



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Programa de doctorado

BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD

Facultad de Medicina

Universidad de Málaga

TESIS DOCTORAL

**CARACTERIZACIÓN PATOBIOLOGICA Y PREDICCIÓN DE
RESPUESTA A NEOADYUVANCIA EN EL CÁNCER VESICAL
UTILIZANDO LA INMUNOHISTOQUÍMICA COMO MARCADOR
SUBROGADO DE SUBTIPOS MOLECULARES**

Tatiana Cano Barbadilla

Enero, 2025

Directores:

Martina Álvarez Pérez

M^a Isabel Hierro Martín

Tutor:

Luis Vicioso Recio



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

AUTORA: Tatiana Cano Barbadilla

 <https://orcid.org/0009-0008-2995-0276>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Vicerrectorado Estudios de
Posgrado Servicio de Posgrado y
Escuela de Doctorado

DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

Dña **TATIANA CANO BARBADILLA**, estudiante del programa de doctorado **BIOMEDICINA, INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL Y NUEVAS TECNOLOGÍAS EN SALUD** de la Universidad de Málaga, como autora de la tesis presentada para la obtención del título de doctora por la Universidad de Málaga, titulada: **CARACTERIZACIÓN PATOBIOLOGÍA Y PREDICCIÓN DE RESPUESTA A NEOADYUVANCIA EN EL CÁNCER DE VESIGA UTILIZANDO LA INMUNOHISTOQUÍMICA COMO MARCADOR SUBROGADO DE SUBTIPOS MOLECULARES**; realizada bajo la tutorización del doctor **LUIS P. VICIOSO RECIO** y la dirección de las doctoras **MARTINA ÁLVAREZ PÉREZ** y **M^a ISABEL HIERRO MARTÍN**.

DECLARO QUE:

La tesis presentada es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, conforme al ordenamiento jurídico vigente (Real Decreto Legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia.

Igualmente asumo, ante a la Universidad de Málaga y ante cualquier otra instancia, la responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad, en caso de plagio, de contenidos en la tesis presentada, conforme al ordenamiento jurídico vigente.

En Málaga, a 7 de enero de 2025

Fdo.: TATIANA CANO BARBADILLA
Doctoranda

Fdo.: LUIS P. VICIOSO RECIO
Tutor

Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.

29071

Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10

E-mail: doctorado@uma.es



EFQM AENOR





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA



Vicerrectorado Estudios de
Posgrado Servicio de Posgrado y
Escuela de Doctorado

Fdo.: MARTINA ÁLVAREZ PÉREZ
Directora de tesis

Fdo.: M^a ISABEL HIERRO MARTÍN
Directora de tesis

Edificio Pabellón de Gobierno. Campus El Ejido.

29071

Tel.: 952 13 10 28 / 952 13 14 61 / 952 13 71 10

E-mail: doctorado@uma.es



EFQM AENOR





UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

Directoras

Dra. MARTINA ÁLVAREZ PÉREZ Prof. Asociado de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Málaga.

Dra. M^a ISABEL HIERRO MARTÍN Prof. Asociado de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Málaga y Jefa del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen de la Victoria (HUVV).

Tutor

Dr. LUIS VICIOSO RECIO Prof. Titular de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Málaga y Jefe de Sección del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen de la Victoria (HUVV).

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación que presenta Dña. **TATIANA CANO BARBADILLA** titulado “CARACTERIZACIÓN PATOBIOLOGICA Y PREDICCIÓN DE RESPUESTA A NEOADYUVANCIA EN EL CÁNCER DE VEJIGA UTILIZANDO LA INMUNOHISTOQUÍMICA COMO MARCADOR SUBROGADO DE SUBTIPOS MOLECULARES”, ha sido realizado bajo nuestra dirección, y consideramos que tiene el rigor científico necesario para ser sometido al juicio del tribunal que ha nombrado la Universidad de Málaga para optar al grado de Doctor. Y para que así conste firmamos el presente certificado en Málaga a 7 de enero de 2025.

Fdo. Martina Álvarez Pérez

Fdo. M^a Isabel Hierro Martín

Fdo. Luis Vicioso Recio

“A mi madre, por darme la capacidad de aprender a volar”

“A Martina, por seguir hacia delante y darme la oportunidad”

“No se pasa de lo posible a lo real, sino de lo imposible a lo verdadero”.

María Zambrano

“Un país sin investigación es un país sin desarrollo.”

Margarita Salas

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi madre, quien siempre ha estado para mí, apoyándome incondicionalmente, tanto en los momentos buenos como en los más difíciles. Ella ha sido mi pilar, la que me ha dado alas y, lo más importante, la que ha sabido dejarme volar. Su amor y fortaleza son la base de todo lo que soy.

A mi hermana Mar. Aunque nuestras diferencias y nuestra relación distante nos hayan marcado, no puedo dejar de reconocer que eres parte esencial de mi vida. Eres la única familia que tengo junto a nuestra madre, y no quiero que te alejes, aunque a veces no lo creas. Esta mención es para recordarte cuánto valoro que estés aquí.

Gracias a mis amigas, que me han encontrado y no me han dejado, incluso en los momentos de mayor incertidumbre. Gracias por escucharme, por estar ahí, por darme el tiempo necesario y por hacerme sentir que no estaba sola, compartiendo momentos vitales que han reconstruido estos últimos años.

Una especial dedicatoria a E. Macarena, que llegó sin buscarla, pero abriéndome las puertas a la ilusión. Su apoyo incondicional me hizo dejar de dudar y creer que acabar este proyecto era posible. Sin ella, este camino habría sido mucho más difícil de recorrer.

Gracias a Isabel Hierro por darme la oportunidad de embarcarme en esta aventura, jugando a ser uropatóloga. Por su dedicación y su apoyo siempre que la he necesitado, enseñándome que la excelencia en esta profesión no solo reside en las células y tejidos vistos al microscopio, sino también en las decisiones que tomamos. Sigues siendo la mejor jefa que he tenido.

A todo el equipo de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Málaga, especialmente a Daniel Prieto e Isabel García, quienes han sido mis mentores y me han hecho crecer con sus enseñanzas. También a mi tutor de tesis, Luis Vicioso, por sus consejos y su amabilidad. Siempre le he admirado por su constante afán de aprendizaje, incluso a pesar de su dilatada experiencia.

A la Dra. Martina Álvarez, por nunca rendirse, por tirar de mí cuando quería abandonar y por su disposición a tiempo completo. Su motivación y apoyo inquebrantable fueron esenciales para que este proyecto llegara a su fin.

A la Dra. Elisa Matas, quien virtualmente nos dio la oportunidad de seguir luchando. Sus reuniones por Zoom y su persistencia evitaron que este proyecto cayera en el olvido. Gracias también a Guillermo Paz y Andrés González, quienes facilitaron la clusterización con su apoyo bioestadístico.

Al Dr. Bernardo Imbroda, por su orientación y por haber puesto sobre la mesa el Bladder Atlas, iniciando así mi carrera investigadora, que ha sido un desafío enriquecedor.

A todas aquellas personas que tuvieron una implicación técnica en este proyecto, como María José Lozano y María Fernanda Lara, quienes me ayudaron con el trabajo de “campo”. Sin ellas, muchos de los avances no habrían sido posibles.

A todos los que, de una u otra manera, han formado parte de mi camino, les agradezco por haber dejado una huella en mi vida y por haberme ayudado a superar momentos difíciles. Esta tesis doctoral es un testimonio de que la perseverancia lo es todo, que cuando recibes un "no", hay que seguir luchando porque, al final del túnel, siempre hay luz. Esta tesis es para todos los que me apoyaron y lucharon para que saliera adelante. Mi gratitud eterna hacia todos ellos.

RESUMEN

El cáncer vesical (CV) es la neoplasia más común del tracto urinario y representa un desafío clínico debido a su alta heterogeneidad biológica y clínica. Histológicamente, la mayoría de los CV se corresponden con carcinomas uroteliales, los cuales pueden dividirse en dos fenotipos principales: no músculo-invasivo (CVNMI) y músculo-invasivo (CVMI). El CVNMI, aunque menos agresivo, se asocia con altas tasas de recidiva, mientras que el CVMI tiene peor pronóstico debido a su capacidad invasiva y metastásica. En los últimos años, la clasificación molecular ha emergido como una herramienta clave para mejorar la predicción pronóstica y personalizar las estrategias terapéuticas, incluida la quimioterapia neoadyuvante (NAC).

En este estudio, se ha pretendido definir los marcadores inmunohistoquímicos (IHC) básicos requeridos en la práctica, para obtener una clasificación subrogada de los subtipos moleculares del CV, analizando su relación con las características clínicopatológicas y la respuesta al tratamiento. Se incluyeron 139 casos de CV (119 músculo-invasivos y 20 no músculo-invasivos), analizados retrospectivamente en matrices tisulares (TMA). Los marcadores IHC KRT20, KRT5, KRT14, FOXA1 y GATA3 permitieron identificar cuatro subtipos moleculares principales mediante clusterización K-means: basal, basal KRT14Alto, luminal y mixto. Los subtipos se definieron según los perfiles de expresión de KRT14, KRT5 y GATA3, que demostraron ser los más discriminativos en la clusterización. El subtipo basal, caracterizado por una alta expresión de KRT5 y una baja expresión de GATA3 y FOXA1, representó el 38.8% de los casos, mientras que el subtipo basal KRT14Alto, con sobreexpresión de KRT14, comprendió el 21.5%. Los tumores luminales, con alta expresión de GATA3 y FOXA1, abarcaron el 11.5%, y el grupo mixto, con patrones de coexpresión basal y luminal, el 29.2%.

En términos de supervivencia global, el subtipo basal KRT14Alto mostró la mejor tasa (92.2%), seguido por los luminales (79.4%), mientras que los mixtos y basales presentaron las tasas más bajas (63.5% y 60.5%, respectivamente). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p=0.04$) y reflejan la heterogeneidad pronóstica entre los distintos subtipos establecidos. Agrupando los casos en tres categorías principales (basal, luminal y mixto), los tumores luminales evidenciaron el mejor pronóstico global, mientras que los mixtos fueron los de peor pronóstico. Sin embargo, la supervivencia del subtipo basal KRT14Alto se redujo significativamente en pacientes que no recibieron NAC, situándose en niveles comparables a los subtipos basal y mixto, lo que enfatiza la importancia del tratamiento sistémico en este grupo.

Entre los 65 pacientes tratados con NAC, la respuesta patológica completa (pRC) se alcanzó en el 21.5%, mientras que el 35.4% mostró una respuesta parcial y el 43.1% no

respondió significativamente. Los subtipos basal y mixto demostraron un beneficio significativo de supervivencia con NAC ($p=0.01$), mientras que los tumores luminales no mostraron diferencias significativas en supervivencia entre los tratados y no tratados. El subtipo basal KRT14Alto, con alta sensibilidad a la quimioterapia, presentó la mejor supervivencia tanto en pacientes con respuesta completa como parcial. Por el contrario, los tumores luminales, a pesar de su mejor pronóstico general, no se beneficiaron significativamente de la NAC, lo que resalta la necesidad de explorar estrategias terapéuticas alternativas, como la inmunoterapia.

En conclusión, este estudio destaca la utilidad de los marcadores IHC para clasificar el CV en subtipos moleculares y su relevancia clínica al correlacionar estos con el pronóstico y la respuesta a NAC. Los hallazgos subrayan la importancia de integrar la clasificación molecular en la práctica clínica para personalizar el tratamiento y optimizar los resultados en pacientes con CV. La sobreexpresión de KRT14 en el subtipo basal KRT14Alto, aunque asociada a un mejor pronóstico con NAC, podría implicar un comportamiento más agresivo en ausencia de tratamiento sistémico, destacando su valor como marcador para guiar la elección terapéutica.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	18
1. Embriología, anatomía e histología vesical.....	19-24
1.1 Embriología.....	19-21
1.2 Anatomía.....	21
1.3 Histología.....	21-24
2. Examen macroscópico y muestreo de tejidos.....	24-27
3. Epidemiología.....	28- 31
4. Etiopatogenia y Carcinogénesis.....	31-34
5. Patogenia molecular.....	34
5.1 Origen celular del cáncer vesical.....	34-35
5.2 Doble vía (DUAL-TRACK) de patogénesis del cáncer vesical.....	35-38
5.3. Principales vías de señalización del cáncer vesical.....	39-41
5.4 Alteraciones a nivel telomérico.....	41
5.5. Alteraciones del ciclo celular.....	42-45
6.Taxonomía molecular.....	45
6.1 Introducción a la era genómica.....	45-46
6.2 Evolución de la taxonomía.....	47-53
6.3 Consenso taxonómico.....	53-57
6.4 Subtipos moleculares del CVNMI.....	57-60
6.5 Nuevas clasificaciones moleculares. ¿Hacia dónde vamos?.....	60-63
7. Histología del cáncer vesical.....	63
7.1 Actualización de la OMS.....	63-64
7.2 Subtipos histológicos.....	64-73
7.3 Carcinomas vesicales no uroteliales.....	73-76
7.4 Correlación morfológica-genotípica.....	76-77
7.4.1 Actualización molecular y variantes histológicas.....	78-81
7.5 T1 y subtipos histológicos.....	81-83

8. Heterogeneidad intratumoral	84-86
9. Inmunohistoquímica como marcador subrogado.....	86-93
10. Tratamiento sistémico del cáncer vesical.....	93
10.1. Introducción a la neoadyuvancia.....	93-94
10.2 Ventajas y desventajas de la neoadyuvancia.....	95
10.3 Impacto de los subtipos moleculares en la neoadyuvancia.....	95-98
10.4 Otros biomarcadores y terapia dirigida.....	98-100
II. PLANTEAMIENTO DE TESIS.....	101-104
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	104-118
IV. RESULTADOS.....	119-129
V. DISCUSIÓN.....	130-142
VI. CONCLUSIONES.....	143-146
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	147-176
VIII. ANEXO.....	177
1. Publicaciones que avalan la tesis.....	178-180
2. Declaración de aceptación de renuncia de los coautores de la publicación...	181-182
3. Certificación comité ético.....	183

ABREVIATURAS

AG: Alto grado

ASCO: Asociación Americana de Oncología Clínica

AUA: Asociación Americana de Urología

BG: Bajo grado

APC: Poliposis adenomatosa familiar

BCG: Bacilo CalmetteGuérin

βHCG: beta hormona gonadotropina coriónica humana

BSQ: Basal-squamous-like clúster

Ba/Sq: Subtipo Basal/squamous

CART: Árboles de clasificación y regresión

CCE: Carcinoma de células escamosas

CCR: Carcinoma renal de células claras

CDK: Quinasas dependientes de ciclinas

CIIN: Centro Internacional de Investigaciones de Cáncer

CIS: Carcinoma in situ

CIT: Cartes d'Identité de Tumeurs

CMC: Clasificación molecular de consenso

CMV: Cisplatino, metotrexato y vinblastina

CMT: Carga mutacional tumoral

CR: Cistectomía radical

CU: Carcinoma urotelial

CUMI: Carcinoma urotelial musculo infiltrante

CUNMI: Carcinoma urotelial no músculo infiltrante

CVMI: Carcinoma vesical musculo infiltrante

CVNMI: Carcinoma vesical no musculo infiltrante

CV: Cáncer vesical

DHH: Desert hedgehog

EAU: Asociación Europea de Urología

EBV: Epstein-Barr Virus

E-CAD: E-cadherina

EGFR: Receptor del factor de crecimiento epidérmico

EMA: Agencia Europea de Medicamentos

EMT: Transición epitelio-mesénquima

EPIC: Investigación Prospectiva Europea de Cáncer y Nutrición

ERK1/2: Reguladores de quinasas extracelulares 1/2

FDA: U.S. Food and Drug Administration

FGFR3: Receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos

GC: Gemcitabina cisplatino

GI: Gastrointestinal

GU: Genómicamente inestable

H-E: Hematoxilina-eosina

HPV: Herpes Papilloma Virus

HRAS: Gen homólogo del onogén viral del sarcoma de rata Harvey

HS: Histoscore

IARC: Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer

ICI: Inhibidor punto de control inmunológico

IHC: Inmunohistoquímica

IHH: Indian hedgehog

IMC: Índice de masa corporal

ITU: Infección tracto urinario

INE: Instituto Nacional Español

KRT: Queratinas

LOH: Pérdida de heterocigosidad

LumP: Subtipo Luminal papilar

LumNS: Subtipo Luminal no específico

LumU: Subtipo Luminal inestable

LV: Linfovascular

MAPK: Mitogen activated protein kinase

Mes-like: tipo mesenquimal

MSH2: Gen reparador del ADN

MUA: Membrana unitaria asimétrica

MVAC: Metotrexato, sulfato de vinblastina, clorhidrato de doxorrubicina (adriamicina) y cisplatino

NAC: Quimioterapia neoadyuvante

NAT2: N-acetiltransferasa 2

NCCN: National Comprehensive Cancer Network

NE: Neuroendocrino

NE-like: Subtipo neuroendocrino

NOS: No especificado

OMS: Organización Mundial de la Salud

pCR: Respuesta completa

PI3K/AKT/mTOR: Phosphoinositide 3-kinase/AKT/mammalian target of rapamycin

PIP3: Phosphatidylinositol (3-5)-trisphosphate

pRC: Respuesta patológica completa

pRP: Respuesta patológica parcial

pT: Estadío patológico

PTCH: Transmembrane receptor patched

PTEN: Gen supresor de tumores homólogo de fosfatasa y tensina

QT: Quimioterapia

RA: Receptor de andrógeno

RPc: Respuesta patológica completa

RT: Radioterapia

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

RTK: Receptor tirosin quinasa

RTU: Resección transuretral

SCC: Squamous cell carcinoma

Sc/NE: Tipo de célula pequeña/neuroendocrina.

SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica

SG: Supervivencia global

SHH: Sonic hedgehog

SLR: Supervivencia libre de recidiva o recurrencia

SOGUG: Grupo genitourinario de oncología española

SSE: Supervivencia libre de enfermedad

STUI: Síndrome de tracto urinario inferior

TCGA: The Cancer Genoma Atlas

TERT: Promotor del gen de la transcriptasa inversa de la telomerasa

TGF- β : Transforming growth factor- β

TMA: Tissue microarray

TNM: Tumor (T), Node (N), Metastasis (M)

TRG: Grado de regresión tumoral

UCN: Universidad Carolina del Norte

UPK: Uroplaquina

WT: Wild-Type

I. INTRODUCCIÓN

1. Embriogénesis, anatomía e histología de la vejiga

1.1 Embriogénesis

La vejiga urinaria se desarrolla a partir del mesodermo intermedio del embrión, específicamente deriva de seno urogenital, el cuál proviene de la cloaca.

Durante el periodo comprendido entre la cuarta y la séptima semanas del desarrollo, la cloaca urogenital, región que da origen a la vejiga urinaria y los órganos reproductores internos, se divide en seno urogenital, en la región anterior, y conducto anal, en la región posterior [1].

A nivel del seno urogenital se distinguen tres porciones; la porción superior y de mayor tamaño se corresponde con la vejiga urinaria. Al inicio, la vejiga está comunicada con el alantoides, pero cuando el lumen de este se oblitera, el remanente constituye un cordón fibroso grueso, el “uraco”, que conecta el ápice de la vejiga con el cordón umbilical, persistiendo en el adulto como el ligamento umbilical medio. La porción pélvica del seno urogenital es un conducto más bien estrecho, y en el varón origina los segmentos prostáticos y membranosos de la uretra. La última parte, es el segmento fálico del seno urogenital. Dicha porción muestra aplanamiento lateral y, al mismo tiempo que el tubérculo genital se elonga, esa parte del seno experimenta tracción ventral. El segmento fálico del seno urogenital difiere en gran medida entre los dos sexos [2].

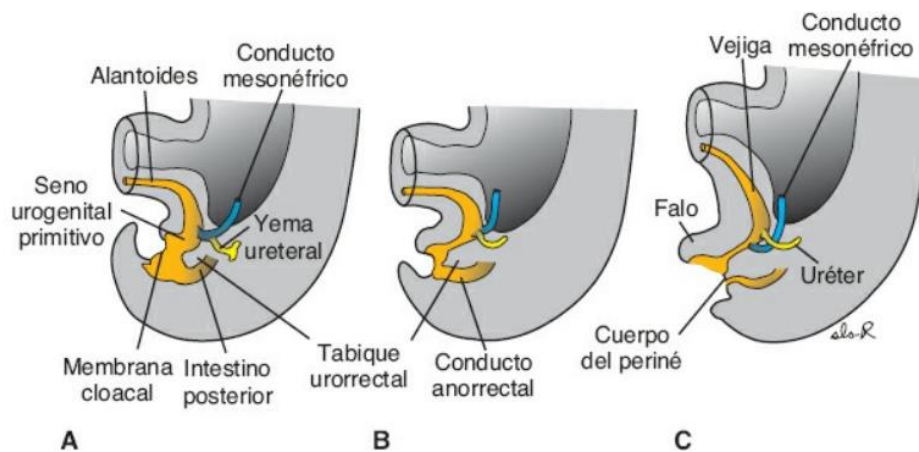


Figura 1. Divisiones de la cloaca en el seno urogenital y el conducto anorrectal. El conducto mesonéfrico queda incluido de manera gradual en la pared del seno urogenital, y los uréteres ingresan en sitios independientes. (A) Al final de la quinta semana. (B) 7 semanas. (C) 8 semanas [1].

Durante el proceso de diferenciación de la cloaca, las porciones caudales de los conductos mesonéfricos quedan incluidos en la pared de la vejiga urinaria. En consecuencia, los uréteres, al inicio evaginaciones de los conductos mesonéfricos, ingresan a la vejiga en forma independiente. A medida que la vejiga crece, los orificios

de los uréteres se desplazan en dirección cefálica, mientras que los orificios de los conductos mesonéfricos se aproximan para ingresar a la uretra prostática. En el varón, estos últimos se transforman en los conductos eyaculadores. Debido a que tanto los conductos mesonéfricos como los uréteres se originan a partir del mesodermo, la mucosa de la vejiga que se forma por la incorporación de los conductos (el trigono vesical) es también de origen mesodérmico. Al pasar el tiempo, el recubrimiento mesodérmico del trigono es sustituido por epitelio endodérmico, de tal modo que el interior de la vejiga queda por último cubierto en su totalidad por epitelio de dicho origen embrionario.

El epitelio de la uretra en ambos sexos se origina a partir del endodermo; el tejido conectivo y el tejido de músculo liso circundantes derivan del mesodermo visceral. Al final del tercer mes el epitelio de la uretra prostática comienza a proliferar y origina varias evaginaciones que penetran en el mesénquima circundante. En el varón estas yemas constituyen la glándula prostática. En la mujer la porción craneal de la uretra da origen a las glándulas uretrales y parauretrales [2].

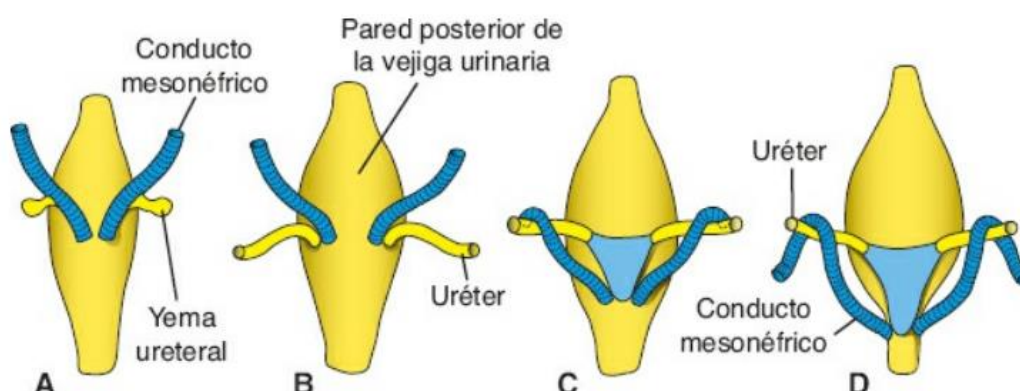


Figura 2. Vistas dorsales de la vejiga, donde se aprecia la relación de los uréteres y los conductos mesonéfricos durante el desarrollo. (A) Al inicio los uréteres se forman a partir de una evaginación del conducto mesonéfricos, (B-D) pero al pasar el tiempo desarrollan sitios de entrada independiente en la vejiga urinaria. (C-D) Obsérvese que el trigono vesical se forma a partir de la incorporación de los conductos mesonéfricos [1].

La uretra se desarrolla desde la porción caudal del seno urogenital y presenta un desarrollo común en ambos sexos hasta la décima semana de gestación.

Durante el desarrollo, la inervación de la vejiga deriva de las células neurales de la cresta neural que migran hacia el mesodermo que rodea a la vejiga. La inervación simpática proviene de los nervios hipogástricos, mientras que la inervación parasimpática procede de los nervios pélvicos. Estas fibras nerviosas controlan la contracción de los músculos de la vejiga y del esfínter urinario.

En resumen, la vejiga urinaria se desarrolla a partir del seno urogenital y está conectada al uréter por medio del uraco. La inervación de la vejiga deriva de la cresta neural y controla la contracción de los músculos de la vejiga y del esfínter urinario [1].

1.2 Anatomía

La vejiga urinaria es una víscera muscular revestida de epitelio que tiene la capacidad de distenderse y acumular hasta 400 a 500 ml de orina sin un cambio en la presión intraluminal. Además, es capaz de iniciar y sostener una contracción hasta que el órgano se vacía. Paradójicamente la micción puede iniciarse o inhibirse de forma voluntaria a pesar de la inervación involuntaria de este órgano. Los uréteres son estructuras tubulares de naturaleza muscular revestidos de epitelio cuya función es la de transportar la orina desde los riñones hasta la vejiga urinaria con la ayuda del peristaltismo. La pelvis renal representa el extremo proximal expandido del uréter y sirve para recolectar la orina excretada por el riñón y transportarla al uréter.

El órgano adulto es una estructura retroperitoneal situada en el suelo de la pelvis entre la sínfisis del pubis y el recto en el varón, o el útero en la mujer. Para mantenerla en su posición adecuada, existen varios ligamentos de sujeción. Por un lado, el ligamento pubovesical, ligamento fibroso que se extiende desde la parte inferior de la sínfisis del pubis hasta la pared anterior de la vejiga; este ligamento es especialmente importante para mantener la posición de la vejiga en las mujeres. El ligamento umbilical medio, es un ligamento fibroso que se extiende desde la pared anterior de la vejiga hasta el ombligo que mide aproximadamente 0,5cm; este ligamento es un vestigio del uraco, el conducto que conecta la vejiga con el ombligo durante el desarrollo fetal. Los ligamentos laterales, son dos ligamentos fibrosos que se extienden desde los lados de la vejiga hasta las paredes laterales de la pelvis. Además de estos ligamentos, la vejiga también está sostenida por el músculo elevador del ano y el suelo pélvico [2,3].

1.3 Histología

La pared de la vejiga urinaria está formada por cuatro capas.

La más interna es conocida como urotelio, también llamado epitelio transicional; este término se acuñó debido a que su aspecto histológico recordaba a un epitelio de transición entre escamoso no queratinizante y columnar pseudoestratificado. El grosor de esta capa no es uniforme, sino que puede variar según el grado de distensión y la localización anatómica. En la vejiga contraída, por lo general tiene un grosor de seis a siete células y en el uréter de tres a cinco células de grosor. Se pueden identificar tres tipos celulares: las células superficiales que están en contacto con el espacio urinario, las células intermedias y las células basales que yacen sobre una membrana basal. Las

células superficiales son células especializadas, de mayor tamaño que las células basales, presentan una morfología elíptica que le confieren una apariencia en forma de paraguas denominándose coloquialmente por ello células “paraguas”. Pueden ser binucleadas y suelen tener abundante citoplasma eosinofílico. En la vejiga distendida, se aplanan y son difíciles de observar con las técnicas de rutina. Si bien la presencia de estas células se toma como un signo de normalidad del urotelio, se debe tener en cuenta que pueden desprenderse debido a la erosión superficial que tiene lugar en situaciones tales como la instrumentación, u observarse en situaciones patológicas entre las que destaca, por su importancia, en los carcinomas. Por lo tanto, su presencia no puede emplearse como elemento determinante de malignidad. Mediante microscopia electrónica, las células uroteliales superficiales han demostrado ser bastante singulares. Presentan una unidad de membrana citoplasmática que tiene tres capas de espesor (trilaminar), dos capas densas en electrones y una capa transparente central, y además estas dos capas densas presentan un grosor desigual, motivo por el cual a esta membrana se la conoce como membrana urinaria asimétrica (MUA). La membrana de superficie que posee abundantes invaginaciones, dándole un aspecto festoneado, y contiene además vesículas que también están revestidas por MUA. Durante el proceso de distensión, estas invaginaciones y vesículas se incorporan a la membrana superficial, aumentando así el área superficial y manteniendo la integridad estructural del urotelio.

Estas células superficiales se asientan sobre las células intermedias, que son más pequeñas y uniformes, y tienen un citoplasma con alto contenido en glucógeno. La capa de células intermedias puede tener un grosor de hasta cinco células en la vejiga contraída, donde están orientadas con el eje longitudinal perpendicular a la membrana basal, produciendo el concepto de polaridad en la mucosa urotelial. Los núcleos son ovalados y tienen cromatina finamente punteada con nucléolo ausente o diminuto. Por último, las células basales que conforman la capa basal del urotelio está compuesta por células cuboidales que son evidentes solo en la vejiga contraída y que se encuentran sobre una membrana basal delgada, pero compuesta por una lámina clara, una lámina densa y fibrillas de anclaje [4,5].

La lámina propia, que constituye la segunda capa, es la capa suburotelial que separa el urotelio de la muscular propia, y está compuesta por tejido conectivo laxo con vasos sanguíneos, nervios, tejido adiposo, células intersticiales de Cajal, telocitos, y un número variable de fibras musculares lisas que forman una muscular de la mucosa discontinua, la muscularis mucosae. Las células intersticiales de Cajal, que se localizan dentro de la lámina propia, forman un sincitio con células musculares lisas y terminaciones nerviosas; estas células son multifuncionales en diferentes tejidos y parecen actuar a nivel vesical como transductores de señales nerviosas para las células del músculo liso [6,7]. Se han descrito engrosamientos de la muscularis mucosae en pacientes con obstrucción de la salida vesical de larga evolución, y debido esta hipertrofia puede resultar muy difícil

distinguir sus fibras engrosadas de los haces musculares lisos del músculo detrusor, que conforma la muscular propia.

En la lámina propia pueden encontrarse agregados celulares nodulares, los denominados nidos de Von Brunn, que a menudo se observan como invaginaciones o grupos separados en la lámina propia. Cuando estos nidos adquieren un mayor tamaño y presentan degeneración quística es lo que denominamos cistitis quística. La cistitis glandular es similar a cistitis quística excepto en que las células que tapizan los quistes son cúbicas o cilíndricas secretoras de mucina, o células caliciformes verdaderas, en cuyo caso se utiliza el término cistitis glandular con metaplasia. Estas lesiones, aunque a veces se asocian con inflamación local, representan variantes de la histología normal. Su principal importancia radica en que en ocasiones pueden causar lesiones visibles que pueden simular una neoplasia vesical.

La tercera capa, muscular propia o músculo detrusor, está compuesta por grandes haces de fibras musculares lisas entrelazados de forma compleja para conseguir un vaciado completo de la vejiga. Está constituida por tres subcapas: longitudinal interna, circular media y longitudinal externa. Estas subcapas están bien definidas alrededor del cuello de la vejiga, pero se encuentran alineadas al azar en el resto de la pared. Esta capa está revestida por una cuarta capa, más externa: la adventicia y/o serosa.

La serosa es una fina capa de tejido conjuntivo que cubre la cúpula de la vejiga y se continúa con la capa peritoneal de la pared abdominal. También contiene vasos sanguíneos de varios tamaños. La adventicia (se incluye el tejido adiposo perivesical) es una capa de tejido conectivo laxo que sirve como capa externa de la vejiga en áreas donde no hay serosa. El tejido adiposo también puede estar presente en la submucosa y a nivel parietal, por lo que su identificación no tiene por qué corresponderse con una capa específica de pared vesical [5, 6].

El subestadiaje del cáncer vesical (CV) requiere el reconocimiento de la existencia de una cierta estratificación de la mucosa vesical, razón por la cuál es necesario conocer bien la histología de la misma.

El término mucosa vesical se refiere al epitelio y a la lámina propia, incluyendo la muscularis mucosae y la submucosa. La muscularis mucosae en la submucosa de la vejiga urinaria se describe como unos finos haces musculares que, de forma discontinua, se disponen paralelamente a la membrana basal y se acompañan de vasos cuyas paredes tienen cierto grosor. Finalmente, la submucosa es el tejido conectivo que se sitúa entre la muscularis mucosae (o plexo vascular en su ausencia) y la muscular propia (ver figura 3 a continuación).

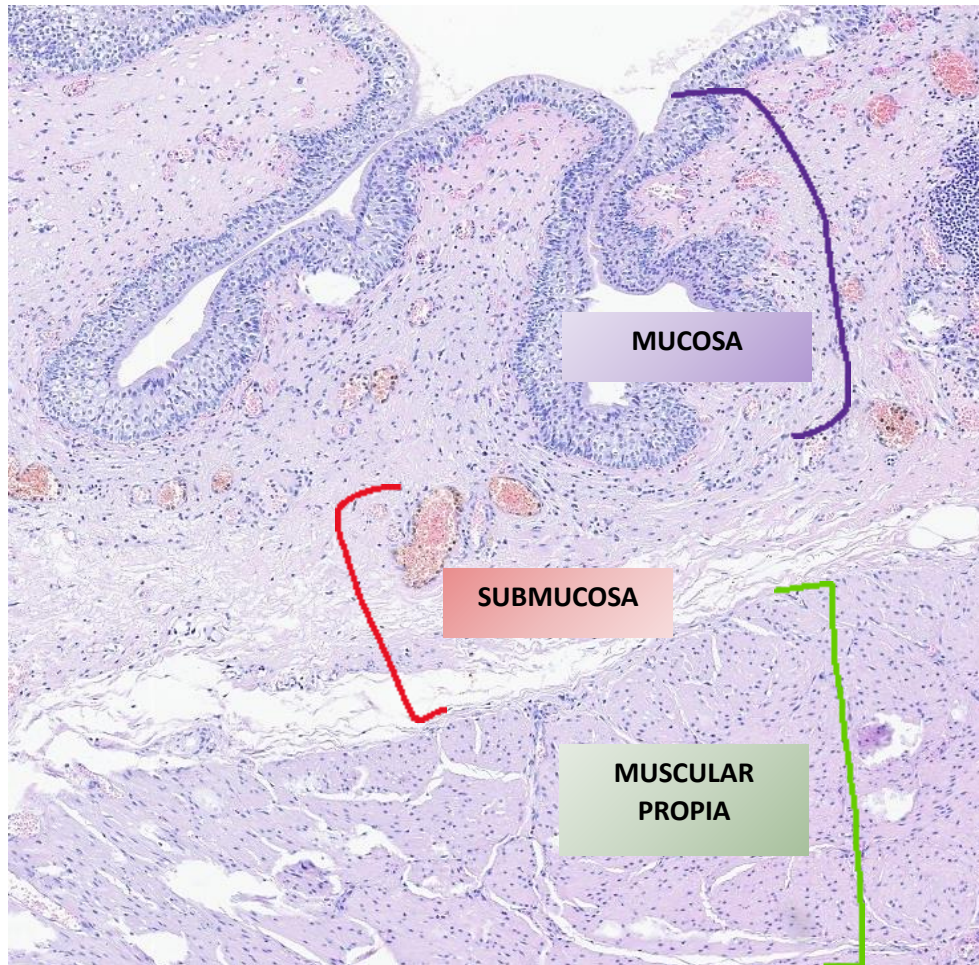


Figura 3. H-E histología normal vesical

2. Examen macroscópico y muestreo de tejidos de la vejiga

El examen macroscópico de la vejiga urinaria consiste en la evaluación anatomopatológica visual de su superficie externa e interna tras un procedimiento postquirúrgico. Este análisis permite determinar la ubicación y extensión del tumor, así como identificar otras posibles alteraciones en el tejido vesical. Existen diferentes protocolos, pero en todos ellos, incluyen directrices encaminadas a realizar un minucioso estudio del espécimen cuyo examen histológico ulterior redundará en el informe final anatomopatológico. En este proceso, se registran parámetros fundamentales como las dimensiones (longitud, anchura y profundidad), el peso de la pieza quirúrgica, la identificación de las estructuras anatómicas de la vejiga (incluyendo la mucosa, la capa muscular y la serosa), así como la caracterización de cualquier lesión visible en términos de ubicación, tamaño y morfología.

Además, se evalúan aspectos clave como los márgenes quirúrgicos y su proximidad al tumor, la invasión tumoral macroscópica, un criterio esencial en el estadiaje del carcinoma vesical, y cualquier otro hallazgo relevante observado durante el examen macroscópico [8,9].

Es importante que los patólogos sigan un protocolo consistente y detallado para garantizar una evaluación completa y precisa de la vejiga urinaria, permitiendo una evaluación meticulosa para determinar la presencia o ausencia de neoplasia y ayudar a guiar el tratamiento adecuado para el paciente.

La estrecha colaboración entre el urólogo y el patólogo es fundamental para lograr un diagnóstico preciso y un adecuado manejo del paciente con CV. Para ello, es crucial proporcionar información detallada y de calidad derivada del procesamiento macroscópico de la pieza quirúrgica, ya que este constituye una parte indispensable del diagnóstico anatomopatológico.

