi". Se, invece, il controllo negativo produce un amplificato (CT determinato), potrebbero esserci problemi di contaminazione nei reagenti, nella preparazione della reazione o nello strumento, generando possibili risultati "falsi positivi".

Nelle analisi quantitative, per quantificare la concentrazione iniziale di DNA nel campione, viene misurato l'aumento della fluorescenza nella fase esponenziale attraverso l'analisi della Curva di Amplificazione, definendo il valore di CT.

3.4 Analisi statistica

Nell'ambito dell'analisi statistica condotta per la presente ricerca, sono state effettuate analisi descrittive su ciascuna popolazione e sotto-popolazioni utilizzando la media, la mediana e la deviazione standard e sono stati creati anche dei box plot per confrontare le varie popolazioni, allo scopo di fornire una visione della dispersione dei dati in ogni gruppo.

Per valutare l'accuratezza diagnostica dei singoli biomarcatori è stato utilizzato il software Analyse.it per Microsoft Excel, da cui si sono ottenute le curve ROC comparate per valutare l'accuratezza diagnostica, prima considerando i campioni sani con i campioni tumorali, i campioni tumorali con i controlli patologici ed infine tutte e tre le popolazioni. Inoltre, i valori soglia selezionati secondo il criterio dell'indice di Youden erano quelli che massimizzavano la sensibilità e la specificità e da questi sono stati calcolati i valori di valore predittivo positivo (VPP) e valore predittivo negativo (VPN). Sono state eseguite analisi logistiche multivariate per valutare il potere diagnostico dei marcatori, combinandoli insieme e ottenendo curve ROC confrontate con il test di DeLong.

Per valutare le relazioni tra i due biomarcatori CK7 e CK20 abbiamo calcolato il coefficiente di correlazione di Spearman, considerando i campioni sani e i campioni con tumore della vescica per un totale di 81 pazienti.

CAPITOLO 4

RISULTATI

4.1 Analisi descrittiva

Sono stati selezionati 41 campioni di pazienti con tumore della vescica ad alto grado T1G3, 40 campioni di pazienti sani e 290 controlli patologici provenienti dal centro prelievi delle Molinette in Torino, per un totale di 371 campioni analizzati. I controlli patologici sono stati suddivisi in cinque sottogruppi a seconda della patologia: tumori misti, patologie non infiammatorie, malattie del fegato, malattie della prostata e processi infiammatori.

Nelle popolazioni si è verificata la presenza dei biomarcatori tumorali CK7,CK20 e TERT nei campioni urinari dei pazienti. Per i primi due marcatori, l'analisi è stata eseguita in doppio, da cui si è calcolata la media, la mediana, la differenza interquartile e la deviazione standard come raffigurato nella Tabella 4.

SANI	CK 7	CK 20	TUMORI	CK7	CK20	CONTROLLI	CK7	CK20
MEDIA	37,33	43,39	MEDIA	34,16	38,424	MEDIA	36,75	35,81
MEDIANA	37,61	45	MEDIANA	33,58	38,26	MEDIANA	36,81	36,02
IQR	35,7-38,5	42,3-45	IQR	31,6-36,1	34,9-43,6	IQR	34,6-38,6	33,9-37,5
DS	2,11	2,28	DS	3,84	5,089	DS	3,12	3,6

Tabella 5 Le tre popolazioni oggetto di studio: popolazione dei sani, popolazione con tumore della vescica e popolazione dei controlli con calcolo della media, mediana, interquartile (IQR) e deviazione standard (DS) per i biomarcatori CK7 e CK20

Come si può notare dalla Tabella 5, nella popolazione dei sani CK7 è più espresso rispetto a CK20, infatti i cicli di amplificazione per il CK7 sono circa 37, mentre CK20 è intorno ai 44, come spiegato in precedenza, la concentrazione dei biomarcatori è inversamente proporzionale ai cicli di amplificazione, quindi maggiori sono i cicli di amplificazione minore è l'espressione del marcatore tumorale. Mentre nella popolazione dei malati, si può notare una maggiore espressione di questi due marcatori, perché CK7 lo si riscontra già al 34 ciclo di amplificazione, mentre CK20 lo si riscontra al 38 ciclo di amplificazione. Per quanto riguarda la terza popolazione, che comprende una casistica eterogenea, anche qui i due biomarcatori sono molto espressi come si può vedere da CK7 dove il ciclo di amplificazione è intorno a 37, mentre per quanto riguarda CK20 è 36.

E' stata calcolata per ciascuna delle popolazioni la deviazione standard: valori più elevati si riscontrano nella popolazione con tumore della vescica, indice di dispersione dei valori più elevata. In confronto, valori di deviazione standard più bassi si osservano nella popolazione dei sani e una situazione intermedia nella popolazione dei controlli.

TUMORI	CK7	CK20	PATOLOGI	CK7	CK20	FEGATO	CK7	CK20	PROSTATA	CK7	CK20	INFEZION	CK7	CK20
MEDIA	36,14	35,17	MEDIA	36,68	35,89	MEDIA	37,03	36,94	MEDIA	39,68	37,21	MEDIA	36,36	34,89
MEDIANA	36,31	35,85	MEDIANA	36,72	35,99	MEDIANA	37,16	36,61	MEDIANA	38,71	37,33	MEDIANA	36,54	35,81
QUARTILE	34,3-38,2	32,9-37,5	QUARTILE	34,6-38,4	33,9-37,5	QUARTILE	35,1-38,5	34,9-39,1	QUARTILE	37,2-45	35,4-39,3	QUARTILE	34-38	33,6-36,9
DS	2,726	3,875	DS	3,076	3,615	DS	2,293	2,988	DS	4,236	3,768	DS	3,231	2,962

Tabella 6 Le cinque sottopopolazioni incluse dei controlli patologici: tumori (verde), patologie non infiammatorie (giallo), patologie del fegato (arancione), patologie della prostata(azzurro) e infezioni /infiammazione (rosso) con calcolo della media, mediana, interquartile (IQR) e deviazione standard (DS)

I 290 campioni patologici sono stati poi suddivisi in altri 5 gruppi, in modo da verificare se le varie patologie potessero interferire con l'espressione dei due biomarcatori tumorali. Come si può notare dalla Tabella 5 nelle varie popolazioni è molto più espresso CK20, infatti nei tumori misti e nelle patologie non infiammatorie i cicli di amplificazione sono 35, mentre nelle infezioni e nella sepsi è presente intorno a 34, nelle patologie del fegato intorno a 36 e nelle patologie della prostata intorno a 37. CK7 nelle varie popolazioni è un po' meno espresso, in particolare nelle patologie della prostata è molto poco espresso.

E' stata calcolata per ciascuna delle popolazioni la deviazione standard: valori più elevati si riscontrano nella popolazione con patologie della prostata, indice di dispersione dei valori più elevata. In confronto, le altre popolazioni presentano valori di deviazione standard più o meno simili.

Nella Figura 16 sono rappresentati box plot suddivisi per la popolazione di origine e a seconda del tipo di marcatore.

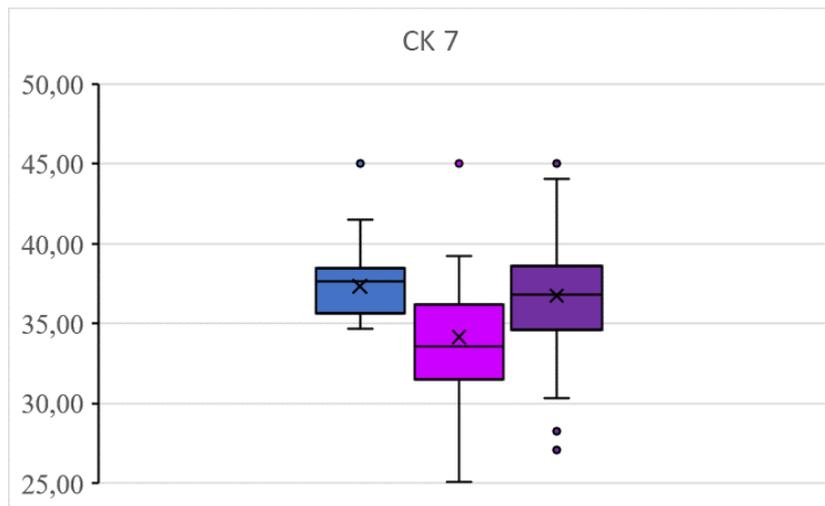


Figura 16 Box plot delle tre popolazioni oggetto di studio per l'espressione del marcatore CK7. Nel primo box plot (azzurro) sono rappresentati i campioni dei controlli sani, per quanto riguarda il marcatore CK7 è stato rilevato un valore medio pari a 37,33 (1° Quart. 35,62- 3° Quart. 38,50). Il secondo box plot (rosa) rappresenta i campioni tumorali di vescica ad alto grado, dove si può notare che i valori sono molto più simmetrici rispetto alla prima popolazione considerata, inoltre, il valore medio è 34,16 (1° Quart. 31,51- 3° Quart. 36,20) mentre il terzo box plot (viola) sono presenti i controlli patologici, una popolazione molto eterogenea, il CK7 ha un valore medio intorno a 36,74 (1° Quart. 34,57-3° Quart. 38,57)

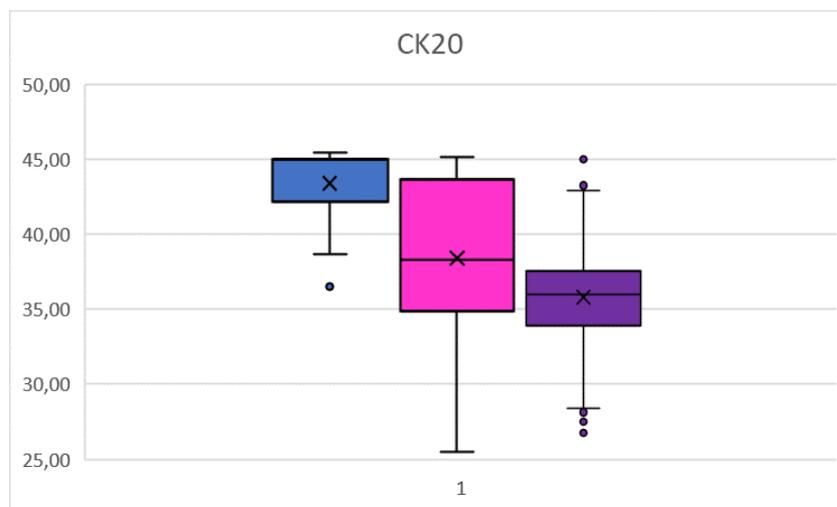


Figura 17 Box plot delle tre popolazioni oggetto di studio per l'espressione del marcatore CK20. Nella popolazione dei sani (azzurro) il valore medio è intorno 43,39 (1° Quart. 42,13- 3° Quart. 45), mentre nella popolazione dei tumorali (rosa) il valore medio è intorno 38,42 (1° Quart. 34,87-3° Quart. 43,68), nell'ultima popolazione, cioè quella dei controlli, il valore medio è intorno 35,81 (1° Quart. 33,88-3° Quart. 37,56).

Nella Figura 17 viene confrontato il marcatore CK20 nelle tre popolazioni. Nella Figura 18 e 19 vengono riportati i valori dei cicli di amplificazione per CK7 e CK20.

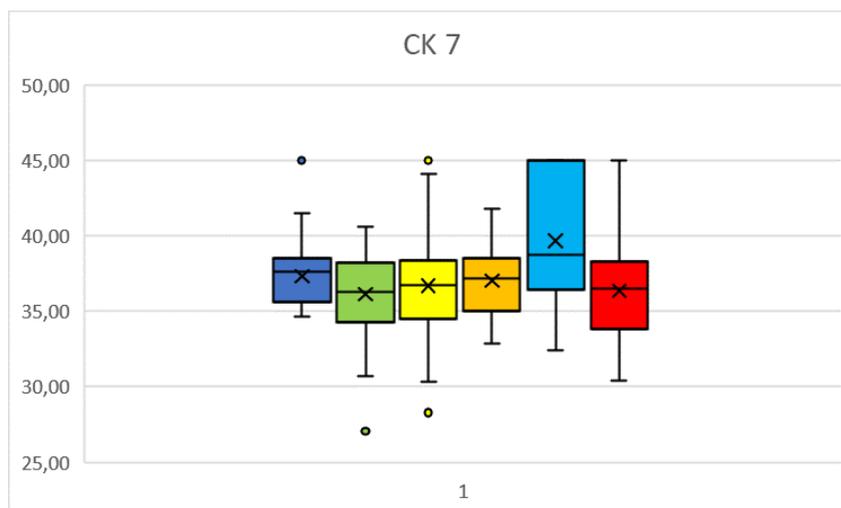


Figura 18 Box plot delle sei popolazioni per l'espressione del marcatore CK7, comprendente a sinistra la popolazione dei sani e i 5 sottogruppi inclusi nei controlli. nella popolazione dei sani (blu) il valore medio è pari a 37,33 (1° Quart. 35,62- 3° Quart. 38,50). La seconda popolazione (verde) rappresenta pazienti con altri tumori diversi dal tumore della vescica, il valore medio è pari 36,14 (1° Quart. 34,24- 3° Quart. 38,23), la terza popolazione (gialla) rappresenta pazienti con differenti patologie, il valore medio è pari 36,68 (1° Quart. 34,52- 3° Quart. 38,40). La quarta popolazione (arancione) rappresenta pazienti con patologie del fegato, il valore medio è pari 37,03 (1° Quart.35,00- 3° Quart. 38,54), la quinta popolazione (azzurra) rappresenta pazienti con patologie della prostata, il valore medio è pari 39,68 (1° Quart. 36,46- 3° Quart. 45), mentre l'ultima popolazione (rossa) rappresenta pazienti con infezioni, il valore medio è pari 36,36 (1° Quart. 33,81-3° Quart. 38,29).

Nella Figura 18 viene confrontato il marcatore CK7 nelle 6 popolazioni

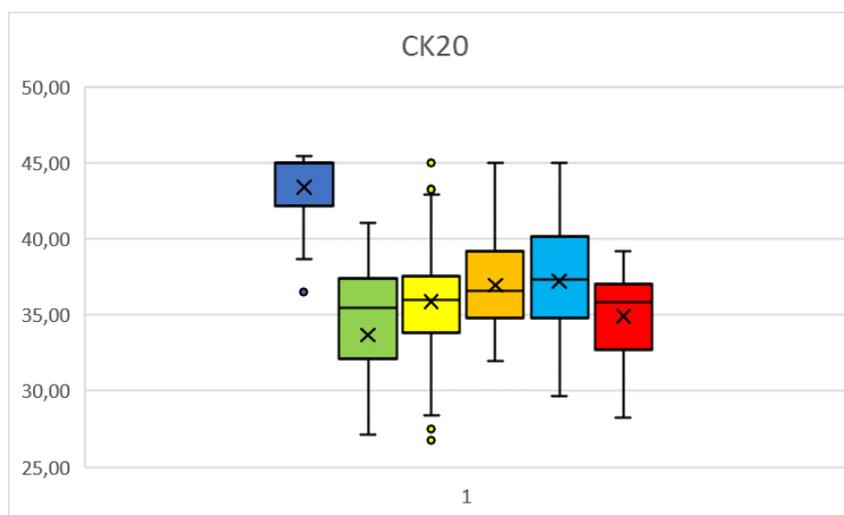


Figura 19 Box plot delle sei popolazioni in studio per l'espressione del marcatore CK20, comprendente a sinistra la popolazione dei sani e i cinque sottogruppi inclusi nei controlli. nella popolazione dei sani (blu) il valore medio è pari a 43,39 (1° Quart. 42,13- 3° Quart. 45,00). La seconda popolazione (verde) rappresenta pazienti con altri tumori diversi dal tumore della vescica, il valore medio è pari 33,67 (1° Quart. 32,11- 3° Quart. 37,38), la terza popolazione (gialla) rappresenta pazienti con differenti patologie, il valore medio è pari 35,89 (1° Quart. 33,86- 3° Quart. 37,52). La quarta popolazione (arancione) rappresenta pazienti con patologie del fegato, il valore medio è pari 36,94 (1° Quart.34,78- 3° Quart. 39,16), la quinta popolazione (azzurra) rappresenta pazienti con patologie della prostata, il valore medio è pari 37,21 (1° Quart. 34,76- 3° Quart. 40,13), mentre l'ultima popolazione (rossa) rappresenta pazienti con infezioni, il valore medio è pari 34,89 (1° Quart. 32,74-3° Quart. 36,99).

E' stato anche calcolato il coefficiente di correlazione tra il marcatore CK7 e CK20 prendendo in considerazione i pazienti sani con i pazienti con tumore della vescica, come mostrato nella Figura 20.

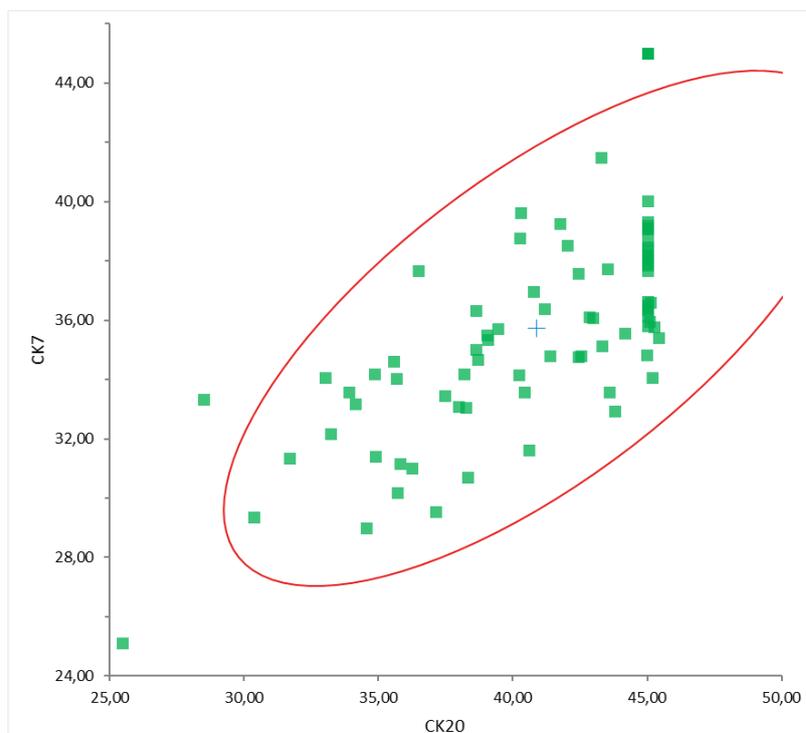


Figura 20 Retta di correlazione tra il marcatore CK7 e il marcatore CK20 da cui si è ottenuto un coefficiente di 0,706 valore positivo che indica che queste due variabili non sono completamente indipendenti l'una dall'altra

Il coefficiente di correlazione è una misura statistica importante per comprendere la correlazione lineare tra due variabili. L'intervallo di confidenza è compreso da 0,577 a 0,801, mentre dalla formula di Pearson si è ottenuto 0,706, valore positivo che indica che queste due variabili non sono completamente indipendenti l'una dall'altra.

E' stato analizzato il marcatore TERT, che è un marcatore molto specifico e poco sensibile. Andando ad analizzare le tre popolazioni considerate in questo studio, si è visto: nei pazienti sani è stato trovato in 3 pazienti su 41 campioni, pari al 7% di positività. Nei pazienti tumorali è stato trovato in 7 pazienti su 40 campioni, quindi la percentuale è del 17,5%, mentre nei controlli patologici, suddividendo i gruppi nei 5 sottogruppi precedentemente citati, si è visto che nei tumori misti, il marcatore è stato trovato in 6 pazienti su 60 campioni (10%), il secondo gruppo che prevede le patologie non infiammatorie ha riscontrato 9 pazienti in 161 pazienti (5,5%), nella terza popolazione, comprendente le patologie del fegato, questo marcatore è stato riscontrato in 2 pazienti su 24 (8,3%), la quarta popolazione comprendente le patologie

prostatiche non ha riscontrato l'espressione di questo marcatore, quindi si potrebbe dedurre che le patologie o comunque complicazioni della prostata non fungono da interferenti, quindi non modificano l'espressione di questi marcatori. L'ultima popolazione comprende pazienti con sepsi o infiammazione, dove il marcatore è stato riscontrato in 3 pazienti su 27 campioni, con una percentuale dell'11,1%. Il totale dei campioni analizzati è di 371 e quindi, il marcatore è stato riscontrato in 30 pazienti su 371, con una percentuale dell'8%.

La Tabella 7 è una tabella di concordanza dove si sono paragonati i pazienti con tumore della vescica ad alto grado e i pazienti sani, da cui poi si sono calcolate la sensibilità e la specificità. La sensibilità è 17% mentre la specificità è 92,5%, conferma del fatto che TERT è un marcatore molto specifico ma poco sensibile.