Los urólogos juegan un papel muy importante no solo como responsables del muestreo de tejidos vesicales para la evaluación patológica, sino que además deberían proporcionar información clínica útil que ayude tanto a un examen macroscópico como microscópico preciso por parte del patólogo: información demográfica e historial clínico del paciente, estudios citológicos de orina previos si los hubiere, información relacionada con antecedentes neoplásicos, incluidos los de la enfermedad actual, así como aspecto cistoscópico de la mucosa vesical e indicar número, tamaño, localización del tumor/es, características de la lesión (papilar, sólida o ulcerada), y el estatus de la mucosa, si ha recibido o no radioterapia previa en vejiga u órgano adyacente, tratamientos de Bacilo CalmetteGuérin (BCG) o instilaciones de mitomicina C tras resección transuretral (RTU) previa, etc. Toda esta información clínica sería necesaria para una correcta valoración patológica ya que muchos tratamientos pueden tener impacto en la morfología y urotelio normal de las muestras a valorar [10, 11].

Las muestras vesicales remitidas al Servicio de Anatomía Patológica pueden presentar variaciones en sus características morfológicas y estructurales, dependiendo del método de obtención y el propósito diagnóstico. Estas incluyen biopsias de pequeño tamaño obtenidas por pinza fría, muestras de mayor volumen provenientes de RTU, así como especímenes quirúrgicos más extensos, como cistectomías parciales o radicales, cistoprostatectomías y cisto-ureterectomías [8].

Las muestras de biopsia suelen obtenerse sin cauterización («en frío») y deben sumergirse inmediatamente en formol. Si se envían varias biopsias por separado, como en los procedimientos de cartografiado (mapeo), tienen que enviarse por separado especificando localización. Las biopsias suelen tener un diámetro de 2 a 3 mm, pudiendo incluir algunas veces parte superficial de muscular propia dependiendo de la habilidad y experiencia del urólogo responsable de realizar la cistoscopia. Las muestras de biopsia pueden ser representativas de pequeñas neoplasias papilares, áreas eritematosas o

aterciopeladas de urotelio que puede representar carcinoma in situ y áreas de inflamación. El mapeo de biopsias no es de uso rutinario, pero se recomienda este enfoque para pacientes con citología de orina positiva y cistoscopia negativa o un historial de cáncer vesical no músculo invasivo (CVNMI) de alto grado o en tumores de aspecto no papilar. Para obtener mapeo representativo de la mucosa de la vejiga, las biopsias deben tomarse del trigono, cúpula y paredes anteriores y posteriores vesicales tanto derechas como izquierdas, además de una muestra de uretra que puede ser útil para evaluar la extensión de la enfermedad. Se recomienda realización de profundizaciones si en las tinciones de hematoxilina-eosina (H-E) no es visible la superficie del urotelio o no está orientado adecuadamente [12].

La RTU es el “gold” estándar para el tratamiento del CVNMI mayores de 6 mm. Los tumores ≤ 1 cm pueden resecarse mediante la técnica de “en bloque” con RTU. Es una técnica quirúrgica emergente que permite realizar una incisión circunferencial de la mucosa vesical con un margen de seguridad de unos pocos milímetros de la lesión, permitiendo la extirpación completa del tumor llegando a muscular propia, proporcionando así una muestra tumoral intacta que contiene músculo detrusor que permite al patólogo realizar estudios histopatológicos precisos. La resección “en bloque” es una práctica quirúrgica que aún no se emplea ampliamente con respecto a la RTU, que sigue siendo el procedimiento quirúrgico empleado en CVNMI y para tumores de mayor tamaño que se pueden extirpar en fragmentos. La Asociación Europea de Urología (EAU) recomiendan enviar las muestras de RTU de parte exofítica del tumor, base y bordes del área de resección en botes separados para precisar y facilitar detección de invasión, así como la presencia o no de muscular propia debido a las importantes implicaciones pronósticas y terapéuticas que tiene la invasión de la misma en el CV [13].

La cistectomía total es la técnica de elección en cáncer de vejiga músculo invasivo (CVMI) tanto en hombre (cistoprostatectomía radical) como en mujeres (cistectomía con evisceración anterior) que no presentan metástasis a distancia. También está indicada esta técnica en CVNMI en vejigas neurógenas y en aquellos pacientes pT1 de alto grado con instilaciones de BCG sin respuesta o respuesta pobre. Antes de la disección macroscópica de la vejiga, se recomienda la fijación adecuada de la misma con formol taponado al 10% ya sea a través de inyección o bien mediante apertura vesical previa al tallado; así como la orientación adecuada del espécimen para poder hacer los cortes macroscópicos de un grosor aproximado de 5 mm, siempre teniendo en cuenta la correlación macroscópica-radiológica del espécimen. Es necesaria la examinación precisa de la mucosa vesical en busca de lesiones tumorales y, en caso de encontrarlas, dar tamaño, ubicación (cúpula, trigono...) y profundidad de invasión. Uno de los componentes del TNM vesical refleja la diferencia entre infiltración microscópica (pT3a) y macroscópica (pT3b) del tejido graso perivesical [14]. En cistectomías postneoadyuvancia donde no se visualice tumor evidente, se deben tomar bloques de

la localización tumoral que nos indiquen las exploraciones previas al tratamiento, recomendándose un muestreo extenso ya que el tumor residual puede ser focal o a veces presentan áreas de carcinoma in situ (CIS). En los especímenes que incluyan próstata en pacientes masculinos o útero y/o vagina en pacientes femeninas, es fundamental realizar un muestreo exhaustivo de estos órganos adyacentes para evaluar la posible afectación tumoral. Se recomienda obtener muestras preferentemente de áreas sospechosas y de los márgenes de resección, garantizando así un análisis preciso de la extensión de la enfermedad [15].

Tabla 1. Ejemplo de tallado macroscópico en piezas de vejiga urinaria.

Protocolo de tallado macroscópico pieza de cistectomía
- Margen distal de la uretra. - Márgenes ureterales (y uréteres distales adheridos). - Bloques representativos tumorales incluyendo el punto más profundo de invasión, el margen de resección más cercano y el borde del tumor. - Mucosa anormal-hemorrágica, granular, ulcerada, blanca firme apariencia (escamosa). - Mucosa de apariencia normal. - Muestreo de próstata en bloques grandes o pequeños como mínimo; considerando la toma de muestras adicionales si se encuentra un carcinoma prostático significativo en el muestreo inicial. - Vesículas seminales en continuidad con cualquier vejiga suprayacente tumor o un bloque de cada vesícula seminal. - Útero, cérvix y margen vaginal-en continuidad con tumor vesical; - Bloques representativos del útero y el cuello uterino, margen vagina, trompas de Falopio y ovarios.

La cistectomía parcial o segmentaria está indicada en una minoría de pacientes con CV, generalmente aquellos que sufren la primera recurrencia con un tumor solitario, y una localización del tumor que permite un margen de resección de 1 cm a 2 cm, como en la cúpula. Los carcinomas del uraco en la cúpula y por encima, con extensión hacia el ombligo, también pueden tratarse mediante cistectomía parcial, al igual que el carcinoma en un divertículo vesical. Los CIS o bien tumores multifocales, son una contraindicación absoluta de este tipo de procedimiento. La orientación del espécimen puede ser asistido por el uso de suturas por parte del urólogo, o bien usando tinta sobre los márgenes relevantes en el corte en este tipo de procedimiento [5].

3. Epidemiología

El CV es el tipo más común de cáncer del tracto urinario y afecta más a los hombres que a las mujeres, con una relación de 3:1. Su prevalencia es alta, especialmente en personas mayores de 60 años. La epidemiología del cáncer vesical es compleja y está influenciada por factores genéticos y ambientales.

Es el noveno tipo de cáncer más común en todo el mundo, con una estimación de 614.298 casos nuevos y 220.596 muertes en 2022. Es el sexto tipo más común de cáncer en los hombres y el décimo en las mujeres a nivel mundial. La incidencia varía en diferentes partes del mundo, siendo más alta en Norteamérica, Europa y algunos países de Asia y África [16].

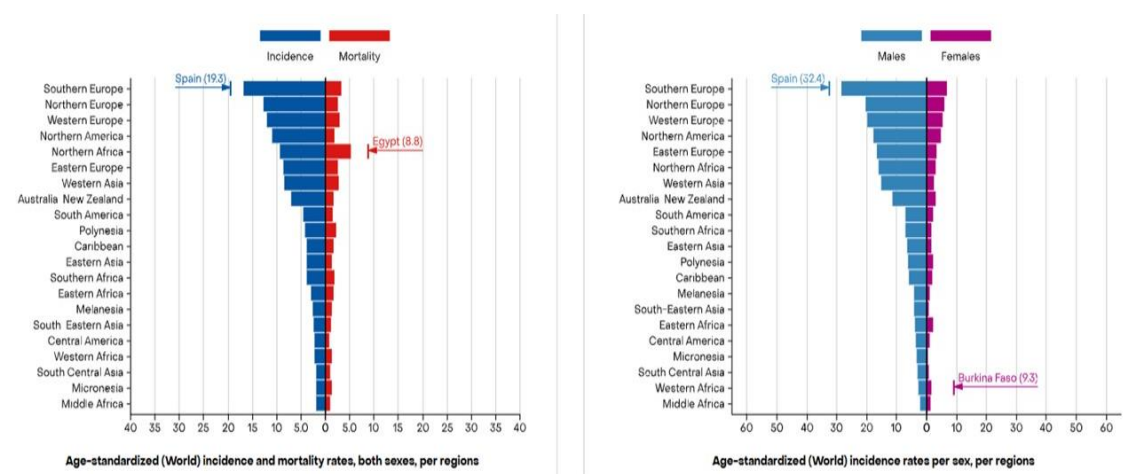


Figura 4. Prevalencia mundial según sexos, mortalidad e incidencia del cáncer vesical 2022[16].

A nivel mundial, la incidencia del cáncer de vejiga ha ido en aumento en las últimas décadas, aunque ha habido algunas variaciones en diferentes regiones y países. Según las estimaciones de la IARC de la OMS [17].

La incidencia de cáncer de vejiga varía considerablemente en Europa. Según los datos del CIIC de la OMS, la tasa ajustada por edad (por cada 100.000 habitantes) de casos nuevos de cáncer de vejiga en 2020 fue de 26.2 en Europa del Este, 19.2 en Europa del Norte, 14.8 en Europa del Oeste, 6.1 en Europa del Sur. Los países con la mayor incidencia de CV en Europa son Albania, Turquía y Eslovaquia, con tasas estandarizadas por edad de alrededor de 20-25 casos por cada 100,000 personas al año con un aumento al alza en la última década de esta entidad.

Estas diferencias pueden deberse a factores de riesgo diferentes, como la exposición ocupacional a productos químicos, el consumo de tabaco y la exposición a la radiación. Además, es importante tener en cuenta que las tasas de incidencia de CV pueden variar según el método de recopilación de datos y la calidad de los sistemas de registro de cáncer en cada país.

Actualmente en España, el CV es uno de los cánceres más frecuentes, representando un 3.30% de todos los nuevos casos de diagnóstico de cáncer. Según la SEOM, Los cánceres más frecuentes diagnosticados en hombres en España en España en 2025, al igual que en 2024, serán los de próstata (32.188), colon y recto (27.224), pulmón (23.442) y vejiga urinaria (18.281). A mucha distancia, los siguientes cánceres más frecuentes serán el cáncer de riñón, los linfomas no hodgkinianos, y los cánceres de páncreas, hígado, cavidad oral y faringe, y estómago, todos ellos con más de 4.000 casos al año. Los cánceres más frecuentemente diagnosticados en mujeres en España en 2025 serán los de mama (37.682) y los de colon y recto (17.349). A mucha distancia, los siguientes cánceres más frecuentes serán los de pulmón (11.064), cuerpo uterino (7.428), páncreas (5.055) y tiroides (4.869), los linfomas no hodgkinianos (4.533) y el cáncer de vejiga urinaria (4.154), todos ellos superando los 4.000 casos al año.

TIPO TUMORAL	N
Cavidad Oral y Faringe	5.211
Esófago	1.883
Estómago	4.197
Colon	18.312
Recto	8.912
Hígado	5.278
Vesícula biliar	1.212
Páncreas	5.283
Laringe	2.785
Pulmón	23.442
Melanoma de piel	4.336
Próstata	32.188
Testículo	1.677
Riñón (sin pelvis)	6.640
Vejiga urinaria	18.281
Encéfalo y sistema nervioso	2.555
Tiroides	1.626
Linfoma de Hodgkin	996
Linfomas no hodgkinianos	5.850
Mieloma	2.035
Leucemias	3.675
Otros	10.139
Todos excepto piel no melanoma	166.513

Fuente: Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN).

Tabla 2. Estimación nuevos casos cáncer en hombres en España 2025. SEOM 2025 [18].

TIPO TUMORAL	N
Cavidad Oral y Faringe	2.235
Esófago	417
Estómago	2.939
Colon	11.999
Recto	5.350
Hígado	1.522
Vesícula biliar	1.147
Páncreas	5.055
Laringe	405
Pulmón	11.064
Melanoma de piel	5.072
Mama	37.682
Cérvix Uterino	2.307
Cuerpo Uterino	7.428
Ovario	3.748
Riñón (sin pelvis)	3.134
Vejiga urinaria	4.154
Encéfalo y sistema nervioso	2.074
Tiroides	4.869
Linfoma de Hodgkin	737
Linfomas no hodgkinianos	4.533
Mieloma	1.696
Leucemias	2.589
Otros	7.434
Todos excepto piel no melanoma	129.590

Fuente: Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN).

Tabla 3. Estimación nuevos casos cáncer en mujeres en España 2025. SEOM 2025 [18].

La incidencia CV ha sufrido una evolución variable a lo largo del tiempo aumentando con la edad. Además, persisten diferencias geográficas en la incidencia en España, estando La Rioja a la cabeza con 32,6 casos por cada 100.000 habitantes, seguido de Castilla y León y País vasco con 29,5 casos y 27,9 casos por cada 100.000 habitantes respectivamente. Andalucía se sitúa dentro de las regiones con menor incidencia de CV presentando 19,1 casos por 100.000. Estas tasas más altas de CV en determinadas regiones se explican por ser regiones con mayor prevalencia a tabaquismo y exposición ocupacional a productos químicos [18].



Figura 5. Cifras de cáncer en España 2025 SEOM [19].

La tasa de mortalidad por CV varía según la región geográfica y el género recogidos sobre los datos estadísticos de GLOBOCAN para el año 2020, el CV fue causante de 199,500 muertes en todo el mundo. En general, se observa una mayor tasa de mortalidad en hombres que en mujeres. También hay diferencias significativas en la tasa de mortalidad por CV entre los países de ingresos bajos, medianos y altos. Los países de ingresos bajos y medianos tienen una tasa de mortalidad más alta en comparación con los países de ingresos altos pudiendo ser influenciada por varios factores, como la disponibilidad de diagnóstico y tratamiento adecuados, la prevención y el control de los factores de riesgo, y la calidad del sistema de atención médica. Además, el CV puede ser un cáncer agresivo que a menudo requiere tratamiento agresivo, lo que puede contribuir largo plazo a la tasa de mortalidad.

Es fundamental fomentar la prevención y el control del CV mediante la promoción de hábitos saludables y la detección temprana para mejorar la supervivencia y reducir la mortalidad por esta enfermedad.

Según los últimos datos publicados por el INE sobre datos de mortalidad en España para el año 2021. Se produjeron 450.744 defunciones con una disminución de la tasa bruta de mortalidad del 8,7% respecto al año anterior. De nuevo, los tumores constituyeron la segunda causa de muerte en España (25,2% de los fallecimientos, 113.662) con un aumento del 0,8% respecto al año anterior y sólo por detrás de las enfermedades del sistema circulatorio. En 2021, se registraron en España un total de 4.464 fallecimientos por CV [19].

Debido a la necesidad de diagnóstico, tratamiento y seguimiento a largo plazo del CV, es importante destacar que el impacto económico de esta enfermedad puede ser bastante significativo. La magnitud del aumento de la carga económica puede variar dependiendo de varios factores, como el sistema de salud del país, el tipo y la etapa del

cáncer o la duración del tratamiento, entre otros. En 2021 se publica un estudio que tiene como objetivo analizar la carga económica del CV en España en el período de 2015 a 2018. El estudio se realizó utilizando datos de diferentes fuentes, como registros de cáncer, informes de costos de atención médica y encuestas a pacientes. Se estimaron los costos directos e indirectos del CV, incluyendo el diagnóstico, el tratamiento, el seguimiento y los costos indirectos asociados con la pérdida de productividad laboral. Los resultados del estudio indican que el CV es una enfermedad costosa en España, con una carga económica que ha aumentado en los últimos años. Se estimó que el coste total directo e indirecto del cáncer CV fue de 342 millones de euros en el período de 2015 a 2018. Los costes directos representaron la mayor parte de los costes totales (86%), con los costes de tratamiento y seguimiento como los principales contribuyentes.

El estudio encontró que el coste total estimado del tratamiento del cáncer vesical en España aumentó de 166,3 millones de euros en 2015 a 181,5 millones de euros en 2018. Los costos de hospitalización y tratamiento quirúrgico representaron la mayor parte de los costes totales [20].

Es importante destacar que el diagnóstico temprano del CV es clave para mejorar el pronóstico y la supervivencia de los pacientes. En España, existen programas de detección precoz y protocolos de seguimiento para los pacientes con cáncer de vejiga. Además, se están desarrollando nuevas terapias y enfoques de tratamiento para mejorar los resultados clínicos y la calidad de vida de los pacientes con cáncer de vejiga en el país.

4. Etiopatogenia y carcinogénesis

El CV Es el tumor más prevalente del sistema urinario, siendo el carcinoma urotelial (CU) el subtipo histológico más prevalente. La etiopatogenia del CV es compleja y multifactorial. Se cree que la mayoría de los casos de cáncer vesical son causados por una combinación de factores genéticos y ambientales.

Debido a la gran cantidad de casos relacionados con causas ambientales, el CV es un objetivo apropiado para las intervenciones preventivas de salud pública. Dejar de fumar, adecuados protocolos en los procedimientos de seguridad ocupacional, la dieta, la pérdida de peso y la prevención de la esquistosomiasis pueden mitigar el aumento de la incidencia mundial. Por tanto, es esencial determinar los principales factores de riesgo como.

El tabaco es el principal factor de riesgo más importante para el CV, representando 30-40% de todos los casos de CU ya que los productos químicos presentes en el humo como beta-naftilamina e hidrocarburos aromáticos policíclicos, son carcinógenos reconocidos del tabaco capaces de dañar el ADN de las células uroteliales activando oncogenes o afectando a genes supresores de tumores, favoreciendo así la carcinogénesis.

Dejar de fumar reduce el riesgo de carcinoma urotelial. Un estudio de cohortes realizado en 2017 mostraba que los pacientes que habían dejado de fumar durante 1 a 3 años presentaron un riesgo relativo de 2,6 en comparación con un riesgo relativo de 1,1 para aquellos que habían dejado de fumar durante más de 15 años [21].

Los trastornos médicos, son otros de los factores de riesgo, ya sea de forma directa o indirecta a través de la toxicidad por tratamientos. Por lo general, la inflamación persistente y la formación de metaplasia escamosa queratinizante impulsan carcinogénesis directa [22]. La radiación también puede ser un factor de riesgo para el CV, especialmente en personas que han recibido radioterapia en la pelvis como parte de su tratamiento para otros tipos de cáncer con un periodo de latencia estimado de 15 a 30 años. Entre los efectos adversos de medicamentos antidiabéticos del tipo de las tiazolidinedionas que reduce los niveles de glucosa en personas con diabetes no insulino dependiente, está el aumento del riesgo de padecer CV [23]. Otro factor de riesgo importante es la quimioterapia, concretamente la ciclofosfamida que es la única quimioterapia que se ha demostrado que induce CV [24].

Existen varias hipótesis acerca de que las ITUs bacterianas persistentes o recurrentes pueden aumentar la posibilidad de desarrollar CV [25], como infecciones recurrentes de gonorrea o patógenos como la esquistosomiasis, una infección parasitaria causada por trematodos endémica en África y Oriente Medio [26]. La infección por VPH también se ha relacionado con un mayor riesgo de CV, aunque este riesgo es menor que para otros tipos de cáncer relacionados con el VPH, como el cáncer de cuello uterino.

La vejiga es un órgano constantemente expuesto a sustancias potencialmente nocivas eliminadas a través de la orina. En consecuencia, susceptible a toxinas ambientales e inflamación. La exposición ocupacional y ambiental suponen el segundo factor de riesgo evitable después del tabaquismo. La exposición ocupacional a carcinógenos tales como aminas aromáticas (2-naftilamina, 4-aminobifenilo y bencidina, etc.), que se emplean en tintes, pinturas, metales, caucho y productos derivados del petróleo son responsables del 5-10% de todos los casos de CV, por tanto, profesionales del mundo del caucho, peluqueros, pintores, trabajadores del cuero, deshollinadores, trabajadores del petróleo, etc., conllevan más riesgo de por vida de desarrollar CV [27]. Se ha reconocido la exposición al arsénico en el agua potable como causa de CV. Tras la contaminación del agua potable en Bangladesh, el riesgo de mortalidad a lo largo de la vida por CV era al menos el doble.

Como ya hemos mencionado anteriormente, el sexo y la edad son factores de riesgo de CV, dada la mayor tasa de incidencia en hombres con respecto a mujeres con una relación 3:1. Se han sugerido varias teorías para explicar el aumento en la incidencia del CV en los hombres. En primer lugar, el tabaquismo es mucho más frecuente entre los hombres que entre las mujeres en todo el mundo, además la metabolización de los carcinógenos podría ser distinta ya que hay estudios que hacen referencia a expresión

diferente de las enzimas involucradas en la degradación de aminas aromáticas en hombres y en mujeres [28]. En mujeres la exposición a esteroides sexuales reduce el riesgo de CV; el receptor de andrógeno (RA) se ha visto relacionado en la génesis y progresión del CV, presentándose su expresión infrarregulada en este tumor [29].

En cuanto a la edad, el 90% de los CV se diagnostican a partir de los 55 años de edad, con una media de diagnóstico de 73 años.

La dieta se ha estudiado ampliamente, los estudios previos retrospectivos hablaban sobre una menor incidencia de CV con un mayor consumo de líquidos. Sin embargo, la Investigación Prospectiva Europea de Cáncer y Nutrición (EPIC) no encontró asociación entre el líquido total consumido y el riesgo total. No obstante, siguen existiendo desacuerdos en cuanto a la relevancia de la ingesta de líquidos [30]. Por un lado, la ingesta de líquido reduce la exposición del urotelio a los carcinógenos diluyendo la orina y aumentando la frecuencia de micción, y por otro lado el tipo de líquido puede influir en un aumento de riesgo si contiene carcinógenos relevantes como arsénico. Además de la ingesta de líquidos, se han considerado los hábitos alimentarios relevantes en carcinogénesis del CV. En otros cánceres, se ha sugerido que el consumo de carne aumenta el riesgo, mientras que el consumo de verduras y frutas es beneficioso. En CV, ninguna de estas dos postulaciones está demostrada. En una serie de casos prospectivos de aproximadamente 500.000 personas del EPIC, se vio como el consumo de carne roja no se relacionó con el riesgo de CV [31].

Un índice de masa corporal (IMC) >30 se correlaciona con un riesgo aumentado de múltiples tipos de cáncer. En concreto que aumentar el IMC es un factor de riesgo significativo para la progresión de CV. Una de las razones de esta relación es la alta correlación entre tabaquismo y obesidad; sin embargo, incluso después de corregir el tabaquismo, el IMC permanece relacionado con el CV. La obesidad aumenta la producción de insulina, lo que puede estimular el crecimiento tumoral [32].

La susceptibilidad genética en CV es un concepto en auge. Aunque los estudios no han logrado reconocer importantes factores genéticos que sustenten el CV esporádico, se ha demostrado que el riesgo de CV es dos veces mayor en familiares de primer grado con CV. Se han identificado dos loci genéticos que presentan una predisposición al CV, como son NAT2 y la GSTM1, que están relacionados con la capacidad de metabolizar aminas aromáticas, por lo podrían desempeñar un papel importante en el subgrupo de individuos con exposición a carcinógenos ambientales, ya que la acetilación lenta puede no conducir intrínsecamente a CV, pero confieren un riesgo adicional a la exposición de carcinógenos como productos de tabaco [33].

Se ha demostrado que mutaciones activadoras en el oncogén FGFR3 son bastantes frecuentes en los CVNMI de bajo grado. Estas mutaciones resultan en una activación constitutiva del receptor, lo que conduce a una señalización continua que promueve la proliferación celular e inhibe la apoptosis. Esto contribuye al desarrollo y mantenimiento

del carcinoma urotelial. Además, las alteraciones de FGFR3 en el CU se han asociado con características clínicas y patológicas distintivas. Los tumores con mutaciones en FGFR3 a menudo presentan un grado más bajo, un mejor pronóstico y una mayor capacidad de respuesta al tratamiento [34].

El aumento en la incidencia de CV subtipo escamoso se ha relacionado con mutaciones en PTEN y MSH2 que se observan fundamentalmente en el síndrome de Cowden y en el de Lynch [35,36].

5. Patogénesis molecular

Diversas teorías se han propuesto para explicar la carcinogénesis del CV. En 1953 se introdujo el concepto de "field cancerization", para explicar el origen de los tumores multicéntricos, mediante la cual determinadas poblaciones celulares poseían alteraciones genéticas y/o epigenéticas comunes que podrían ocasionar una tumorigénesis múltiple [37]. Por otro lado, la "teoría del origen clonal" establece que el CV surge a partir de la proliferación incontrolada de una sola célula capaz de proliferar con subsiguientes alteraciones genéticas variables [38]. Actualmente, se considera que la acumulación de alteraciones genéticas y/o epigenéticas constituye la base para el proceso de carcinogénesis múltiple y, por tanto, debemos entender el proceso tumoral vesical como un proceso darwiniano evolutivo [39].

5.1 Origen celular del cáncer vesical.

El origen exacto del CV sigue siendo incierto; sin embargo, los análisis histológicos y moleculares de la estructura urotelial proporcionan pistas importantes. El urotelio se compone de 3 tipos de células diferentes según nivel de diferenciación, proporcionando una base para los estudios sobre subtipificación molecular

- Las células basales adyacentes a la membrana basal son las menos diferenciadas y expresan la citoqueratina basal KRT5/6 y KRT14, pero no KRT18 y KRT20, que son características de capas de células uroteliales intermedias. Además, presentan receptor de laminina y beta4integrinas. Otro marcador característico es el receptor de ácido hialurónico (CD44). La creencia general es que las células madre o células uroprogenitoras con capacidad de autorenovación residen en la capa basal [40].
- Las células intermedias que están entre la capa basal y luminal muestran una diferenciación moderada y expresan KRT18, así como CD44, KRT5/6 en niveles más reducidos. El potencial proliferativo de las células intermedias es limitado y similar a las células parcialmente comprometidas de otros tejidos.

- La capa superficial compuesta por células luminales que se diferencian terminalmente en las células “paraguas”, expresan uroplaquina y KRT20.

Múltiples estudios hablan sobre una fuerte evidencia de que las células madre o uroprogenitoras constituyen el origen más probable del desarrollo del CV [41]; y serían capaces de diferenciarse en la mucosa a través de diferentes vías oncogénicas [42].

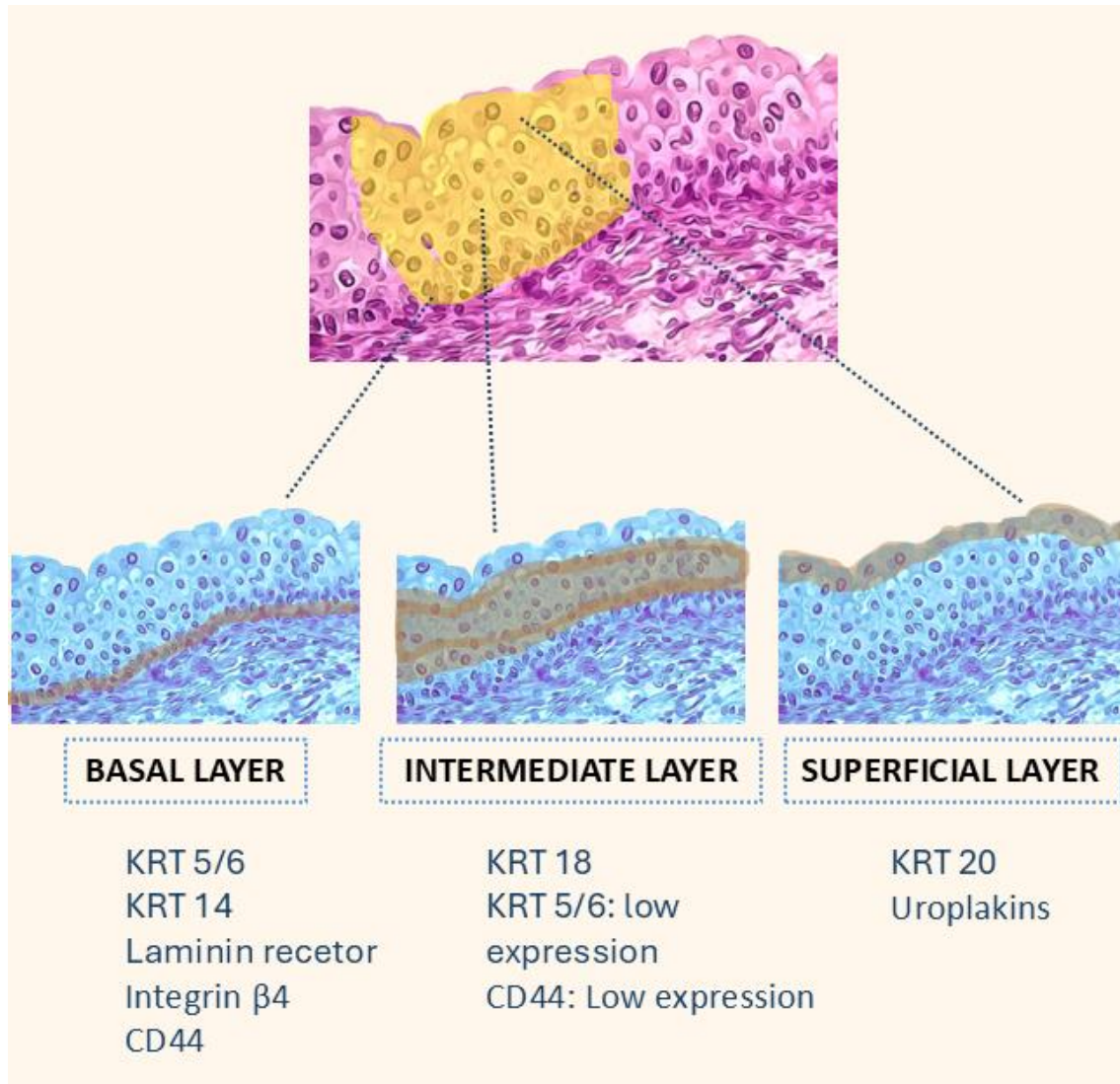


Figura 6. Composición celular del urotelio y expresión de queratinas asociadas. La figura ilustra las tres capas principales del urotelio: basal, intermedia y superficial. Cada capa se caracteriza por la expresión de queratinas específicas y otros marcadores. La capa basal expresa KRT 5/6, KRT 14, integrina $\beta 4$ y CD44; la capa intermedia expresa KRT 18 con bajos niveles de KRT 5/6 y CD44; y la capa superficial se caracteriza por KRT 20 y uroplaquinas, que están asociadas con la diferenciación terminal del urotelio [43].

5.2 Doble vía (DUAL-TRACK) de patogénesis del cáncer vesical

El CU es la neoplasia más frecuente de la vejiga y representa aproximadamente el 90% de los tumores vesicales malignos. Se desarrolla a partir de las células del urotelio a través de dos vías patogénicas principales, lo que ha dado lugar a la clasificación de la

enfermedad en carcinoma urotelial no músculo invasivo (CUNMI) y carcinoma urotelial músculo invasivo (CUMI), cada uno de ellos con características clínicas, pronósticas y terapéuticas diferentes.

Desde un punto de vista histológico, el CUNMI se asocia principalmente con tumores papilares, caracterizados por un crecimiento exofítico en proyecciones digitiformes que emergen del epitelio urotelial. En cambio, el CUMI suele desarrollarse a partir de lesiones planas de alto grado, como el carcinoma in situ, caracterizado por una proliferación celular atípica y desorganizada con alto riesgo de progresión invasiva. Esta diferencia en la morfología refleja los distintos mecanismos moleculares que impulsan cada subtipo. Aproximadamente el 80% de los carcinomas vesicales son papilares superficiales, originados a partir de una lesión premaligna, como la neoplasia intraurotelial de bajo grado o displasia urotelial. Los tumores papilares exhiben una morfología exofítica, con proyecciones digitiformes sobre la superficie de la mucosa, y presentan alta tasa de recurrencia tras la escisión local, aunque rara vez invaden la muscular propia o metastatizan.

El fenotipo CUNMI representa a la mayoría de los carcinomas uroteliales en el momento del diagnóstico inicial y se considera genómicamente el más estable, caracterizándose por la delección del cromosoma 9 en aproximadamente el 50% de los casos. Entre las alteraciones más relevantes se encuentran las mutaciones activadoras de FGFR3 y RAS. Aproximadamente el 70% de los tumores papilares de bajo grado presentan mutaciones activadoras de FGFR3, en comparación con el 10-20% en los tumores invasivos. FGFR3 es uno de los cuatro miembros de la familia de receptores de tirosina quinasa, fundamentales para el desarrollo embrionario, crecimiento celular, diferenciación, proliferación y angiogénesis.

El hecho de que FGFR3 y HRAS estén mutados en alrededor del 70% y 30% de los tumores papilares no músculo invasivos, respectivamente, indica enérgicamente que la activación constitutiva de la vía Ras-MAPK es responsable de la génesis de una gran proporción de estos tumores. Además, se han identificado mutaciones en genes que regulan la modificación de la cromatina, como KDM6A, CREBBP, EP300 y ARID1A, lo que sugiere que las alteraciones epigenéticas desempeñan un papel clave en la progresión de estos tumores. Clínicamente, el CUNMI representa entre el 70-80% de los casos de CU, con una alta tasa de recurrencia del 50% a los 5 años y una progresión a carcinoma urotelial músculo invasivo en un 20-30% de los pacientes.

En contraste, el CUMI muestra una inestabilidad genómica mucho mayor, con inactivación de genes supresores tumorales como TP53, RB1 y PTEN, lo que permite la evasión de los puntos de control del ciclo celular y facilita la invasión tumoral. Aunque las mutaciones en FGFR3 son menos frecuentes en el CUMI que en el CUNMI, hasta el 40% de los tumores músculo invasivos presentan sobreexpresión de FGFR3, lo que sugiere un papel en la progresión tumoral. Además, se ha identificado la activación de

la vía ERBB2/HER2, particularmente en la variante micropapilar del carcinoma urotelial, lo que ha abierto nuevas oportunidades terapéuticas con inhibidores específicos. El CUMI es más agresivo, con mayor probabilidad de diseminación metastásica y un peor pronóstico. Aproximadamente el 50% de los pacientes con CUMI desarrollarán metástasis después de una cistectomía radical, lo que resalta la necesidad de enfoques terapéuticos más eficaces y personalizados [44].

Las alteraciones epigenéticas también juegan un papel clave en la biología del CU. Se han identificado diferencias en los patrones de metilación del ADN entre los subtipos músculo invasivo y no músculo invasivo. Mientras que el carcinoma urotelial no músculo invasivo se asocia con hipometilación en islas no CpG, el carcinoma músculo invasivo presenta hipermetilación difusa de promotores, lo que contribuye a la inactivación de genes supresores tumorales. Estas diferencias pueden influir en la respuesta terapéutica, ya que los subtipos moleculares no luminales han mostrado una mejor supervivencia tras la quimioterapia neoadyuvante basada en cisplatino en comparación con los subtipos luminales.

Las alteraciones cromosómicas son comunes en los CU, aunque ha sido difícil determinar si ciertas alteraciones son consecuencia directa de la formación del tumor o si están asociadas con una vía específica de tumorigénesis urotelial. La pérdida de heterocigosidad (LOH) del brazo largo del cromosoma 9q es más prevalente en tumores superficiales de bajo grado, aunque otros estudios indican que la delección de ambos brazos del cromosoma 9 es frecuente en los carcinomas uroteliales y ocurre en las primeras etapas de la tumorigénesis. Estas aberraciones cromosómicas no parecen distinguir entre las dos vías de desarrollo tumoral, pero sí se asocian con la progresión tumoral, desde lesiones precursoras como la displasia hasta el carcinoma in situ y el carcinoma invasivo. La LOH en 9q se ha correlacionado con un peor pronóstico y una mayor probabilidad de recurrencia y progresión de la enfermedad [45].

En general, las alteraciones del cromosoma 9, tanto en 9p como en 9q, reflejan la importancia de los genes supresores tumorales y las vías de control del ciclo celular en la progresión del CU. Estas alteraciones pueden favorecer la proliferación celular anormal, promoviendo la transformación maligna y la agresividad del tumor. Sin embargo, la tumorigénesis es un proceso multifactorial, y estas alteraciones representan solo una parte de los eventos genéticos y moleculares involucrados [46].

El modelo de vía dual (DUAL-TRACK) de la patogénesis del CV no solo ha permitido mejorar la clasificación molecular del CU, sino que también ha facilitado la identificación de biomarcadores pronósticos y terapéuticos, lo que está revolucionando el manejo clínico de la enfermedad. La identificación de alteraciones específicas, como la activación de FGFR3 en el CUNMI y la inactivación de TP53 y RB1 en el CUMI, ha llevado al desarrollo de terapias dirigidas, incluyendo inhibidores de FGFR, inhibidores de

puntos de control inmunológico y terapias basadas en la inhibición de ERBB2/HER2 en casos seleccionados.