	TERT	
	+	-
K	7	34
SANI	3	37

Tabella 7 Tabella di concordanza tra pazienti con tumore e pazienti sani per il marcatore TERT di cui si sono calcolati: la sensibilità che è 17%, la specificità è 92,5%, il valore predittivo positivo è 70% e il VPN 47%.

Poi è stato calcolato anche il valore predittivo positivo, che corrisponde alla proporzione dei pazienti positivi che sono effettivamente malati e il valore predittivo negativo che corrisponde alla proporzione dei pazienti negativi che sono sani.

Nella Tabella 8 invece, si sono paragonati i pazienti con tumore della vescica ad alto grado e i controlli patologici, da cui poi si sono calcolate la specificità e la sensibilità. La sensibilità è 17% mentre la specificità è 93,1%.

	TERT	
	+	-
K	7	34
CNTRL	20	270

Tabella 8 Tabella di concordanza tra pazienti con tumore e controlli patologici per il marcatore TERT di cui si sono calcolati: la sensibilità è 17%, la specificità è 93,1%, il VPP è 26% e VPN è 88,8%

Nella Tabella 9 si sono paragonati i pazienti con tumore della vescica ad alto grado e i pazienti sani con i controlli patologici, da cui poi si sono calcolate la specificità e la sensibilità. La sensibilità è 17%, mentre la specificità è 93%.

	TERT	
	+	-
K	7	34
CNTRL	23	307

Tabella 9 Tabella di concordanza tra pazienti sani e i controlli per il marcatore TERT di cui si sono calcolati: la sensibilità è 17%, la specificità è 93%, il VPP è 23%, il VPN è 90%

4.2 Accuratezza diagnostica

La Figura 21 mostra le curve ROC che mettono in relazione la sensibilità con la specificità dei due biomarcatori esaminati CK7 e CK20, in 40 campioni di pazienti sani e 41 campioni di pazienti con tumore della vescica ad alto grado. L'accuratezza, corrispondente all'area sotto la curva (AUC), individuata del marcatore CK7 è 0,813, mentre per il marcatore CK20 è 0,784. L'intervallo di confidenza dell'AUC per CK7 compreso tra 0,681 a 0,887, mentre l'intervallo di confidenza dell'AUC per CK20 è compreso tra 0,710 a 0,915. Confrontando l'accuratezza dei due biomarcatori la differenza è pari a 0,029 con un intervallo di confidenza compreso tra - 0,005 e 0,112.

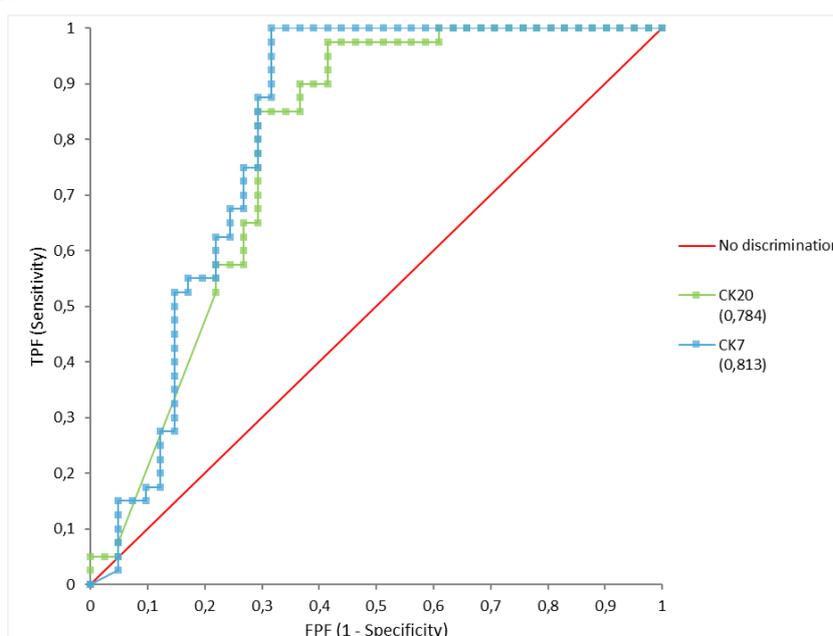


Figura 21 Curva ROC calcolata tra i pazienti tumorali e i pazienti sani: CK20 presenta AUC di 0,784, mentre CK7 a 0,813

	AUC	95% CI
CK20	0,784	0,681 to 0,887
CK7	0,813	0,710 to 0,915
Contrast	Difference	95% CI
CK7 - CK20	0,029	-0,055 to 0,112

La Tabella 10 mostra i valori di cut-off dei due marcatori, considerando l'indice di Youden: CK20 38,64 con una sensibilità e specificità rispettivamente 97,5% e 58,5%; CK7 34,62 con una sensibilità del 100% e una specificità dell'68,3%.

	Cut-off	Sensitivity	Specificity
CK20	38,64	0,975	0,585
CK7	34,62	1	0,683

Tabella 10 Valori di cut-off, sensibilità e specificità dei due biomarcatori CK7 e CK20 per pazienti tumorali e pazienti sani. Per CK20 il cut-off è 38,64, la sensibilità è 97,5%, la specificità è 58,5%. La CK7 presenta un cut-off di 34,62, la sensibilità è del 100%, la specificità è 68,3%

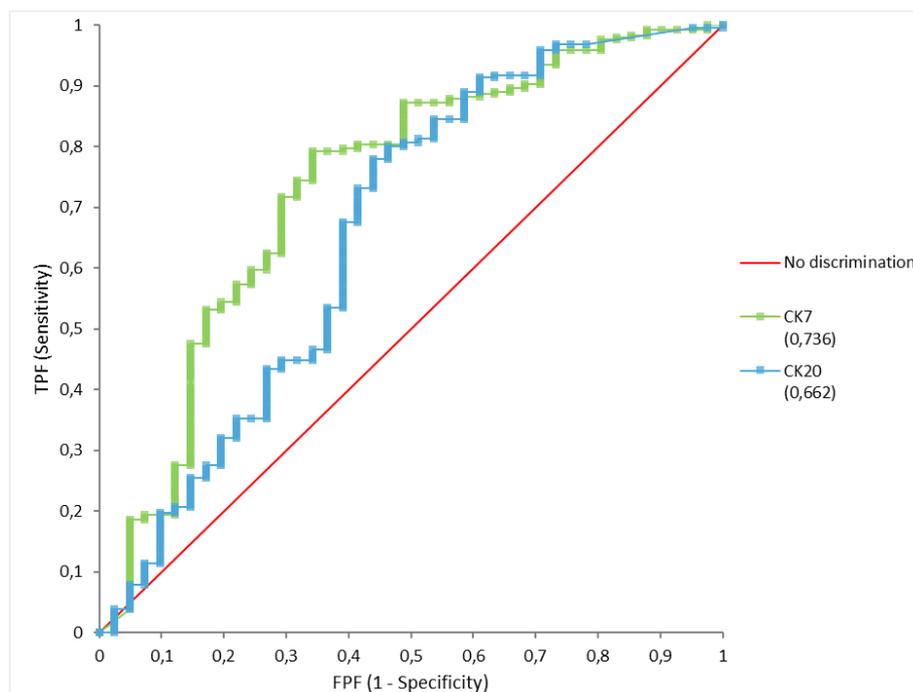


Figura 22 Curva ROC tra controlli patologici e pazienti con tumore della vescica: CK7 presenta AUC di 0,736 mentre il marcatore CK20 presenta AUC di 0,662.

La Figura 22 mostra le curve ROC che mettono in relazione la sensibilità con la specificità dei due biomarcatori esaminati CK7 e CK20, in 290 campioni di controlli patologici e 41 campioni di pazienti con tumore della vescica ad alto grado. L'accuratezza individuata del marcatore CK7 è 0,736, mentre per il marcatore CK20 è 0,662. L'intervallo di confidenza dell'AUC per CK7 compreso tra 0,645 a 0,827, mentre l'intervallo di confidenza dell'AUC per CK20 è compreso tra 0,558 a 0,766. Confrontando l'accuratezza dei due biomarcatori la differenza è pari a 0,074 con un intervallo di confidenza compreso tra -0,100 e 0,247

	AUC	95% CI
CK7	0,736	0,645 to 0,827
CK20	0,662	0,558 to 0,766
Contrast	Difference	95% CI
CK7 - CK20	0,074	-0,100 to 0,247

La Tabella 11 mostra i valori di cut-off dei due marcatori, considerando l'indice di Youden: CK20 37,97 con una sensibilità e specificità rispettivamente 77,9% e 56,1%; CK7 34,18 con una sensibilità del 79,3% e una specificità dell'65,9%.

	Cut-off	Sensitivity	Specificity
CK20	37,97	0,779	0,561
CK7	34,18	0,793	0,659

Tabella 11 Valori di cut off, sensibilità e di specificità dei due biomarcatori CK7 e CK20 per i controlli patologici e pazienti tumorali: per il CK20 il cut-off è 37,97, con una sensibilità di 77,9%, la specificità del 56,1%. Per CK7 il cut-off è 34,18, la sensibilità è 79,3%, la specificità 65,9%

La Figura 23 mostra le curve ROC che mette in relazione la sensibilità con la specificità dei due biomarcatori esaminati CK7 e CK20, in 40 campioni di pazienti sani, 290 di controlli patologici per un totale di 330 controlli e 41 campioni di pazienti con tumore della vescica ad alto grado. L'accuratezza individuata del marcatore CK7 è 0,745, mentre per il marcatore CK20 è 0,611. L'intervallo di confidenza dell'AUC per CK7 compreso tra 0,654 a 0,836, mentre l'intervallo di confidenza dell'AUC per CK20 è compreso tra 0,510 a 0,836. Confrontando l'accuratezza dei due biomarcatori la differenza è pari a 0,029 con un intervallo di confidenza compreso tra -0,005 e 0,112.

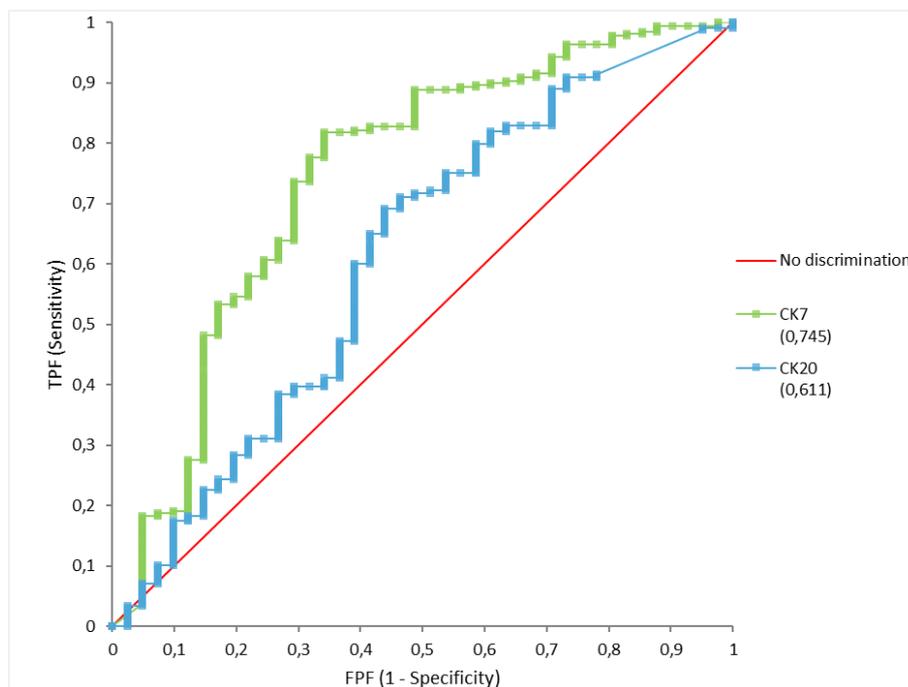


Figura 23 Curva ROC delle tre popolazioni oggetto di studio Curva ROC tra controlli patologici e pazienti con tumore della vescica: CK7 presenta AUC di 0,745 mentre il marcatore CK20 presenta AUC DI 0,611.

	AUC	95%
CK7	0,745	0,654
CK20	0,611	0,510

La Tabella 12 mostra i valori di cut-off dei due marcatori, considerando l'indice di Youden: CK20 38,6 con una sensibilità e specificità rispettivamente 97,5% e 58,5%; CK7 34,6 con una sensibilità del 100% e una specificità dell'68,3%.

	Cut-off	Sensitivity	Specificity
CK20	38,64	0,975	0,585
CK7	34,62	1	0,683

Tabella 12 Valori di cut off, sensibilità e specificità dei due biomarcatori CK7 e CK20 nelle tre popolazioni oggetto di studio: CK7 presenta un cut-off di 38,64, la sensibilità è 97,5%, la specificità è 58,5%. CK7 presenta un cut-off di 34,62, la sensibilità è 100%, la specificità è 68,3%

4.3 Combinazione dei tre biomarcatori

Successivamente sono state calcolate le curve ROC combinando i tre biomarcatori tumorali in modo da analizzarne l'accuratezza diagnostica.

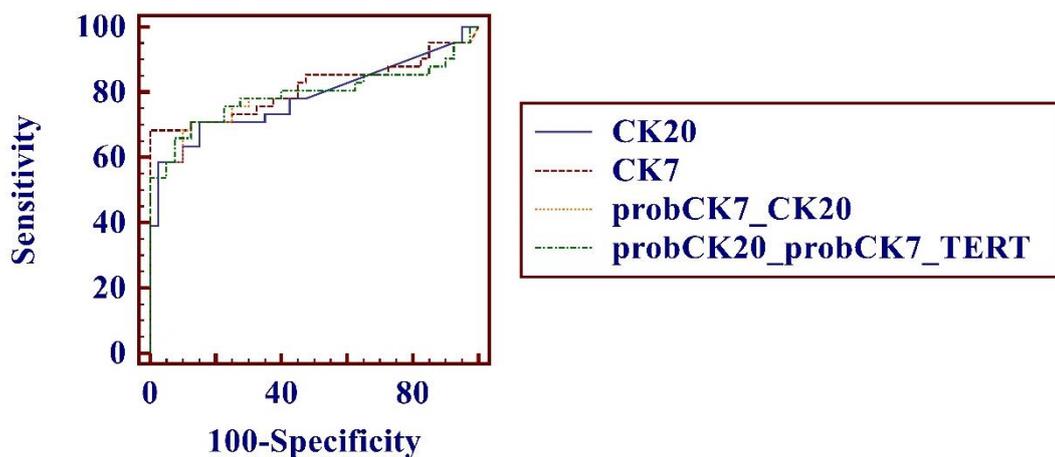


Figura 24 Curva ROC tra popolazione dei sani e popolazione con tumore della vescica

Come si può notare dalla Figura 24, sono state calcolate le curve ROC considerando 81 campioni, di cui 40 di campioni sani e 41 di campioni con tumore della vescica ad alto grado; si è partiti calcolando i due biomarcatori CK7 e CK20 singolarmente, combinati insieme e combinati anche con il marcatore TERT. Come si può notare dalla tabella sottostante, si sono calcolate quindi, le curve ROC e si è visto che la curva AUC migliore si è riscontrata nel marcatore CK 7, mentre il marcatore CK20 ha un valore inferiore, mentre combinando insieme i tre biomarcatori si è ottenuta una curva AUC buona intorno a 0.792.

	AUC	SE ^a	95% CI ^b
CK20	0.784	0.0527	0.679 to 0.868
CK7	0.813	0.0522	0.711 to 0.891
probCK7_CK20	0.788	0.0554	0.683 to 0.871
probCK20_probCK7_TERT	0.792	0.0552	0.688 to 0.874

Tabella 13 Curve ROC dei biomarcatori presi singolarmente e in combinazione: CK20 presenta AUC di 0.784, CK7 ha AUC maggiore intorno a 0.813, mentre in combinazione con TERT l'AUC è 0.792

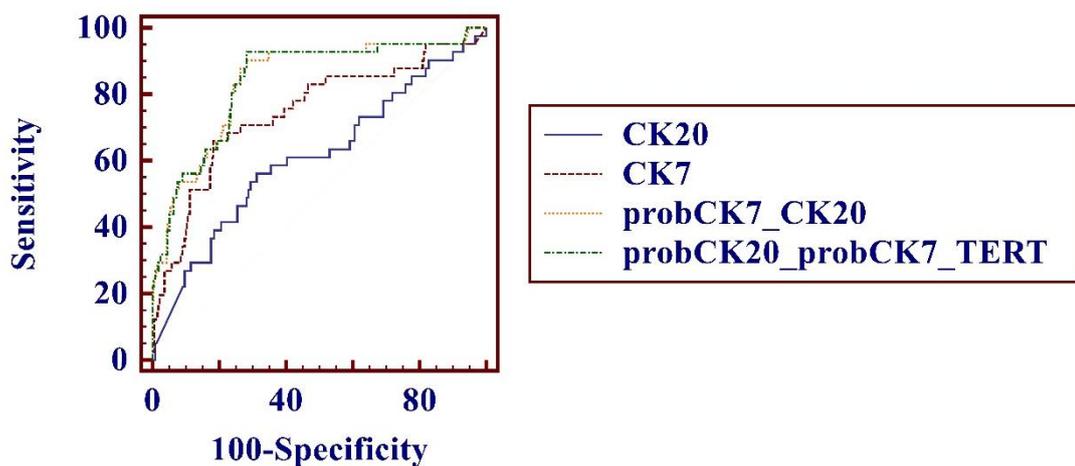


Figura 25 Curva ROC tra popolazione con tumore della vescica e popolazione dei controlli

Come si può notare dalla Figura 25, sono state calcolate le curve ROC considerando 371 campioni, di cui 330 controlli patologici provenienti dal centro prelievi e 41 di campioni con tumore della vescica ad alto grado; si è partiti calcolando i due biomarcatori CK7 e CK20 singolarmente, combinati insieme e combinati anche con il marcatore TERT. Come si può notare dalla tabella sottostante, si sono calcolate quindi, le curve ROC e si è visto che la curva AUC migliore si è riscontrata nel marcatore CK 7, mentre il marcatore CK20 ha un valore inferiore, mentre combinando insieme i due biomarcatori la curva AUC è migliore arrivando a 0.838, mentre combinando insieme i tre biomarcatori si è ottenuta una curva AUC pari a 0.839.

	AUC	SE ^a	95% CI ^b
CK20	0.608	0.0515	0.556 to 0.658
CK7	0.745	0.0466	0.697 to 0.789
probCK7_CK20	0.838	0.0362	0.797 to 0.874
probCK20_probCK7_TERT	0.839	0.0363	0.798 to 0.875

Tabella 14 Curve ROC dei biomarcatori presi singolarmente e combinati insieme: CK20 presenta AUC di 0.608, CK7 presenta AUC maggiore intorno a 0.745, mentre dalla combinazione dei 3 marcatori si ottiene un AUC buona intorno a 0.839

CAPITOLO 5

DISCUSSIONE

Ad oggi non sono ancora stati validati ed introdotti nella routine del laboratorio biomarcatori per il tumore della vescica. Tra le cause, una scarsa accuratezza diagnostica e comunque nessun marcatore si è mai dimostrato superiore alla citologia urinaria, che rimane il test di screening più utilizzato, anche se è poco specifico. Inoltre, numerosi studi considerano l'utilità dei biomarcatori nell'evitare procedure invasive come la cistoscopia, soprattutto nel monitoraggio dei pazienti, quindi ad un buon marcatore viene richiesta un'elevata accuratezza. A ciò si devono aggiungere i problemi legati al tipo di campione da utilizzare, con l'urina che rappresenta un candidato ideale ma difficile da gestire a livello pre-analitico, come ad esempio per la stabilità delle molecole. In questo studio, dal momento che l'urina può andare incontro a rapide e difficilmente prevedibili modifiche, per renderla il più stabile possibile è stato aggiunto il guanidinio. Anche per la conservazione dei campioni, è importante mantenere alla giusta temperatura per non incorrere in alterazioni delle componenti che possono interferire con l'espressione dei biomarcatori considerati. Analogamente per una corretta interpretazione del dato analitico bisogna valutare l'effetto della matrice urinaria, piuttosto complessa e potenzialmente ricca di sostanze interferenti. A tal riguardo, per i controlli patologici raccolti presso il Laboratorio Baldi e Riberi si è cercato di individuare sottogruppi abbastanza omogenei in base al tipo di patologia: il primo gruppo sono pazienti con tumori diversi dal tumore della vescica, il secondo gruppo sono pazienti con patologie non infiammatorie, quali malattie del sistema cardiovascolare, diabete, sclerosi multipla; il terzo gruppo comprende pazienti con patologie del fegato, il quarto gruppo pazienti con patologie benigne (ipertrofia prostatica, prostatiti) o maligne della prostata e l'ultimo gruppo pazienti con infezioni o sepsi. Tale approccio potrebbe consentire di evidenziare fattori o situazioni associate ad interferenze o alterazioni dell'espressione dei tre biomarcatori analizzati.