El estudio de la patogénesis del CV sigue siendo un área crucial en la investigación oncológica, ya que su comprensión permitirá optimizar la estratificación del riesgo, mejorar la detección temprana, desarrollar nuevas terapias personalizadas y, en última instancia, impactar en la supervivencia de los pacientes con CU.

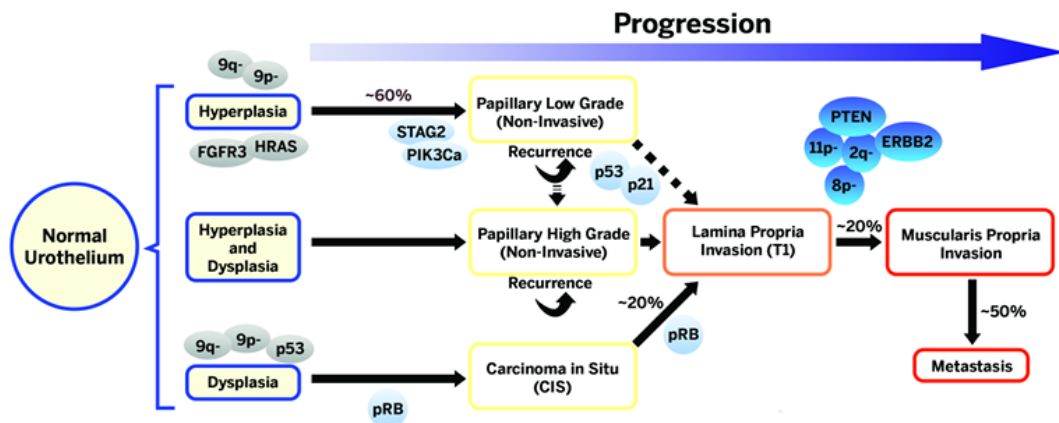


Figura 7. Patogénesis DUAL del cáncer vesical, el cual se desarrolla a través de dos vías distintas, dando lugar al cáncer de vejiga no músculo-invasivo CVNMI y al CVMI. Las alteraciones comunes en el CVNMI incluyen deleciones del cromosoma 9 y las mutaciones puntuales en FGFR, las cuales también son evidentes en los precursores hiperplásicos [47].

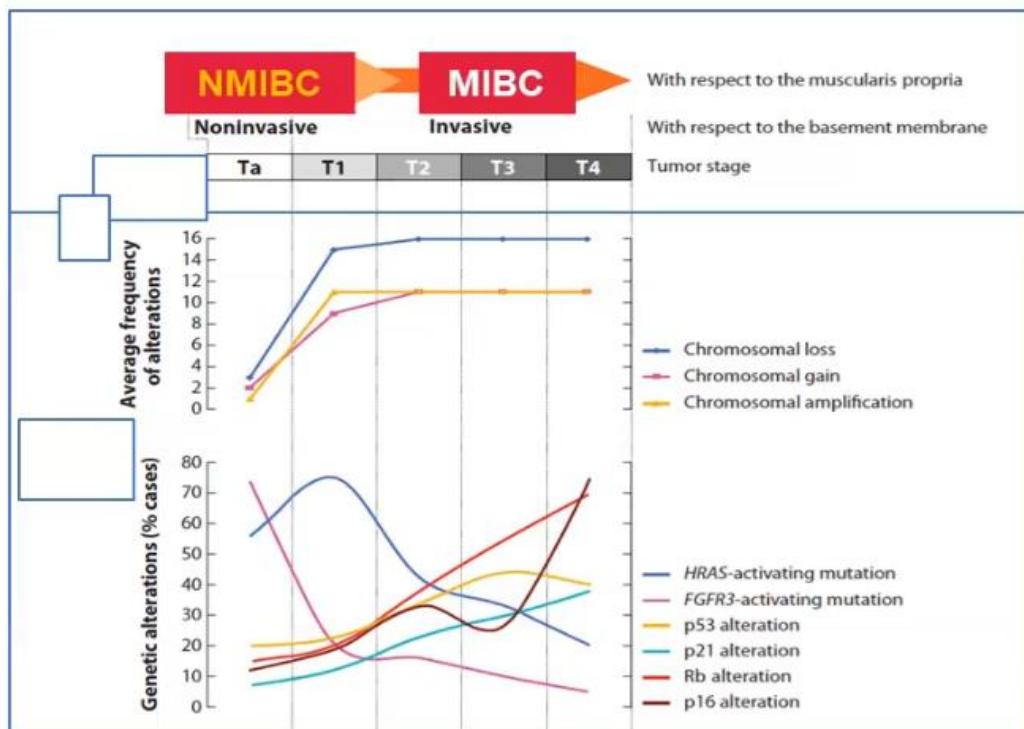


Figura 8. Alteraciones genéticas más relevantes en CVNMI y CVMI [46].

5.3. Principales vías de señalización del cáncer vesical

Hoy en día existen cada vez más investigaciones sobre las vías de señalización molecular involucradas en la patogénesis del cáncer de vejiga con el objetivo de descubrir potenciales dianas terapéuticas.

PI3K/AKT/mTOR:

Es fundamental para la regulación celular, interviene a nivel de procesos metabólicos, crecimiento celular, proliferación y supervivencia. La cascada se inicia con la fosforilación de PI3K por un receptor tirosin-quinasa. La transducción de la señal inducida por PI3K está mediada por la generación del PIP3 a través de la fosforilación del componente fosfolípido PIP2 unido a la membrana. PIP3 trabaja para reclutar y activar AKT, que se adhiere a la membrana plasmática y activa varias cascadas de señalización involucradas en crecimiento celular, incluidas la activación de mTOR.

Esta vía está controlada por diversos mecanismos de regulación entre ellos PTEN que actúa en el citoplasma desfosforilando PIP3 previniendo la activación de AKT. PTEN es un potente inhibidor de la vía PI3K/AKT/mTOR. Otro de los mecanismos a los que se asocia es a la inducción del arresto celular a través de la caída de expresión de ciclinaD1 y la inhibición de la fosforilación de MAPK.

En el CV se recogen graves alteraciones que afectan a esta vía. Dentro de las mutaciones más importantes que influyen en esta vía destacan:

- La pérdida de PTEN se asocia a mayor mortalidad, metástasis e invasividad [48]. Hasta en un 30% de carcinoma uroteliales invasivo se ha visto mutación de PTEN mientras que en tumores superficiales (Ta/T1) este porcentaje decae a un 6,6%. El 94% de estadios avanzados de CV se asocian a reducción de PTEN.
- Mutaciones de PI3K aparecen en el 27% de los CV, correlacionándose con tumores uroteliales de bajo grado y con estadios bajo. Estas mutaciones están fuertemente asociadas con las mutaciones de FGFR3 que se encuentran comúnmente en los tumores superficiales de vejiga, lo que indica que ambas mutaciones pueden estar involucradas en la misma vía de progresión tumoral [49].

Ras/Raf/MEK/MAPK

Es una vía conservada evolutivamente implicada en el crecimiento celular, la diferenciación, la supervivencia y la apoptosis. Si bien hay seis conocidos grupos de MAPK, la vía MAPK prototípica es la mediada por reguladores de quinasas extracelulares ERK1/2. Esta cascada se inicia con la activación de Ras por un receptor tirosina quinasa. Ras se une a GTP para activar la quinasa Raf, que fosforila y activa MEK. La activación de

MEK. La activación del MEK activa la transcripción de factores de transcripción Jun y Fos para entrar en el núcleo y aumentar la expresión de genes fundamentales para la proliferación y supervivencia celular [50]. Dos caminos MAPK distintos son los mediados por JNK y p38, que funcionan para inhibir la proliferación celular e inducir la apoptosis. FGFR3 a través de Ras produce activación de MAPK, y es una de las principales vías de la patogenia del CV. La activación de MAPK por mutación de Ras y/o de FGFR3 se ha demostrado que están presentes en el 85% de los CVNMI.

Wnt/b-Catenina

Vía altamente conservada y fundamental tanto para el desarrollo embriológico como para la carcinogénesis de varios tipos de tumores. Interviene en la regulación de multitud de procesos celulares entre ellos motilidad, polaridad y renovación de células madre.

La vía Wnt/b-catenina fue implicada por primera vez en cáncer con el descubrimiento de la mutación del gen APC, pero en los últimos años ha ganado una mayor atención en los CV, sobre todo porque puede tener una importancia pronóstica en los CVMI, observándose alteraciones de la vía de Wnt/b-catenina hasta en un 73% de los pacientes con CVMI sin QT previa y en los CVNMI de alto grado [51].

Estudios recientes demuestran que existe sobrecruzamiento de la vía de Wnt con PI3K y MAPK y promueven la tumorigénesis [52].

NOTCH

La familia de genes NOTCH incluye 4 receptores transmembrana (NOTCH 1-4). La activación e inactivación de NOTCH se encuentra implicada/ ha demostrado estar implicada en la patogénesis de diferentes tumores.

La importancia de la vía NOTCH en el CV es controvertida. Se ha demostrado que la vía es supresora de tumores en el CV. Un estudio demuestra que el 60% de las muestras de CV presentaban una pérdida de función por mutación en NOTCH, específicamente en NOTCH 1 y 2 [53].

Alternativamente, baja actividad de la vía NOTCH se ha correlacionado con un aumento de la agresividad del CV y peor pronóstico [54].

Hedgehog

Esta vía juega un papel central en la embriogénesis y la función de las células madre postnatales. Esta vía incluye los ligandos SHH, DHH, IHH que se unen al receptor de

membrana PTCH. Se ha observado un aumento de la expresión de SHH en el 96% de CVNMI y 52% de los CVMi [55].

Otras vías de señalización

En la era genómica, se ha logrado un avance significativo en la comprensión de alteraciones genéticas y moleculares del CV, identificándose diversas vías de señalización molecular además de las descritas anteriormente encontramos Hippo, TGF- β o JAK/STAT entre otras [55].

5.4 Alteraciones a nivel telomérico

Las mutaciones activadoras que ocurren en TERT, provocan un aumento de la expresión de la enzima telomerasa, provocando que algunas neoplasias eviten la senescencia evitando el problema que supone la replicación final.

Inicialmente alteraciones de TERT se describieron en melanoma y posteriormente se han ido describiendo en múltiples tumores, concretamente un 66% de los CUMi presentan mutaciones activadoras de TERT. Por lo tanto, TERT es el gen más frecuentemente mutado en formas avanzadas de esta enfermedad, y la localización de estas mutaciones en una pequeña región génica en el promotor de TERT brinda una oportunidad extraordinaria para el desarrollo de biomarcadores [56].

En un estudio realizado por Johns Hopkins trataron de evaluar la utilidad TERT como marcador en orina para la detección temprana de CV y analizaron una serie de 76 pacientes con CU papilares y planos no invasivos tanto de AG como de BG y valoraciones en 14 muestras independientes de pacientes con CV y orinas en seguimiento positivas para ver la concordancia de TERT. Se observó una alta tasa de mutación del promotor de TERT tanto en lesiones papilares como planas, así como en neoplasias uroteliales no invasivas de BG y AG. Además, de una alta concordancia en las mutaciones TERT de pacientes con CV y orinas positivas ya que las mismas mutaciones estaban presentes en las muestras de orina de seguimiento [57].

Las mutaciones del promotor de TERT, por tanto, ocurren en lesiones papilares y planas, son las alteraciones genéticas más frecuentes identificadas hasta la fecha en lesiones precursoras no invasivas de la vejiga, detectables en la orina y parecen estar fuertemente asociadas con la recurrencia del cáncer de vejiga.

Las mutaciones del promotor de TERT pueden ofrecer un biomarcador urinario útil tanto para la detección temprana como para la monitorización de neoplasias de vejiga.

5.5. Alteraciones del ciclo celular

La vía TP53/RB1 juega un papel importante en la regulación de la progresión del ciclo celular.

5.5.1 TP53

La mutación o delección de TP53 se ha observado predominantemente en casos de CIS y CVMI. La inactivación de RB1 también se ha observado predominantemente en CVMI, a menudo con mutaciones de TP53 concurrente [58].

TP53 es un gen supresor de tumores que se encuentra en el cromosoma 17p13.1 y que codifica p53, que inhibe la progresión del ciclo celular en la transición de G1-S.

Es una molécula central en varios programas celulares importantes relacionados con el desarrollo del cáncer, progresión y respuesta a la terapia, incluida la regulación del ciclo celular, angiogénesis, apoptosis y reparación del ADN.

Las mutaciones de TP53 resultan en una proteína alterada, estable, resistente a la vía de degradación normal por vía de las ubiquitinas, que se acumula en el núcleo celular. Esta acumulación nuclear de p53 es detectada inmunohistoquímicamente con una alta correlación con mutaciones en el gen TP53. Se ha descrito que la acumulación de p53 nuclear tiene un valor predictivo en pacientes con CU invasivos órgano-confinados, sin ganglios positivos [59].

Aunque la acumulación de p53 es directamente proporcional a la mutación de TP53, existen discordancias. Hay estudios que muestran una fuerte evidencia que tanto la acumulación nuclear como la mutación del gen TP53 son indicadores pronósticos diferentes. Por tanto, los tumores con fenotipo TP53 mutado y sobreexpresión de p53 muestran peor pronóstico y los que presentan WT TP53 y proteína no alterada, son los de mejor pronóstico [46].

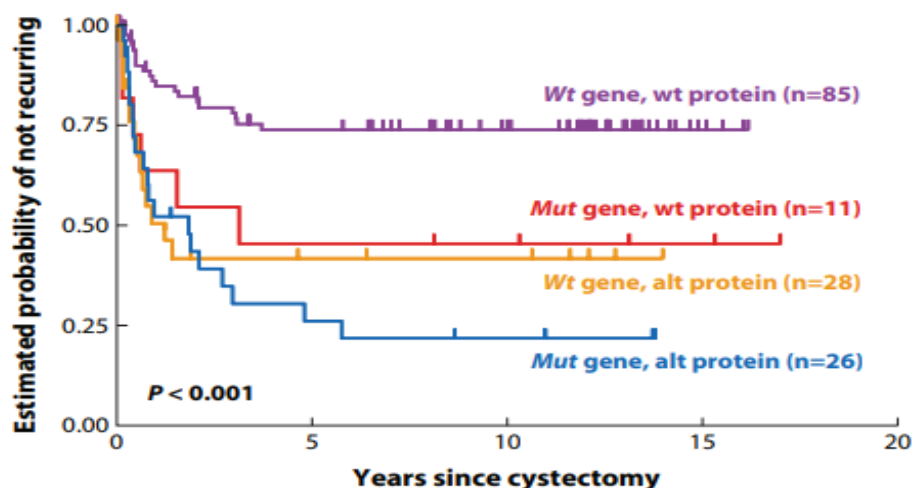


Figura 9. Relación pronóstica entre mutaciones de TP53 y alteraciones proteína p53. Pacientes WT TP53 y p53negativos son los de mejor pronóstico [46].

P53 interactúa con otras proteínas que intervienen en la tumorigénesis del CV como es el caso de p21 y proteína MDM.

El gen TP21 codifica la proteína p21, un inhibidor de quinasa dependiente de ciclina, regulado por p53. Aunque puede ser regulado de forma p53-independiente. La pérdida de expresión de p21 es un mecanismo fundamental para que las alteraciones de p53 influyan en la progresión tumoral. Se ha demostrado que la pérdida de p21 es un factor predictor de progresión independiente en el CU y que la conservación de expresión de p21 parece anular los efectos nocivos de p53 alterado.

MDM2 es una proteína que interviene autorregulando un circuito de retroalimentación con p53, controlando así su actividad. La amplificación de MDM2 ha sido observada en CU, y su frecuencia aumenta con el aumento del estadiaje y el grado del tumor.

El gen MDM2 se inhibe por la proteína p14, propiciando otro nivel de regulación para p53. Niveles alto de metilaciones de p14 se correlacionan con peor pronóstico en CU.

5.5.2 RB

El gen del retinoblastoma RB se localiza en el cromosoma 13q14 y codifica la fosfoproteína Rb que interactúa con múltiples proteínas regulatorias que intervienen en el ciclo celular de G1-S. Esta proteína interviene en diversos roles en el desarrollo, la diferenciación, el ciclo celular, restricción, senescencia y apoptosis; se sabe que está directamente involucrada en la tumorigénesis.

La forma activa y desfosforilada de Rb se une y secuestra al factor de transcripción E2F, y tras la fosforilación por CDKs, Rb libera a E2F, el cual a su vez transcribe los genes necesarios para la síntesis de ADN.

Mutaciones inactivadoras del gen RB, y que conllevan pérdida de expresión de proteína Rb, se han asociado a todos los estadios tumorales y grados de CU.

Por otro lado, tumores con niveles muy altos de expresión de Rb, muestran Rb constitutivamente hiperfosforilada, lo que resulta de la pérdida de expresión de p16 y/o sobreexpresión de ciclina D1. Esta hiperfosforilación de Rb esta mediada por ciclina D1/CDK4/6 y ciclina E/CDK2 [60].

La regulación negativa de las CDKs se logra a través de inhibidores de las CDKs como p21, p16 y p27, los cuales actúan como supresores tumorales. Se ha observado que niveles bajos de p27 están asociados con una menor supervivencia sin enfermedad y supervivencia general acortada en UC.

Esto indica que la disminución de los niveles de p21 o también llamada CDKN1A puede tener un impacto negativo en el pronóstico de los pacientes con CU. La pérdida de expresión o la reducción de p21 puede conducir a una mayor actividad de las CDKs y a una regulación inadecuada del ciclo celular, lo que favorece el crecimiento y la proliferación descontrolada de las células cancerosas. Como resultado, se ha observado que los pacientes con niveles bajos de p21 presentan un peor pronóstico en términos de supervivencia sin enfermedad y supervivencia general en el carcinoma urotelial.

Estos hallazgos resaltan la importancia de p21 como un factor pronóstico independiente en el CU y respaldan su papel como supresor tumoral en la regulación del ciclo celular [61].

Estudios tempranos sobre la expresión combinada de Rb y p53 revelaron que la expresión anormal de cualquiera de estas proteínas, o ambas, estaba significativamente asociada con un mayor riesgo de progresión en tumores T1 [62]. Otros estudios que examinaron los efectos combinados de las alteraciones en p53, p21 y Rb han demostrado que un aumento incremental en el número de marcadores alterados se asocia con una menor supervivencia libre de recurrencia y supervivencia global. Mientras que otros, han realizado análisis similares utilizando diversas combinaciones de marcadores como p53, p21, Rb, p16 y MDM2 para generar paneles pronósticos, y han demostrado una sinergia entre estos marcadores en la tumorigénesis, progresión y predicción del resultado en el CV [63].

Estos hallazgos indican que la evaluación conjunta de las alteraciones en las vías p53 y Rb, así como otros marcadores relacionados como p21, p16 y MDM2, puede proporcionar información importante sobre el pronóstico y la progresión del CU. La presencia de alteraciones en múltiples marcadores se ha asociado con un peor pronóstico en términos de supervivencia libre de enfermedad (SSE) y supervivencia

global (SG). Estos resultados respaldan la importancia de considerar la interacción y la sinergia entre los diferentes genes y proteínas implicados en la regulación del ciclo celular y la supresión tumoral en el contexto del CU.

6. Taxonomía molecular del cáncer vesical

6.1. Introducción a la era genómica

En la era genómica, se ha logrado un avance significativo en la comprensión de las alteraciones genéticas y moleculares involucradas en el CV. Se han identificado mutaciones en varios genes, como FGFR3, TP53, RB1, y PIK3CA, etc., que desempeñan un papel crucial en el desarrollo y progresión de esta neoplasia. El concepto simplista de CVNMI con mutación característica de FGFR3, como hemos descrito previamente, o CVMi con mutaciones de p53 y RB, queda obsoleto con la implementación de múltiples estudios genómicos. Múltiples estudios no solo en CVMi sino en CVMNI ponen de manifiesto la gran heterogeneidad y complejidad de alteraciones moleculares que abarca el CV [64].

La comprensión de la genómica del CV ha llevado al desarrollo de terapias más precisas y personalizadas. Se han desarrollado terapias dirigidas y terapias inmunológicas que se basan en las alteraciones genómicas específicas encontradas en cada paciente.

Los estudios sobre la genética del CV se han basado en la investigación exhaustiva de CVMi a través de técnicas de secuenciación masiva (NGS), por diferentes grupos de investigación. Sin embargo, hay pocos estudios de CVNMI que hayan sido examinados con la metodología NGS, que están además limitados por falta de datos clínicos, ausencia de RTU de reestadificación para asegurar una estadificación adecuada o la falta de diferenciación de tumores primarios y recurrentes [65]. No obstante, se ha demostrado que el estudio de la caracterización molecular del CVNMI puede proporcionar una base biológica para predecir la respuesta al tratamiento y estrategias terapéuticas novedosas.

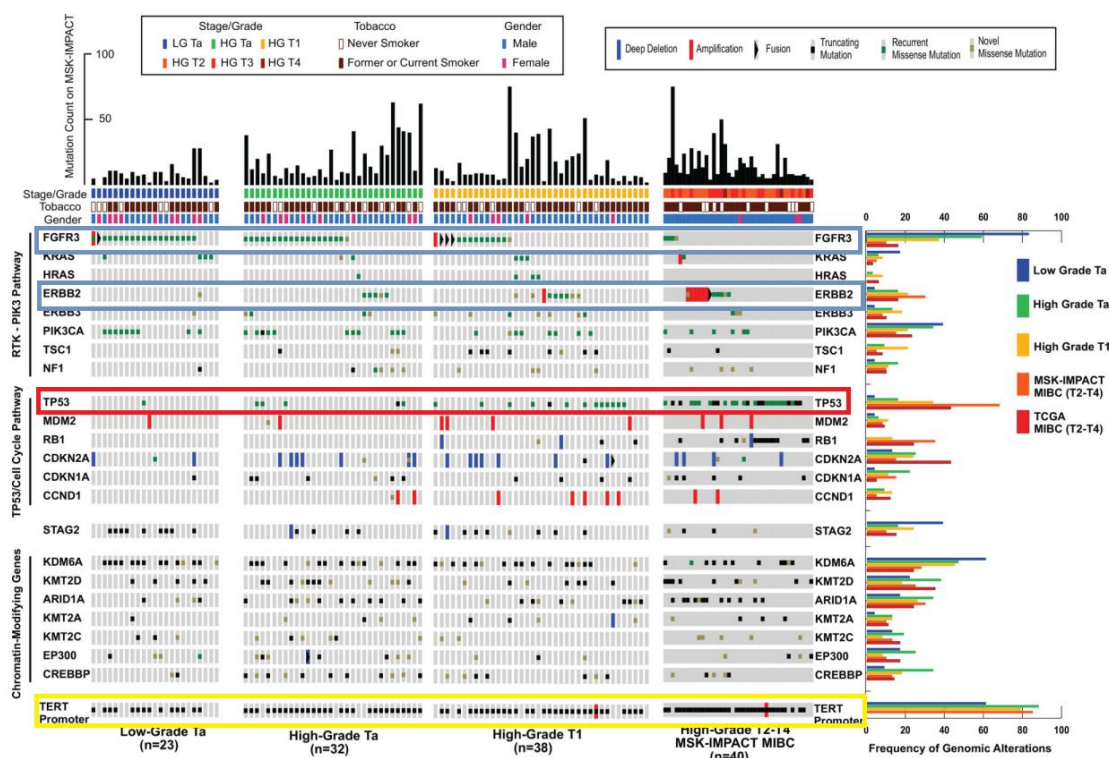


Figura 9. Comparativa alteraciones genómicas en CVNMI (recuadro azul), CVMI (recuadro rojo) en ambos (recuadro amarillo) [65].

El estudio genómico permite clasificar el CV en diferentes subtipos moleculares, proporciona información pronóstica y terapéutica e identifica biomarcadores que pueden ayudar en la detección temprana, estratificación del riesgo y respuesta al tratamiento.

Hasta ahora, los estudios de validación de las clasificaciones moleculares del CV se consideran limitados, pero algunos ensayos en curso incorporan la clasificación molecular del CV y se espera que brinden información sobre su aplicabilidad en la práctica clínica [47].

Dada aún la falta de consenso y de mayores aportaciones para establecer el valor y utilidad real de estas taxonomías que emergen, debemos entender que es crucial continuar esta línea de investigación, puesto que el CV constituye una patología con elevada morbi-mortalidad, en la que "poco" o "nada" se ha avanzado en los últimos 40 años. Además, esta revolución genómica está permitiendo adoptar nuevas direcciones en el tratamiento del CV, con dianas terapéuticas emergentes: HER2, EGFR, FGFR, PDL1, PD1, VEGFR o VEGF entre otros [66].

6.2 Evolución de la taxonomía

Molecular classification: New proposals

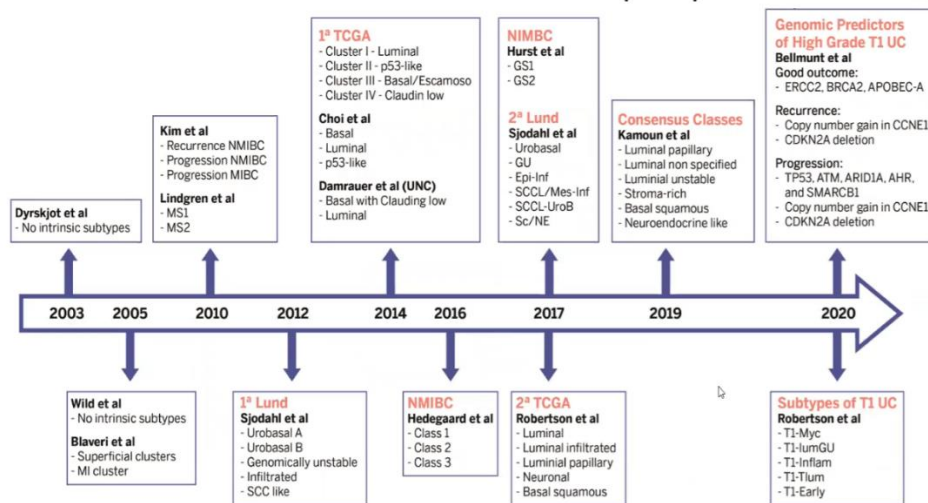


Figura 11. Cronograma evolutivo de las clasificaciones taxonómicas CV [47].

Los primeros estudios de clasificación molecular del CV comenzaron con Dyrskjot et al. en 2003 mediante análisis con microarray. Aún no existían marcadores inmunohistológicos o moleculares aceptados para definir subconjuntos clínicamente relevantes de CV. El objetivo principal del estudio era analizar las características moleculares de los tumores de vejiga y buscar patrones genéticos que pudieran ayudar a clasificar y entender mejor la heterogeneidad de este tipo de tumor. Los investigadores utilizaron microarrays para examinar y analizar la expresión génica de miles de genes simultáneamente. Esto les permitió identificar patrones de expresión génica específicos que estaban asociados con diferentes clases de CV.

Los resultados del estudio revelaron la existencia de distintas clases de carcinoma de vejiga, cada una con perfiles de expresión génica característicos. Estas clases reflejaban diferencias en la biología tumoral y en la progresión de la enfermedad. Además, se encontraron correlaciones entre ciertos perfiles de expresión génica y la supervivencia de los pacientes, lo que sugería que la clasificación molecular podría tener implicaciones pronósticas.

El estudio también identificó genes específicos que estaban sobreexpresados o subexpresados en las diferentes clases de CV, lo que proporcionó información sobre las vías moleculares y los procesos biológicos involucrados en cada tipo de tumor.

En general, este estudio fue pionero en la aplicación de la tecnología de microarrays para la clasificación molecular del CV. Proporcionó una visión más detallada de la heterogeneidad del CV y sentó las bases para futuras investigaciones en el campo de la clasificación molecular y el tratamiento personalizado del CV [67].

En 2005 se publica un estudio de nuevo con análisis de microarrays de expresión génica para investigar la progresión del CV y clasificar los tumores en subgrupos más homogéneos y clínicamente relevantes. Se logró separar con éxito dos subgrupos o clústeres, por un lado, tumores superficiales (Ta, T1) y por otro los músculo-infiltrantes (T2-T4). Estos subtipos se emplearon para clasificar los tumores en transicionales versus escamosos y en subgrupos de buen pronóstico versus mal pronóstico. Estos subtipos se asociaron con diferentes resultados clínicos y tasas de supervivencia [68].

Estos primeros estudios asentaron las bases de la taxonomía del CV, impulsando el estudio por parte de otros grupos de trabajo que establecen potenciales nuevas taxonomías moleculares.

Así, el grupo del Baylor College of Medicine [69], estableció dos grupos pronósticos en función de la diferenciación celular urotelial:

- Peor pronóstico (KRT14/Thy-1/CD44+)
- Mejor pronóstico (KRT5/KRT17/CD44+).

La clasificación de la Universidad de Carolina del Norte [70] establece dos grupos:

- Basal (KRT5/6, CD44+, RB)
- Luminal (PPARG, GATA3, KRT20, FGFR3, TSC1).

El basal, más frecuente en mujeres, reveló similitudes con el cáncer de mama en el análisis realizado mediante la firma de expresión PAM50.

La clasificación del MD Anderson [71] establece tres clústeres:

- Basal-like,
- Luminal
- p53-like.

Su clasificación de basal y luminal fue concordante con la de otros grupos y observaron que el p53-like mostraba mayor resistencia a la QT basada en cisplatino.

La primera clasificación del grupo de la Universidad de Lund, en Suecia, en 2012 describe 5 subgrupos [72]:

- Urobasal A
- Urobasal b
- SCC-like
- Genómicamente inestable
- Infiltrado

Los subtipos muestran resultados clínicos distintos y difieren en cuanto a la expresión de genes del ciclo celular, receptores tirosina quinasa, especialmente FGFR3, ERBB2 y EGFR, citoqueratinas y genes de adhesión celular, así como en la frecuencia de

mutaciones en FGFR3, PIK3CA y TP53. Se observó que los urobasal B y SCC- like presentaban mayor riesgo de recidiva tumoral y los urobasal A solían ser tumores pTa de bajo grado con mejor pronóstico. Estos hallazgos indicaban que la estratificación molecular del CV puede proporcionar información pronóstica y ayudar a establecer una elección terapéutica más adecuada para cada paciente. Este mismo estudio emplea estudio de corroboración de clusterización con marcadores inmunohistoquímicos (IHC).

Cabe destacar, la importancia del proyecto colaborativo del TCGA, que llevó a cabo un amplio estudio del genoma del cáncer en varios tipos de tumores, incluido CV. El TCGA ha generado datos genómicos y moleculares valiosos que han contribuido a la comprensión de la heterogeneidad molecular del CV. Un gran avance supuso la publicación en 2014 de la primera clasificación taxonómica molecular del TCGA que incluía el análisis genómico de 131 pacientes con CVMI proporcionando información valiosa sobre las alteraciones genéticas asociadas con la enfermedad, identificando al CV como uno de los tipos de tumores con un alto nivel de alteraciones genómicas por caso.

Los análisis del CV revelaron un promedio de 302 mutaciones por caso, provocando cambios en la secuencia de ADN de los genes, los cuales pueden interrumpir las funciones celulares normales y contribuir al desarrollo y progresión del cáncer. Identificaron 204 alteraciones en el número de copias de segmentos genéticos. Estas alteraciones en el número de copias implican cambios en la cantidad de copias de segmentos específicos de ADN, lo que puede ocasionar desequilibrios en la dosis génica y afectar la regulación de vías celulares críticas. Además, informaron de una media de 22 reordenamientos, alterándose la disposición de los genes y por tanto ultimando con una función alterada de los mismos [73].

Destacaron la recurrencia de 32 mutaciones basadas en alteraciones del ciclo celular, regulación de la cromatina, alteraciones MAPK y mutaciones en 9 genes no frecuentemente mutados en cáncer (MLL2, ERCC2, ELF3, KLF5, RXRA, CDKN1A, etc.). Una de las repercusiones de este artículo fue que el 69% de los pacientes del estudio presentaron targets o dianas terapéuticas para diversos fármacos, especialmente aquellas que involucran las vías PI3K/AKT/mTOR, CDKN2A/CDK4/CCND1 y RTK/RAS, incluyendo ERBB2 (Her-2), ERBB3 y FGFR3, que son en principio susceptibles de ser tratadas terapéuticamente, proporcionando nuevas oportunidades potenciales sobre la terapéutica del CV, ya que el tratamiento del CVMI se basa en la combinación de quimioterapia (QT) con cisplatino y cistectomía desde hace 30 años con una supervivencia con QT de 14 a 15 meses [74].

Además, en 2014 el TCGA planteo la división de los pacientes con CV según sus alteraciones moleculares, en 4 grupos o también llamados clústeres. Clúster I de características luminal, diferenciado, de histología papilar con mutaciones de FGFR3, y deleciones de CDKN2A. Clúster II, luminal, menos diferenciado con alteraciones de p53,

HER2 elevado. Estos dos clústeres tenían hallazgos similares a los luminal A de mama [75]. Clúster III denominado basal/squamous con una histología preferentemente escamosa que expresan KRT5/KRT14 con un perfil muy similar a los basal-like de mama. Clúster IV que hace referencia los pobremente diferenciados con gran componente de alteraciones moleculares, sobre todo genes del sistema inmunitario y genes relacionados con la transición epitelio-mesénquima.

Los datos mostrados por TCGA sugieren un subconjunto de CUMI que podían ser potencialmente objetivos de FGFR3. De manera similar, la amplificación de ERBB2 (HER2) puede ser susceptible de ser tratada mediante estrategias utilizadas como en el cáncer de mama, brindando nuevos enfoques inmunoterapéuticos novedosos en el CV. Lo mismo ocurría en el clúster III, cuyo análisis de perfil reveló la existencia de un subtipo de carcinoma urotelial con características de expresión de células madre del cáncer (incluyendo KRT14 y KRT5), lo que puede brindar otra vía de objetivo terapéutico [73].

Este análisis realizado por el TCGA refinó la comprensión de la heterogeneidad molecular en el CV, resaltando la alta carga de alteraciones genómicas proporcionando una profundización en la genómica de esta entidad.

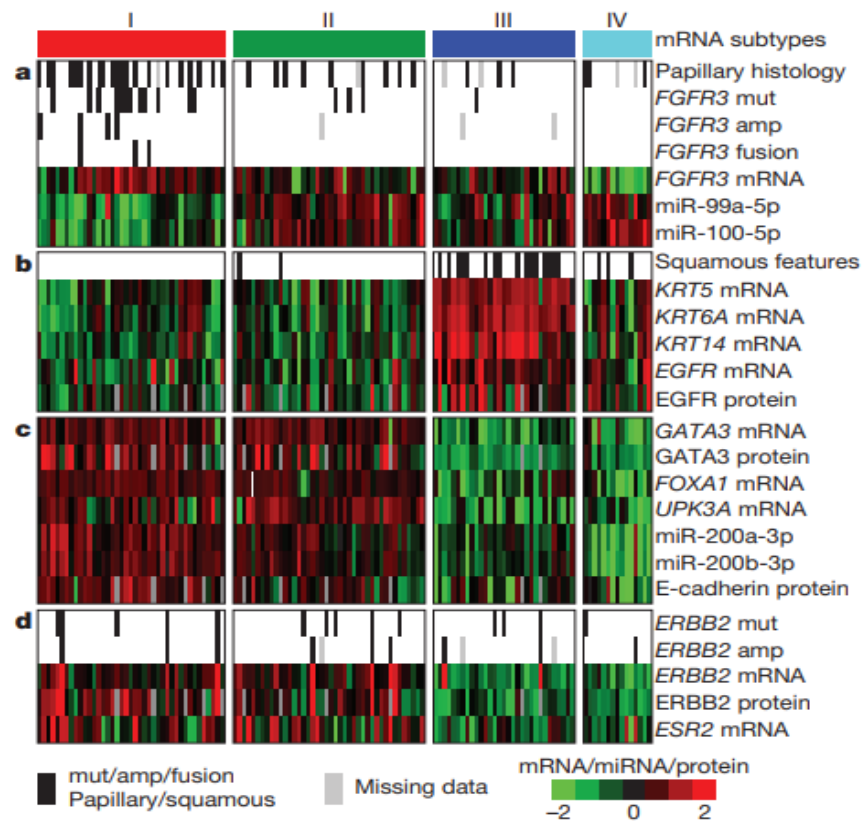


Figura 12. Análisis integrado de mRNA, miRNA y proteínas para cluterización inicial TCGA [73].

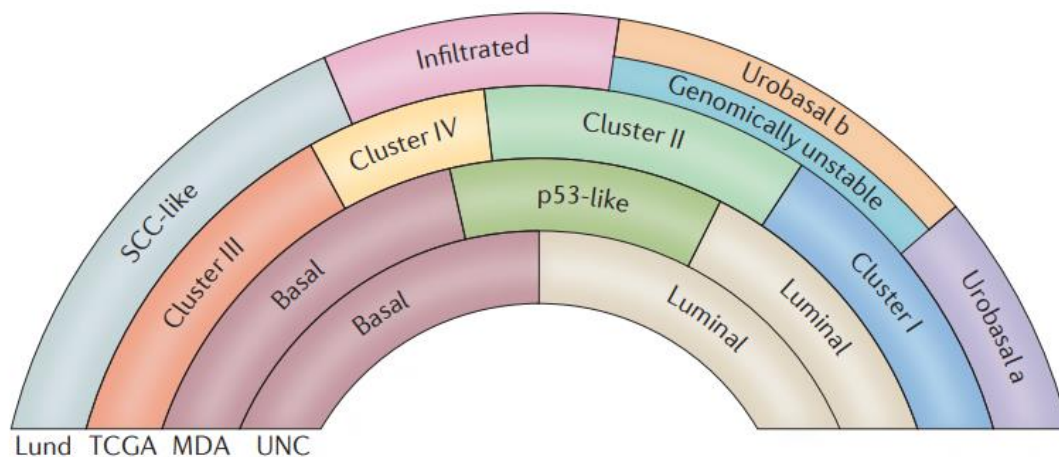


Figura 13. Representación esquemática de las clasificaciones taxonómicas y subtipos de CV [76].

En 2017 se publica la segunda clasificación del TCGA [77] que incluía 412 casos, donde se identificaron 34 genes supresores de tumores adicionales y 158 genes que estaban sujetos a silenciamiento epigenético. Se encontraron eventos de fusión que implican a PPARG como un gen clave en el desarrollo del cáncer de vejiga. Y confirmaron que las altas tasas de mutaciones de CVMI, como ocurre en melanomas o cáncer de pulmón de células no pequeñas, se asocian a mutaciones de una enzima mutagénica endógena, la citidina desaminasa APOBEC; la mutagénesis de este complejo APOBEC I puede influir en la respuesta al tratamiento y el pronóstico del paciente. Redefinieron los subtipos previamente definidos en la primera clasificación de 2014 al considerar tanto el perfil de ARN mensajero como el perfil de ARN largo no codificante. Además de identificar los subtipos CV luminales y basales, estratificaron 5 subtipos distintos entre ellos el subtipo “neuronal” y “luminal” que había sido corroborados por la cohorte independiente de la segunda clasificación de LUND ese mismo año [78].

El grupo de LUND empleó un análisis global de la expresión de ARNm, un método que es eficiente para el perfilado fenotípico de tumores y se ha utilizado para definir subtipos moleculares en casi todos los principales tipos de tumores. Emplearon muestras de 307 pacientes con CV avanzado sometidos a cistectomía para el análisis de expresión génica y utilizaron detección inmunohistoquímica con anticuerpos para 28 proteínas. Describieron cinco fenotipos de células tumorales del carcinoma urotelial avanzado: urotelial, genéticamente inestable, basal/SCC-like, mesenquimal y células pequeñas/neuroendocrinas.

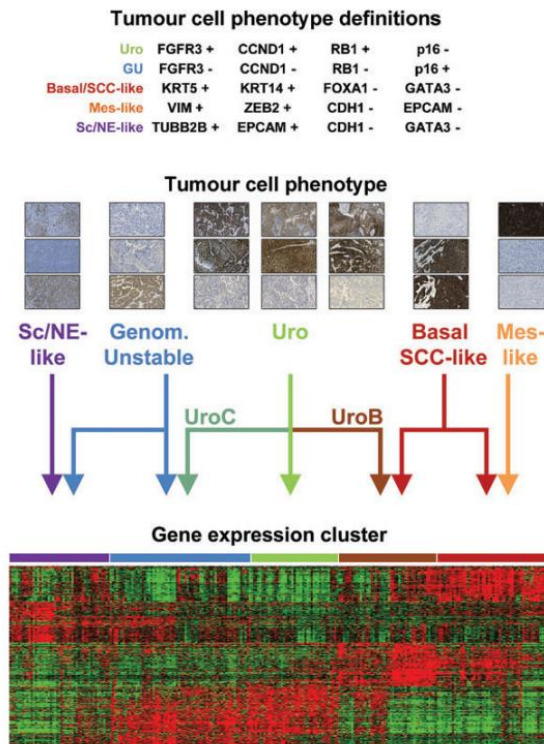


Figura 14. Fenotipos inmunohistoquímicos y expresión de clusterización genómica 2ª clasificación de LUND [78]

La clasificación de TCGA agrupaba a los tumores luminales en luminales-papilares, luminales-infiltrados y luminales y los tumores basales en basal/squamous.

- Luminal-papilar: supusieron el 35% de la cohorte del TCGA. La mayoría presentaron morfología papilar, y bajo grado. Se caracterizaban por mutaciones de FGFR3, fusiones de FGFR3-TACC3 y/o amplificaciones. Activación de la vía Hedgehog. Este tipo de tumores presentaron bajo riesgo de progresión y una baja respuesta a QT basada en cisplatino [79].
- Luminal-infiltrado: correspondieron al 19% de los casos. Se caracterizaban por tener la menor pureza, con alta expresión de marcadores de transición epitelio-mesénquima (EMT) y miofibroblastos, así como de los miR-200s. Muestra una expresión moderada de los marcadores inmunológicos como PD-L1 y CTLA4. Pueden ser resistentes a QT basada en cisplatino.
- Luminal: representado por un 6%. Muestra expresión de UPKs, KRT20 y SNX31. En este subtipo no estaba establecida la eficacia de la neoadyuvancia (NAC), ni potenciales targets mutación-específicos, por tanto, la terapia óptima no estaba definida aún, necesitando más estudios prospectivos.
- Basal/squamous: representando el 35% de la serie. La mayor parte presentaron diferenciación escamosa con mayor prevalencia en mujeres. Se caracterizaron por expresión de queratinas basales, alta expresión de los marcadores inmunológicos como PD-L1 y CTLA4, y otros signos de infiltración inmunológica.

Buena respuesta a NAC basada en cisplatino, así como potenciales targets terapéuticos como antiPD-L1 [79].

- Neuronal: Supuso tan solo el 5% de la cohorte. Característicamente expresaron genes neuroendocrinos y neuronales, no presentan características morfológicas típicas asociadas a tumores neuroendocrinos. Se recomendó la terapia con etopósido-cisplatino en el ámbito neoadyuvante y metastásico.

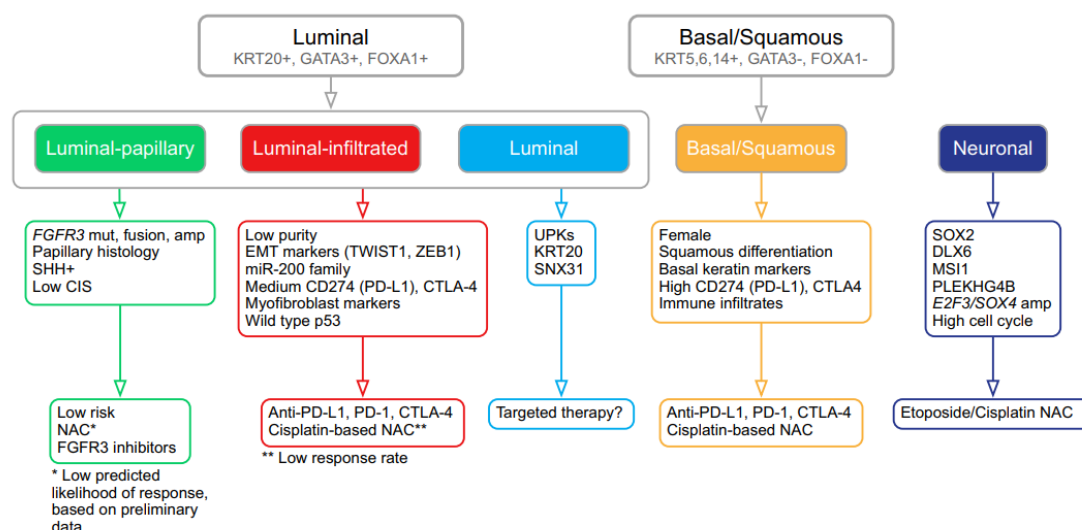


Figura 15. Esquema de subtipos moleculares de la 2ª clasificación del TCGA con características definitorias, Immunocaracterización y aproximación terapéutica [77].

Esta segunda clasificación del TCGA en 2017 por tanto ampliaba el estudio y la comprensión de los diferentes subtipos moleculares aumentando la alta tasa mutacional del CV, mejorando la aproximación terapéutica de cada subtipo. Planteó además una concordancia inmunohistoquímica con diferentes subtipos de la clusterización molecular. Los tumores luminales eran (KRT20+/GATA3+/FOXA1+) y los basales (KRT5/6+/KRT14+/GATA3-/FOXA1-).

6.3 Consenso taxonómico

La clasificación clásica del CV se ha basado principalmente en el estudio histológico, incluyendo tamaño tumoral, afectación ganglionar y presencia o no de metástasis, hallazgos todos ellos recogidos en la clasificación TNM. Dada la heterogeneidad subyacente que presenta el CV, las evaluaciones histológicas que son sustancialmente subjetivas, no son suficientemente firmes a la hora de caracterizar esta heterogeneidad, por lo que se hizo necesario el empleo de estudios genómicos para una mejor caracterización.

Han sido múltiples los equipos de trabajo los que han encaminado las diferentes clasificaciones moleculares, proponiendo varios y diferentes subgrupos, incrementando nuestro conocimiento sobre la biología del CV. Es importante destacar que varios equipos de trabajo destacaron la importancia clínica de estos subgrupos al distinguir diferentes respuestas a quimioterapia e inmunoterapia entre ellos, apoyando así a la necesidad de implementar una clasificación molecular del CV en la práctica clínica de rutina.

La diversidad de clasificaciones publicadas ha dificultado esta implantación. La mayoría de los grupos de trabajo presentaron hallazgos moleculares similares y complementarios y las principales diferencias estaban relacionadas con la representación de tumores CVNMI y CVMI. Estas diferencias se deben sobre todo a problemas de selección de casos, heterogeneidad variable en cuanto a la conservación y calidad del tejido. Otro dato importante con respecto a los subtipos moleculares es que la mayoría de los datos disponibles en los diferentes modelos se generaron a partir de repositorios, coleccionando tumores de vejiga congelados con mínima intervención de patólogos en la selección de muestras adecuadas para el análisis molecular. Esta importante deficiencia podría ser relevante en práctica y debe tenerse en cuenta al explicar los datos contradictorios [80].

Ante este escenario surge la necesidad de un consenso internacional publicado en 2020 para ayudar a esta implementación [81]. Este consenso, amplía la última clasificación del grupo de Robertson [77], nos habla de 5 grupos que ya había descrito este último y añade un sexto grupo más relacionado con alteraciones de genes del sistema inmunitario y enriquecido en fibroblastos. Los grupos del consenso son LumP, LumNS, Lum U, rico en estroma, Ba/Sq y NE-like.

Para la clasificación de consenso se usaron 6 clasificaciones moleculares: la de Baylor [82], la universidad de Carolina del Norte [70], la de MD Anderson [71], la de Robertson del TCGA [77], la de Lund [78], y la CIT-Curie [83]. Estas clasificaciones se basaban en 1750 perfiles transcriptómicos de CVMI. El 24 % de los CVMI se clasificaron de LumP, el 8% de LumNS, el 15% de LumU, el 15% de rico en estroma, el 35% de ba/sq, y el 3% a subgrupo NE-like.

% of MIBC	24%	8%	15%	15%	35%	3%
Class Name	Luminal Papillary (LumP)	Luminal Non-Specified (LumNS)	Luminal Unstable (LumU)	Stroma-rich	Basal/Squamous (Ba/Sq)	Neuroendocrine-like (NE-like)
						
Differentiation	Urothelial / Luminal				Basal	Neuroendocrine
Oncogenic mechanisms	FGFR3 + PPARG + CDKN2A -	PPARG +	PPARG + E2F3 +, ERBB2 + Genomic instability Cell cycle +		EGFR +	TP53 -, RB1 -, Cell cycle +
Mutations	FGFR3 (40%), KDM6A (38%)	ELF3 (35%)	TP53 (76%), ERCC2 (22%) TMB +, APOBEC +		TP53 (61%), RB1 (25%)	TP53 (94%) RB1 (39%)*
Stromal infiltrate		Fibroblasts		Smooth muscle Fibroblasts Myofibroblasts	Fibroblasts Myofibroblasts	
Immune infiltrate				B cells	CD8 T cells NK cells	
Histology	Papillary morphology (59%)	Micropapillary variant (36%)			Squamous differentiation (42%)	Neuroendocrine differentiation (72%)
Clinical	T2 stage +	Older patients + (80+)			Women + T3/T4 stage +	
Median overall survival (years)	4	1.8	2.9	3.8	1.2	1

* 94% of these tumors present either RB1 mutation or deletion

Figura 16. Resumen de los subtipos de la clasificación molecular de consenso [81]

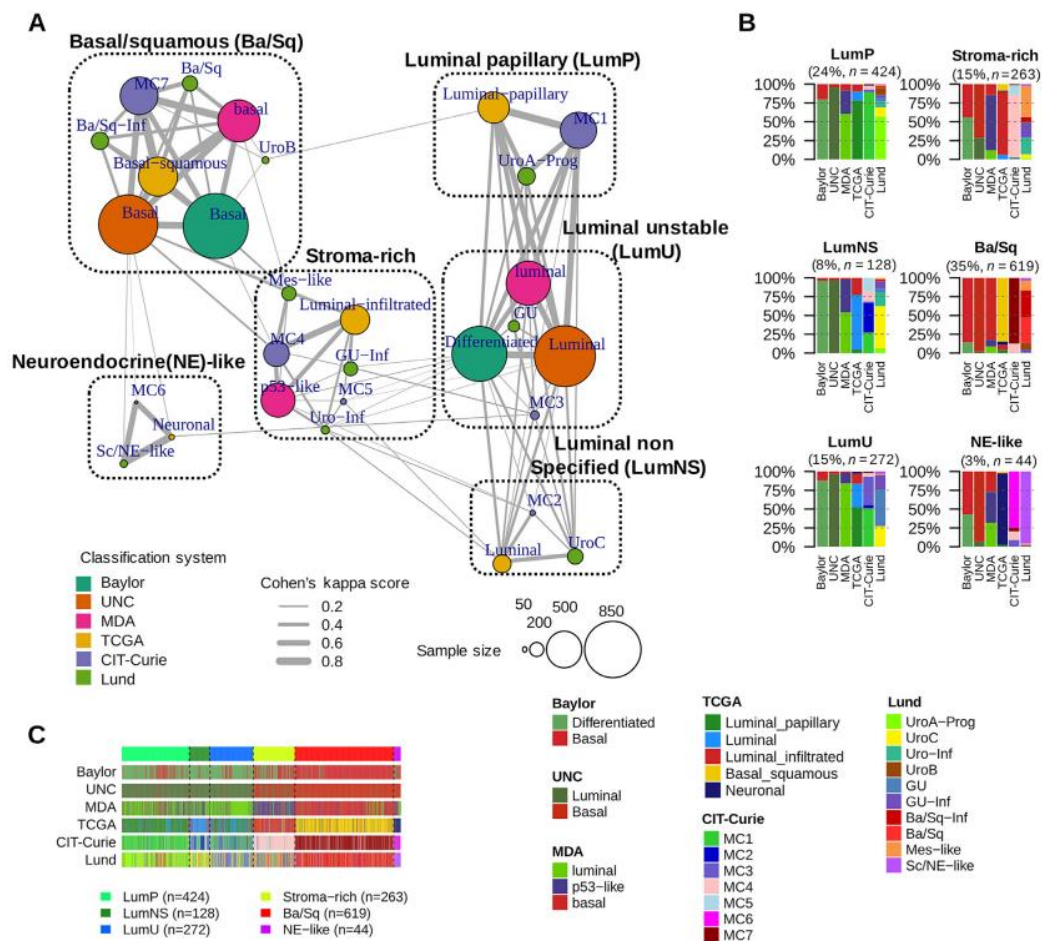


Figura 17. Las seis subtipos de consenso y sus relaciones con los subtipos moleculares [81].

Como características generales de esta clasificación de consenso, todos los subtipos luminales sobreexpresaron FOXA1, GATA3 y marcadores PPARG relacionados con la diferenciación urotelial. Además, los lumP tenían una serie de alteraciones que indicaban FGFR3 enriquecido, los lumNS tenían una firma estromal, los lumU presentaron mayor actividad del ciclo celular. Los ricos en estroma sobreexpresaban firmas de genes de músculo liso, endotelial, fibroblastos y miofibroblastos, mientras que la sobreexpresión de diferenciación basal y neuroendocrina se vio en los subtipos ba/sq y NE-like respectivamente.

Las características de cada subtipo de la clasificación molecular de consenso (CMC) presentaron asociaciones significativas con los subtipos de cada uno de los sistemas de clasificación originales. El subtipo basal/escamoso es el que tuvo mayor representación muestral, en torno a un 35% como hemos descrito, asociándose con diferenciación escamosa y peores resultados de supervivencia. Además, presentó una alta asociación a STAT3 e HIF1A y mutaciones frecuentes de TP53 (61%) y RB1 (25%) [84].

Los tumores tipo NE-Like estaban altamente relacionados con células pequeñas e histología neuroendocrina. Presentaron mutación o delección de TP53 (94%) y RB1 (94%) se asociaron con los peores resultados de supervivencia en general.

Diferencias en el microambiente tumoral se han descrito en los distintos subtipos. Mayor infiltrado inmune se ha observado en Ba/Sq y tumores ricos en estroma, sobre todo. Los Ba/Sq se han relacionado con firma de genes asociados con linfocitos citotóxicos y natural killers, mientras que los ricos en estroma se asocian a sobreexpresión de linfocitos B.

UNC	Basal		Luminal Basal		
MDA	Basal		p53-like	Luminal	
Lund	Basal	UroB	Infiltrated	GU	UroA
TCGA	Neuronal	Squamous	Luminal infiltrated	Luminal	Luminal-papillary
Consensus classification	NE	Ba/Sq	Stroma-Rich	LumNS	Luminal Unstable LumP
Features	NE differentiation	Squamous differentiation	CIS		Papillary histology
	Mutations in TP53,RB1	Immune infiltrations: Cytotoxic lymphocytes and natural killer cells	Immune infiltrations: B cells Fibroblast	Fibroblast PPAR γ signature PPAR γ signature	Mutations in FGFR3 and KDM6A PPAR γ signature
Therapeutic options	Chemotherapy, Immunotherapy	Chemotherapy	Immunotherapy	Radiotherapy	FGFR3 targeted therapy

Figura 18. Asociaciones de las diferentes clasificaciones moleculares junto a hallazgos claves y opciones terapéuticas [85].

En cuanto a las potenciales dianas terapéuticas de la CMC los LumP presentan una menor sensibilidad a la NAC y como alternativa tratamiento de inhibidores de FGFR3. Los LumNS y los LumU responderían a ICI, presentando baja sensibilidad a NAC y sensibilidad a NAC respectivamente. Ambos Ba/Sq y NE-like presentan sensibilidad a NAC y buena respuesta a ICI [47]. La respuesta a inhibidores de EGFR es, además, una característica del subtipo Ba/Sq [86].

Tabla 5. Características moleculares de los subtipos moleculares de CVMI y su implicación terapéutica (47)

	Luminal-papillary (24%)	Luminal nonspecified (8%)	Luminal unstable (15%)	Stroma rich (15%)	Basal-squamous (35%)	Neuroendocrine-like (3%)
Immunohistochemistry	GATA3, FOXA1 FGFR3, CK20, Uroplakin 2	GATA3, FOXA1 FGFR3, CK20, Uroplakin 2	GATA3, FOXA1 FGFR3, CK20, Uroplakin 2	Vimentin, desmin, SMA	CK5/6, CK14, Desmoglein 3, STAT3	INSM1, Synaptophysin, Chromogranin, CD56
Potential targeting therapy	Low risk, FGFR3 inhibitors, low sensitivity to NAC	Response to ICI, low sensitivity to NAC	Response to ICI Sensitivity to NAC	Not specified	Response to ICI EGFR inhibitors, Cisplatin NAC	Response to ICI, Combined chemotherapy
*Additional terminology	Lund Uro A MDA luminal TCGA luminal-papillary UNC luminal	Lund Uro C MDA p53-like and luminal TCGA luminal UNC luminal	Lund genomically unstable MDA luminal TCGA luminal UNC luminal	Lund mesenchymal- like MDA p53-like TCGA basal- squamous UNC basal	Lund basal- squamous and basal-squamous infiltrated/Uro B MDA basal TCGA basal- squamous UNC basal	Lund small cell/ NE- like TCGA neuronal, UNC basal

6.4 Subtipos moleculares en CVNMI

EL CV se ha clasificado clásicamente en CVMI que incluía estadios de enfermedad de T2 a T4 y CVNMI que incluía Ta, T1, y los Cis. Aproximadamente un 70% de los CV corresponden a CVNMI, caracterizados por recurrencia tumoral frecuente, tendencia limitada a progresar, y una alta tasa de supervivencia. Es importante destacar que los últimos artículos sobre estadificación de riesgo en CVNMI mencionan una mayor variabilidad en progresión tumoral, planteando una estadificación en 3 categorías de riesgo (bajo, medio y alto riesgo) [87,88].

Los T1 dentro de los CVNMI son el subtipo más agresivo con un 40% de recurrencia y un 15% de progresión a los 5 años [89]. Aunque la mayoría se trata con BCG, aquellos que sufren recurrencia o progresión requieren una cistectomía radical. Se buscó identificar una clasificación molecular de este tipo de tumores para identificar biomarcadores que predigan la respuesta al BCG. Ya se habían descrito mutaciones compartidas o similares en los T1 y CVMI, pero estas mutaciones no servían para predecir la respuesta a BCG [90]. El empleo de las clasificaciones moleculares mostró la existencia de subtipos moleculares biológicamente relevantes, la mayoría de estas clasificaciones se basaron en análisis transcriptómicos de cohortes con CVMI, mientras que otros grupos analizaron muestras de CVNMI o cohortes mixtas, creándose finalmente en 2020 una clasificación consenso como hemos visto para CVMI [81].

Una de las primeras clasificaciones de los CVNMI fue la de Hedegaard et al., que estableció 3 clases (I, II, III). Se analizaron los perfiles transcriptómicos de 460 CVNMI, de los cuales 345 eran Ta, 112 de T1 y 3 de CIS, junto con 16 CVMI. Concluyeron que los tumores de alto grado y estadio, así como aquellos con signos de progresión a CVMI, predominaban en las clases II y III, mientras que la clase I tenía menos casos de este tipo. También encontraron similitudes entre los tumores CVMI y CVNMI clasificados en clase II.

La clase I mostraba alta expresión de uroplaquinas (UPK1A, UPK2) y de genes tempranos del ciclo celular y un curso menos agresivo; la clase II incluía alta expresión de uroplaquinas, alteraciones de APOBEC y expresión de genes tardíos del ciclo celular, factores de activación de EMT, KRT14 y KRT20 y peor pronóstico; y la clase III expresión de células basales, CD44, KRT14, KRT15 [91].

Cuando se compararon las 3 clases de esta clasificación con la primera clasificación de 2014 del TCGA [75] se observó como la clase I y la II eran similares y por tanto superponibles a los clústeres I y II, pero la clase III no estaba recogida por ninguno de los clústeres representados por el TCGA [47].

Esta clasificación fue apoyada y ampliada por el mismo grupo de investigación, subdividiendo la clase II en dos subgrupos: clase IIa y clase IIb, lo que resultó en un total de cuatro clases de CVNMI. En esta clasificación, los pacientes se agruparon según su probabilidad de tener una supervivencia libre de recurrencia y una supervivencia libre de progresión. Aquellos con la mayor supervivencia libre de recurrencia se asignan a la clase I, mientras que aquellos con la menor supervivencia libre de progresión se clasifican como clase IIa, seguidos por la clase IIb. Las características moleculares de los tumores de clase IIa están vinculadas a la expresión de genes relacionados con el ciclo celular tardío, genes relacionados con la diferenciación celular y la replicación del ADN, así como la expresión de uroplaquinas. En contraste, los tumores de clase IIb están asociados con la expresión de genes relacionados con EMT y marcadores de células madre tumorales, pero no están fuertemente vinculados con la expresión de genes de proliferación celular. Los tumores de clase IIb muestran las tasas más altas de infiltración por células inmunitarias en comparación con las otras clases de CVNMI. Además, se sugiere que los tumores de clase IIb podrían ser sensibles a la inmunoterapia [92].

Tabla 6. Subtipos y hallazgos moleculares de CVNMI según la clasificación de Hedegaard et al. [92].

The Aarhus group classification	Class I	Class IIa	Class IIb	Class III
Gene expression	Uroplakins	Uroplakins <i>KRT20</i> <i>KRT14</i>	Uroplakins <i>KRT20</i> <i>KRT14</i>	<i>KRT5</i> <i>KRT15</i> <i>KRT14</i> <i>CD44</i> <i>GATA3</i>
Regulon activity		<i>FOXM1</i> <i>ESR2</i> <i>ERBB2</i> <i>ERBB3</i>	<i>ESR1</i> <i>FGFR1</i> <i>RARB</i> <i>STAT3</i> <i>PGR</i>	<i>AR</i> <i>GATA3</i>
Molecular feature	Early stage, high expression of early cell cycle genes	High expression of late cell cycle genes	The highest immune infiltration of NMIBC	Dormant state of disease
Prognosis	Good	The poorest	Poor	

En base a que dentro de los CVNMI los tumores T1 son potencialmente el subtipo más agresivo, hay un estudio reciente en la clasificación de los CVNMI que se centra como objetivo principal en investigar la heterogeneidad tumoral en T1 tratados con BCG por secuenciación de 73 casos, identificándose cinco subtipos tumorales T1 con resultados clínicos y características biológicas distintas [93].

El subtipo T1-LumGU (T1 luminal genómicamente inestable) estuvo frecuentemente asociado con el carcinoma in situ, mostró una alta expresión de E2F1 y EZH2, y también se enriqueció en genes diana de E2F y alteraciones en el punto de control del ciclo celular G2M; el subtipo T1-Inflam (T1 inflamado) estuvo altamente infiltrado por células inmunitarias, el subtipo T1-TLum (T1 luminal) presentó diferenciación luminal y urotelial una alta expresión de FGFR3, sin eventos de recurrencia y con el menor número de ganancias de número de copias; el subtipo T1-Myc tuvo la mayor cantidad de recurrencias y una supervivencia libre de recurrencia significativamente peor que los otros subtipos, además mostró la expresión mediana más alta de MYC; el subtipo T1-Early fue un tumor altamente recurrente después del tratamiento con BCG que expresó IFN- α e IFN- γ y mostró otras características de inflamación.

Este estudio proporciona información valiosa para entender mejor la heterogeneidad molecular de las neoplasias T1 y puede ayudar a mejorar las decisiones de tratamiento, aunque aún está pendiente de validación clínica. En un futuro la evaluación de estos subtipos podría ayudar a estratificar el riesgo de los tumores T1 y obtener un tratamiento de precisión.

Un estudio reciente examinó la asociación de perfiles de mutaciones somáticas con la recurrencia del tumor, la progresión y buen pronóstico [94]. Los autores realizaron secuenciación del exoma en 62 tumores de alto grado en estadio T1, junto con 15 muestras de tejido normal emparejado. En este estudio, la CMT fue similar a la del CVMI;

fue más alta en casos cuyos pacientes presentaron un buen pronóstico, intermedia en aquellos cuyos tumores progresaron y más baja en pacientes con recurrencia del tumor. La CMT alta se asoció con mutaciones en genes relacionados con la respuesta al daño del ADN y un buen pronóstico, como fue el caso de la mutación en ERCC2 y BRCA2; las mutaciones en TP53, ATM, ARID1A, AHR y SMARCB1 caracterizaron los tumores con progresión, mientras que los tumores que recidivaron o progresaron presentaron un enriquecimiento en ganancia del número de copias en CCNE1 y deleciones de CDKN2A. Estos hallazgos indicaban que la caracterización molecular de los tumores podría mejorar el manejo y el pronóstico del cáncer de vejiga de alto grado en estadio T1.

6.5. Nuevas clasificaciones moleculares. ¿Hacia dónde vamos?

La clasificación molecular del carcinoma de vejiga es un tema importante sobre todo por sus implicaciones terapéuticas y pronósticas en el CV actual, ayudando a determinar el tratamiento adecuado de cada paciente.

Hasta ahora las clasificaciones moleculares se basan generalmente en perfiles transcriptómicos, generando categorías muy diversas con una correlación limitada.

A pesar de la publicación de la CMC, la aplicación de la clasificación molecular aún requiere una tecnología costosa, muy compleja y que frecuentemente no se encuentra disponibles en la práctica clínica habitual [47,95].

Como parte de la Conferencia sobre el CV de la Sociedad Internacional de Patología Urológica en 2022, se revisó el estado de la subtipificación molecular del cáncer de vejiga, incluyendo varios sistemas de subtipificación diferentes. Identificaron 7 principios claves: 1) existen 3 subtipos moleculares principales: luminal, basal-escamoso y neuroendocrino; 2) las firmas del microambiente tumoral difieren ampliamente entre los CV, especialmente entre los tumores luminales; 3) los luminales son biológicamente diversos, y gran parte de esta diversidad se debe a diferencias en características no relacionadas con el microambiente tumoral, como la señalización de FGFR3 y la inactivación de RB1; 4) el subtipo molecular se asocia con el estadio tumoral y la histomorfología; 5) muchos sistemas de subtipificación incluyen peculiaridades, como subtipos no reconocidos por ningún otro sistema; (6) existen límites borrosos y amplios entre los subtipos moleculares, y los casos que caen en estos límites a menudo son clasificados de manera diferente por diferentes sistemas de subtipificación; y (7) cuando hay regiones histomorfológicamente distintas dentro de un solo tumor, los subtipos moleculares de estas regiones a menudo son discordantes [96].

Estos principios destacan la diversidad biológica de los CV, la asociación del subtipo molecular con el estadio del tumor y la histomorfología, y la falta de consenso en algunos aspectos entre los sistemas de subtipificación. Aunque la subtipificación molecular muestra promesa como biomarcador clínico, actualmente no hay suficiente evidencia

para su uso generalizado en el manejo del CV, y se enfatiza que debe ser considerado como resultado de pruebas de laboratorio específicas y no como una propiedad inherente del tumor.

La introducción de la tecnología NanoString, establecida ya hace más de dos décadas, ofrece una alternativa para la subtipificación molecular. Proporciona un tiempo de respuesta más rápido, siendo un método robusto para procesar y clasificar subtipos moleculares para una mejor implementación clínica [97].

Nuevas clasificaciones moleculares del CV emergen del empleo de análisis de expresión génica basado en tecnología NanoString. Se trata de un método cuantitativo basado en el conteo de ARNm como nContador (NanoString Technologies, Inc). Este método puede obtener medidas precisas de la expresión de ARN en comparación con RT-PCR, y que podría representar una alternativa al perfil genómico/transcriptómico de NGS empleado en la clasificación molecular del CV.

Múltiples trabajos, entre ellos el de López Beltrán et al. [98], han empleado la nueva tecnología de NanoString para realizar un estudio con una cohorte retrospectiva de 91 pacientes con CVMI (T2-T3) y CVNMI (Ta-T1) empleando la detección de ARNm de 4 marcadores incorporando GATA3 y KRT20 (típicamente relacionado con subtipo molecular luminal) y KRT5 y KRT14 (típicamente relacionados con el subtipo molecular basal) [98].

Esta metodología les permitió explorar las diferencias en los parámetros clinicopatológicos y las posibles sensibilidades a ICI.

La tecnología NanoString determinó los subtipos moleculares según la expresión de ARNm de GATA3 o KRT20 para los subtipos luminales (71%) y KRT5 o KRT14 para los subtipos basales (21%). Al igual que lo reportado en otras clasificaciones moleculares, los datos proporcionaron diferentes pronósticos y sensibilidades terapéuticas asociadas con ambos subtipos principales.

El luminal, que mostró una baja agresividad y se asoció con CVNMI de morfología convencional, baja expresión de PD-L1 y baja mortalidad; y el basal, que mostró una alta agresividad y se encontró en tumores pT2-4 con histología variable. Aunque el subtipo basal es agresivo, mostró una mejor supervivencia específica para cáncer en comparación con el subtipo luminal debido a una buena respuesta a las terapias actuales. Además, se identificó un tercer subtipo llamado null/DN en un pequeño porcentaje de casos que carecían de expresión de los marcadores utilizados. La tecnología NanoString se mostró prometedora para clasificar con precisión los subtipos moleculares de carcinoma urotelial de vejiga de forma rápida y costos relativamente bajos, presentando además una adecuada correlación con los marcadores inmunohistoquímicos siendo los luminales (GATA3+, KRT20+), los basales (KRT14+, KRT5+, GATA3 low /-, KRT20 low/-) y null/DN (GATA3-, KRT20-, KRT14-, KRT5-).

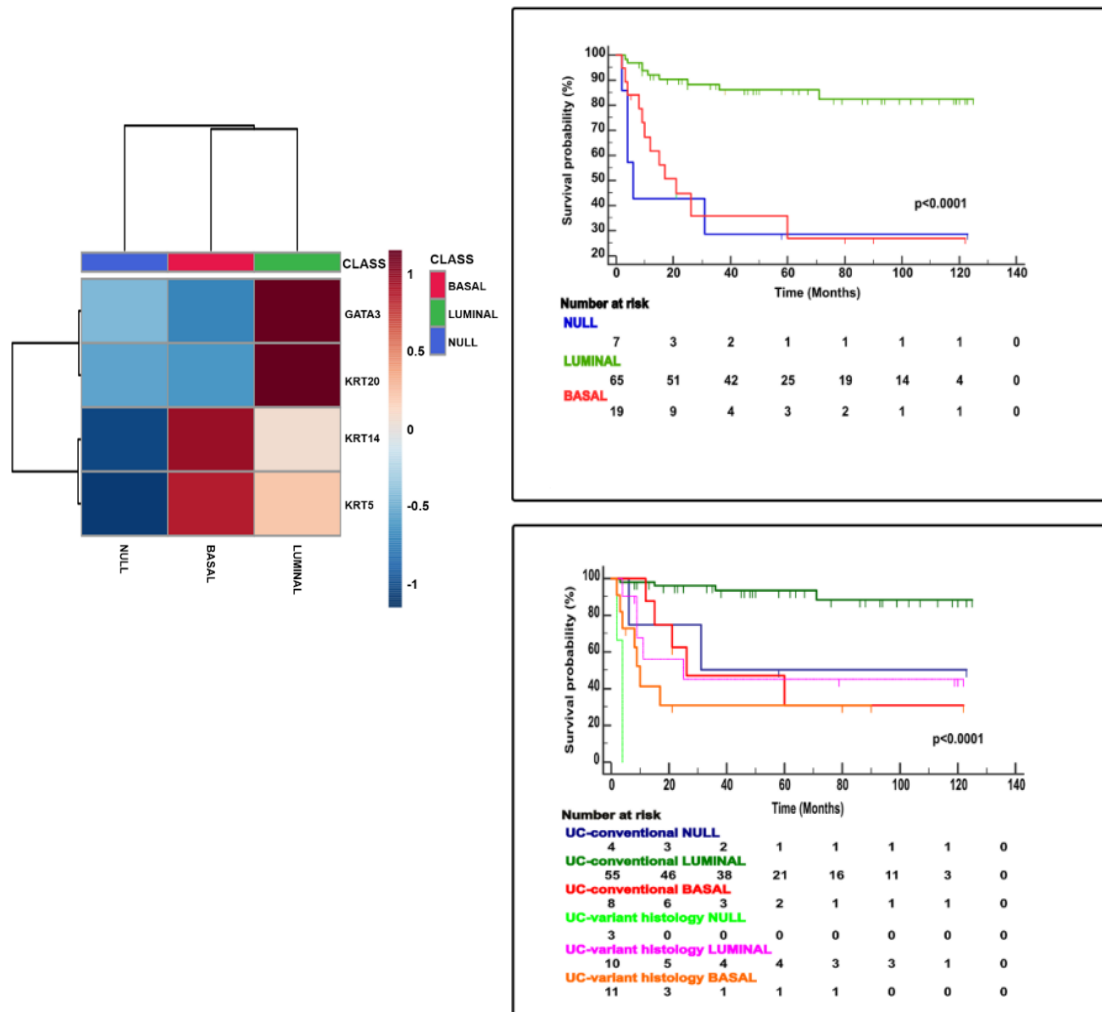


Figura 19. (Izq) Expresión génica con NanoString. (Derch) Curvas de supervivencia Kaplan Meyer en función de clasificación patológica tumoral y molecular [98].

En otro estudio, Olkhov-Mistel et al. evaluaron de nuevo el uso de la plataforma NanoString nCounter y la IHC convencional GATA3-CK5/6 para la clasificación molecular de CVMI en entornos de práctica clínica. Se desarrollo un clasificador molecular basado en la tecnología NanoString, siete genes (KRT5, KRT6, SERPINB13, UPK1A, UPK2, UPK3A y KRT20) y una cohorte de 138 casos de CVMI que permitió la asignación de dos subtipos moleculares, luminal o basal, con diferentes pronósticos y respuestas terapéuticas [99].

Además, se validó el empleo de estudio inmunohistoquímico de KRT5/6 y GATA3 previamente publicado [100,101], que mostró una alta concordancia del 96.9% con la clasificación molecular por expresión génica basado en NanoString.

A pesar de las limitaciones de estudios que emplean análisis de expresión génica basado en NanoString, como su naturaleza retrospectiva y el tamaño muestral relativamente

pequeño, los resultados respaldan la aplicabilidad clínica de la tecnología NanoString en la clasificación de subtipos moleculares en CV, proporcionando una alta correlación con el estudio inmunohistoquímico asentando las bases para futuras aplicaciones clínicas de la clasificación molecular del CV [102].