In questo studio abbiamo preso in considerazione l'espressione dell'mRNA di tre potenziali biomarcatori: CK7, CK20 e TERT. I primi due sono citocheratine che appartengono ai filamenti intermedi del citoscheletro, sono spesso espresse insieme in diversi tipi di tumore. CK20 è una citocheratina acida a basso peso molecolare, espressa in poche cellule della vescica, presenta un'elevata sensibilità e la sua espressione è maggiore nei tumori non muscolo-invasivi, mentre diminuisce nei tumori muscolo-invasivi. CK7 è una citocheratina basica, la cui espressione

insieme alla CK20 è un utile strumento diagnostico per andare a differenziare l'origine dei tumori vescicali, infatti CK7 la si riscontra sia nei tumori non muscolo-invasivi che muscolo-invasivi del tumore della vescica, oltre che in altri tipi di tumore, inoltre presenta un'elevata sensibilità per i tumori di basso e alto grado rispettivamente del 90 e del 95% rispetto alla citologia urinaria.[122] [123] TERT è la telomerasi trascrittasi inversa e rappresenta un ottimo marcatore per la diagnosi precoce dei tumori alla vescica, essendo molto più performante della citologia, riuscendo a rilevare condizioni precoci del tumore della vescica. Le mutazioni dei promotori del TERT possono rappresentare un valido strumento per la diagnosi precoce del tumore, senza utilizzare tecniche più complesse e invasive.[124]

L'obiettivo di questo studio è stato quello di sviluppare un protocollo diagnostico in Real time PCR multiplex di questi tre biomarcatori nelle urine di pazienti con tumore della vescica, in modo da valutarne un possibile uso in ambito clinico.

Punti di forza del lavoro sono la standardizzazione delle modalità di raccolta dei campioni di urina, al fine di ridurre al minimo la variabilità pre-analitica e l'utilizzo di una metodica automatizzata per l'estrazione dei campioni. In letteratura sono presenti dati incoraggianti riguardo l'utilizzo dei marcatori, in particolare dei biomarcatori CK7 e CK20. Si è iniziato, quindi, con una valutazione separata dei biomarcatori CK7 e CK20 con l'obiettivo di confermare le capacità diagnostiche. Una buona correlazione è stata trovata tra i due biomarcatori, suggerendo che possano ritenersi indicatori di anomalie fisiopatologiche simili, come dimostrato dai valori sovrapponibili delle aree sotto le curve ROC, pur evidenziando una lieve superiorità in termini di accuratezza di CK7, senza raggiungere la significatività statistica, ma con la possibilità di identificare una soglia associata al 100% di sensibilità nel confronto tra tumori della vescica e controlli sani e tra tumori della vescica e controlli totali (sani+patologici).

Dai risultati ottenuti analizzando i singoli biomarcatori, si è visto che TERT non era molto espresso, se non in pochissimi casi nella nostra popolazione, con positività solo in 7 pazienti dei 41 con tumore della vescica, e con una specificità del 93% ed una sensibilità del 17%, a conferma del fatto che si tratta di un biomarcatore molto specifico ma poco sensibile. È interessante notare che nell'ambito della popolazione di pazienti con patologie della prostata il marcatore TERT non è mai stato rilevato dalla PCR, facendo ipotizzare come processi patologici a carico della prostata non interferiscano con la espressione del biomarcatore.

L'analisi eseguita per calcolare l'accuratezza dei biomarcatori in combinazione ha confermato, da un lato, la migliore performance di CK7, dall'altro ha sottolineato il valore aggiunto dei tre

biomarcatori insieme quando applicati alla valutazione della curva ROC tra pazienti con tumore della vescica e tutta la popolazione di controllo.

Le principali limitazioni del presente studio sono legate alla relativamente bassa numerosità del gruppo dei pazienti con tumore della vescica e all'impossibilità di valutare il comportamento dei biomarcatori nella stratificazione tra tumori a basso o alto grado di malignità.

CAPITOLO 6

CONCLUSIONI

Ulteriori studi prospettici sono in corso per determinare l'accuratezza dei biomarcatori in una più ampia coorte di pazienti con tumore della vescica, anche a diversi stadi di malattia, e confrontarla con quella della citologia urinaria e di tecniche di imaging, al fine di definire il ruolo dei biomarcatori nell'iter diagnostico di questi tumori. L'estensione dello studio anche a raccolte seriate di urine ad intervalli di tempo potrà chiarire il possibile significato dei biomarcatori come tecnica non invasiva nel monitoraggio della risposta alla terapia e della ripresa di malattia. Ulteriori indicazioni potranno anche derivare dall'inserimento di nuovi biomarcatori nel pannello multiplex, in grado di ridurre le false positività che abbiamo rilevato e aumentare la capacità diagnostica del test. L'approccio multiparametrico, infatti, sembra essere la soluzione ottimale per l'utilizzo di combinazioni di biomarcatori, espressione dei diversi processi patologici che concorrono alla crescita e alla diffusione delle cellule tumorali.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Components of Urinary System. (n.d.). National Cancer Institute. <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/urinary/components/>
- [2] Urinary Bladder. (n.d.). National Cancer Institute. <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/urinary/components/bladder.html>.
- [3] Bolla SR, Odeluga N, Amraei R, et al. Histology, Bladder. [Updated 2023 Feb 25]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-.
- [4] Components of Urinary System. (n.d.). National Cancer Institute. <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/urinary/components/>
- [5] Shermadou ES, Rahman S, Leslie SW. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Bladder. [Updated 2023 Jul 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-.
- [6] Shermadou ES, Rahman S, Leslie SW. Anatomy, Abdomen and Pelvis: Bladder. [Updated 2023 Jul 24]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-.
- [7] Bladder Cancer statistics. (n.d.). World Cancer Research Fund International. <https://www.wcrf.org/cancer-trends/bladder-cancer-statistics/>
- [8] Jubber, I., Ong, S., Bukavina, L., Black, P. C., Compérat, E., Kamat, A. M., Kiemeny, L., Lawrentschuk, N., Lerner, S. P., Meeks, J. J., Moch, H., Necchi, A., Panebianco, V., Sridhar, S. S., Znaor, A., Catto, J. W. F., & Cumberbatch, M. G. (2023). Epidemiology of Bladder Cancer in 2023: A Systematic Review of Risk Factors. *European urology*, 84(2), 176–190.
- [9] Jubber, I., Ong, S., Bukavina, L., Black, P. C., Compérat, E., Kamat, A. M., Kiemeny, L., Lawrentschuk, N., Lerner, S. P., Meeks, J. J., Moch, H., Necchi, A., Panebianco, V., Sridhar, S. S., Znaor, A., Catto, J. W. F., & Cumberbatch, M. G. (2023). Epidemiology of Bladder Cancer in 2023: A Systematic Review of Risk Factors. *European urology*, 84(2), 176–190.
- [10] Kamoun, A., de Reyniès, A., Allory, Y., Sjö Dahl, G., Robertson, A. G., Seiler, R., Hoadley, K. A., Groeneveld, C. S., Al-Ahmadie, H., Choi, W., Castro, M. A. A., Fontugne, J., Eriksson, P., Mo, Q., Kardos, J., Zlotta, A., Hartmann, A., Dinney, C. P., Bellmunt, J., Powles, T., ...

Bladder Cancer Molecular Taxonomy Group (2020). A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *European urology*, 77(4), 420–433.

[11] Kirkali, Z., Chan, T., Manoharan, M., Algaba, F., Busch, C., Cheng, L., Kiemeny, L., Kriegmair, M., Montironi, R., Murphy, W. M., Sesterhenn, I. A., Tachibana, M., & Weider, J. (2005). Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*, 66(6 Suppl 1), 4–34.

[12] Kirkali, Z., Chan, T., Manoharan, M., Algaba, F., Busch, C., Cheng, L., Kiemeny, L., Kriegmair, M., Montironi, R., Murphy, W. M., Sesterhenn, I. A., Tachibana, M., & Weider, J. (2005). Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*, 66(6 Suppl 1), 4–34.

[13] Kirkali, Z., Chan, T., Manoharan, M., Algaba, F., Busch, C., Cheng, L., Kiemeny, L., Kriegmair, M., Montironi, R., Murphy, W. M., Sesterhenn, I. A., Tachibana, M., & Weider, J. (2005). Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*, 66(6 Suppl 1), 4–34.

[14] Kirkali, Z., Chan, T., Manoharan, M., Algaba, F., Busch, C., Cheng, L., Kiemeny, L., Kriegmair, M., Montironi, R., Murphy, W. M., Sesterhenn, I. A., Tachibana, M., & Weider, J. (2005). Bladder cancer: epidemiology, staging and grading, and diagnosis. *Urology*, 66(6 Suppl 1), 4–34.

[15] van de Putte, E. E. F., Bosschieter, J., van der Kwast, T. H., Bertz, S., Denzinger, S., Manach, Q., Compérat, E. M., Boormans, J. L., Jewett, M. A. S., Stoehr, R., van Leenders, G. J. L. H., Nieuwenhuijzen, J. A., Zlotta, A. R., Hendricksen, K., Rouprêt, M., Otto, W., Burger, M., Hartmann, A., & van Rhijn, B. W. G. (2018). The World Health Organization 1973 classification system for grade is an important prognosticator in T1 non-muscle-invasive bladder cancer. *BJU international*, 122(6), 978–985.

[16] Corral, R., Lewinger, J. P., Van Den Berg, D., Joshi, A. D., Yuan, J. M., Gago-Dominguez, M., Cortessis, V. K., Pike, M. C., Conti, D. V., Thomas, D. C., Edlund, C. K., Gao, Y. T., Xiang, Y. B., Zhang, W., Su, Y. C., & Stern, M. C. (2014). Comprehensive analyses of DNA repair pathways, smoking and bladder cancer risk in Los Angeles and Shanghai. *International journal of cancer*, 135(2), 335–347.