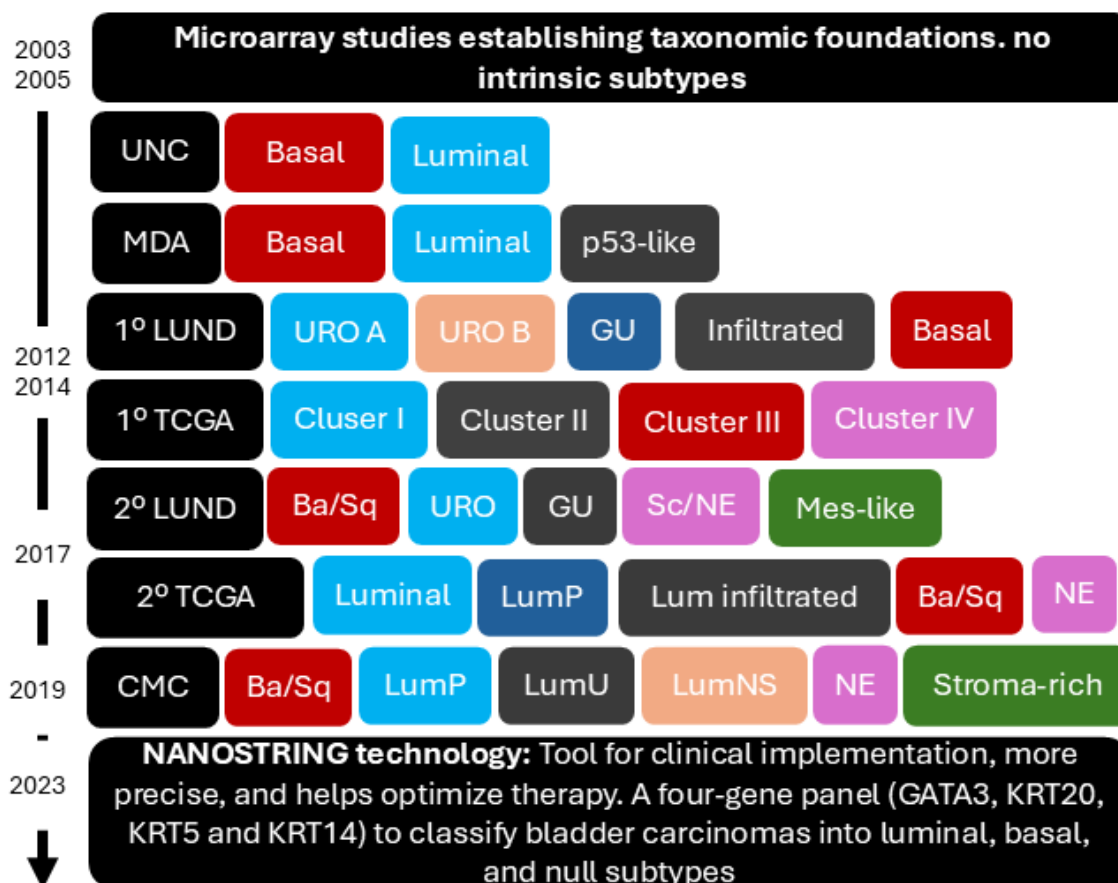


Figura 20. Evolución de la taxonomía molecular en el cáncer de vejiga. Esta figura muestra la progresión desde los primeros estudios con microarrays, que no identificaron subtipos intrínsecos, hasta las clasificaciones moleculares más sofisticadas desarrolladas a lo largo del tiempo por instituciones como la Universidad de Carolina del Norte (UNC), el Centro de Cáncer MD Anderson (MDA), The Cancer Genome Atlas (TCGA) y la Universidad de Lund, culminando en la clasificación por consenso (CMC). La línea de tiempo resalta la expansión desde los subtipos basales y luminales hacia categorías más refinadas. La adopción de la tecnología NanoString en 2023 marca un avance clave para la implementación clínica, proporcionando un enfoque más preciso y eficiente para la subtipificación molecular y la optimización de terapias. El código de colores dentro de la figura refleja la categorización de los subtipos moleculares a través de los estudios: los tonos rojos representan subtipos similares a basal, que muestran características basales en diferentes sistemas de clasificación; los tonos azules corresponden a subtipos luminales, asociados con la diferenciación urotelial; el gris indica subtipos similares a urotelial o p53, dependiendo de la clasificación; el verde representa subtipos ricos en estroma o infiltrados, que se distinguen por firmas inmunes o estromales; y el naranja y el rosa denotan categorías neuroendocrinas y similares a mesenquimales, introducidas en clasificaciones más recientes [43].

7. Histología del cáncer vesical

7.1. Actualizaciones de la OMS

En la quinta edición, y última publicada, de la clasificación de la OMS de tumores del tracto urinario y genital masculino, se recogen todas las características histológicas que siguen siendo el “gold” estándar para clasificar y diagnosticar el CV. Como hemos visto, la era genómica con las crecientes y consecuentes clasificaciones tanto en CVMI como en CVNMI han permitido un conocimiento más amplio y divergente de la heterogeneidad tumoral en términos de panorama mutacional, ayudando a una mejor clasificación pronóstica y terapéutica de los pacientes, no obstante, siguen sin tener una implementación en la práctica clínica [17].

En esta edición de la OMS se proporciona la nomenclatura actualizada de la histología, pasando a emplear el término “subtipos” en lugar de “variante”, y el término “variante” para denotar alteraciones genómicas.

Han intentado abordar el problema de la heterogeneidad intratumoral que ocurre sobre todo a la hora de gradación tumoral creando problemas diagnósticos al notificarse más tumores de AG. Estos problemas no solo se deben a esta heterogeneidad del grado, sino a la falta de criterio consenso y una escasa reproductibilidad interobservador. Esta heterogeneidad de grado ocurre en hasta un tercio de los CU papilares no invasivos y tiene influencia en el resultado.

Han propuesto criterios sobre el grado en tumores papilares, dándose de AG, siempre y cuando el componente de AG represente $\geq 5\%$ del tumor. Además, los tumores con $< 5\%$ de componente de AG deben ser informados como BG con $< 5\%$ de componente de AG [103].

En esta última actualización, han unificado los tumores ureterales, vejiga y uretra en la categoría de tumores uroteliales dada la histogénesis de estos. Los tumores neuroendocrinos lo clasifican como entidad aparte.

Es importante hacer referencia al porcentaje de subtipos tumorales dada la heterogeneidad del CV, ya que pueden tener implicación terapéutica y pronóstica.

7.2 Subtipos histológicos

Aproximadamente el 85% de los CV se clasifican como CU puro, mientras que los subtipos histológicos representan el restante 15% [17].

Microscópicamente, los CU convencionales muestran agrupaciones de células de diferentes tamaños, formando nidos, láminas, estructuras trabeculares, cordones y a veces células individuales. Algunos de estos tumores intentan parecerse al revestimiento normal del urotelio al mostrar una organización en capas, ayudándonos

al diagnóstico la presencia de papilas en superficie o la presencia de CIS. Para confirmar que estas células realmente provienen del revestimiento urotelial, se pueden usar marcadores IHC como p63, GATA3, KRT7, KRT20 [104].

El CU se caracteriza por su variabilidad en cuanto a apariencia morfológica. En una sola lesión, es posible observar una combinación de características del urotelio convencional y diversos subtipos histológicos claramente definidos, además de áreas donde se observa una diferenciación divergente hacia otras líneas celulares epiteliales como células escamosas, glandulares y neuroendocrinas de células pequeñas, especialmente en casos avanzados [105]. Es importante saber reconocer los subtipos histológicos ya no solo porque puedan parecerse a otro tipo de tumores no uroteliales o tener incluso una apariencia benigna, sino por tener su propia implicación pronóstica y terapéutica [106].

El carcinoma urotelial con diferenciación divergente es la variante histológica más común, suponiendo aproximadamente un 30%. Este término se refiere a tumores en los cuales se presenta algún grado de carcinoma urotelial típico junto con otras morfologías, incluyendo la diferenciación escamosa, la glandular y la trofoblástica.

- La diferenciación escamosa es la más común de las diferenciaciones, ocurriendo en un 40% de los CU convencionales. Se produce por una transición del epitelio urotelial al escamoso; histológicamente se caracteriza por una queratinización y/o formación de puentes intercelulares en un CU invasivo. Cuando todo el tumor presenta diferenciación escamosa es cuando hablamos de carcinoma escamoso vesical, un carcinoma no urotelial. El diagnóstico en RTU de esta entidad puede llevar a confusiones ya que podemos sobrediagnosticar carcinomas escamosos vesicales puros por la representación parcial del tumor en la RTU, siendo necesario el informe de CIS o CU convencional en la biopsia para distinguirlo de esta entidad, así como el porcentaje de diferenciación escamosa. Tanto CU con diferenciación escamosa como el carcinoma escamoso puro, son positivos para p63, KRT5/6, KRT7, son usualmente positivos para citoqueratinas de alto peso molecular y parcialmente positivos para marcadores uroteliales como S100P, GATA3 y uroplaquina II. Además, pueden ser positivos para células escamosas con marcadores como CK14, desmogleína-3, pero negativos para KRT20 y uroplaquina III [107]. No son tumores asociados a HPV, entidades como esquistosomiasis, litiasis o la vejiga neurógena son factores de riesgo tanto de carcinoma escamoso como de diferenciación escamosa. Suele darse en estadios avanzados, con poca respuesta a tratamiento y alta tasa de recidiva [108].
- La diferenciación glandular se define morfológicamente por áreas de carcinoma que tienen la apariencia de un adenocarcinoma que forma glándulas. Se diagnostica cuando existe una mezcla de CU y formación glandular; si todo el tumor muestra diferenciación glandular pasaríamos a llamarlo adenocarcinoma.

Entidad rara donde se observan glándulas de tipo intestinal mucoproducidas y entéricas. Presenta una frecuencia de un 18% y pueden presentar diferentes patrones como el mucinoso, coloide con mucina extracelular, anillo de sello y menos frecuentemente villoglandular y hepatoide. Inmunohistoquímicamente se caracteriza por células tumorales positivas para KRT7, KRT20, p63 y GATA3 en diferentes grados. En particular, aquellos con diferenciación entérica son positivos para CDX-2. Al igual que en la diferenciación escamosa, en algunos casos puede ser difícil distinguir el adenocarcinoma del CU con una diferenciación glandular extensa debido a problemas de muestreo. La detección de mutaciones en TERT puede ser útil para diferenciar lesiones glandulares en la vejiga ya que se detectan en un 70% de las diferenciaciones glandulares mientras que en el adenocarcinoma primario vesical son negativas o se expresan en menor frecuencia [109].

- La diferenciación trofoblástica es la menos frecuente de las diferenciaciones, en torno a un 5,5%. Se caracteriza por la presencia de células gigantes sincitiotrofoblásticas, que producen β HCG. Niveles elevados de β HCG en suero se asocian con una baja respuesta a la QT. Inmunohistoquímicamente se caracterizan por positividad de β HCG en células tumorales. El principal diagnóstico diferencial es con el coriocarcinoma primario de vejiga con el cual es indistinguible inmunohistoquímicamente [110]. La diferenciación trofoblástica parece estar asociada con un estadio superior en presentación [111].

La identificación precisa de los subtipos histológicos es un factor importante parte de la estratificación del riesgo, ya que estas variantes exhiben un comportamiento biológico agresivo. Los principales subtipos son:

- **Subtipo micropapilar:** Este patrón es poco común, ocurriendo en 0.6% a 2.2% de los casos, sobre todo en varones con edad media en 66 años. Morfológicamente se caracteriza por la presencia de pequeños nidos de células y papilas filiformes que se han retraído del estroma circundante, con múltiples papilas por laguna [112]. La inmunohistoquímica es positiva para los marcadores convencionales uroteliales como CK7, EMA, CK20, CEA, GATA3, Uroplakinas y en un 30% se puede observar Ca125 que se da en los carcinomas de ovario, esto es importante ya que histológicamente se asemeja al carcinoma seroso del ovario, un diagnóstico diferencial importante en mujeres. Es común la presencia de invasión linfovascular y la asociación con CIS. Esta variante es agresiva, y suele haber invasión de la pared muscular; se ha argumentado que la cistectomía en fases iniciales puede ser una buena opción en aquellos pacientes con CU micropapilar sin invasión muscular mejorando la supervivencia con respecto a los no cistectomizados [113]. Este subtipo alberga las tasas más altas de

alteraciones del gen ERBB2, en comparación con el CU convencional y con otros subtipos, lo que tiene su implicación a nivel terapéutico como target o diana terapéutica [114].

- **Subtipo nested:** Se caracteriza por la presencia de nidos y túbulos infiltrantes de CU. A pesar de su morfología de bajo grado y aspecto indolente, a menudo tiene un pronóstico pobre porque se presenta en un estadio avanzado. El diagnóstico diferencial incluye nidos floridos de von Brunn, cistitis quística y glandular, papiloma invertido, adenoma nefrogénico y paraganglioma. Las características específicas que ayudan a establecer el diagnóstico son los nidos de alta densidad, casi confluentes, que pueden anastomosarse e invadir la muscular propia. La atipia nuclear puede presentarse solo de manera focal y, a menudo, se encuentra en las partes más profundas de proliferación. Puede haber ausencia de desmoplasia del estroma. Existe una variante que es variante nested de nidos grandes, que consiste en grandes nidos irregulares e infiltrantes, asociados con una reacción estromal con características histológicas laxas. No hay diferencias en la supervivencia postquirúrgica. Inmunohistoquímicamente este subtipo presenta un ki67 elevado mayor que en procesos reactivos como en los nidos de von Brunn, así como una inmunopositividad para p53 más alta, pero el grado de superposición de estos marcadores impiden su uso como herramientas de diagnóstico [115]. Por inmunohistoquímica, presenta un fenotipo luminal con expresión de FOXA1, GATA3 y KRT20, además pueden exhibir KRT5/6 y más de la mitad de muestran expresión PAX8. Entre los hallazgos genómicos relevantes se incluye la alta tasa de mutaciones del promotor TERT que generalmente no se detectan en patología benigna [116].
- **Subtipo tubular y microquístico:** muestra formación de túbulos y microquísticas con características citológicas blandas, suelen ser microquistes menores de 2mm, revestidos por células uroteliales columnares bajas, o por una sola capa de epitelio aplanado de grado nuclear bajo-intermedio. Este subtipo está estrechamente relacionado con el nested dada la apariencia blanda celular y la morfología celular que recubren los túbulos o estructuras microquísticas, planteando un desafío en su diagnóstico diferencial. En un 40% se asocia a CU convencional, y su pronóstico es similar a este. Se asocian también a mutaciones del promotor TERT [117]. El diagnóstico diferencial incluye entidades como la cistitis quística polipoide florida, el adenocarcinoma, y en ocasiones el adenocarcinoma prostático Gleason 3+3, pero resulta negativo a marcadores prostáticos como PSA o el NKX3.1. Presenta un perfil inmunohistoquímico similares al carcinoma urotelial convencional, como GATA3, KRT7, KRT20 y p63, destacando la positividad para MUC5AC [118].

- **Subtipo plasmocitoide:** es raro y agresivo, se caracteriza por la presencia de células individuales discohesivas que se parecen a las células plasmáticas, y ocasionalmente puede estar presente un patrón mixoide. Además de la morfología plasmocitoide, suele haber células individuales con vacuolas citoplasmáticas, con o sin mucina, que confieren una apariencia de célula en anillo de sello. No están asociados con la producción de mucina extracelular, lo cual es muy útil para diferenciarlo del adenocarcinoma con células en anillo de sello, que si lo está. Se asocia a CU de AG y CIS. Inmunohistoquímicamente se puede confirmar la naturaleza urotelial ya que son positivas a KRT7, KRT20, p63, GATA3 y uroplaquina III; en un tercio de los casos estas células son positivas a CD138 que es un marcador de células plasmáticas. Los pacientes suelen presentarse en una etapa avanzada con una alta tasa de recaída y mortalidad, y con frecuente carcinomatosis peritoneal [119]. El carcinoma plasmocitoide parece responder a la quimioterapia. La pérdida de E-cadherina, codificada por el gen CDH1, se ha descrito recientemente en una gran cohorte de pacientes con carcinoma urotelial plasmocitoide y puede ser responsable de la marcada discohesión. La pérdida de la proteína E-cadherina por inmunohistoquímica puede observarse en aproximadamente el 70% de los carcinomas plasmocitoide, en contraste con solo el 11% de los CU convencionales. Se han observado mutaciones en CDH1 en el 87% de los carcinomas plasmocitoide [120].
- **Subtipo sarcomatoide:** tumor bifásico con componente epitelial y otro componente mesenquimatoso, este generalmente descrito como componente fusocelular de alto grado constituido por celularidad indiferenciada dispuestas en fascículos, o patrón estoriforme o una confluencia de ambos, sin patrón claramente definido, que puede estar asociados o no a una diferenciación heteróloga (osteosarcoma el más común, seguido del rabdomiosarcoma, leiomiomasarcoma, liposarcoma, angiosarcoma o mezclas de estos). El informe anatomopatológico debe incluir si el carcinoma sarcomatoide es homólogo o heterólogo, aunque hasta la fecha esto no parece tener importancia pronóstica. En el 85% de estos tumores el componente epitelial carcinomatoso corresponde a CU convencional, en algunos casos la representación epitelial la constituye exclusivamente el CIS. El tratamiento previo con radiación y ciclofosfamida son factores predisponentes, suele presentarse como enfermedad avanzada y tiene un mal pronóstico con una supervivencia del 28% a los 5 años y una media de supervivencia de 14 meses [121]. El estadio patológico parece ser el mejor predictor de supervivencia en el carcinoma sarcomatoide [122].
Para establecer el diagnóstico de CU sarcomatoide, se debe identificar una de las siguientes características: 1) diferenciación epitelial en la HE; 2) expresión variable de queratina en las áreas sarcomatosas, a menudo queratinas de alto peso molecular como CK 34βE12 o KRT5/6; y 3) expresión de GATA3 en las áreas

sarcomatosas. A nivel molecular es muy similar al CU convencional con enriquecimiento de TP53, mutaciones en RB1 y PIK3CA. Esta variante se asocia a un subtipo ba/sq con desregulación de marcadores EMT y sobreexpresión de PDL1. En el carcinoma sarcomatoide con estroma mixoide y esclerosante hay que hacer el diagnóstico diferencial con tumor miofibroblástico inflamatorio, con el nódulo células de fusiformes postoperatorio o con el CU con estroma pseudosarcomatoso o con hallazgos mucinosos/cordoides [118].

Un estudio reciente valora la supervivencia global y libre de enfermedad del subtipo sarcomatoide con respecto CU convencionales, con una peor supervivencia tanto global como libre por parte de los sarcomatoides; además estratifica el componente sarcomatoide si es focal será <50% y si es extensivo >50%, observando que el focal no tiene diferencias significativas con el CU convencional, pero si el extensivo [121].

- **Subtipo linfoepitelioma-like:** subtipo raro con características idénticas al descrito en nasofaringe caracterizado por láminas y nidos de células malignas poco diferenciadas que crecen en un patrón sincitial entremezclado con un infiltrado linfoplasmacítico denso [123]. No está asociado ni a EBV ni al HPV, al contrario de lo que ocurre en nasofaringe [124]. El componente epitelial que imparte esta apariencia sincitial es positivo para CKAE1AE3, KRT7, GATA3 y negativo para KRT20; mientras que el componente linfoide incluye linfocitos T (sobre todo los CD3) y B, histiocitos y ocasionalmente neutrófilos y/o eosinófilos. Se asocian frecuentemente a alteraciones de p53. El diagnóstico diferencial se centra en el linfoma de células grandes y cistitis crónica grave, incluida la cistitis folicular. Este subtipo presenta un pronóstico, quimiosensibilidad y respuesta a inmunoterapia, similar a la del CU convencional. Más del 50% de componente de linfoepitelioma se asocia a mejor pronóstico.
- **Subtipo células claras/rico en glucógeno:** entidad rara que presenta un patrón arquitectural sólido o en nidos constituido por células con membranas citoplasmáticas prominentes y abundante citoplasma claro. La principal importancia de este subtipo radica en sus diagnósticos diferenciales y no confundirlo con metástasis de CCR, adenocarcinoma primario vesical de células claras, así como con liposarcoma o carcinoma en anillo de sello, respectivamente. Las células tumorales tiñen de forma positiva para KRT7, p63 y GATA3, que apoya el origen urotelial, así como la presencia de CU reconocible que también apoya al diagnóstico. La mayoría de los casos se dan en estadios avanzados [17].
- **Subtipo rico en lípidos:** presenta células de tipo lipoblastos con vacuolas citoplasmáticas de lípidos. Se asocian frecuentemente a CU convencional y suele

presentarse en estadios avanzados. Inmunohistoquímicamente marcan con marcadores uroteliales como KRT7, KRT20, GATA3, uroplaquina y EMA. El contenido rico en lípidos se confirma con microscopia electrónica y las tinciones de Sudan Black B y Oil Red. Se ha visto un patrón idéntico de pérdida de heterocigosidad entre las áreas de CU convencional y el componente rico en lípidos, lo que sugiere un origen clonal común [125]. Debido al número limitado de casos reportados de carcinoma urotelial rico en lípidos, es difícil determinar el resultado clínico asociado.

- **Subtipo células gigantes:** subtipo raro con pocos casos reportados en la literatura que se suele acompañar de CU convencional. Histológicamente está constituido por nidos expansivos e infiltrantes de CU acompañados de células gigantes anaplásicas con poca cohesión, se asocian a necrosis y frecuentes mitosis atípicas. El diagnóstico diferencial debe hacerse con el CU con células gigantes de tipo osteoclastos con la diferenciación trofoblástica, en este caso la β HCG resulta negativa, las células gigantes, no obstante, suelen expresar queratinas y otros marcadores uroteliales convencionales [126]. Suelen ser muy agresivos y presentarse en estadios avanzados con afectación ganglionar.
- **Subtipo poco diferenciado:** recoge hallazgos morfológicos no comunes en CU. En la nueva clasificación de la OMS, este subtipo engloba carcinoma indiferenciado con células gigantes osteoclasticas que expresan CD68, cualquier otro tumor en el cual una parte sustancial de la neoplasia no muestre una línea definitiva de diferenciación y CU con rasgos rabdoides, el cual no expresa SMARCB-1. Estos tumores a menudo pierden marcadores específicos de linaje (GATA3, uroplaquina 2), pero de manera variable expresan marcadores de diferenciación epitelial (CKAE1AE3, Cam 5.2, KRT7 y/o EMA). La invasión linfovascular es muy frecuente. Se hace necesaria la búsqueda de CU convencional o CIS para ayudarnos al diagnóstico [117].

Es importante describir el porcentajes de los destinos subtipos y sobre todo con especial precaución con los subtipos micropapilar, sarcomatoide, plasmocitoide y poco diferenciado ya que, en las guías terapéuticas, lo establecen como CU de muy alto riesgo y presenten opciones terapéuticas específicas [127].

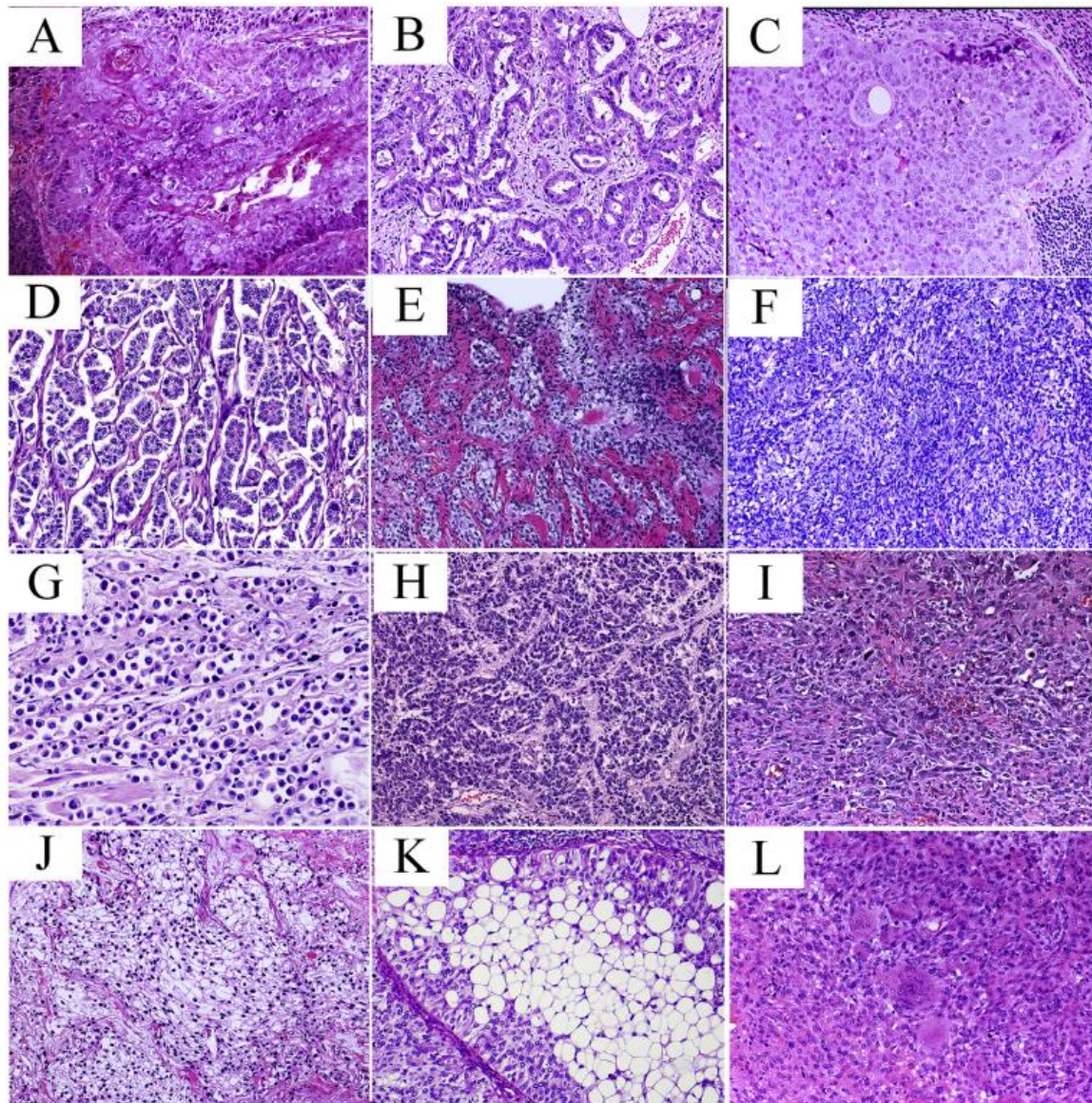


Figura 21. Representación de los subtipos de CU [107]. A) diferenciación escamosa, B) diferenciación glandular, C) diferenciación trofoblástica, D) subtipo micropapilar, E) subtipo nested, F) subtipo linfoepitelioma-like, G) subtipo plasmocitoide, H) carcinoma neuroendocrino de célula pequeña, I) subtipo sarcomatoide, J) subtipo células claras, K) subtipo rico en lípidos, L) subtipo células gigantes.

Tabla 7. Subtipos de Carcinoma Urotelial y sus Criterios de Diagnóstico Esenciales y Deseables [17].

Subtype	Essential diagnostic criteria	Desirable diagnostic criteria
Conventional urothelial carcinoma	Invasive carcinoma with evidence of urothelial origin	Coexisting CIS and/or papillary urothelial carcinoma; no morphologically similar tumour in another organ
Urothelial carcinoma with squamous differentiation	Conventional urothelial carcinoma with transition to squamous differentiation, including	Coexisting CIS and/or papillary urothelial carcinoma; no morphologically similar tumour in

	intercellular bridges or keratinization	another organ
Urothelial carcinoma with glandular differentiation	Conventional urothelial carcinoma with transition to glandular formation (apical cytoplasm and glandular lumina)	Coexisting CIS and/or papillary urothelial carcinoma; no morphologically similar tumour in another organ
Urothelial carcinoma with trophoblastic differentiation	Conventional urothelial carcinoma with admixed syncytiotrophoblastic cells	Coexisting CIS and/or papillary urothelial carcinoma; increased serum level of β -hCG; positive hCG immunohistochemistry
Nested urothelial carcinoma	Nests of bland cells (superficial portion) or atypical cells (deep portion) in myxoid, focally desmoplastic, or non-reactive stroma	Coexisting CIS and/or papillary/conventional urothelial carcinoma; invasion to the muscularis propria
Tubular and microcystic urothelial carcinomas	Cysts, macrocysts, or large tubular structures in non-reactive or myxoid stroma	Coexisting CIS and/or papillary/conventional urothelial carcinoma; negative immunohistochemistry for markers of prostate cancer (in a man) or relevant gynaecological tumour (in a woman)
Micropapillary urothelial carcinoma	Invasive carcinoma with multiple cell clusters with micropapillary features in cleft-like or lacunar spaces	Coexisting CIS and/or papillary/conventional urothelial carcinoma; no morphologically similar tumour in another organ (such as a gynaecological tumour); positive ERBB2 immunohistochemistry; negativity for markers of non-bladder origin
Lymphoepithelioma-like urothelial carcinoma	Invasive carcinoma composed of a syncytial arrangement of cytokeratin-positive cells in a polymorphic inflammatory infiltrate	Coexisting CIS and/or papillary/conventional urothelial carcinoma
Plasmacytoid urothelial carcinoma	Invasive carcinoma composed of single cells, dispersed or in a linear arrangement; absence of extracellular mucin	Coexisting CIS and/or papillary/conventional urothelial carcinoma; no morphologically similar tumour in another organ; positive immunohistochemistry for cytokeratin; absence of membranous E-cadherin labelling; negative immunohistochemistry for markers of non-bladder origin
Giant cell urothelial carcinoma	Invasive carcinoma composed of pleomorphic giant cells	Coexisting CIS and/or papillary/conventional urothelial carcinoma; positive cytokeratin

		immunohistochemistry
Lipid-rich urothelial carcinoma	Invasive carcinoma composed of lipoblast-like, cytokeratin-positive cells	Coexisting CIS and/or papillary/conventional urothelial carcinoma
Clear cell (glycogen-rich) urothelial carcinoma	Invasive carcinoma composed of nests or sheets of clear cells with well-defined cell membranes and voluminous optically clear cytoplasm	Coexisting CIS and/or papillary/conventional urothelial carcinoma; no morphologically similar tumour in another organ (such as renal cell carcinoma); positive for urothelial markers
Sarcomatoid urothelial carcinoma	Tumour cells that are morphologically indistinguishable from sarcoma cells	Coexisting CIS and/or papillary/conventional urothelial carcinoma; positive immunohistochemistry for urothelial or epithelial markers
Urothelial carcinoma, poorly differentiated	Invasive carcinoma with evidence of urothelial origin by immunohistochemistry	Coexisting CIS and/or papillary/conventional urothelial carcinoma; no morphologically similar tumour in another organ

7.3 Carcinomas vesicales no uroteliales

Como hemos descrito, las lesiones uroteliales son las neoplasias más frecuentes de la vejiga, pero no son las únicas. La complejidad histológica es mucho mayor, las neoplasias vesicales no uroteliales suponen a menudo un reto diagnóstico siendo necesario una adecuada correlación clínico-patológica en repetidas ocasiones. Podemos destacar principalmente:

- **Carcinoma de células escamosas:** el CCE es extremadamente raro en el mundo occidental, donde representa menos del 5% de los CV, pero en zonas endémicas de esquistosomiasis como África o el Medio Oriente en el que este tipo de neoplasia es la más común. Además de los factores de riesgo habituales como el tabaquismo, la exposición al arsénico y las aminas aromáticas, existen importantes factores de predisposición que incluyen la irritación crónica asociada con infecciones crónicas del tracto urinario, cálculos, cateterización y esquistosomiasis. El tratamiento con ciclofosfamida o infección por HPV son otros de los potenciales agentes en el desarrollo de CCE [128]. Morfológicamente debe ser puramente escamoso, una neoplasia formadora de queratina y/o puentes intercelulares sin componente de CU ni invasivo o no invasivo. La presencia de metaplasia escamosa queratinizante apoya este diagnóstico. El grado se da en función de la diferenciación en bien, moderadamente o poco

diferenciado. Este tumor muestra inmunoreactividad para KRT5/6, KRT7, KRT14, desmogleína3, p63 y p40, pero la positividad a esos marcadores no es útil en los diagnósticos diferenciales, sobre todo el CU con diferenciación escamosa por el solapamiento inmunohistoquímico. Generalmente se dan en estadios avanzados un cuarto de los pacientes presentan afectación ganglionar tras análisis de cistectomía. Los resultados en cuanto a la supervivencia son controvertidos en comparación con el CU con diferenciación escamosa, ya que algunos estudios no encontraron diferencia en la supervivencia mientras que otros nos hablan de que el CCE es más agresivo [128, 129].

- **Adenocarcinoma:** tumoración maligna que presenta un fenotipo glandular puro. Representan del 0.5-2% de los tumores vesicales, aunque aumenta la incidencia en países donde es endémica la esquistosomiasis. Presenta una predominancia en hombres con respecto a mujeres. Los factores de riesgo para esta entidad incluyen metaplasia intestinal de larga duración, extrofia de vejiga, irritación crónica y obstrucción vesical no funcional o esquistosomiasis endémica. Macroscópicamente, los tumores con frecuencia son sólidos o sésiles. Hay distintos tipos de adenocarcinoma primario, puede ser de tipo entérico, mucinoso, mixto y NOS. Existe una variante de células claras que no se incluye dentro de los adenocarcinomas puros en el último libro de la OMS, considerándola una entidad aparte englobada en los tumores de tipo Mülleriano. El patrón de tipo entérico es igual que la región gastrointestinal con epitelio pseudoestratificado con atipia dispuesto en patrones arquitectónicos acinares, cribiformes, vellosos o sólidos; el tipo mucinoso se compone de abundante mucina extracelular algunos con apariencia en células tipo anillo de sello, otras formas glándulas y otras veces presentan un patrón laminar; el tipo mixto presenta una mezcla de patrones entre el intestinal y el mucinoso; cuando no es posible aplicar ninguno de los patrones anteriores se utiliza la designación NOS. No existe ningún sistema de gradación actual para el adenocarcinoma vesical. Las displasias de AG y los adenocarcinomas in situ ocurren conjuntamente con el adenocarcinoma invasivo en un 35% de los casos. Inmunohistoquímicamente resultan positivos para CK20 y CDX2 con una variabilidad en la positividad para CK7, CEA, Ca125 y b-catenina, mientras que GATA3 es raramente positivo. Los diagnósticos diferenciales principales abarcan principalmente la diferenciación glandular del CU y adenocarcinomas de origen GI, prostático y del tracto genital femenino. La tasa de supervivencia a 5 años se informa en un rango del 30 al 50%, y el pronóstico está influenciado principalmente por el estadio. El tipo histológico no parece ser un predictor significativo de los resultados en el adenocarcinoma primario de vejiga. Los adenocarcinomas primarios presentan distintas alteraciones moleculares que los CU; se han demostrado alta incidencia de alteraciones oncogénicas en P53, KRAS, PIK3CA, CTNNB1, APC, FBXW7, TERT, IDH2 y RB1. La incidencia de

alteraciones de APC es significativamente menor que en el cáncer colorrectal. Mutaciones en el promotor TERT se ven en un 17-28.5% de los adenocarcinomas, una frecuencia mucho menor que en los CU que se da en torno a un 60-80% [130].

- **Tumores de tipo Mülleriano:** se piensa que esta entidad proviene de un precursor mülleriano preexistente. Este tipo de neoplasias se asemejan a sus contrapartes de tipo mülleriano en el tracto genital femenino. Hay dos tipos el adenocarcinoma de células claras y el adenocarcinoma endometriode. De estos dos tipos el adenocarcinoma de células claras es el más frecuente y a diferencia de otros tumores vesicales tienen una predominancia en mujeres. Morfológicamente, este tipo de tumor muestra patrones de crecimiento papilar, tubulocístico y/o sólido. Los núcleos fibrovasculares papilares pueden mostrar hialinización. La reacción estromal mixoide es común. Marcadores inmunohistoquímicos útiles para el carcinoma de células claras incluyen PAX8, CK7, EMA, HNF1 β y Ca125, y negativo para GATA3, p63, RE, RP, PSA, además se ha propuesto realizar inmunohistoquímica para ARID1A, ya se han encontrado mutaciones frecuentes en el adenocarcinoma de células claras, pero su utilidad clínica en tumores vesicales aún debe evaluarse [131]. Alteraciones genómicas de esta entidad incluyen PIK3CA, alteraciones del número de nucleótidos, alteraciones del número de copias con ausencia de alteraciones del promotor TERT.
- **Carcinomas neuroendocrinos:** dentro de los tumores neuroendocrinos (NE) vesicales tenemos tres tipos, el carcinoma NE de células pequeñas, el de células grandes y el mixto. El carcinoma de células pequeñas es raro y agresivo, su incidencia es de 0.5-1% de los tumores vesicales, es indistinguible de su homónimo en pulmón, presenta células pequeñas con una alta relación núcleo-citoplasma, moldeamiento nuclear, abundantes figuras mitóticas y necrosis; suelen estar asociados a CU. Por contrapartida, el carcinoma NE de células grandes suele ser de alto grado y están poco diferenciados, con un patrón de crecimiento en forma de láminas, trabéculas o nidos. Las células tumorales son grandes y poligonales, con citoplasma abundante. Los núcleos muestran un patrón de cromatina similar a la sal y la pimienta, con o sin nucléolos prominentes. Se observan figuras mitóticas frecuentes y cuerpos apoptóticos, con ocasional necrosis y células gigantes extravagantes. Marcadores de tipo NE (CD56, sinaptofisina, cromogranina e INSM1) son positivos en los dos tipos de carcinoma NE y a veces expresan queratinas de forma focal. Mediante perfiles transcriptómicos de expresión se ha visto un cambio fenotípico del urotelial al neural, asociándose a una regulación negativa de marcadores luminales y basales y desregulación de EMT. En cuanto a su perfil genómico, es similar al del

CU con niveles elevados de la firma de mutación APOBEC, un alto nivel de inestabilidad cromosómica y duplicación genómica, y tasas más altas de mutaciones en TP53, RB1 y el promotor de TERT [132].