- [17] Rafnar, T., Vermeulen, S. H., Sulem, P., Thorleifsson, G., Aben, K. K., Witjes, J. A., Grotenhuis, A. J., Verhaegh, G. W., Hulsbergen-van de Kaa, C. A., Besenbacher, S., Gudbjartsson, D., Stacey, S. N., Gudmundsson, J., Johannsdottir, H., Bjarnason, H., Zanon, C., Helgadottir, H., Jonasson, J. G., Tryggvadottir, L., Jonsson, E., ... Kiemeny, L. A. (2011). European genome-wide association study identifies SLC14A1 as a new urinary bladder cancer susceptibility gene. *Human molecular genetics*, 20(21), 4268–4281.
- [18] Zaghoul, M. S., Zaghoul, T. M., Bishr, M. K., & Baumann, B. C. (2020). Urinary schistosomiasis and the associated bladder cancer: update. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*, 32(1), 44.
- [19] Saginala K, Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Padala SA, Barsouk A. Epidemiology of Bladder Cancer. *Med Sci (Basel)*. 2020 Mar 13;8(1):15.
- [20] Bladder cancer symptoms. (n.d.). National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/types/bladder/symptoms>
- [21] Oeyen, E., Hoekx, L., De Wachter, S., Baldewijns, M., Ameye, F., & Mertens, I. (2019). Bladder Cancer Diagnosis and Follow-Up: The Current Status and Possible Role of Extracellular Vesicles. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 821.
- [22] Furuse, H., & Ozono, S. (2010). Transurethral resection of the bladder tumour (TURBT) for non-muscle invasive bladder cancer: basic skills. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*, 17(8), 698–699.
- [23] Hu X, Li G, Wu S. Advances in Diagnosis and Therapy for Bladder Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Jun 29;14(13):3181.
- [24] Hu X, Li G, Wu S. Advances in Diagnosis and Therapy for Bladder Cancer. *Cancers (Basel)*. 2022 Jun 29;14(13):3181.
- [25] Grotenhuis, A. J., Ebben, C. W., Aben, K. K., Witjes, J. A., Vrieling, A., Vermeulen, S. H., & Kiemeny, L. A. (2015). The effect of smoking and timing of smoking cessation on clinical outcome in non-muscle-invasive bladder cancer. *Urologic oncology*, 33(2), 65.e9–65.e6.5E17.

- [26] Gupta, N. P., Saini, A. K., Dogra, P. N., Seth, A., & Kumar, R. (2011). Bipolar energy for transurethral resection of bladder tumours at low-power settings: initial experience. *BJU international*, 108(4), 553–556
- [27] Mariappan, P., Zachou, A., Grigor, K. M., & Edinburgh Uro-Oncology Group (2010). Detrusor muscle in the first, apparently complete transurethral resection of bladder tumour specimen is a surrogate marker of resection quality, predicts risk of early recurrence, and is dependent on operator experience. *European urology*, 57(5), 843–849.
- [28] Kim LHC, Patel MI. Transurethral resection of bladder tumour (TURBT). *Transl Androl Urol*. 2020 Dec;9(6):3056-3072.
- [29] Soria, F., Giordano, A., & Gontero, P. (2020). Transurethral resection of bladder tumor and the need for re-transurethral resection of bladder tumor: time to change our practice?. *Current opinion in urology*, 30(3), 370–376.
- [30] Kim LHC, Patel MI. Transurethral resection of bladder tumour (TURBT). *Transl Androl Urol*. 2020 Dec;9(6):3056-3072.
- [31] Soria, F., Giordano, A., & Gontero, P. (2020). Transurethral resection of bladder tumor and the need for re-transurethral resection of bladder tumor: time to change our practice?. *Current opinion in urology*, 30(3), 370–376.
- [32] Porten SP, Leapman MS, Greene KL. Intravesical chemotherapy in non-muscle-invasive bladder cancer. *Indian J Urol*. 2015 Oct-Dec;31(4):297-303.
- [33] Wołęcawicz, M., Hryniewicz, R., Grywalska, E., Suchojad, T., Leksowski, T., Roliński, J., & Niedźwiedzka-Rystwej, P. (2020). Immunotherapy in Bladder Cancer: Current Methods and Future Perspectives. *Cancers*, 12(5), 1181.
- [34] Zhang J, Li M, Chen Z, OuYang J, Ling Z. Efficacy of Bladder Intravesical Chemotherapy with Three Drugs for Preventing Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer Recurrence. *J Healthc Eng*. 2021 Nov 30;2021:2360717.
- [35] Zhang J, Li M, Chen Z, OuYang J, Ling Z. Efficacy of Bladder Intravesical Chemotherapy with Three Drugs for Preventing Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer Recurrence. *J Healthc Eng*. 2021 Nov 30;2021:2360717.

- [36] Zhang J, Li M, Chen Z, OuYang J, Ling Z. Efficacy of Bladder Intravesical Chemotherapy with Three Drugs for Preventing Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer Recurrence. *J Healthc Eng.* 2021 Nov 30;2021:2360717.
- [37] Hara, T., Takahashi, M., Gondo, T., Nagao, K., Ohmi, C., Sakano, S., Naito, K., & Matsuyama, H. (2009). Risk of concomitant carcinoma in situ determining biopsy candidates among primary non-muscle-invasive bladder cancer patients: retrospective analysis of 173 Japanese cases. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*, 16(3), 293–298.
- [38] Huguet, J., Crego, M., Sabaté, S., Salvador, J., Palou, J., & Villavicencio, H. (2005). Cystectomy in patients with high risk superficial bladder tumors who fail intravesical BCG therapy: pre-cystectomy prostate involvement as a prognostic factor. *European urology*, 48(1), 53–59.
- [39] Palou, J., Sylvester, R. J., Faba, O. R., Parada, R., Peña, J. A., Algaba, F., & Villavicencio, H. (2012). Female gender and carcinoma in situ in the prostatic urethra are prognostic factors for recurrence, progression, and disease-specific mortality in T1G3 bladder cancer patients treated with bacillus Calmette-Guérin. *European urology*, 62(1), 118–125.
- [40] Losa, A., Hurle, R., & Lembo, A. (2000). Low dose bacillus Calmette-Guerin for carcinoma in situ of the bladder: long-term results. *The Journal of urology*, 163(1), 68–72.
- [41] Miyake, H., Eto, H., Hara, S., Okada, H., Kamidono, S., & Hara, I. (2002). Clinical outcome of bacillus Calmette-Guérin perfusion therapy for carcinoma in situ of the upper urinary tract. *International journal of urology : official journal of the Japanese Urological Association*, 9(12), 677–680.
- [42] Kaasinen, E., Wijkström, H., Malmström, P. U., Hellsten, S., Duchek, M., Mestad, O., Rintala, E., & Nordic Urothelial Cancer Group (2003). Alternating mitomycin C and BCG instillations versus BCG alone in treatment of carcinoma in situ of the urinary bladder: a nordic study. *European urology*, 43(6), 637–645.

- [43] Sylvester, R. J., van der Meijden, A., Witjes, J. A., Jakse, G., Nonomura, N., Cheng, C., Torres, A., Watson, R., & Kurth, K. H. (2005). High-grade Ta urothelial carcinoma and carcinoma in situ of the bladder. *Urology*, 66(6 Suppl 1), 90–107.
- [44] Goebbels, R., Amberger, L., Wernert, N., & Dhom, G. (1985). Urothelial carcinoma of the prostate. *Applied pathology*, 3(4), 242–254.
- [45] Holmång, S., Andius, P., Hedelin, H., Wester, K., Busch, C., & Johansson, S. L. (2001). Stage progression in Ta papillary urothelial tumors: relationship to grade, immunohistochemical expression of tumor markers, mitotic frequency and DNA ploidy. *The Journal of urology*, 165(4), 1124–1130.
- [46] Palou, J., Rodríguez-Rubio, F., Millán, F., Algaba, F., Rodríguez-Faba, O., Huguet, J., & Villavicencio, H. (2009). Recurrence at three months and high-grade recurrence as prognostic factor of progression in multivariate analysis of T1G2 bladder tumors. *Urology*, 73(6), 1313–1317.
- [47] Mariappan, P., & Smith, G. (2005). A surveillance schedule for G1Ta bladder cancer allowing efficient use of check cystoscopy and safe discharge at 5 years based on a 25-year prospective database. *The Journal of urology*, 173(4), 1108–1111.
- [48] Soukup, V., Babjuk, M., Bellmunt, J., Dalbagni, G., Giannarini, G., Hakenberg, O. W., Herr, H., Lechevallier, E., & Ribal, M. J. (2012). Follow-up after surgical treatment of bladder cancer: a critical analysis of the literature. *European urology*, 62(2), 290–302.
- [49] National Collaborating Centre for Cancer (UK). (2015). *Bladder Cancer: Diagnosis and Management*. National Institute for Health and Care Excellence (NICE).
- [50] Kim KH, Lee HW, Ha HK, Seo HK. Perioperative systemic therapy in muscle invasive bladder cancer: Current standard method, biomarkers and emerging strategies. *Investig Clin Urol*. 2023 May;64(3):202-218.
- [51] Aminoltejari K, Black PC. Radical cystectomy: a review of techniques, developments and controversies. *Transl Androl Urol*. 2020 Dec;9(6):3073-3081.
- [52] Aminoltejari K, Black PC. Radical cystectomy: a review of techniques, developments and controversies. *Transl Androl Urol*. 2020 Dec;9(6):3073-3081.

- [53] H. Kitamura, T. Tsukamoto, T. Shibata, N. Masumori, H. Fujimoto, Y. Hirao, K. Fujimoto, Y. Kitamura, Y. Tomita, K. Tobisu, M. Niwakawa, S. Naito, M. Eto, Y. Kakehi. Randomised phase III study of neoadjuvant chemotherapy with methotrexate, doxorubicin, vinblastine and cisplatin followed by radical cystectomy compared with radical cystectomy alone for muscle-invasive bladder cancer: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG0209, *Annals of Oncology*, Volume 25, Issue 6, 2014, Pages 1192-1198.
- [54] Culine, S., Allory, Y., & Pfister, C. (2018). Refining the use of neoadjuvant chemotherapy in locally advanced bladder cancer: from conviction to optimization. *Translational andrology and urology*, 7(4), 757–759.
- [55] Zhang, S., Yu, Y. H., Zhang, Y., Qu, W., & Li, J. (2015). Radiotherapy in muscle-invasive bladder cancer: the latest research progress and clinical application. *American journal of cancer research*, 5(2), 854–868.
- [56] Marta, G. N., Hanna, S. A., Gadia, R., Correa, S. F., Silva, J. L., & Carvalho, H. de A. (2012). The role of radiotherapy in urinary bladder cancer: current status. *International braz j urol : official journal of the Brazilian Society of Urology*, 38(2), 144–154.
- [57] Wołacewicz, M., Hrynkiewicz, R., Grywalska, E., Suchojad, T., Leksowski, T., Roliński, J., & Niedźwiedzka-Rystwej, P. (2020). Immunotherapy in Bladder Cancer: Current Methods and Future Perspectives. *Cancers*, 12(5), 1181.
- [58] Wołacewicz M, Hrynkiewicz R, Grywalska E, Suchojad T, Leksowski T, Roliński J, Niedźwiedzka-Rystwej P. Immunotherapy in Bladder Cancer: Current Methods and Future Perspectives. *Cancers (Basel)*. 2020 May 7;12(5):1181
- [59] Yahyazadeh R, Bashash D, Ghaffari P, Kord S, Safaroghli-Azar A, Ghaffari SH. Evaluation of hTERT, KRT7, and survivin in urine for noninvasive detection of bladder cancer using real-time PCR. *BMC Urol*. 2021 Apr 19;21(1):64.
- [60] Dimashkieh, H., Wolff, D. J., Smith, T. M., Houser, P. M., Nietert, P. J., & Yang, J. (2013). Evaluation of urovysion and cytology for bladder cancer detection: a study of 1835 paired urine samples with clinical and histologic correlation. *Cancer cytopathology*, 121(10), 591–597.