Tabla 8. Carcinomas no uroteliales de vejiga [118]

Carcinoma categories	Definition	Diagnostic considerations
Squamous cell features		
Squamous cell carcinoma	Pure invasive squamous cell carcinoma that shows irregular invasive nests and frequent desmoplasia	Well-, moderately or poorly differentiated should be specified
Verrucous carcinoma	Well-differentiated squamous cell carcinoma with broad, pushing invasive front with frequent HPV association	Entire lesion should be submitted to exclude a conventional SCC
Adenocarcinomatous features		
Adenocarcinoma	Invasive carcinoma with glandular features	Subtypes include enteric, mucinous, mixed and NOS; intracellular mucin within single cells may indicate plasmacytoid urothelial carcinoma
Urachal carcinoma	Carcinoma arising in the dome or anterior wall of the bladder and not associated with glandular changes in the surface urothelial lining of the bladder	Carcinomas may be cystic or solid and encompass mucinous, enteric and other forms of adenocarcinoma
Müllerian type tumours	Tumours that arise in association with Müllerian remnants such as endometriosis and Müllerianosis	Subtypes include clear cell adenocarcinoma and endometrioid adenocarcinoma
Neuroendocrine tumours		
Well-differentiated neuroendocrine tumour	Neuroendocrine lesion with limited atypia, often small in size	Relatively favourable prognosis
Large-cell neuroendocrine carcinoma	Neuroendocrine carcinoma with abundant cytoplasm	Shows similar immunohistochemical findings and clinical outcomes as small-cell carcinoma
Small-cell neuroendocrine carcinoma	Neuroendocrine carcinoma with limited cytoplasm, identical to small-cell carcinomas arising at other sites	May be admixed with other forms of bladder cancer or occur in pure form; exclude secondary spread from other sites

NOS, Not otherwise specified; HPV, Human papillomavirus; SCC, Squamous cell carcinoma.

7.4. Correlación morfológica-genotípica

Tanto la morfología como el inmunofenotipo y el genotipo están estrechamente relacionados en el CV. La heterogeneidad tumoral es bastante amplia lo que dificulta las agrupaciones y clasificaciones de este tipo de tumor, pero es esencial el hacerlo por su implicación terapéutica y pronóstica.

Como ya hemos comentado la mayor parte de los CV se clasifican en CU convencionales y después tenemos una serie de subtipos y carcinomas no uroteliales basándose en criterios morfológicos en HE por parte de los patólogos. El aumento del diagnóstico histológico de todas estas entidades viene por parte de una mejora en el reconocimiento a consecuencia de una mayor conciencia sobre ellas, pero es muy dependiente de la

variabilidad interobservador. Aproximadamente un 30% de los diagnósticos de CU cambian al ser evaluados por patólogos diferentes [133] y en un 44% de los casos analizados por patólogos no especialistas en genitourinario, no habían sido diagnosticados correctamente los distintos subtipos. Se ha visto que los CU con diferenciación escamosa y los carcinomas micropapilares son los que se identifican con mayor frecuencia, siendo el linfocarcinoma-like, nested y plasmocitoides los más infradiagnosticados [106].

La identificación anatomopatológica precisa y el informe del subtipo histológico es esencial para una estratificación de riesgo de los pacientes, con el fin de elegir el manejo óptimo y mejorar los resultados oncológicos. La presencia de estos subtipos histológicos indica una enfermedad más agresiva, aunque siguen existiendo controversia en cuanto al pronóstico cuando comparamos estadio y grado [134-136].

Clásicamente, las variantes se clasifican según su morfología, pero los recientes avances en biología molecular y tecnologías de secuenciación han mejorado el conocimiento del panorama genómico dando lugar a diversas clasificaciones moleculares ayudando a una caracterización molecular de las diferentes variantes de CU. Existe asociación entre determinadas variantes histológicas y los subtipos moleculares, hay numerosas publicaciones que consensuan este hecho [137-139]. Una de estas publicaciones hace referencia a la heterogeneidad intratumoral integrando la clasificación molecular y las variantes histológicas empleando la 2ª clasificación molecular de LUND (uro-A, uro-B, genómicamente inestable, ba-sq, mesenquimal, y neuroendocrino) (79); y vieron como el 90% de su serie pertenecían a los subtipos uroteliales, ba/sq, y genómicamente inestable. Observaron además que un 39% de los pacientes con más de una histología tumoral, mostró heterogeneidad molecular entre las diferentes histologías tumorales, siendo más alta en el subtipo ba/sq [139].

Hasta ahora existe una clasificación consenso donde se analizaron perfiles transcriptómicos de 1750 CVMI obtenidos de otras clasificaciones de diferentes grupos de trabajos; estableciéndose 7 subtipos (LumP, LumNS, LumU, Ba/Sq, rico en estroma y NE-like), pero instaurándose fundamentalmente dos grupos principales luminales y basales [81]. Esta categorización de luminal-basal se adoptó inicialmente por las similitudes con los perfiles de expresión del cáncer de mama. El subtipo molecular basal se relaciona con una enfermedad más agresiva, con resultados de supervivencia pobres pero alta respuesta a la NAC. En cambio, el subtipo luminal tiene un pronóstico mejor pero baja respuesta a la quimioterapia [136]. Se ha visto como la histología escamosa se identifica más comúnmente en el subtipo molecular ba/sq; sin embargo otros como el carcinoma micropapilar puede ser luminales, genómicamente inestables, uroteliales o ba/sq; los carcinomas tipo nested, plasmocitoides y adenocarcinomas puros parecen ser predominantemente luminales en la mayoría de los estudios, mientras que el CU sarcomatoides generalmente está asociado con alteraciones en la vía EMT y mutaciones adicionales en los genes PIK3CA, TP53 o RB1.

7.4.1 Actualización molecular y variantes histológicas

- **Diferenciación escamosa:** Es la diferenciación más frecuente del CU. Los estudios de expresión génica de CU con diferenciación escamosa fueron agrupados de manera consistente en subtipo ba/sq, caracterizándose por la sobreexpresión de queratinas de alto peso molecular (KRT5, KRT6 y KRT14), EGFR e infraregulación de marcadores de diferenciación urotelial, como uroplaquinas, GATA3, FOXA1, PPARG y trombomodulina. Algunos artículos hacen referencia a la heterogeneidad tumoral dentro del CU con diferenciación escamosa analizando por separado las áreas morfológicamente uroteliales y las escamosas dentro del mismo tumor, observándose que en algunos casos las zonas uroteliales se clasificaron como luminales mientras que las escamosas en ba/sq [139, 140].
- **Diferenciación glandular:** existen pocos artículos que se refieran a características moleculares de esta diferenciación dada la limitación de las cohortes con diferenciación glandular; no obstante, sugieren que presentan grandes similitudes con el CU como mutaciones en el promotor TERT y alteraciones en genes de remodelación de la cromatina [141].
- **Variante micropapilar:** Variante agresiva del CU, se considera predominantemente subtipo luminal. La agresividad asociada con el carcinoma micropapilar podría estar relacionada con la activación de la vía RUVBL1. Además, un subconjunto de carcinomas micropapilares muestra características del subtipo molecular TP53-like asociado con resistencia a la QT [142]. Se han visto tasas más elevadas de amplificación de ERBB2 que en el CU convencional con sobreexpresión de HER2 [143]. Al contrario de lo que ocurre en cáncer de mama no está claro si la sobreexpresión de HER2 en CV está asociada a respuesta a trastuzumab, pero la heterogeneidad tumoral, así como la escasa representación de esta variante en la serie de casos hace necesaria que se realicen ensayos específicos de tratamientos con trastuzumab en presencia de esta amplificación [144].
- **Variante plasmocitoide:** Suele presentarse en estadios avanzados (T3 o mayor al inicio), asociado a una alta mortalidad y propensión a la carcinomatosis peritoneal. Igual que ocurre en el carcinoma lobulillar de mama o en el carcinoma gástrico de tipo difuso, la variante plasmocitoide pierde la función de la proteína

E-Cad (aproximadamente el 80% de los plasmocitoides presentan mutaciones de CDH1, gen que codifica esta proteína). A nivel genómico presenta alteraciones muy similares al CU convencional con mutaciones frecuentes en modificadores de la cromatina, reguladores del ciclo celular, en el promotor de TERT, alteraciones de la vía PI3K; todo esto sugiere un origen celular compartido con ambos tipos de tumores.

- **Variante nested:** Resulta difícil su diagnóstico histológico por el solapamiento de entidades histológicas benignas. A nivel molecular se han visto alteraciones en TERT en aproximadamente un 60% de los casos y que no se encuentra en estas patologías imitadoras de esta entidad que son benignas (cistitis glandulares, von Brunn, etc.). Se han encontrado mutaciones similares al CU convencional como TP53, JAK3, CTNNB1, mientras que la variante nested células grandes presenta frecuentes mutaciones sobre FGFR3. EL subtipo molecular más frecuentemente asociado es el luminal, con expresión de marcadores luminales inmunohistoquímicos como FOXA1, GATA3 y KRT20.

- **Variante sarcomatoide:** Presenta un componente mesenquimal/sarcomatoide que comparte el mismo origen clonal que el componente urotelial, enriquecido con mutaciones en TP53, RB1 y PIK3CA y alteraciones de la vía EMT con sobreexpresión de marcadores EMT. Comparte características del subtipo molecular ba/sq. Frecuentemente expresan PDL1 dejando una puerta a posible tratamiento con ICI. Aplicando la 2ª clasificación de LUND, esta variante puede ser clasificada en diferentes subtipos moleculares (uro, genómicamente inestable, ba/sq o mesenquimal), lo que refleja su heterogeneidad [139].

- **Otros carcinomas vesicales:** hay otras variantes de carcinomas vesicales poco frecuentes que tienen particular relevancia por su implicación terapéutica. El carcinoma NE puede ser puro o mixto, y en este último caso estar asociado a CU, carcinoma escamoso y raramente con adenocarcinoma. El NE de célula pequeña muestra en un 80% co-alteración de TP53 y RB1 además de otras alteraciones frecuentes que también se dan en el CU convencional, asociándose a un alto nivel de inestabilidad cromosómica y alteraciones de APOBEC que no presentan sus homólogos en pulmón. El enfoque actual para el carcinoma neuroendocrino se basa en combinaciones de quimioterapia, pero algunos casos pueden responder a ICI. Suelen asociarse a un subtipo molecular neuroendocrino-like y ba/sq.

El linfioepitelioma-like presenta un denso infiltrado linfoide sobre todo a expensas de linfocitos T CD3+, y parece responder bien a tratamiento por su

sensibilidad a QT, RT e ICI. El tipo molecular correspondería al ba/sq y suelen ser positivos para PDL1 [118]. Más del 50% de componente de linfopitelioma se asocia a mejor pronóstico.

El CCE puro representa el 5% de los CV y su pronóstico parece estar relacionado con la extensión de la enfermedad, se trata inicialmente solo con cirugía o con diferentes combinaciones de QT y RT. El 60% de los carcinomas escamosos de la vejiga suelen expresar altos niveles de PD-L1 relevante para tratamiento con ICI.

Otras variantes como el poco diferenciado, rico en lípido, o células gigantes presentan resultados pobres y su terapia óptima sigue siendo incierta [47].

Tabla 9. Correlación subtipos histológicos con pronóstico y subtipo molecular [136].

Variant	Outcomes after RC (adjusted for stage): inferior/similar/superior/variable	Outcomes after perioperative CT: beneficial/no effect/no data/not preferred	Outcomes after trimodality therapy: inferior/similar/superior/no data/not preferred	Outcomes after intravesical therapy with BCG (NMIBC): inferior/similar/superior/variable/no data	Molecular subtype: luminal/basal/unknown
Nested	Similar	No data	No data	Inferior	Luminal/basal
Microcystic	Similar	No data	No data	No data	Luminal/basal
Micropapillary	Similar/inferior	Beneficial/no effect	No data	Inferior	Luminal
Lymphoepithelioma-like	Superior	Beneficial	No data	No data	Basal
Plasmacytoid/signet ring cell	Similar/inferior	Beneficial/no effect	Inferior (Signet ring cell)	No data	Luminal
Sarcomatoid	Inferior/similar	No benefit	No data	No data	Basal
Clear cell	Variable	No data/not preferred	No data	No data	Luminal/basal
Mixed variants	Similar	Beneficial (MVAC)	Similar	Similar (glandular)	Luminal (glandular)/basal (squamous)
Neuroendocrine tumours	Inferior/similar	Beneficial (Etoposide)	No data	No data	Basal
Adenocarcinoma	Similar	No benefit	No data	No data	Unknown
Pure squamous cell carcinoma	Inferior	No benefit	No data	No data	Unknown

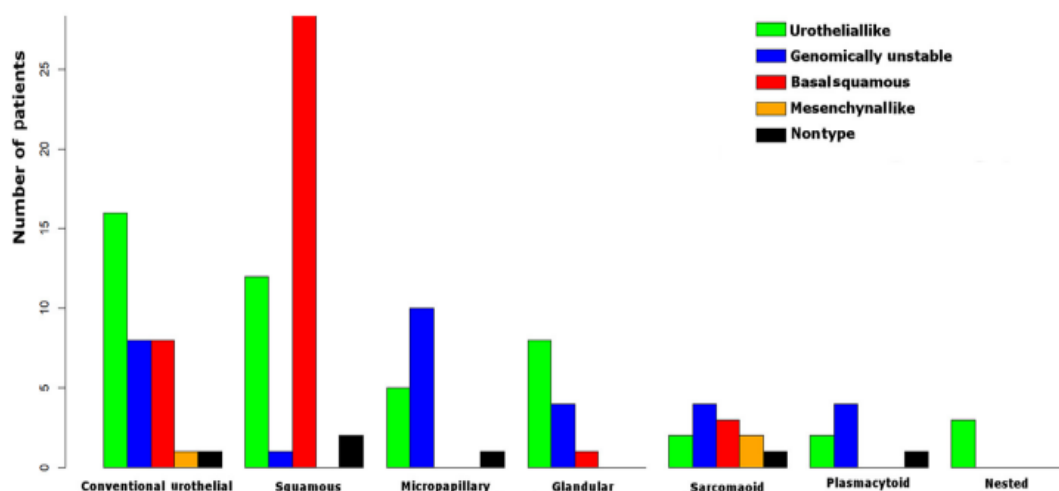


Figura 22. Variantes histológicas y diferentes subtipos moleculares asociados según 2ª clasificación de LUND [139].

7.5 T1 y subtipos histológicos

El 75% de los CVNMI T1 de AG van a presentar recurrencia de su enfermedad a pesar de las instilaciones de BCG, y en torno a un 25% presentan un alto riesgo de progresión a musculo infiltración. Dada la heterogeneidad tumoral que presenta el CV hace que existan limitaciones en la gradación y estadificación de los tumores T1 [145], haciéndose necesario una identificación temprana de aquellos tumores de AG con comportamiento agresivo y potencialmente mortales que tendrían un impacto en nuestra práctica clínica. Para lograr este objetivo, se ha recomendado considerar factores asociados al riesgo, como el tamaño del tumor, el patrón de crecimiento, la multifocalidad, la extensión y la profundidad de la invasión, y la presencia concomitante de CIS. Sin embargo, existen pocos estudios que comparen según las variantes histológicas. En un estudio retrospectivo realizado recientemente en 1490 pacientes querían investigar los resultados tras instilaciones de BCG comparando CU convencional con CU con diferenciación y diferentes subtipos de CU y encontraron que los CU con subtipos concomitantes, se asocian a más riesgo de mortalidad cáncer específica pero no para supervivencia libre de recurrencia o progresión que los CU convencionales y los CU con diferenciación divergente [146].

La guía de la NCCN recomienda la cistectomía radical inmediata para T1AG con variantes micropapilares, plasmocitoides o sarcomatoides [134], y las pautas de la AUA incluyen la presencia de cualquier variante histológica como una categoría AG en los CVNMI [147]. A pesar de estas indicaciones, realmente tenemos datos inciertos sobre la incidencia real y riesgo de los subtipos histológicos en el T1AG. Por un lado, la discordancia interobservador cuando se realiza una revisión de casos, así como un pequeño tamaño muestral o el hecho de que la mayoría de las variantes no sean

reconocidas en la práctica diaria por el patólogo, puede explicar el conocimiento limitado disponible sobre el riesgo asociado a ellas en la práctica.

Un artículo reciente plantea estratificar el CU T1AG en categorías de riesgo basadas en la presencia de subtipos histológicos en comparación con CU convencional [148]. A pesar de la limitación de la muestra (104 pacientes) consiguen estratificar grupos de riesgo a través de los subtipos histológicos, el 37% de la muestra presentaba algún tipo de subtipo histológico. Los subtipos de CU incluyeron el nested, diferenciación glandular, micropapilar, diferenciación escamosa, basaloide, microquístico, veloso y el linfopitelioma-like. Los subtipos se asociaron con características clínico-patológicas agresivas variables, incluida la supervivencia y la tasa de recurrencia después de la RTU completa y las instilaciones de BCG guiadas por mantenimiento. Curiosamente, las variantes identificadas no mostraron, considerándolas de forma global, el mismo riesgo de enfermedad agresiva, concluyendo que los CU con histología variante, ya sea con diferenciación o subtipos, presentaron mejor supervivencia que los CU convencionales, aunque reflejan que ha podido ser debido a la limitación de la muestra. No obstante, cuando estratifican por subtipos sí que observa diferenciaciones significativas donde el villoglandular y linfopitelioma-like tiene mejor pronóstico y los que tiene peor pronóstico con respecto al CU convencional destacan el nested, micropapilar, basaloide y glandular; consiguiendo realizar una estratificación de los subtipos histológicos por riesgo en el T1AG en tres categorías:

- Alto riesgo: CU convencional, micropapilar, nested, diferenciación glandular y basaloide
- Bajo riesgo: Diferenciación escamosa, patrón de crecimiento invertido y el microquístico
- Muy bajo riesgo: Villoglandular, linfopitelioma-like

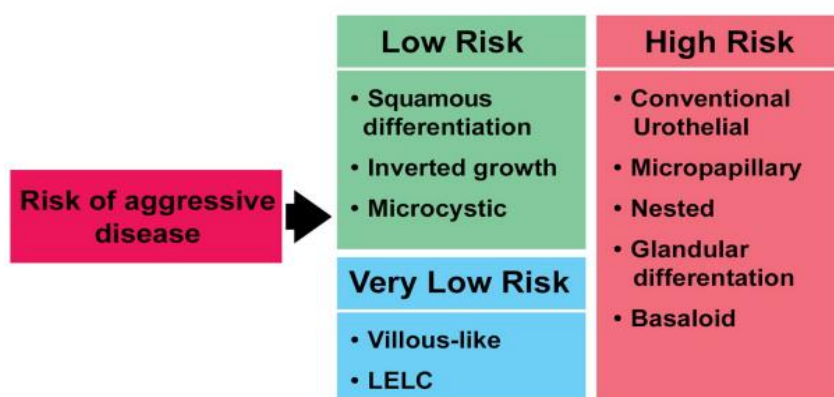


Figura 23. Categorías de riesgo de los distintos subtipos histológicos en T1AG [148].

Estos resultados respaldan la inclusión del CU micropapilar en T1AG dentro de la categoría de alto riesgo como sugieren, pero también favorecen la inclusión de los tipos nested, diferenciación glandulares y basalioides en la categoría de alto riesgo debido a su potencial de comportamiento agresivo, y su respuesta limitada a BCG, reiterando el valor de informar sobre los subtipos de CU como una característica de agresividad variable en los CU T1AG.

8. Heterogeneidad tumoral

El CVMI es una enfermedad muy heterogénea con una alta tasa de mutaciones e inestabilidad genética. La diversidad tanto en los resultados clínicos como en las respuesta terapéuticas a QT se manifiesta en los distintos pacientes mostrándose una heterogeneidad intertumoral.

La heterogeneidad en el CV se refiere a la presencia de una variedad de características genéticas, moleculares y fenotípicas en las células cancerosas de un mismo tumor. Esta diversidad puede manifestarse en diferencias en la agresividad tumoral, la respuesta a tratamientos y la capacidad de metástasis. Comprender la heterogeneidad es crucial para mejorar los enfoques de diagnóstico y tratamiento, ya que las terapias tradicionales podrían no ser efectivas contra todas las poblaciones de células cancerosas presentes en el tumor.

Actualmente existen dos teorías sobre el desarrollo de los tumores, por un lado, la evolución clonal basada en modelos darwiniano de selección natural. Esta teoría sugiere que el cáncer se origina a partir de una sola célula mutada que se duplica y da lugar a una población de células cancerosas con características similares. A medida que el tumor crece, se acumulan mutaciones adicionales que dan lugar a subpoblaciones de células con diferentes propiedades en la cual las células inestables genéticamente acumulan mutaciones, y luego la presión selectiva favorece el crecimiento y supervivencia de clonas con ventajas biológicas. Esta inestabilidad genética lleva a que las células individuales acumulen más mutaciones, formando subpoblaciones clonales divergentes. Las células más agresivas impulsan la progresión del cáncer. Este proceso dinámico conlleva una continua remodelación del tumor, generando diversas dimensiones de heterogeneidad [149].

Y, por otro lado, según una segunda teoría, el CV contiene una pequeña población de células madre cancerosas que tienen la capacidad de autorrenovación y de diferenciarse en diferentes tipos de células cancerosas. Estas células madre serían responsables de mantener la heterogeneidad del tumor ya que tan solo un subgrupo de células cancerosas participa en la evolución “clonal” y progresión tumoral. Tienen un interés especial debido a su papel en tumorigénesis, metástasis y resistencia a QT.

Hay un modelo alternativo llamado plasticidad epitelial reversible que conecta estos dos modelos; esta teoría destaca la capacidad de las células cancerosas para cambiar de características en respuesta a señales del microambiente. Esto significa que las células cancerosas podrían adaptarse y cambiar sus propiedades para sobrevivir y crecer en diferentes condiciones. Las células cancerosas pueden cambiar entre estados de células madre y diferenciadas en respuesta a señales del microambiente tumoral. Esta plasticidad está vinculada a la regulación de la vía EMT y es más prominente en las células cancerosas que en las normales [150].

La relación entre las células tumorales y su entorno microscópico es un factor crucial en la regulación del desarrollo, avance y propagación del cáncer. Este es conocido como microambiente tumoral, y se trata de un sistema dinámico que engloba células cancerosas, tejido estromal y matriz extracelular circundante. Hay estudios que respaldan que este microambiente tumoral activa la vía EMT no solo en células tumorales, sino en las células madre cancerosas. Estas células del microambiente desencadenarían señales moleculares que controlarían la supervivencia y mantenimiento de las células madre cancerosas; y podrían también causar resistencia a los tratamientos farmacológicos [151].

La importancia de entender la heterogeneidad radica en cómo afecta el tratamiento del CV. Si se pasa por alto la diversidad de poblaciones de células, los tratamientos podrían dirigirse únicamente a una subpoblación, dejando a otras partes del tumor sin tratar y permitiendo que las células resistentes se multipliquen. Los enfoques de tratamiento personalizados, que consideran la heterogeneidad, podrían incluir terapias dirigidas a diferentes subpoblaciones de células cancerosas y tratamientos combinados para abordar la variabilidad [152].

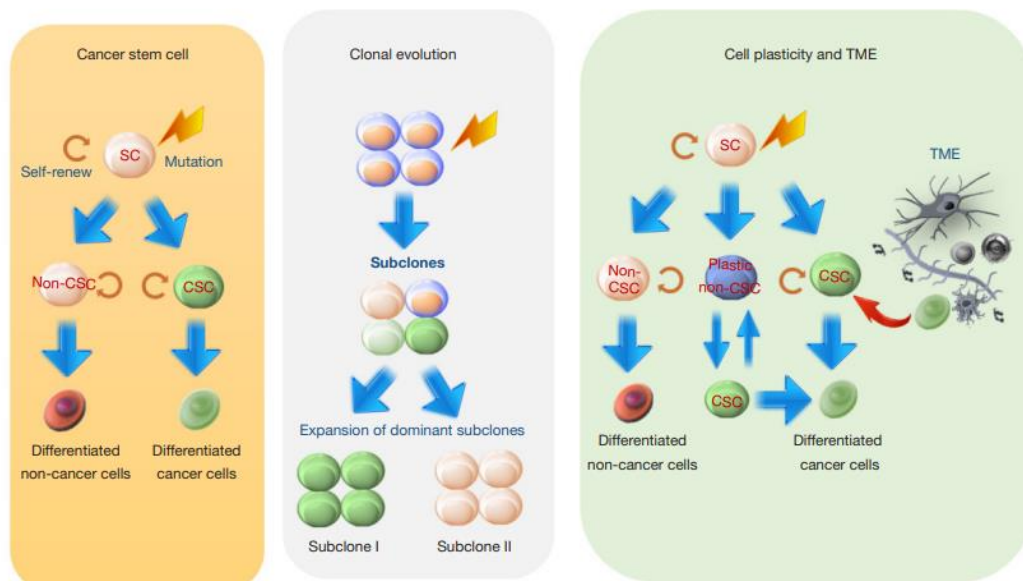


Figura 24. Modelos de heterogeneidad tumoral (155).

La heterogeneidad fenotípica es reconocida por el patólogo como parte esencial de un tumor, un ejemplo claro es el reconocimiento de diferentes subtipos histológicos con diferentes implicaciones clínicas, dada la frecuente coexistencia de CU junto con distintos subtipos. Esta misma heterogeneidad intratumoral la podemos encontrar entre el tumor primario y las recidivas locales o metastásicas, dificultando el camino hacia una medicina personalizada ya que es poco probable que una única biopsia o extirpación quirúrgica parcial nos proporcionen una imagen clara del panorama genómico de cada tumor. Ya hay artículos que empiezan a hablar de esta heterogeneidad intratumoral encontrando distintas áreas del mismo tumor con diferentes patrones moleculares [139].

Es importante mencionar que la iniciación subclonal de un tumor puede surgir de forma natural o bien inducida por tratamiento quimioterápico como en la NAC. La relación entre NAC y la heterogeneidad intratumoral en el contexto del CV es compleja y significativa. Las áreas diferentes dentro del mismo tumor pueden responder de manera diferente a la QT, lo que lleva a una respuesta heterogénea en la reducción del tamaño del tumor. Algunas áreas pueden ser más resistentes que otras, lo que puede resultar en una disminución asimétrica del tamaño tumoral. Además, puede inducir cambios en la composición celular y en la genética de las diferentes áreas, algunas subclonas celulares pueden ser eliminadas o debilitadas por la QT, mientras que otras pueden sobrevivir y proliferar. Esto puede llevar a cambios en la heterogeneidad molecular y fenotípica del tumor después de la quimioterapia, puede interactuar con el microambiente tumoral y el sistema inmunológico viéndose alterado [152].

Así pues, la heterogeneidad tumoral es un obstáculo crucial para obtener respuestas efectivas en diversos tipos de tratamientos. En el caso del CV, es esencial identificar las células tumorales potencialmente letales, lo que podría ser clave para mejorar la supervivencia de los pacientes. En este proceso, los patólogos pueden desempeñar un papel importante, ya que detectar la heterogeneidad sigue siendo un desafío para llevar los avances moleculares a la práctica clínica. El desarrollo de terapias dirigidas a objetivos específicos y enfoques inmunoterapéuticos ha abierto nuevas posibilidades para abordar la heterogeneidad tumoral y mejorar los resultados para los pacientes con CV [153].

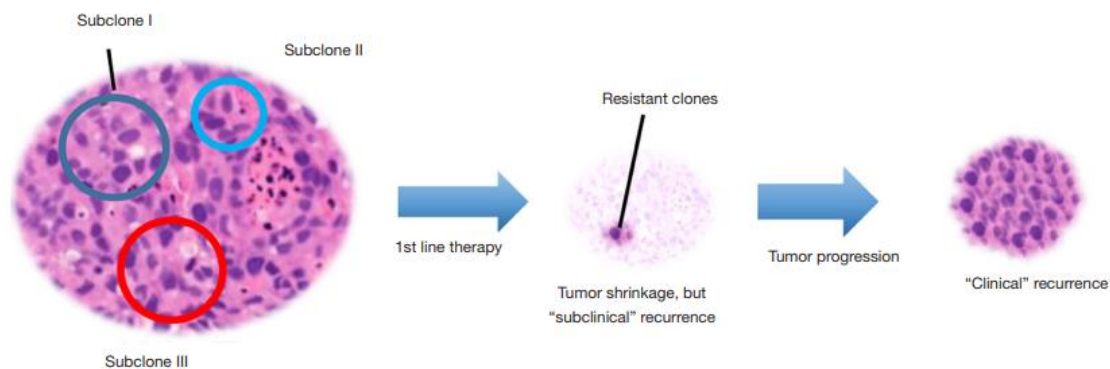


Figura 25. Poblaciones subclonales y su resistencia a quimioterapia y posterior recurrencia [152].

9. Inmunohistoquímica como marcador subrogado

La falta de reproducibilidad asociada al alto coste y disponibilidad limitada en centros de rutina diagnóstica para el análisis molecular del CV limita el empleo de las clasificaciones moleculares en la práctica clínica rutinaria [47,95, 154].

A raíz de la propuesta de clasificación molecular de consenso surge el debate de como poder implementar esta clasificación, planteándose el uso de la inmunohistoquímica como marcador subrogado de subtipos moleculares, fundamentalmente de los dos subtipos principales el basal y el luminal. Ya se conoce que el estudio inmunohistoquímico desempeña un papel importante en el diagnóstico de las neoplasias vesicales, siendo complemento a la evaluación morfológica del tumor en combinación con la clínica del paciente [155].

Distintos estudios han intentado validar estos subtipos en varias cohortes clínicas e identificar marcadores inmunohistoquímicos característicos para simplificar y rentabilizar esta categorización. Uno de ellos empleó la expresión de solo dos marcadores inmunohistoquímicos, luminal (GATA3) y basal (KRT5/6), lo que fue suficiente para identificar los subtipos moleculares con una precisión de más del 90% [154]. Los tumores luminales mostraron un patrón de expresión similar a las capas intermedias/superficiales y presentaron usualmente una activación de genes objetivo de PPAR y una mayor presencia de mutaciones en FGFR3, ELF3, CDKN1A y TSC1 y sobreexpresión de proteínas como E-Cad, HER2/3. Por otro lado, los tumores basales mostraron una firma de expresión similar a la capa basal, mayor número de mutaciones en TP53 y RB1 y una sobreexpresión de CD49, Ciclina B1 y EGFR. Los análisis de supervivencia revelaron que los CV basales invasivos en músculo tenían un comportamiento más agresivo en comparación con los CV luminales.

Uno de los estudios pioneros en demostrar perfiles basales y luminales por IHC empleo dos marcadores: la KRT5/6 y la KRT20; por un lado, KRT5/6+ y KRT20- detectó la mayor parte de los subtipos basales; y por otro KRT20+ / KRT5/6- categorizaban el subtipo

luminal [71]. Este estudio concluye con una mejor respuesta a quimioterapia por parte de los basales con expresión de KRT5/6, P63 y KRT14 y los luminales con expresión activa de PPAR y mutaciones activadoras de FGFR3 con expresión de CK20, FOXA1 y GATA3.

Se intentó corroborar la propuesta de Choi et al. [71] sobre el uso de KRT20 y KRT5/6 en la identificación inmunohistoquímica de luminal y basal respectivamente, desarrollando una clasificación de grado molecular en CVNMI [156]. Obtuvieron resultados muy similares a otro artículo que identificó expresión de mRNA de KRT20 alta y KRT5 baja en subtipos luminales [157], donde el fenotipo luminal se asociaba con una peor supervivencia libre de progresión y libre de recurrencia. Concluyen válida la categorización en luminal-basal por inmunohistoquímica, y además identifican dos categorías adicionales basadas en inmunohistoquímica y RT-PCR, la categoría doble positivo (KRT20+, KRT5/6+) y la doble negativa (KRT20-, KRT5/6-). La relevancia y la forma en que se clasifican estas categorías aún no están claras y requieren más investigación para comprenderlas mejor [156].

Otro de los estudios que trataba de evaluar la clasificación fenotípica para los CVNMI utilizó TMA con estudio IHC de marcadores luminales (GATA3, KRT20, RE, uroplaquina II y HER2/neu) y basales (KRT5/6 y CD44). Confirmaron la expresión de KRT5/6 como un predictor de la progresión del estadio tumoral en CVNMI, y apoyaron el uso de IHC como marcador subrogado de perfil molecular basal-luminal. Intentaron crear una clasificación dual basada en inmunohistoquímica para los grupos basal y luminal (usando CD44 y KRT5/6 frente a KRT20 y Uroplaquina II, respectivamente), pero no tuvo éxito en la cohorte de CVNMI. Abrieron la posibilidad de que pudiera ser debido a la heterogeneidad molecular tumoral planteando además limitaciones con la inmunohistoquímica como extensión e intensidad de las reacciones; necesitándose estudios futuros con un mayor número de pacientes en la cohorte que ayuden a la implementación de la clasificación luminal/basal basada en la inmunohistoquímica [158].

La relación de la clasificación taxonómica por IHC y su relación como predictor de respuesta a NAC ha sido recientemente estudiado por un grupo de trabajo que definió por inmunohistoquímica 3 subgrupos, el tipo Ba/Sq (FOXA1 y GATA3 bajo, KRT5/6 y KRT14 alto), tipo luminal (FOXA1 y GATA3 alto, KRT5/6 y KRT14 bajo) y un grupo mixto (FOXA1 y GATA3 alto, KRT5/6 alto y KRT14 bajo). Indicaron que los pacientes con tumores tipo Ba/Sq tenían más probabilidades de lograr una respuesta patológica completa a NAC [159]. La clasificación que propusieron estaba respaldada por otro artículo que empleó FOXA1 y KRT14 como marcadores de subtipos luminales y basales en pacientes CVMI con CU convencional y variantes. Vieron como KRT14 alto y FOXA1 bajo se expresaron en subtipos basales, mientras que los luminales tenían KRT14 bajo y FOXA1 alto y caracterizó como luminales carcinoma micropapilares, nested y plasmocitoides [160].

El grupo de LUND ya empleo el estudio inmunohistoquímico y el análisis de expresión génica en las clasificaciones taxonómicas [78]. Actualmente han creado un sistema de algoritmo inmunohistoquímico que agrupa en un primer nivel 3 grupos a partir de GATA3 Y KRT5; El urotelial y/o genómicamente inestable (GATA3+ /KRT5 bajo), el Ba/Sq (GATA3-/KRT5 alta), y el mesenquimal y/o NE (GATA3-/KRT5 bajo). En un segundo nivel se puede aplicar p16 para distinguir entre urotelial (p16-) y genómicamente inestable (p16+) y EpCAM entre mesenquimales (EpCAM -) y NE (EpCAM+). En un tercer nivel se puede aplicar inmunohistoquímica opcional en uroteliales (CCND1+), en genómicamente inestables (CCND1-), en Ba/Sq (KRT14+), en mesenquimales (VIM+, y morfología sarcomatoide) en NE (marcadores NE y morfología de células pequeñas) [161].

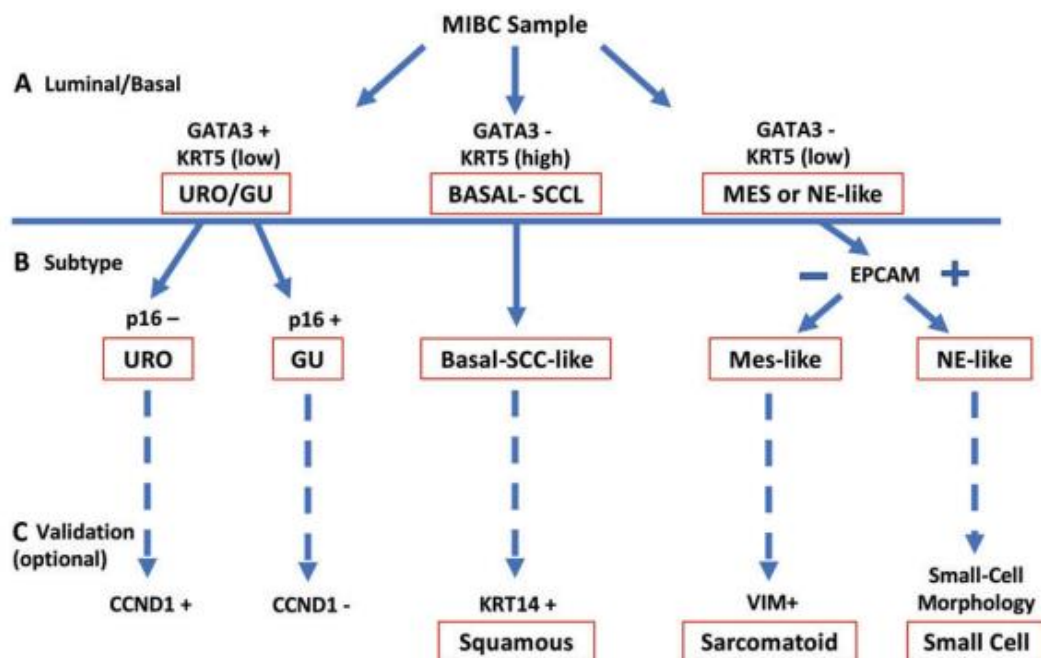


Figura 26. Propuesta de algoritmo inmunohistoquímico de tres niveles. A) La expresión de KRT5 y GATA3 produce tres categorías: Uro/GU (subtipos similares al urotelio e inestables genéticamente), basal-SCCL (subtipo basal/similar al carcinoma de células escamosas) y Mes-like/NE-like (subtipo similar al mesénquima y similar a las neuroendocrinas). B) La subclasificación (izquierda) en Uro o GU se basa en una tinción de intensidad baja versus moderada o alta con anticuerpos contra p16. La IHC de EpCAM (derecha) subclasifica los MIBC GATA3-/KRT- en subtipos NE-like (positivo) y MES-like (negativo). C) La IHC de CCND1 es positiva en los subtipos Uro y negativa en los subtipos GU. El subtipo basal/SCC-like se puede confirmar mediante la expresión de KRT14 y/o morfología escamosa. El subtipo Mes-like se puede confirmar mediante la tinción de vimentina y/o la morfología sarcomatoide. El subtipo NE-like se puede confirmar mediante morfología de células pequeñas o marcadores típicos de IHC neuroendocrinos como cromogranina o sinaptofisina [161].