- [61] Jeong SH, Ku JH. Urinary Markers for Bladder Cancer Diagnosis and Monitoring. *Front Cell Dev Biol.* 2022 May 2;10:892067.
- [62] Miremami J, Kyprianou N. The promise of novel molecular markers in bladder cancer. *Int J Mol Sci.* 2014 Dec 22;15(12):23897-908.
- [63] Pichler, R., Tulchiner, G., Fritz, J., Schaefer, G., Horninger, W., & Heidegger, I. (2017). Urinary UBC Rapid and NMP22 Test for Bladder Cancer Surveillance in Comparison to Urinary Cytology: Results from a Prospective Single-Center Study. *International journal of medical sciences*, 14(9), 811–819.
- [64] Pichler, R., Tulchiner, G., Fritz, J., Schaefer, G., Horninger, W., & Heidegger, I. (2017). Urinary UBC Rapid and NMP22 Test for Bladder Cancer Surveillance in Comparison to Urinary Cytology: Results from a Prospective Single-Center Study. *International journal of medical sciences*, 14(9), 811–819.
- [65] Mian, C., Pycha, A., Wiener, H., Haitel, A., Lodde, M., & Marberger, M. (1999). Immunocyt: a new tool for detecting transitional cell cancer of the urinary tract. *The Journal of urology*, 161(5), 1486–1489.
- [66] He H, Han C, Hao L, Zang G. ImmunoCyt test compared to cytology in the diagnosis of bladder cancer: A meta-analysis. *Oncol Lett.* 2016 Jul;12(1):83-88.
- [67] Wolfs JRE, et al. Novel urinary biomarkers ADXBLADDER and bladder EpiCheck for diagnostics of bladder cancer: A review. *Urol Oncol Semin Orig Investig* 2021;39: 161–70.
- [68] Ekaterina Laukhtina et al. Diagnostic Accuracy of Novel Urinary Biomarker Tests in Non-muscle-invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *Eur Urol Oncol.* 2021;4(6):927-942.
- [69] D'Elia C, Folchini DM, Mian C, Hanspeter E, Schwienbacher C, Spedicato GA, Pycha S, Vjaters E, Degener S, Kafka M, Pycha A, Trenti E. Diagnostic value of Xpert® Bladder Cancer Monitor in the follow-up of patients affected by non-muscle invasive bladder cancer: an update. *Ther Adv Urol.* 2021 Mar 5;13:1756287221997183
- [70] Witjes, J. A., Morote, J., Cornel, E. B., Gakis, G., van Valenberg, F. J. P., Lozano, F., Sternberg, I. A., Willemsen, E., Hegemann, M. L., Paitan, Y., & Leibovitch, I. (2018).

Performance of the Bladder EpiCheck™ Methylation Test for Patients Under Surveillance for Non-muscle-invasive Bladder Cancer: Results of a Multicenter, Prospective, *Blinded Clinical Trial*. *European urology oncology*, 1(4), 307–313.

[71] Sieverink CA, Batista RPM, Prazeres HJM, Vinagre J, Sampaio C, Leão RR, Máximo V, Witjes JA, Soares P. Clinical Validation of a Urine Test (Uromonitor-V2®) for the Surveillance of Non-Muscle-Invasive Bladder Cancer Patients. *Diagnostics (Basel)*. 2020 Sep 24;10(10):745.

[72] Raman, J. D., Kavalieris, L., Konety, B., Porten, S., Daneshmand, S., Lotan, Y., & Loo, R. (2021). The Diagnostic Performance of Cxbladder Resolve, Alone and in Combination with Other Cxbladder Tests, in the Identification and Priority Evaluation of Patients at Risk for Urothelial Carcinoma. *The Journal of urology*, 206(6), 1380–1389.

[73] Leotsakos, I., Dimopoulos, P., Gkioka, E., Msaouel, P., Nezos, A., Stravodimos, K. G., Koutsilieris, M., & Constantinides, C. A. (2014). Detection of circulating tumor cells in bladder cancer using multiplex PCR assays. *Anticancer research*, 34(12), 7415–7424.

[74] Bruch, P. G., Plage, H., Hofbauer, S., Kornienko, K., Weinberger, S., Roßner, F., Schallenberg, S., Kluth, M., Lennartz, M., Blessin, N. C., Marx, A. H., Samtleben, H., Fisch, M., Rink, M., Slojewski, M., Kaczmarek, K., Ecke, T., Hallmann, S., Koch, S., Adamini, N., Elezkurtaj, S. (2023). Cytokeratin 20 expression is linked to stage progression and to poor prognosis in advanced (pT4) urothelial carcinoma of the bladder. *Experimental and molecular pathology*, 131, 104860.

[75] Jiang, J., Ulbright, T. M., Younger, C., Sanchez, K., Bostwick, D. G., Koch, M. O., Eble, J. N., & Cheng, L. (2001). Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 in primary urinary bladder carcinoma and matched lymph node metastasis. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 125(7), 921–923.

[76] Yahyazadeh R, Bashash D, Ghaffari P, Kord S, Safaroghli-Azar A, Ghaffari SH. Evaluation of hTERT, KRT7, and survivin in urine for noninvasive detection of bladder cancer using real-time PCR. *BMC Urol*. 2021 Apr 19;21(1):64.

- [77] Fu, L., Zhang, J., Li, L., Yang, Y., & Yuan, Y. (2020). Diagnostic accuracy of urinary survivin mRNA expression detected by RT-PCR compared with urine cytology in the detection of bladder cancer: A meta-analysis of diagnostic test accuracy in head-to-head studies. *Oncology letters*, 19(2), 1165–1174.
- [78] Kawata, N., Tsuchiya, N., Horikawa, Y., Inoue, T., Tsuruta, H., Maita, S., Satoh, S., Mitobe, Y., Narita, S., & Habuchi, T. (2011). Two survivin polymorphisms are cooperatively associated with bladder cancer susceptibility. *International journal of cancer*, 129(8), 1872–1880.
- [79] Hosen, M. I., Sheikh, M., Zvereva, M., Scelo, G., Forey, N., Durand, G., Voegelé, C., Poustchi, H., Khoshnia, M., Roshandel, G., Sotoudeh, M., Nikmanesh, A., Etemadi, A., Avogbe, P. H., Chopard, P., Delhomme, T. M., Foll, M., Manel, A., Vian, E., Weiderpass, E., Calvez-Kelm, F. L. (2020). Urinary TERT promoter mutations are detectable up to 10 years prior to clinical diagnosis of bladder cancer: Evidence from the Golestan Cohort Study. *EBioMedicine*, 53, 102643.
- [80] Budman LI, Kassouf W, Steinberg JR. Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *Can Urol Assoc J*. 2008 Jun;2(3):212-21.
- [81] Hakenberg, O. W., Fuessel, S., Richter, K., Froehner, M., Oehlschlaeger, S., Rathert, P., Meye, A., & Wirth, M. P. (2004). Qualitative and quantitative assessment of urinary cytokeratin 8 and 18 fragments compared with voided urine cytology in diagnosis of bladder carcinoma. *Urology*, 64(6), 1121–1126.
- [82] Schroeder, G. L., Lorenzo-Gomez, M. F., Hautmann, S. H., Friedrich, M. G., Ekici, S., Huland, H., & Lokeshwar, V. (2004). A side by side comparison of cytology and biomarkers for bladder cancer detection. *The Journal of urology*, 172(3), 1123–1126.
- [83] Giribaldi, G., Filippini, C., Viberti, C., Khadjavi, A., Finesso, N., Ulliers, D., Turini, S., Bressan, B. E., Pecoraro, F., Prato, M., Allione, A., Bellis, M., Montefusco, G., Bonomessi, G., Allasia, M., Matullo, G., Soria, F., & Gontero, P. (2021). Combination of urinary fibrinogen β -chain and tyrosine-phosphorylated proteins for the detection of bladder cancer. *Future science OA*, 7(9), FSO758.

- [84] Sagnak, L., Ersoy, H., Ozok, U., Senturk, B., Ercil, H., Bahar, G., & Ozturk, E. (2009). Predictive value of urinary interleukin-8 cutoff point for recurrences after transurethral resection plus induction bacillus Calmette-Guérin treatment in non-muscle-invasive bladder tumors. *Clinical genitourinary cancer*, 7(2), E16–E23.
- [85] Budman LI, Kassouf W, Steinberg JR. Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *Can Urol Assoc J*. 2008 Jun;2(3):212-21.
- [86] Sankhwar, M., Sankhwar, S. N., Abhishek, A., & Rajender, S. (2015). Clinical significance of the VEGF level in urinary bladder carcinoma. *Cancer biomarkers : section A of Disease markers*, 15(4), 349–355
- [87] Hazzaa, S. M., Elashry, O. M., & Afifi, I. K. (2010). Clusterin as a diagnostic and prognostic marker for transitional cell carcinoma of the bladder. *Pathology oncology research : POR*, 16(1), 101–109.
- [88] Yang, H., Li, H., Wang, Z., Gao, J., & Guo, Y. (2013). Is urinary soluble Fas an independent predictor of non-muscle-invasive bladder cancer? A prospective chart study. *Urologia internationalis*, 91(4), 456–461.
- [89] Vinata B. Lokeshwar, Tomonori Habuchi, H. Barton Grossman, William M. Murphy, Stefan H. Hautmann, George P. Hemstreet, Aldo V. Bono, Robert H. Getzenberg, Peter Goebell, Bernd J. Schmitz-Dräger, Jack A. Schalken, Yves Fradet, Michael Marberger, Edward Messing, Michael J. Droller, Bladder tumor markers beyond cytology: International Consensus Panel on bladder tumor markers, *Urology*, Volume 66, Issue 6, Supplement 1, 2005, Pages 35-63.
- [90] Alvarez, A., & Lokeshwar, V. B. (2007). Bladder cancer biomarkers: current developments and future implementation. *Current opinion in urology*, 17(5), 341–346.
- [91] Sun, Y., He, D. L., Ma, Q., Wan, X. Y., Zhu, G. D., Li, L., Luo, Y., He, H., & Yang, L. (2006). Comparison of seven screening methods in the diagnosis of bladder cancer. *Chinese medical journal*, 119(21), 1763–1771.
- [92] Hattori, S., Kojima, K., Minoshima, K., Yamaha, M., Horie, M., Sawamura, T., Kikuchi, A., & Deguchi, T. (2014). Detection of bladder cancer by measuring CD44v6 expression in

urine with real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. *Urology*, 83(6), 1443.e9–1443.e1.443E15.