La complejidad de los algoritmos de subtipificación publicados es un impedimento importante para fomentar su uso clínico. Últimos estudios han tratado de optimizar,

validar y actualizar los algoritmos inmunohistoquímicos basados en la taxonomía de Lund [127]. Han propuesto que un algoritmo basado en GATA3, KRT5 y p16 es capaz de lograr al menos un 78% de precisión para la identificación de los subtipos urotelial, genómicamente inestable y ba/sq de la clasificación de LUND, y para la clasificación luminal/basal alcanza una precisión del 91%.

Helal et al. en 2023 plantean un algoritmo inmunohistoquímico simple con GATA3, KRT5 y p53 en pacientes CVMI. Para ello emplearon el Inmunoscore utilizando el punto de corte de 20% de expresión tumoral como positivo, y consiguieron estratificar 3 subtipos: luminales con expresión de GATA3 (con frecuencia menor respecto a otras cohortes como la de LUND o la MD Anderson), otros subgrupo de luminales que expresaron GATA3 y fueron positivos a p53, que pasaron a llamarlos p53-WT, y el subtipo basal con mayor representación en la cohorte del estudio que la de otros grupos de trabajo. El subtipo basal mostró una respuesta significativamente mejor a la NAC. La expresión de HER2 fue significativamente mayor en los subtipos luminales, mientras que la expresión de EGFR fue significativamente mayor en los subtipos basales; esto supone que podrían beneficiarse de terapias dirigidas a HER2 los luminales y los basales a EGFR. Por otra parte, se corrobora la mejor respuesta a NAC de los basales, mientras que el subtipo p53-WT son quimioresistentes y se beneficiarían de tratamientos adicionales [162].

Todas estas propuestas respaldan el uso de la IHC para proporcionar una evaluación básica de los subtipos moleculares en basales y luminales en la práctica clínica, aunque están pendiente de estudios de validación. La caracterización basada en inmunohistoquímica en el CVMI es compleja, pero tiene la ventaja de estar disponible y accesible de manera inmediata para los patólogos, por lo que es necesario una futura implementación de manera eficiente y efectiva como marcador subrogado de perfiles moleculares.

Recientemente nuestro grupo de trabajo ha publicado una revisión sobre el uso de la inmunohistoquímica como marcador subrogado de CV. No solo centrándonos en CVMI, ya que incluimos CVNMI que son menos estudiados [43]. Aproximadamente el 75% de los pacientes con CV son diagnosticados con CVNMI, una entidad heterogénea para la cual los intentos de clasificación dual basada en IHC para fenotipos luminales y basales no han demostrado ser exitosos en predecir los resultados [72]. Por ello hemos considerado necesario realizar este estudio para analizar en nuestro medio si estos moleculares pueden clasificarse de manera efectiva mediante IHC y si poseen un valor pronóstico en CVNMI.

Según los paneles simplificados de tres marcadores de la Taxonomía Lund, se empleó un algoritmo con tres anticuerpos (GATA3, KRT5 y p16) en pacientes con CVNMI. Este algoritmo clasifica a los pacientes en cuatro subtipos: basal, GU, URO y URO-KRT5+, facilitando la estratificación de subtipos en bajo o alto riesgo de recurrencia y progresión. Los subtipos basales mostraron el peor pronóstico con progresión más

rápida, respaldando el uso del algoritmo de IHC en la práctica clínica rutinaria y en la toma de decisiones terapéuticas [163].

En un estudio de Mulwijk et al., se evaluó una cohorte de 109 CVNMI pTa. Aunque no se clasificaron explícitamente subtipos moleculares, el análisis se centró en la aplicación de marcadores IHC, incluyendo marcadores basales (p63, KRT5, p40) y luminales (GATA3, KRT20). Se identificó una correlación inversa entre KRT5 y KRT20, lo que distinguió efectivamente entre tumores de alto y bajo grado, indicando comportamientos biológicos distintos en CVNMI comparado con CVMI. La expresión de KRT5 fue validada mediante análisis de ARNm [164]. Otros estudios en carcinoma urotelial no músculo-invasivo del tracto urinario superior también demostraron que KRT5 es un factor pronóstico independiente en este contexto [165,166].

Sikic et al. concluyeron que la subtipificación mediante IHC usando KRT5 y KRT20 puede identificar subtipos de carcinoma urotelial del tracto urinario superior con peor pronóstico, especialmente los tumores KRT20+/KRT5- [165]. Jung et al. también concluyeron que la expresión de KRT5/6 y KRT20 es crucial para la estratificación pronóstica, con tumores de perfil basal (KRT5/6 positivos) mostrando mejor supervivencia en comparación con tumores de perfil luminal (KRT20 positivos) [166]. Sin embargo, los resultados sobre KRT5 son controvertidos. Mai et al., en un estudio de 302 casos de CVNMI, identificaron un subgrupo basal con alta reactividad a KRT5 y CD44, que mostró mayor recurrencia, progresión acelerada y tendencia a la multifocalidad [167].

Breyer J et al. evaluaron la expresión de ARNm de KRT20 (luminal) y KRT5 (basal) para subtipar CVNMI, mostrando que altos niveles de KRT20 y bajos de KRT5 se asociaron con peor pronóstico [157], corroborando otros estudios [91,156,168]. Concluyeron que la RT-PCR ofrece mayor precisión pronóstica en comparación con la IHC sola, sugiriendo que KRT5 puede correlacionarse positiva o negativamente en diferentes grupos de CVNMI [145,169].

Existen pocos estudios que subtipifiquen el CIS. Garczyk et al. analizaron el CIS usando un panel de marcadores luminales (KRT20, GATA3, ERBB2) y basales (KRT5/6, KRT14), además de p53, destacando la heterogeneidad intratumoral sin encontrar correlación directa con el pronóstico clínico [170]. Barth et al., con un panel similar, observaron una transición fenotípica de CIS hacia tumores invasivos, con pérdida de marcadores luminales e incremento de basales, lo que sugiere un cambio de fenotipo luminal a basal con posibles implicaciones terapéuticas [171].

La clasificación molecular basada en IHC también predice la eficacia de la quimioterapia intravesical en pacientes con CVNMI, particularmente en subtipos basales. Tumores clasificados como basales mediante IHC han mostrado mayor sensibilidad y mejor supervivencia libre de progresión cuando son tratados con gemcitabina y cisplatino, en comparación con otros subtipos [172]. Estos hallazgos destacan la importancia de la

estratificación molecular mediante IHC para optimizar estrategias terapéuticas y mejorar los resultados clínicos.

IHC también ha sido utilizada en estudios como el de Ottley et al., quienes evaluaron marcadores luminales, basales y de transición epitelio-mesénquima en casos de T1 de alto grado, explorando su papel como predictores de supervivencia específica por enfermedad y progresión a CVMI. Los marcadores luminales FOXA1 y SCUBE2 se asociaron significativamente con mejor supervivencia específica por enfermedad, mientras que los marcadores relacionados con transición epitelio-mesénquima no fueron predictores significativos [173].

Las discrepancias en la literatura respecto al uso de IHC como marcador subrogado en CVNMI se deben, en parte, a la diversidad de métodos empleados, estadios tumorales (Ta, T1, CIS) y grados tumorales (alto/bajo grado) en estos estudios [91].

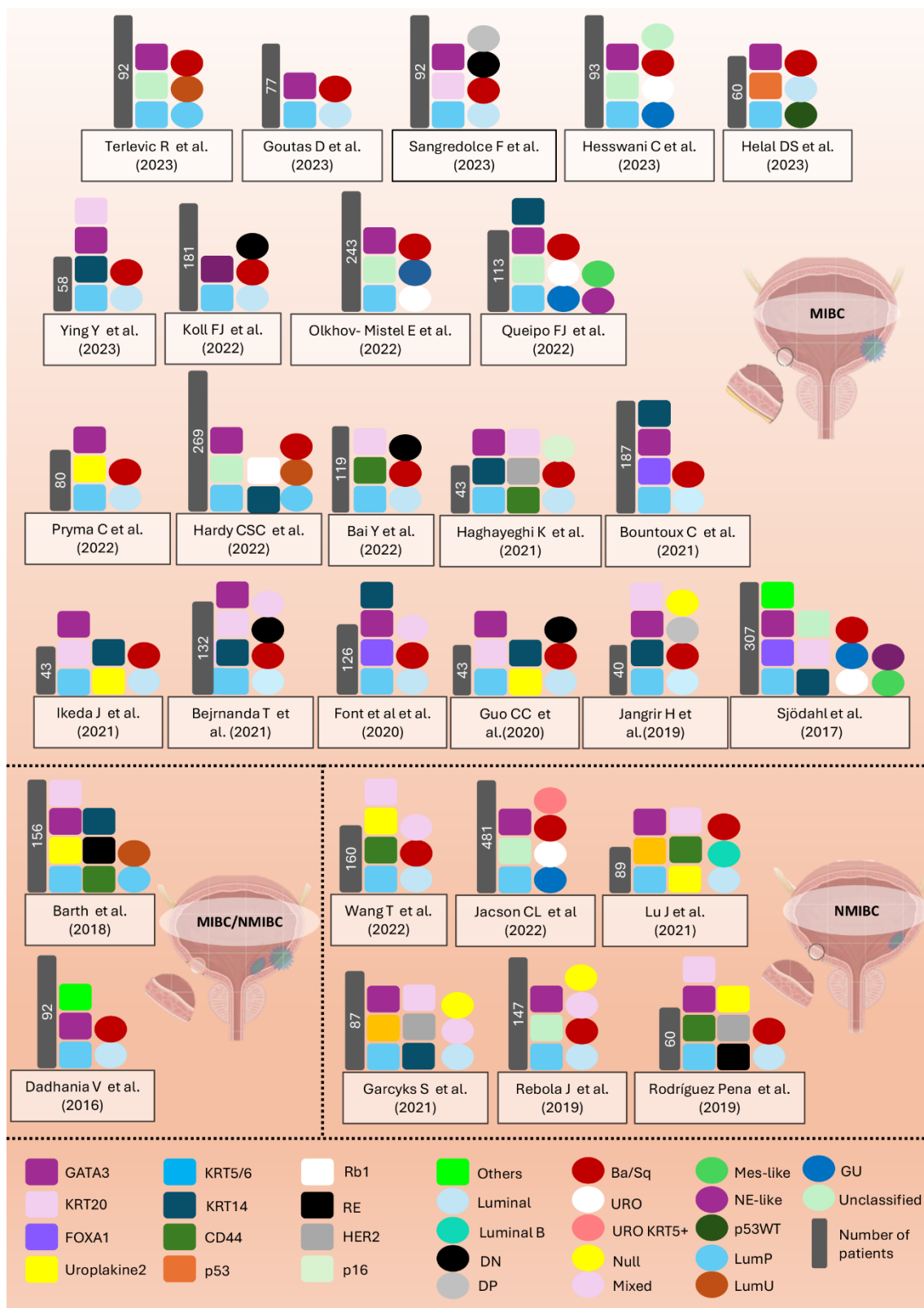


Figura 27. Resumen de los principales estudios sobre la subtipificación molecular del cáncer de vejiga (CV) mediante marcadores inmunohistoquímicos (IHC). La figura resalta los diferentes marcadores utilizados en diversos estudios desde 2016 hasta 2023, con un enfoque en el cáncer de vejiga invasivo en músculo (CVMI) y no invasivo en músculo (CVNMI). Cada estudio está representado con los marcadores correspondientes (cuadrados), el número de pacientes analizados y los subtipos identificados en cada estudio (círculos). Se incluye una clave en la parte inferior para descifrar los colores y marcadores empleados en la clasificación [43].

Tabla 10. Resumen de los principales marcadores de inmunohistoquímica utilizados para la clasificación molecular de los subtipos de cáncer de vejiga. La tabla resume los principales subtipos moleculares junto con sus marcadores inmunohistoquímicos asociados y las características clave de su expresión [43].

Molecular Subtypes	Immunohistochemistry Markers	Key Expression Markers
Luminal	GATA3, KRT20, Uroplakin2, FOXA1, HER2	High expression of GATA3 and KRT20; low levels of KRT5/6. Associated with urothelial differentiation
Basal/squamous (ba/sq)	KRT5/6, KRT14, p63, CD44	High expression of KRT5/6, KRT14, and p63
Genomically Unstable (GU)	p16, GATA3, HER2, CCDN1	High p16, GATA3, ERBB2, Low KRT5/6, KRT14. Associated with genomic instability and proliferation
Small cell/Neuroendocrine (Sc-Ne like)	Synaptophysin, chromogranin A, CD56	Expression of neuroendocrine markers; aggressive phenotype and poor differentiation
Mesenchymal like (Mes like)	Vimentin, CDH1	High Vimentin, CDH1, Low GATA3, KRT5/6. Associated with epithelial-mesenchymal transitions; low expression of luminal and basal markers

10. Tratamiento sistémico del cáncer vesical.

10.1 Introducción a la Neoadyuvancia

El tratamiento estandarizado para pacientes con CVMI es la CR, pero las tasas de supervivencia a los 5 años son alrededor de un 50% [174]. La recurrencia de la enfermedad tras CR es una preocupación, tanto a nivel local como sistémico. En torno a un 20-50% de los pacientes podrán presentar recidiva sistémica mientras que de un 10-15% lo harán de forma local. Para mejorar estos resultados se ha propuesto el uso de NAC en pacientes con alto nivel de evidencia [175]. Actualmente, las distintas asociaciones como la EAU [175], ASCO [176] o la SEOM- SOGUC [177] recomienda el uso de tratamiento sistémico con NAC y posterior CR en pacientes T2-4N0M0.

Los primeros estudios realizados emplearon un régimen de MVAC como el más eficaz con RPC de hasta el 38% [178]; sin embargo, dada la toxicidad de este régimen y en base a las equivalencia de SG y SLR similares a GC, pero con mayor tolerancia, han hecho que GC se convierta en el esquema más utilizado en la práctica clínica. Los ensayos aleatorizados más grandes utilizaron combinaciones de CMV o MVAC, y aunque GC demostró tasas similares de RPC del MVAC, tuvo un perfil de toxicidad mejor [179].

Tres metaanálisis respaldan el beneficio de NAC, con una mejora significativa de la supervivencia en pacientes en pacientes tratados con NAC y CR en comparación con tratamiento exclusivo de CR [180]. Uno de estos metaanálisis incluyó 3005 pacientes e informaron sobre una reducción del riesgo de mortalidad en un 9% con un aumento de la supervivencia global en 5 años de un 3% [181]. En otro trabajo englobaron 2605 pacientes, se obtuvo un beneficio en la supervivencia de 6,5% en combinación con cisplatino, y una RPC en 43% de los casos tratados con MVAC [182], diferencia que no fue encontrada en un metaanálisis con 3285 pacientes en RPC entre los esquemas de

cisplatino y MVAC, y que refirieron un mayor beneficio en supervivencia global en torno a un 8% [183]. Estos metaanálisis demostraron que NAC con esquemas de cisplatino obtienen un incremento en la supervivencia a 5 años entre el 5-8%.

Cerca de la mitad de los pacientes que reciben NAC en etapa avanzada logran RPc o una reducción significativa de la enfermedad antes de la cirugía. Aquellos que se benefician más de esta terapia son los que logran una respuesta completa [178, 183]. El problema es que no podemos predecir con precisión quiénes responderán bien a la NAC, lo que ha llevado a que algunos pacientes reciban un tratamiento innecesario y se retrase la cirugía, que podría ser potencialmente curativa, lo que afecta negativamente la supervivencia [183,184]. Además, se ha visto como pacientes que aún tienen tumor residual tras NAC y CR tienen peores resultados de supervivencia en comparación con aquellos que solo se someten a tratamiento quirúrgico [186].

Todo esto subraya la necesidad de investigaciones adicionales para determinar qué pacientes podrían beneficiarse más de NAC y buscar nuevos marcadores biológicos que nos ayuden a identificarlos. Hasta ahora, no contamos con una herramienta confiable que nos permita predecir qué pacientes responderán positivamente a la NAC. Sin embargo, cada vez hay más evidencia que sugiere que ciertos genes relacionados con la reparación del daño del ADN y clasificaciones moleculares podrían tener un papel importante en la predicción de la respuesta al tratamiento. Esto podría abrir la puerta a terapias dirigidas más precisas en el futuro, pero aún se requiere más investigación y validación prospectiva. En resumen, actualmente no tenemos suficiente evidencia para respaldar un cambio en la forma en que se utiliza la NAC basada en marcadores específicos de respuesta [187]. La capacidad de predecir de manera precisa qué pacientes responderán completamente a la quimioterapia podría evitar la necesidad de someterlos a CR, que conlleva riesgos y complicaciones significativas. Se han investigado varios indicadores, como datos clínicos, patológicos, moleculares y de imágenes médicas, para tratar de predecir esta respuesta completa. Sin embargo, hasta ahora, ninguno de los indicadores clínicos y patológicos tradicionales ha demostrado ser lo suficientemente preciso para predecir quiénes responderán completamente. Los estudios genómicos han mostrado más promesa en este sentido y han llevado al desarrollo de múltiples ensayos clínicos para evaluar si es posible preservar la vejiga en pacientes seleccionados [188].

10.2 Ventajas y desventajas de la NAC

Tabla 11. Ventajas y desventajas de NAC en CVMI

NAC	
Ventajas	Desventajas
- Tratamiento potencial de las micrometástasis tempranas, con reducción metastática a nivel microscópico (178). - Demostración “in vivo” eficacia de la quimioterapia que proporciona información pronóstica y orienta hacia terapias adicionales (78). - Posibilidad de reducir el tamaño del tumor primario sensible a la quimioterapia y facilitar la cirugía. - Mejor estado general previo a cirugía con mayor tolerancia a tratamiento. - Incremento de la supervivencia en pacientes respondedores (170-173). - No parece afectar a la morbi-mortalidad de la CR (179,180).	- Demora en la CR puede comprometer el resultado en tumores no quimiosensibles (175, 176). - La toxicidad, siendo la neutropenia el efecto adverso más frecuente secundario a toxicidad. Comparando los esquemas de MVAC y GC, presentan un supervivencia similar pero la toxicidad de este último es mucho menor (181). - Depende de la estadificación clínica y puede dar lugar a la administración innecesaria de quimioterapia en pacientes con sobreestadificación. Deben considerares las limitaciones de los métodos actuales en diagnóstico con sobre e infradiagnósticos del 70% (181).

10.3 Impacto de los subtipos moleculares en NAC

A pesar de ser una de las recomendaciones de tratamiento con el más alto nivel de evidencia para CVMI, todavía existe una subutilización de la NAC previa a CR. Las razones incluyen la toxicidad relacionada con el tratamiento y un modesto beneficio absoluto en la supervivencia, que varía entre el 5% y el 10%. La falta de biomarcadores tisulares para predecir la respuesta a la NAC en CVMI no que permitan reducir el sobretratamiento de pacientes que no responderán a la QT prequirúrgica, lo que representa una necesidad médica insatisfecha y un desafío importante para la comunidad de investigadores.

Hay múltiples estudios que han tratado de relacionar los subtipos moleculares con la respuesta a NAC. Estos subtipos moleculares se representan por fenotipos distintos con respuestas variables a tratamientos sistémicos. Se ha observado que las alteraciones genómicas en genes de reparación del ADN, como las mutaciones en ERCC2, y mutaciones en ATM, RB1 o FANCC, se asocian con una mejor respuesta a la quimioterapia neoadyuvante.

Uno de los primeros estudios en relacionar la NAC y los subtipos histológicos, planteo el concepto de la diversidad biológica y fenotipos asociados que conllevaban las clasificaciones moleculares y la asociación de los mismo con una terapéutica adecuada sobre todo en NAC con cisplatino [71].

Posteriormente se publican diversos estudios que respaldan el hecho de diferentes respuestas a NAC según el subtipo molecular. Uno de ellos emplea una cohorte de 343 muestras de RTU de pacientes con CVMI para investigar la capacidad de los subtipos moleculares para predecir la disminución patológica y la supervivencia después de la NAC [79]. Corroboraron las diferencias significativas en cuanto a supervivencia en los subtipos con y sin NAC. Los pacientes con tumores basales parecen obtener el mayor beneficio de la NAC. Estos tumores basales altamente proliferativos demostraron un mal pronóstico cuando se trataron solo con cirugía, pero su pronóstico mejoró drásticamente en la cohorte de NAC. Los tumores luminales fueron los de mejor pronóstico independientemente de la estrategia de tratamiento, por lo que no parecían beneficiarse de NAC; aunque los luminales- infiltrados categorizados por la clasificación de UCN parecen tener una respuesta limitada a NAC favoreciéndose de inmunoterapia con ICI. Y los tumores claudin-low enriquecidos con firma mesenquimales tienen el peor resultado independientemente del tratamiento con NAC. Aunque observaron relaciones claras entre la supervivencia general después de la NAC y los subtipos moleculares, no vieron un efecto claro en la respuesta patológica a la NAC, requiriendo por tanto una validación prospectiva.

El grupo de LUND ha publicado recientemente un trabajo sobre las diferentes respuestas a NAC en los subtipos moleculares [189]. Se realizó una clasificación de una cohorte retrospectiva de 149 pacientes mediante perfiles transcriptómicos tumorales e inmunohistoquímica y compararon la RPc en la muestra de cistectomía y la supervivencia en subtipos moleculares predefinidos. Los hallazgos más relevantes indicaron que los tumores clasificados como genómicamente inestables (GU) o luminal U (LumU) presentaron una mejoría significativa tanto en la RPc como en la supervivencia tras recibir NAC y someterse a cistectomía radical, independientemente del estadio tumoral. En contraste, los tumores ba/Sq mostraron peores tasas de RPc y una menor supervivencia específica de cáncer. Por otro lado, el subtipo rico en estroma, aunque presentó una tasa de RPc más baja, evidenció una mejor supervivencia específica de cáncer en comparación con el subtipo Ba/Sq. Estos resultados contrastan con hallazgos previos de estudios basados en la CMC, donde no se observaron diferencias

significativas en la supervivencia entre los subtipos moleculares tras el tratamiento con NAC y cistectomía. No obstante, al extrapolar las curvas de supervivencia, se sugiere que los subtipos Ba/Sq y luminal no especificado (Lum-NS) podrían tener una mayor respuesta a la NAC, aunque estos datos no son completamente consistentes entre estudios. El grupo de LUND también plantea una discrepancia con investigaciones anteriores que identificaban al subtipo claudin-low como el de peor pronóstico. Sin embargo, esta diferencia podría explicarse por el uso de sistemas de clasificación molecular distintos. De hecho, se ha sugerido que el subtipo claudin-low comparte características con el subtipo Ba/Sq descrito en la clasificación de Lund, lo que podría explicar los resultados desfavorables observados.

Las diferencias algo dispares en los resultados de los estudios que investigan la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante y los subtipos moleculares pueden atribuirse a diseños de estudio ampliamente variados con diferentes puntos finales de supervivencia, tratamientos y principios de selección, y posiblemente también a factores de confusión desconocidos. Además, los principales genes asociados con la respuesta variaron entre los conjuntos de datos de los diferentes estudios, lo que sugiere que estos resultados pueden deberse a diferencias reales entre las cohortes en lugar de a los métodos de clasificación utilizados.

Recientemente se ha publicado otro estudio que clasifica los subtipos moleculares por inmunohistoquímica en TMA y hablan sobre una mejor respuesta a NAC y supervivencia en los subtipos basales [159]. Sin embargo, este estudio incluyó una proporción desconocida de regímenes basados en carboplatino y pacientes con afectación de ganglios, y no informó sobre datos de supervivencia ajustados por estadio clínico del tumor.

Se reconoce por tanto la necesidad de investigaciones adicionales para comprender mejor los mecanismos de resistencia a NAC en CV.

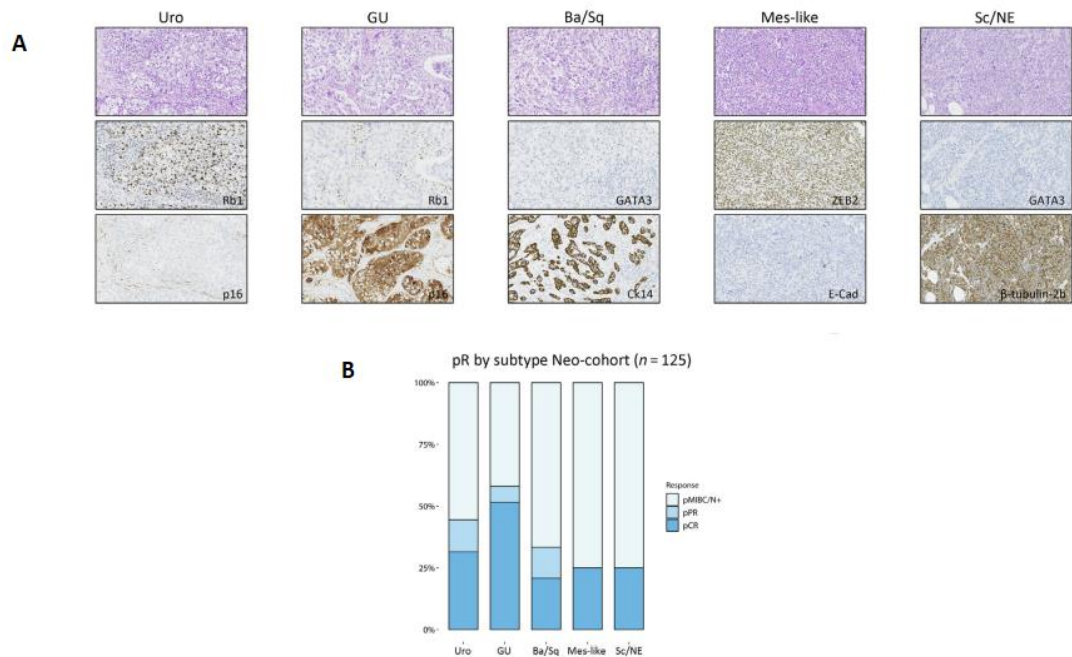


Figura 28. (A) Tinción con H-E (arriba), y dos inmunotinciones que definen subtipos (en medio y abajo) para un tumor representativo de cada uno de los cinco principales subtipos moleculares de la taxonomía de Lund. Los gráficos de barras apiladas muestran (B) la proporción que alcanza una respuesta patológica completa (pCR), respuesta patológica parcial (pPR) o que tiene enfermedad residual invasiva en músculo o con ganglios positivos (pMIBC/N+) en la Neo-cohort estratificado por clasificación basada en ARN en los cinco principales subtipos moleculares [188].

10.4. Otros biomarcadores y terapia dirigida

La taxonomía del CV no solo es una forma de categorizar y agrupar la diversidad de tumores, puede proporcionar información sobre respondedores a NAC o sensibilidad a ICI, además proporcionan información sobre biomarcadores predictivos de respuesta o por el contrario falta de respuesta al tratamiento. Todo ello supone una ventaja para el tratamiento personalizado del cáncer vesical [81].

La llegada de la inmunoterapia ha revolucionado el tratamiento de los pacientes no sensibles a cisplatino. PD-L1 es un marcador que ha cobrado bastante importancia este último tiempo, siendo aprobados distintos fármacos en esta línea para el tratamiento de carcinoma urotelial y tracto urinario superior localmente avanzado o metastásico, ya que se considera factible y efectivo el tratamiento basado en anti PD-L1 como atezolizumab, durvalumab, y el recientemente aprobado por la EMA avelumab; y anti-PD-1 pembrolizumab y nivolumab [190]. La guía ESMO recomienda el tratamiento con inmunoterapia anti PDL- 1 o anti-PD-1 en segunda línea de tratamiento, o en primera línea en pacientes no sensibles a cisplatinos, y el mantenimiento con avelumab de los tumores que no están progresando tras tratamiento QT con cisplatino de primera línea [191].

La diversidad de anticuerpos para la valoración de PD-L1, así como la variabilidad de cut-off y la posible carga mutacional asociada son limitaciones que supone la valoración actual de PD-L1. Parece que altos niveles de expresión de PD-L1 detectados por IHC se correlacionan con CV más agresivos y probablemente sugieren que es pronóstico [192]. Hay varios estudios que correlacionan el estudio de los perfiles moleculares, variantes histológicas con expresión de PD-L1 o respuesta a ICI [193]. En el ensayo de IMvigor-210 [194] que categoriza según basal o luminal acorde a los criterios del TCGA, el subtipo basal es el más enriquecido con PD-L1 en células tumorales; en el ensayo de Checkmate-275 [195] se observó mejor respuesta a ICI en el subtipo basal. A partir de estos estudios se han desarrollado otros en pacientes con carcinoma urotelial no metastásico con NAC. El ensayo PURE-01 [196], que engloba pacientes precistectomizados con tratamiento con pembrolizumab y cuyo objetivo fue valorar la RPC, tras la cistectomía y con 3 ciclos previos de pembrolizumab se evidenció que un 42% presentaron RPC y el 54% restante una respuesta parcial con estadio <pT2. Aunque la conclusión de este ensayo favorece que pembrolizumab podría ser validado como tratamiento neoadyuvante, aún existe incertidumbre en la aplicación clínica de la carga tumoral e IHC de PDL-1.

Se están investigando numerosos biomarcadores en el CV, tanto para diagnóstico como para tratamiento. Dado que el CV es muy complejo a nivel molecular, no es posible utilizar un solo gen o proteína como marcador predictivo o diana terapéutica. Si bien, se están identificando nuevos objetivos en el CV, como FGFR3, EGFR, la vía PI3K/AKT/mTOR, VEGFR, COX2, Aurora kinase A y ARNm. Estos son ejemplos de una nueva generación de terapias dirigidas basadas en biomarcadores.

Se observan mutaciones de FGFR3 en un 60% de los CVNMI y en torno a un 15% en los CVMl. Los tumores luminales están enriquecidos en FGFR3, RAS y PPARG [81]. FGFR3 es diana terapéutica y el fármaco empleado es el erdafitinib, su uso se asoció con una respuesta tumoral objetiva en el 40% de los pacientes previamente tratados que tenían carcinoma urotelial localmente avanzado e irresecable o metastásico con mutaciones o fusiones en FGFR [197]. Según estos hallazgos, la FDA aprobó el uso de erdafitinib en 2019 para pacientes con cáncer de vejiga metastásico o localmente avanzado que habían progresado después de recibir QT estándar con cisplatino y que tenían alteraciones en los genes FGFR3 o FGFR2. En estos pacientes, la respuesta al tratamiento puede verse influenciada por la heterogeneidad en diferentes áreas del mismo tumor [152]. Además, aproximadamente un 15% de los pacientes con carcinoma urotelial luminal tenían mutaciones activadoras en el gen PPARG, y tratamientos dirigidos a menudo generan respuestas excelentes, pero solo en una minoría de pacientes.

Se han realizado análisis genómicos para encontrar nuevos targets terapéuticos. En uno de estos estudios [197] el 60% de los tumores tienen alteraciones potencialmente tratables ya que presentaban “dianas” para tratamiento dirigido. Informaron de una importante heterogeneidad genómica, que incluye mutaciones de ERBB2/HER2, BRAF, TSC1, FGFR3 y PIK3CA; deleciones de PTEN; y amplificaciones de FGFR1, CCND3, CCND1

y MDM2. El estudio respalda la caracterización genómica previa al tratamiento para reforzar la terapia específica, pero concluye que el fracaso de terapias dirigidas no es por la falta de dianas terapéuticas identificables, sino más bien por la heterogeneidad genómica de la enfermedad [152].

Uno de los nuevos biomarcadores que está ganando importancia es Nectina-4, la cual se expresa en la superficie de las células en el 80% de los cánceres de vejiga. Enfortumab vedotin es el anticuerpo diana para la Nectina-4, y no se requiere la expresión de Nectina-4 para aplicar la terapia con enfortumab en pacientes con CV [198,199].

Actualmente las investigaciones están dirigidas a la búsqueda de biomarcadores o firmas predictoras de respuesta a NAC y saber que pacientes se beneficiarían o no de esta terapia. La quimioterapia sistémica puede afectar la evolución del cáncer, limitando la clonalidad asociada al tumor y, en última instancia, conduciendo a la resistencia al tratamiento en el carcinoma urotelial [152].

El estudio de Font et al. en 2023 busca identificar una firma predictiva de respuesta a la NAC que integre puntuación clínica, subtipo taxonómico y expresión génica [200]. Recopilaron 81 pacientes y analizaron 41 genes relacionados con reparación del daño del ADN y respuesta inmune; los genes relacionados con la respuesta patológica se identificaron mediante regresión logística penalizada LASSO. LASSO seleccionó ocho genes para incluir en la firma, pero la precisión predictiva más alta se observó cuando el modelo incluyó solo tres genes (RAD51, IFN γ , CHEK1) y vieron que tenía una mayor capacidad predictiva que la puntuación clínica más el subtipo taxonómico o solo la puntuación clínica, asociándose además a mayor SG y SSE.

II. PLANTEAMIENTO DEL TEMA Y OBJETIVOS

El CV es la novena neoplasia más común a nivel mundial, con aproximadamente 614.298 nuevos casos anuales y una alta incidencia en Europa Occidental y América del Norte, donde la carga de la enfermedad continúa aumentando. Es el tumor más frecuente del tracto urinario, representando un problema de salud global significativo debido a su alta incidencia, recurrencia y coste sanitario asociado. En España, se estimaron 21.860 casos nuevos de cáncer de vejiga en 2023, con una incidencia significativamente mayor en hombres (17.364 casos) en comparación con mujeres (4.496 casos). Esta diferencia refleja una proporción de aproximadamente 3:1 entre hombres y mujeres. Además, la incidencia aumenta con la edad, alcanzando su pico entre los 50 y 70 años. Todo ello representa una carga importante de enfermedad, considerándose como una de las patologías que más recursos sanitarios consume debido a su incidencia, cronicidad, morbi-mortalidad y elevado coste de los tratamientos.

El CV se clasifica en dos categorías principales: CVNMI y CVMI. El CVNMI representa aproximadamente el 75% de los casos y se caracteriza por una alta tasa de recurrencia tras la RTU. En tumores con histología de alto grado y/o invasión subepitelial temprana, el tratamiento estándar incluye inmunoterapia intravesical con BCG. A pesar de estas estrategias terapéuticas, entre un 20-30% de los CVNMI de alto riesgo progresarán a CVMI, lo que resalta la necesidad de una estratificación adecuada de los pacientes para optimizar su tratamiento.

Por otro lado, el CVMI, que constituye alrededor del 25% de los casos, se asocia a una progresión más rápida y un peor pronóstico debido a su tendencia a desarrollar metástasis tempranas. El tratamiento estándar incluye la cistectomía radical con o sin NAC. Sin embargo, a pesar de este enfoque, la supervivencia a cinco años apenas alcanza el 50%. Además, la recurrencia continúa siendo un desafío clínico importante, tanto a nivel local (10-15% de los pacientes) como sistémico (20-50% de los pacientes).

Aunque se ha demostrado que la NAC aumenta la supervivencia a 5 años entre un 5-8%, su uso sigue siendo limitado debido a problemas relacionados con la toxicidad, la selección de pacientes adecuados y la dificultad para predecir la respuesta al tratamiento.

La capacidad para identificar biomarcadores confiables que predigan la respuesta a la NAC sigue siendo un desafío en la práctica clínica. A pesar de los avances en la evaluación clínica y patológica, los factores clásicos como el estadio tumoral, el grado histológico y la afectación ganglionar han demostrado ser insuficientes para predecir con precisión los resultados clínicos debido a la heterogeneidad biológica del CV y la subjetividad inherente a las evaluaciones histopatológicas.

En este contexto, los estudios genómicos han permitido avanzar en el entendimiento del CV, y se han establecido clasificaciones moleculares del CV en subtipos distintos, destacando principalmente dos grupos: luminal y basal. Estos subtipos exhiben comportamientos clínicos diferenciados y sensibilidades específicas a la NAC. Los

tumores luminales suelen asociarse con mejores tasas de supervivencia y una menor sensibilidad a la NAC, mientras que los tumores basales, aunque más agresivos, muestran una mayor sensibilidad a la NAC.

A pesar de estos avances, la aplicación clínica de la clasificación molecular supone desafíos importantes debido a la complejidad técnica, los costes elevados y la falta de protocolos estandarizados. Ante estas limitaciones, la inmunohistoquímica ha surgido como una posible herramienta accesible y eficaz para identificar de forma subrogada subtipos moleculares previamente identificados mediante análisis transcriptómicos.