[93] Budman LI, Kassouf W, Steinberg JR. Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *Can Urol Assoc J*. 2008 Jun;2(3):212-21.

[94] Yang, X., Huang, H., Zeng, Z., Zhao, L., Hu, P., He, D., Tang, X., & Zeng, Z. (2013). Diagnostic value of bladder tumor fibronectin in patients with bladder tumor: a systematic review with meta-analysis. *Clinical biochemistry*, 46(15), 1377–1382.

[95] Budman LI, Kassouf W, Steinberg JR. Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *Can Urol Assoc J*. 2008 Jun;2(3):212-21

[96] Darwiche F, Parekh DJ, Gonzalgo ML. Biomarkers for non-muscle invasive bladder cancer: Current tests and future promise. *Indian J Urol*. 2015 Oct-Dec;31(4):273-82.

[97] Santoni M, Catanzariti F, Minardi D, Burattini L, Nabissi M, Muzzonigro G, Cascinu S, Santoni G. Pathogenic and Diagnostic Potential of BLCA-1 and BLCA-4 Nuclear Proteins in Urothelial Cell Carcinoma of Human Bladder. *Adv Urol*. 2012;2012:397412.

[98] Roobol, M. J., Bangma, C. H., el Bouazzaoui, S., Franken-Raab, C. G., & Zwarthoff, E. C. (2010). Feasibility study of screening for bladder cancer with urinary molecular markers (the BLU-P project). *Urologic oncology*, 28(6), 686–690.

[99] Tahlita C.M. Zuiverloon, Willemien Beukers, Kirstin A. van der Keur, Annemieke J.M. Nieuweboer, Thomas Reinert, Lars Dyrskjot, Torben F. Orntoft, Ellen C. Zwarthoff,. Combinations of Urinary Biomarkers for Surveillance of Patients with Incident Nonmuscle Invasive Bladder Cancer: The European FP7 UROMOL Project, *The Journal of Urology*, Volume 189, Issue 5, 2013, Pages 1945-1951.

[100] Park, H. S., Park, W. S., Bondaruk, J., Tanaka, N., Katayama, H., Lee, S., Spiess, P. E., Steinberg, J. R., Wang, Z., Katz, R. L., Dinney, C., Elias, K. J., Lotan, Y., Naeem, R. C., Baggerly, K., Sen, S., Grossman, H. B., & Czerniak, B. (2008). Quantitation of Aurora kinase A gene copy number in urine sediments and bladder cancer detection. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(19), 1401–1411.

- [101] Park, H. S., Park, W. S., Bondaruk, J., Tanaka, N., Katayama, H., Lee, S., Spiess, P. E., Steinberg, J. R., Wang, Z., Katz, R. L., Dinney, C., Elias, K. J., Lotan, Y., Naeem, R. C., Baggerly, K., Sen, S., Grossman, H. B., & Czerniak, B. (2008). Quantitation of Aurora kinase A gene copy number in urine sediments and bladder cancer detection. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(19), 1401–1411.
- [102] Catto JW, Miah S, Owen HC, Bryant H, Myers K, Dudzicz E, Larré S, Milo M, Rehman I, Rosario DJ, Di Martino E, Knowles MA, Meuth M, Harris AL, Hamdy FC. Distinct microRNA alterations characterize high- and low-grade bladder cancer. *Cancer Res*. 2009 Nov 1;69(21):8472-81.
- [103] Guancial EA, Bellmunt J, Yeh S, Rosenberg JE, Berman DM. The evolving understanding of microRNA in bladder cancer. *Urol Oncol*. 2014 Jan;32(1):41.e31-40.
- [104] Rosenberg E, Baniel J, Spector Y, Faerman A, Meiri E, Aharonov R, Margel D, Goren Y, Nativ O. Predicting progression of bladder urothelial carcinoma using microRNA expression. *BJU Int*. 2013 Nov;112(7):1027-34.
- [105] Budman LI, Kassouf W, Steinberg JR. Biomarkers for detection and surveillance of bladder cancer. *Can Urol Assoc J*. 2008 Jun;2(3):212-21.
- [106] Reinert T, Borre M, Christiansen A, Hermann GG, Ørntoft TF, Dyrskjøt L. Diagnosis of bladder cancer recurrence based on urinary levels of EOMES, HOXA9, POU4F2, TWIST1, VIM, and ZNF154 hypermethylation. *PLoS One*. 2012;7(10):e46297.
- [107] Gazzaniga P, Gradilone A, de Berardinis E, Busetto GM, Raimondi C, Gandini O, Nicolazzo C, Petracca A, Vincenzi B, Farcomeni A, Gentile V, Cortesi E, Frati L. Prognostic value of circulating tumor cells in nonmuscle invasive bladder cancer: a CellSearch analysis. *Ann Oncol*. 2012 Sep;23(9):2352-2356.
- [108] Miremami J, Kyprianou N. The promise of novel molecular markers in bladder cancer. *Int J Mol Sci*. 2014 Dec 22;15(12):23897-908
- [109] Flaig TW, Wilson S, van Bokhoven A, Varella-Garcia M, Wolfe P, Maroni P, Genova EE, Morales D, Lucia MS. Detection of circulating tumor cells in metastatic and clinically localized urothelial carcinoma. *Urology*. 2011 Oct;78(4):863-7.

- [110] Descotes F, Dessen P, Bringuier PP, Decaussin M, Martin PM, Adams M, Villers A, Lechevallier E, Rebillard X, Rodriguez-Lafrasse C, Devonec M, Paparel P, Perrin P, Lazar V, Ruffion A. Microarray gene expression profiling and analysis of bladder cancer supports the sub-classification of T1 tumours into T1a and T1b stages. *BJU Int.* 2014 Feb;113(2):333-42.
- [111] Emig M, Saussele S, Wittor H, et. al. Accurate and rapid analysis of residual disease in patients with CML using specific fluorescent hybridization probes for real time quantitative RT-PCR. *Leukemia.* 1999;13(11):1825-32.
- [112] Miyake Y, Fujiwara Y, Ohue M, et al. Quantification of micrometastases in lymph nodes of colorectal cancer using real-time fluorescence polymerase chain reaction. *Int J Oncol.* 2000;16(2):289-93.
- [113] Guo B, Luo C, Xun C, et al. Quantitative detection of cytokeratin 20 mRNA in urine samples as diagnostic tools for bladder cancer by real-time PCR. *Exp Oncol.* 2009;31(1):43-7.
- [114] Urquidi V, Rosser CJ, Goodison S. MULTIPLEX URINARY TESTS FOR BLADDER CANCER DIAGNOSIS. *Eur Med J Urol.* 2013;1:70-73).
- [115] Luo HT, Liang CX, Luo RC, Gu WG. Identification of relevant prognostic values of cytokeratin 20 and cytokeratin 7 expressions in lung cancer. *Biosci Rep.* 2017 Nov 6;37(6):BSR20171086.
- [116] Jiang J, Ulbright TM, Younger C, Sanchez K, Bostwick DG, Koch MO, Eble JN, Cheng L. Cytokeratin 7 and cytokeratin 20 in primary urinary bladder carcinoma and matched lymph node metastasis. *Arch Pathol Lab Med.* 2001 Jul;125(7):921-3.
- [117] Trung, N.T., Hoan, N.X., Trung, P.Q. et al. Clinical significance of combined circulating TERT promoter mutations and miR-122 expression for screening HBV-related hepatocellular carcinoma. *Sci Rep* 10, 8181 (2020).
- [118] Mengoni A, Scialpi A. La PCR e le sue varianti : quaderno di laboratorio- Firenze : Firenze University Press, 2008 - vi, 111 p. : ill. - *Manuali. Scienze;*
- [119] Mackay J, Landt O. Real-time PCR fluorescent chemistries. *Methods Mol Biol.* 2007;353:237-61.

[120] Calculations for Molecular Biology and Biotechnology: Third Edition (third). (2016). https://www.researchgate.net/publication/308478011_Calculations_for_Molecular_Biology_and_Biotechnology_Third_Edition

[121] Real-Time PCR (QPCR) Basics. (n.d.). Thermofisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/it/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics.html>

[122] Bruch, P. G., Plage, H., Hofbauer, S., Kornienko, K., Weinberger, S., Roßner, F., Schallenberg, S., Kluth, M., Lennartz, M., Blessin, N. C., Marx, A. H., Samtleben, H., Fisch, M., Rink, M., Slojewski, M., Kaczmarek, K., Ecke, T., Hallmann, S., Koch, S., Adamini, N., Elezkurtaj, S. (2023). Cytokeratin 20 expression is linked to stage progression and to poor prognosis in advanced (pT4) urothelial carcinoma of the bladder. *Experimental and molecular pathology*, 131, 104860.

[123] Yahyazadeh R, Bashash D, Ghaffari P, Kord S, Safaroghli-Azar A, Ghaffari SH. Evaluation of hTERT, KRT7, and survivin in urine for noninvasive detection of bladder cancer using real-time PCR. *BMC Urol*. 2021 Apr 19;21(1):64.

[124] Hosen, M. I., Sheikh, M., Zvereva, M., Scelo, G., Forey, N., Durand, G., Voegelé, C., Poustchi, H., Khoshnia, M., Roshandel, G., Sotoudeh, M., Nikmanesh, A., Etemadi, A., Avogbe, P. H., Chopard, P., Delhomme, T. M., Foll, M., Manel, A., Vian, E., Weiderpass, E., Calvez-Kelm, F. L. (2020). Urinary TERT promoter mutations are detectable up to 10 years prior to clinical diagnosis of bladder cancer: Evidence from the Golestan Cohort Study. *EBioMedicine*, 53, 102643.