Su validez y utilidad vendrán dadas por la elección de marcadores IHC adecuados, así como del método de cuantificación y algoritmo, que deberían ser estandarizados y fáciles de utilizar. El primer desafío radica en determinar la combinación óptima y el número adecuado de marcadores, así como establecer el método más fiable de cuantificación, para poder clasificar eficazmente a los pacientes en los diferentes subtipos, idealmente tras aplicar un algoritmo diagnóstico simple, y a ser posible tanto para el CVMI como para los CVNMI, pocas veces estudiados estos últimos en la clasificación molecular del CV.

Los biomarcadores inmunohistoquímicos más utilizados incluyen KRT20, KRT5, KRT14, FOXA1 y GATA3. El análisis de estos biomarcadores ha permitido diferenciar con precisión los subtipos luminal y basal. En el subtipo basal, la expresión de KRT5/6 y la ausencia de KRT20 son características clave, mientras que en el subtipo luminal la alta expresión de KRT20 y la ausencia de KRT5/6 son distintivas. Además, el biomarcador GATA3 se ha consolidado como un marcador confiable para diferenciar entre estos subtipos. Estos hallazgos sugieren que, con pocos marcadores de uso rutinario, la IHC puede ser una herramienta eficaz para identificar subtipos moleculares en un entorno clínico estándar, facilitando la estratificación precisa de pacientes, la predicción de la respuesta a NAC y una mejor personalización o elección de las terapias.

A pesar de estos avances, persisten desafíos relacionados con la reproducibilidad de los resultados, la estandarización de protocolos y la interpretación de los biomarcadores. Por ello, con este estudio se persigue examinar la utilidad de la IHC como uso subrogado de la clasificación molecular del CV para lo cual nos planteamos los siguientes objetivos:

Objetivo General:

El presente estudio persigue analizar el papel de las técnicas IHC, utilizando anticuerpos de rutina, como marcadores subrogados de los subtipos transcriptómicos de las clasificaciones moleculares del CV, tanto en CVMI como en los menos estudiados CVNMI; así como explorar su capacidad predictiva de respuesta a la NAC, con el fin de ayudar a la implementación de la clasificación molecular en la práctica clínica, utilizando la IHC como herramienta, predictiva y pronóstica, útil, fácil de usar y económica, para contribuir a una medicina personalizada y efectiva en el manejo de esta patología.

Para acometer el objetivo general, se contemplan los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar y establecer el número mínimo de proteínas o biomarcadores necesarios para poder obtener un algoritmo inmunohistoquímico válido como marcador subrogado de los subtipos moleculares del CV.
2. Clasificar los tumores de nuestra cohorte en, al menos, los dos grandes subgrupos establecidos, luminales y basales, mediante algoritmo inmunohistoquímico.
3. Determinar la tasa de precisión de la clasificación molecular subrogada de nuestro estudio, comparando los resultados obtenidos con los reportados en estudios previos.
4. Correlación de los subtipos moleculares con parámetros clínico-patológicos y de supervivencia global, en CV con y sin tratamiento neoadyuvante.
5. Verificar si los subtipos moleculares categorizados con IHC tienen valor pronóstico y/o predictivo de respuesta a NAC.
6. Análisis de la variabilidad interobservador en la evaluación de la expresión de los marcadores inmunohistoquímicos.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño de estudio y población a estudio

Se trata de un estudio de cohorte retrospectivo donde se han seleccionado 139 casos de pacientes tratados con NAC asociado a platino y pacientes no NAC, diagnosticados de CVMI tras procedimiento de RTU, desde 2010 hasta 2019 en el Hospital Universitario “Virgen de la Victoria” de Málaga. Se recopilaron tanto las RTU como las piezas quirúrgicas del mismo paciente.

Criterios de inclusión

- Pacientes mayores de 18 años diagnosticados en Unidad de Urología del Hospital Universitario Virgen de la Victoria
- Paciente con tumores primarios y diagnóstico histológico confirmado en RTU de CVMI
- Pacientes con historia previa de CVNMI de alto riesgo que presenten un tamaño superior o igual a 3cm. En caso de que el tamaño tumoral sea igual a 3cm se incluirán si existe multiplicidad.
- Casos con muestras histológicas disponibles (cortes originales de H-E, así como bloques de parafina) que fuesen representativas y en los que se pudiesen determinar componente de músculo-infiltración.

Criterios de exclusión

- Pacientes diagnosticados exclusivamente con métodos de imagen sin estudio histológico de confirmación.
- Aquellos casos que presentaban otra patología oncológica
- Falta de tejido tumoral disponible por el centro

Se ha realizado un estudio retrospectivo preliminar de 152 pacientes desde 2010 hasta 2019 para evaluar sus características clinicopatológicas tanto en muestras de RTU como en muestras quirúrgicas. Sin embargo, estos criterios han hecho que, al final de la selección, se hayan reducido el número de casos estudiados, resultando en una población final de 139 pacientes debido a la falta de datos (como la ausencia de algunos marcadores de IHC para la agrupación) o a la falta de tejido tumoral disponible. La información fue recolectada a través de una revisión retrospectiva de registros clínicos y patológicos.

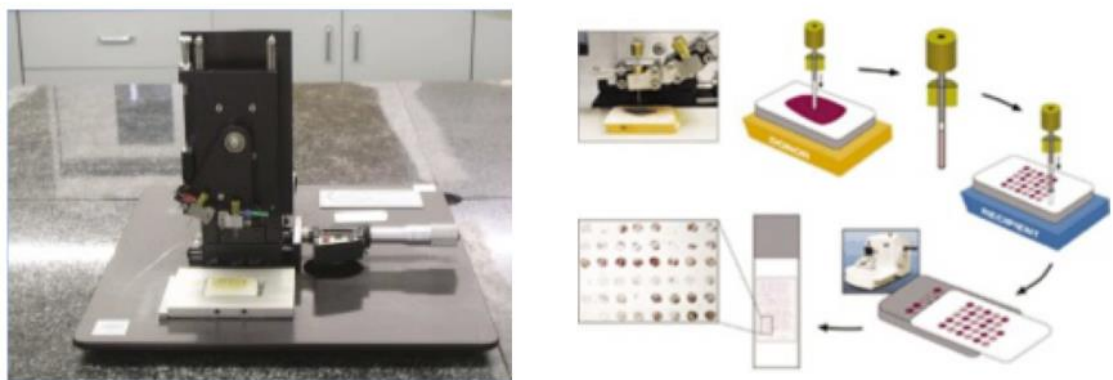
2. Metodología

2.1 Realización de los TMA “Tissue Array” /matrices tisulares

Los bloques RTU y pieza quirúrgica fijados con formol e incorporados en parafina se revisaron y recolectaron del repositorio de biobancos del Hospital. Previa a la búsqueda y obtención de bloques se realizó un análisis de los informes anatomopatológicos.

Posteriormente, se hizo una revisión de las preparaciones histológicas correspondientes para seleccionar el bloque y las áreas más representativas tumorales en H-E. Se extrajeron 3 cilindros centrales de 1 mm, basándonos en estudios previos realizados por el grupo de investigación, para construir las TMA. Todas las preparaciones y los bloques de parafina seleccionados para confeccionar los TMA de los tejidos neoplásicos correspondientes fueron remitidos a la Unidad de Apoyo a la Investigación Oncopatológica UMA de Málaga.

Para la creación de los TMA, se utilizó un dispositivo arrayer de tejidos manual (Beecher Instruments). Los TMA también incluyeron muestras de tejido hepático normal como control de la reactividad del tejido neoplásico, y por cada caso se extrajeron 3 cilindros tumorales, construyéndose finalmente 11 bloques de parafina con 80 cilindros de tejido tumoral en cada uno de ellos y 8 controles de tejido hepático, excepto en el último TMA realizado que se incluyeron 18 casos más 3 controles.



		TMA											
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
9	CONTROL HIGADO							12B2435		CONTROL HIGADO			
8	CONTROL HIGADO												
7	CONTROL HIGADO		12B2435			CONTROL HIGADO							
6	CONTROL HIGADO												
5	CONTROL HIGADO												
4											CONTROL HIGADO		
3			CONTROL HIGADO										
2								CONTROL HIGADO			12B2435		
1													CONTROL HIGADO

Figura 29. Arrayer, realización TMA, Plantilla

2.2 Protocolo inmunotinción

Previo a la tinción inmunohistoquímica de los cortes de TMA, se procedió a determinar el método de desenmascaramiento antigénico más apropiado, en cortes de tejido control de conocida positividad.

Se realizaron secciones consecutivas del bloque de parafina TMA de 4-5 micras de grosor y se montaron en portaobjetos recubiertos (ChemMate, Dako) con tinción H-E.

Antes de la inmunotinción los cortes de tejido fueron sometidos a un proceso de desenmascaramiento antigénico. La técnica inmunohistoquímica se ha llevado a cabo en los equipos de inmunotinción automatizada DAKO TechMate Horizon y Autostainer, usando como método de visualización de la reacción antígeno-anticuerpo el sistema EnVision (DAKO). De forma resumida: se realizó bloqueo de la peroxidasa endógena (DAKO Peroxidase Block), incubación con anticuerpo primario, incubación con el polímero marcado y luego con el sustrato cromógeno (DAB), contratinción con hematoxilina y montaje. Como control de calidad, cada grupo de inmunotinciones se ha realizado con un determinado anticuerpo, incluyendo un correspondiente control positivo y un control negativo, donde el anticuerpo primario fue sustituido por suero no inmune de la misma especie que el anticuerpo primario.

2.3 Marcadores inmunohistoquímicos

Se utilizaron los siguientes anticuerpos: KRT20 (Ks20.8, Dako), KRT5 (PRB-160P, Covance), KRT14 (PRB-155P, Covance), FOXA1 (ab170933, Abcam), FGFR3 (B9, Santa Cruz), GATA3 (CM405A, BIOCARE), p53 (IR616, Dako), Ki67 (IR626, Dako), COL11A1 (Oncomatrix). La valoración de cada TMA fue llevada a cabo por dos patólogos distintos para establecer variable interobservador.

Todos los anticuerpos son monoclonales, se han obtenido de sobrenadante de cultivo purificado, pre-diluido en un polímero sintético orgánico lineal en solución tamponada (pH 7.4) que contiene un agente bacteriostático y bactericida, listos para su uso.

2.4 Valoración e interpretación de la inmunotinción

Los datos de tinción inmunohistoquímica se han obtenido tras la observación y cuantificación de los cortes de TMA de cada anticuerpo a través de un microscopio óptico. Se realizó la evaluación de las matrices de forma manual y a doble ciego (dos facultativos patólogos independientes). Con cada marcador inmunohistoquímico realizado, independientemente del control externo, se valoró un control positivo interno a la propia muestra (las células epiteliales normales, linfocitos y/o células estromales, dependiendo del marcador).

Se registró la proporción de células reactivas (0-100%) y la intensidad de la tinción que puede variar de 0 a 3 (0: sin tinción; 1+: débil; 2+: moderada; 3+: fuerte. Calculando posteriormente el HS ($H\text{-score} = \sum(I \times P)$), donde I es la intensidad de la tinción, y P es el porcentaje de células que muestran esa intensidad, registrado con un rango de 0-300. El promedio de las puntuaciones se utilizó para el análisis.

Los patrones de tinción de los marcadores seleccionados fueron

- Citoplasmáticos: KRT20, KRT5, KRT14
- Nucleares: FGFR3, FOXA1, GATA3, p53, Ki67

La metodología de TMA ha permitido un análisis más simplificado debido al estudio simultáneo de un gran número de muestras, y, por otro lado, supone un gran ahorro en reactivos sobre el uso de cortes titulares completos. Los resultados estadísticos son más fiables, dado el elevado número de casos que se pueden analizar con este método. El empleo del inmunoteñidores automáticos ha facilitado la estandarización de condiciones para todos los casos de la serie, evitando la variabilidad metodológica. El uso de EnVision (polímero marcado con enzima) como método de visualización de la reacción inmunohistoquímica ha evitado la tinción inespecífica de biotina endógena que aparece frecuentemente con el sistema avidina-biotina, facilitando así la visualización del anticuerpo, por ser altamente sensible y con notable amplificación de la señal.

2.5 Variables estudiadas

2.5.1 Variables Clínico-Patológicas

- **Número de historia clínica.** Se utilizó como "dato identificativo" de cada caso.
- **Edad al diagnóstico.** Se consideró la edad datada por cada paciente en el momento de diagnóstico en RTU. Se definió como una variable de confusión numérica.
- **Sexo.** Variable de confusión numérica (0: "masculino", 1: "femenino")
- **Fumador.** Variable confusión numérica (0: "No", 1: "Sí")
- **Síntomas de inicio.** Se recogió como una variante nominal que recoge 5 circunstancias. (0: "hematuria", 1: "uropatía obstructiva", 2: "síndrome constitucional", 3: "STUI", 4: "seguimiento TV")
- **Indicador cistectomía.** Se definió como variable nominal-categorica (0: "CVNMI multirecidivante", 1: "CVMI")
- **Enfermedad extravesical al diagnóstico.** Se definió como una variable de confusión numérica (0: "No", 1: "Sí")

-**Metástasis viscerales.** Se definió como una variable de confusión numérica (0: "No", 1: "Sí")

- **NAC.** Variable confusión numérica (0: "No", 1: "Sí")

- **Respuesta NAC.** Variable nominal que recoge 3 tipos de respuesta, (0: "TRG1, regresión completa tumoral", 1: "TRG2, >50% regresión tumoral", 2: "TRG3 <50% regresión tumoral").

- **Tipo de NAC.** Variable nominal que recoge tres tipos de tratamiento (0: "Gemcitabina-cisplatino", 1: "MVAC", 2: "carboplatino-gemcitabina")

- **Éxito.** Se clasificó como una variable nominal definida por causa de muerte específica y no específica. (0: "No", 1: "cáncer-específico", 2: "otras causas").

- **Seguimiento de los pacientes.** La recogida de datos de los pacientes se ha realizado a través del Registro Hospitalario de Tumores (RHT), encargado de la recopilación de unos datos mínimos del paciente y de actualizar el seguimiento anualmente. Los datos de seguimiento de los pacientes recogidos han permitido determinar la supervivencia global en meses. Para lo cual, también se recogieron datos como:

1. La fecha de diagnóstico (día-mes-año).
2. Fecha de recidiva posterior (día-mes-año).
3. La fecha de última revisión (día-mes-año).
4. El estado del paciente en la última revisión (E.U.C.), que se tabuló según los siguientes criterios:
 1. Paciente vivo, sin enfermedad
 2. Paciente vivo, con enfermedad
 3. Paciente muerto, por enfermedad
 4. Paciente muerto, por otras causas
 5. Paciente perdido para seguimiento

En el caso de los pacientes fallecidos, se recogió también la variable fecha de fallecimiento (día-mes-año). Mientras que en los casos de los pacientes vivos (EUC de tipo 1, 2 ó 5), se recogió la fecha del último contacto (día-mes-año). A partir de estas fechas y del estado del paciente, se calculó la supervivencia global (en meses); la cual se describe como la diferencia entre la fecha de última de revisión/fallecimiento y la fecha de diagnóstico. La variable supervivencia es numérica de tipo continuo y será la variable dependiente del estudio.

2.5.2 Variables histopatológicas

- **Histología.** Esta es una variable que hace referencia a lo subtipos de carcinoma vesical. Dado el tipo de estudio retrospectivos y la variabilidad en las últimas clasificaciones histológicas de la OMS. Se determinaron las siguientes variables ajustadas a la 5ª y última edición. (0: “urotelial”, 1: “diferenciación escamosa”, 2: “micropapilar”, 3: “adenocarcinoma”, 4: “no tumor”, 5: “sarcomatoide”, 6: “nested”).

- **Gradación tumoral.** Variable nominal categórica (0: “bajo grado” LV, 1: “alto grado”).

- **Invasión LV en RTU.** Variable confusión numérica (0: “No” LV, 1: “Si” LV).

- **Estadíaje patológico postquirúrgico.** Estadío patológico. Se definió como una variable nominal, categorizada según los diferentes estadios patológicos adecuándolo al sistema TNM 2017. (0: “pT0”, 1: “pT1”, 2: “pT2”, 3: “>pT2 (T3-T4)

La descripción general del sistema TNM específicamente para el cáncer vesical se basa en:

- T (Tumor): Esta categoría describe el tamaño y la extensión del tumor primario en la vejiga. Se subdivide en varias etapas:
 - TX: El tumor primario no puede ser evaluado.
 - T0: No hay evidencia de tumor en la vejiga.
 - Ta: Carcinoma in situ (CIS) o tumor papilar no invasivo.
 - Tis: Carcinoma in situ (CIS) que se encuentra en el epitelio vesical.
 - T1: El tumor ha invadido la submucosa de la vejiga.
 - T2: El tumor ha invadido la capa muscular de la vejiga.
 - T3: El tumor ha invadido la grasa perivesical.
 - T4: El tumor se ha extendido a estructuras adyacentes, como próstata, útero, vagina, pared abdominal o pelvis ósea.
- N (Ganglios linfáticos): Esta categoría describe si hay presencia de metástasis en los ganglios linfáticos cercanos a la vejiga. Las opciones son:
 - NX: Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados.
 - N0: No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
 - N1: Hay metástasis en un solo ganglio linfático pelviano.
 - N2: Hay metástasis en múltiples ganglios linfáticos pelvianos.
 - N3: Hay metástasis en ganglios linfáticos en la región lumboaórtica o a distancia.
- M (Metástasis): Esta categoría describe si el cáncer se ha propagado a otras partes del cuerpo, más allá de la vejiga y los ganglios linfáticos regionales. Las opciones son:

- MX: Metástasis a distancia no puede ser evaluada.
- M0: No hay evidencia de metástasis a distancia.
- M1: Hay evidencia de metástasis a distancia, que puede incluir órganos como el hígado, los pulmones o los huesos.

2.5.3 Variables inmunohistoquímicas

Cada marcador inmunohistoquímico, según los requerimientos de patrón de tinción, ha sido evaluado e interpretado como sigue:

- **KRT20/KRT14/KRT5:** Se ha realizado una evaluación semicuantitativa, en base a la intensidad y % del total de células positivas de cada caso. Se recogen 4 ítems fundamentales por cada marcador:
 - % total células tumorales positivas. Contabilizando el número de células tumorales con tinción de membrana positivos en 3 campos de gran aumento (40x) por cada cilindro de la matriz y realizando la correspondiente media aritmética entre los tres campos. De la interpretación que se deriva es una variable numérica continua que se ha recogido como porcentaje (%) de células tumorales positivas, donde 0% es ninguna célula teñida y 100% es todas las células teñidas.
 - Intensidad. Se le asocian 4 valores 0 a 3, usando mucosa normal adyacente como mediana. Interpretándose de la siguiente forma:
 - 0: ausencia de tinción.
 - 1+: débil tinción.
 - 2+: moderada tinción.
 - 3+: tinción fuerte.
 - Media recogida de la valoración de cada patólogo. Recordando que la valoración de la expresión de los distintos marcadores inmunohistoquímicos biomoleculares se ha llevado a cabo, de forma independiente, por dos observadores (facultativos patólogos)
 - HISTOSCORE. Sistema de puntuación que permite cuantificar el anticuerpo en función de la intensidad y la proporción de células positivas, definiéndose por tanto como el producto de (% de células reactivas) x (intensidad), y oscila en un rango 0-300.
- **FOXA1/GATA3/FGFR3/p53/Ki67:** Se ha realizado una evaluación una semicuantitativa, en base a la intensidad y % del total de células positivas de cada caso. Se recogen 4 ítems fundamentales por cada marcador:
 - % total células tumorales positivas. Contabilizando el número de células tumorales con tinción nuclear positiva en 3 campos de gran aumento

(40x) por cada cilindro de la matriz y realizando la correspondiente media aritmética entre los tres campos. De la interpretación se deriva es una variable numérica continua que se ha recogido como porcentaje (%) de células tumorales positivas, donde 0% es ninguna célula teñida y 100% es todas las células teñidas.

- Intensidad. Se le asocian 4 valores de 0 a 3, usando mucosa normal adyacente como mediana. Interpretándose de la siguiente forma:
 - 0: ausencia de tinción.
 - 1+: débil tinción.
 - 2+: moderada tinción.
 - 3+: tinción fuerte.
- Media recogida de la valoración de cada patólogo. Recordando que la valoración de la expresión de los distintos marcadores inmunohistoquímicos biomoleculares se ha llevado a cabo, de forma independiente, por dos observadores (facultativos patólogos).
- HISTOSCORE. Sistema de puntuación que permite cuantificar el anticuerpo en función de la intensidad y la proporción de células positivas, definiéndose por tanto como el producto de (% de células reactivas) x (intensidad), y oscila en un rango 0-300.

Se ha calculado la media entre valoraciones de patólogos obteniendo un único valor por marcador. En caso de discordancia, fue revisado de nuevo el caso para llegar a un acuerdo por consenso y, cuando fue necesario (discrepancias mayores), se solicitó la intervención de un tercer observador independiente.

En cuanto al valor asignado cuando en el TMA faltaba un cilindro se asignaba el valor 8888, y si en el TMA hay zona sin tumor 9999.

Una vez realizadas las medias de cada anticuerpo, se seleccionaron FOXA1, GATA3, KRT14, KRT5, KRT20, p53, Ki67 para realizar un estudio clúster-dirigido. Revisando la literatura se han encontrado pocas publicaciones que hablen sobre el estudio clústeres dirigido por inmunohistoquímica, estableciendo los siguientes grupos (Font A, et al. 2020):

Tabla 12. Estudio inmunohistoquímico empleado en Font A et al [159]

Basal- squamous-like	Luminal-like	Mixed
FOXA1: LOW	FOXA1: HIGH	FOXA1: HIGH
GATA 3: LOW	GATA 3: HIGH	GATA 3: HIGH
KRT 5/6: HIGH	KRT 5/6: LOW	KRT 5/6: HIGH
KRT14: HIGH	KRT14: LOW	KRT14: LOW

El algoritmo que hemos utilizado para generar las agrupaciones, o **clusters**, es dependiente de los datos originales y no requiere ni utiliza puntos de corte para definir las agrupaciones, lo que lo diferencia de los modelos de clasificación supervisada. En este trabajo, se empleó el algoritmo **K-means** como método para realizar un análisis no supervisado de agrupación, permitiendo identificar patrones entre los datos. Este enfoque es particularmente útil cuando no se dispone de información previa sobre las categorías que podrían existir. Sin embargo, es crucial considerar ciertas particularidades asociadas a este tipo de análisis:

1. **No son agrupaciones necesariamente replicables:** Los clústeres generados por K-means dependen de las características específicas de los datos utilizados en cada análisis. Por ello, si el procedimiento se repitiese con un nuevo conjunto de datos, no necesariamente se obtendrían las mismas agrupaciones. Esto resalta la importancia de interpretar los resultados dentro del contexto del conjunto de datos analizado.
2. **No permite clasificar nuevos datos:** A diferencia de los algoritmos supervisados, los análisis no supervisados, como K-means, no generan modelos que puedan aplicarse a datos futuros para clasificarlos en las agrupaciones definidas previamente. En este sentido, herramientas como los árboles de decisión o algoritmos basados en distancias, como **K-Nearest Neighbors**, ofrecen un enfoque supervisado capaz de clasificar nuevos datos en categorías específicas. Sin embargo, K-means se centra exclusivamente en descubrir las relaciones inherentes entre los datos del conjunto original.
3. **No existe un punto de corte definido para crear los grupos:** Las agrupaciones generadas por K-means se forman optimizando la variabilidad intra-grupo (dentro de cada grupo) y la variabilidad inter-grupo (entre los grupos), sin establecer límites predefinidos. Este proceso asegura que las muestras se asignen al grupo más cercano en función de la distancia a los centroides calculados, evitando la necesidad de puntos de corte arbitrarios.

En este trabajo, además del análisis no supervisado mediante el algoritmo K-means, se llevó a cabo un árbol de decisión como herramienta de clasificación supervisada. Este método nos permitió avanzar hacia un modelo diagnóstico basado en las características

de los datos, diferenciándose de los clústeres generados por K-means, que son únicamente descriptivos. En nuestro caso, el árbol se construyó a partir de sucesivas ramificaciones en las que se utilizó uno u otro anticuerpo como criterio de división. Este proceso dio lugar a un modelo jerárquico en el que un mismo anticuerpo puede ser utilizado en más de una ocasión, en diferentes ramificaciones del árbol.

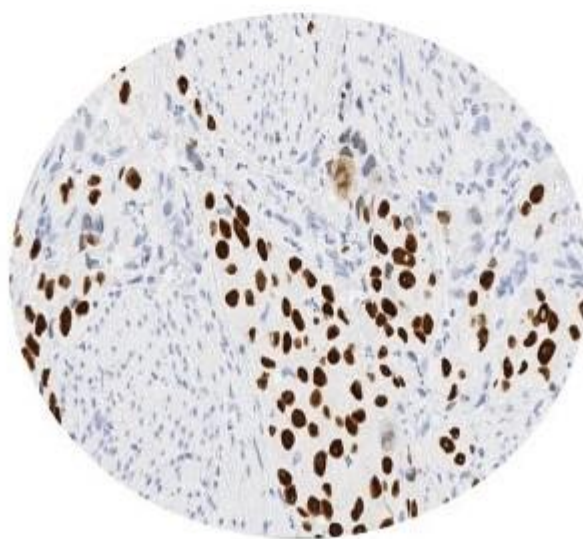
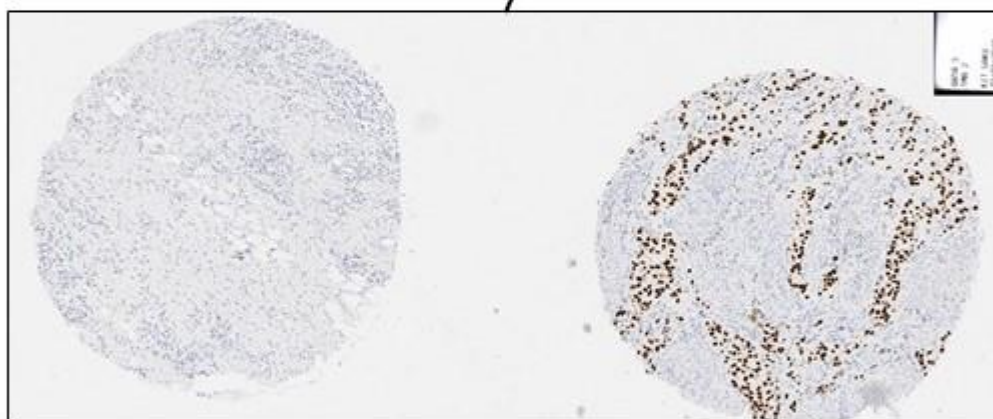
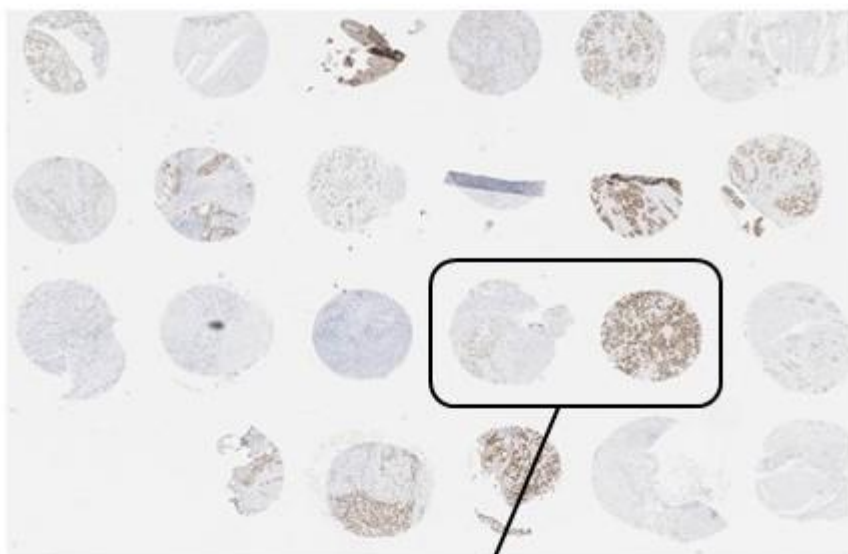


Figura 30. GATA3 (90% reactividad, 3+ intensidad)

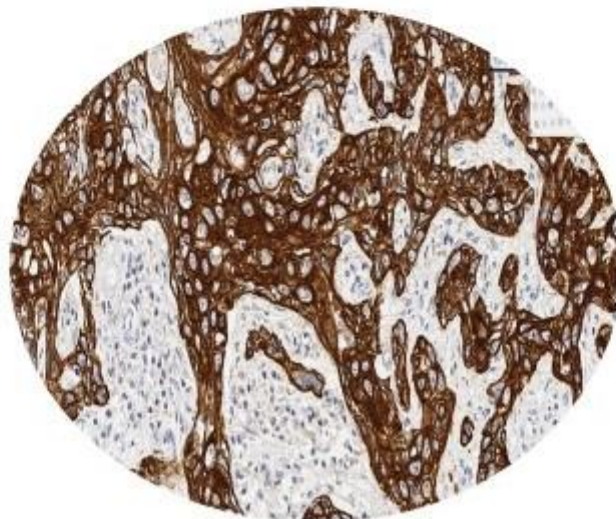
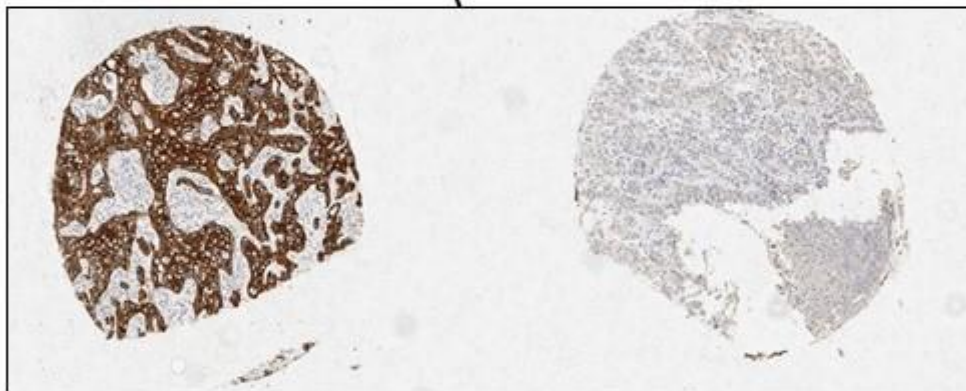
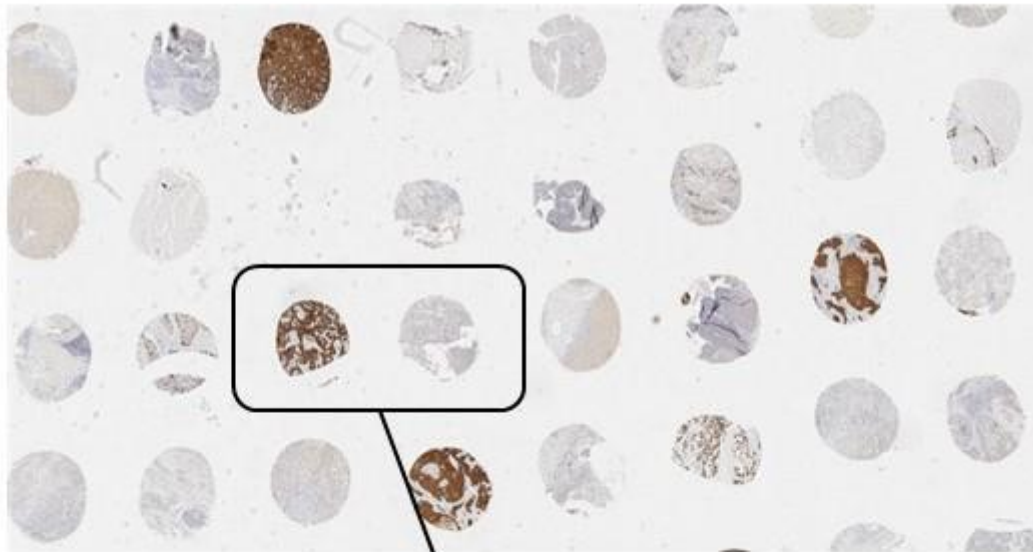


Figura 31. KRT14 (100% reactividad, 3+ intensidad)

3. Estudio estadístico y análisis de datos

Una vez completada la base de datos y actualizado el seguimiento (a 6 de julio de 2023), hemos procedido a una descripción de todos los parámetros clinicopatológicos convencionales (variables de confusión), supervivencia (variable dependiente) y de los marcadores biomoleculares testados en todas las muestras de carcinoma vesical incluidas en el estudio.

Los datos fueron analizados utilizando el software R (versión 4.3.2). Se realizó un resumen estadístico de los datos, incluyendo variables clínicas y diagnósticas. Para las variables continuas, se calcularon datos como la media, mediana y cuartiles, mientras que para las variables categóricas se calculó la distribución entre grupos. Los datos cualitativos fueron filtrados y procesados, calculando los valores de los marcadores y las muestras mediante la multiplicación de la intensidad por el porcentaje detectado. Posteriormente, los datos se escalaron utilizando el método Z-score y se realizó un análisis de agrupamiento K-means a través del paquete *stats* (versión 4.3.3), junto con las funciones *nbclust* y *fviz_cluster* del paquete *factoextra* (versión 1.0.7), para identificar los grupos óptimos de muestras, utilizando una inicialización aleatoria con 50 muestras, obteniéndose cuatro grupos. Una vez definidos los grupos, se emplearon las funciones *rpart* y *rpart.control* del paquete *rpart* (versión 4.1.23) y *rpart.plot* (versión 3.1.1) para ajustar y visualizar árboles de clasificación.

Se realizaron análisis de supervivencia mediante el método de Kaplan-Meier, utilizando las estadísticas log-rank (Mantel-Cox), Breslow (Wilcoxon generalizado) y Tarone-Ware, con las opciones predeterminadas habilitadas en SPSS (versión 28.0).

Finalmente, se realizó un análisis multivariado de supervivencia mediante regresión de Cox en R (versión 4.4.1) para identificar las variables más significativas. Para ello, se utilizó el paquete *survival* (versión 3.6-4). Primero, se ajustó un modelo completo utilizando como variables predictoras el grupo de clúster, edad, sexo, hábito de fumar, morfología, invasión LV en TURB, NAC, pT y grado tumoral en TURB. Posteriormente, solo se mantuvieron en el modelo final las variables significativas basadas en un umbral de $p < 0.05$. Finalmente, el modelo final se utilizó para calcular el Odds Ratio de cada variable significativa.

IV. RESULTADOS

1. Estudio descriptivo

El 87,8 % (130 casos de la serie) eran hombres y el 12,2 % (22 casos) mujeres. La edad media fue de 67,39 años (con un intervalo entre 29 y 85 años). El 82,9 % (126 casos de la serie) eran fumadores y el 17,1% % (26 casos) no fumadores. La invasión linfovascular estuvo presente en el 20.9% de los casos.

En cuanto al estadiaje, la población se dividió en MIBC correspondiendo a 119 casos de los cuales 90 eran un estadio T2 y 29 correspondían a un estadio mayor, T3/T4; y pacientes NMBIC que eran estadios T1.

Respecto al tipo histológico, el 83.3% correspondían a carcinoma urotelial convencional, el 14.4% tenía diferenciación escamosa, el 1.4% presentaba el subtipo micropapilar, el 2.2% tenía el subtipo anidado, el 0.7% presentaba el subtipo sarcomatoide. De los 139 pacientes, 65 (46.1%) recibieron NAC, de los cuales 60 recibieron GC, uno recibió MVAC y otros tratamientos. Solo el 21.5% mostró pRC (respuesta patológica completa) después de NAC, mientras que el 43.1% no respondió. Ninguno de los pacientes con NMIBC recibió NAC.

2. Patrón de expresión de biomarcadores inmunohistoquímicos: identificación taxonómica de clústeres

Para evaluar el patrón de expresión inmunohistoquímica, se analizaron los resultados de tinción mediante el histoscore, que combina la intensidad y el porcentaje de tinción de los diferentes biomarcadores incluidos en el TMA. La evaluación de las matrices se realizó a doble ciego por dos patólogos independientes, obteniéndose una correlación interobservador del 98% y una variabilidad interobservador mínima, con un porcentaje prácticamente equivalente.

Se estudiaron anticuerpos nucleares (GATA3, FOXA1, FGFR3, P53 y Ki67) y anticuerpos citoplasmáticos (KRT20, KRT5 y KRT14).

Para clasificar los tumores según su perfil inmunohistoquímico, se utilizó análisis discriminante con el objetivo de reducir las distancias entre variables y mejorar la diferenciación de los grupos tumorales. Aplicando posteriormente, la metodología K-means para el análisis de agrupamiento (clusterización).

Los anticuerpos que resultaron ser más discriminativos en la clusterización global de la población fueron KRT20, KRT14, KRT5 y GATA3, alcanzando la identificación el 93% de los casos de la serie. Se identificaron cuatro grupos:

- **el clúster 1** (basal, N=54) caracterizado por una disminución en la expresión de FOXA1, GATA3, KRT20, con un aumento en la expresión de KRT5 y variabilidad en la expresión de KRT14.
- **el clúster 2** (basal KRT14 Alto, N=30) caracterizado por sobreexpresión de KRT14, altos niveles de KRT5, con expresión variable de GATA3 y FOXA1.

- **el clúster 3** (luminal, N=16) caracterizado por niveles muy bajos de KRT5 y bajos niveles de KRT14, con un aumento discreto de FOXA1 y GATA3.
- **el clúster 4** (mixto, N=41) caracterizado por una elevada expresión de GATA3, FOXA1 y KRT5 con baja expresión de KRT14 (Figura 26B) (Tabla 11, 13).

El análisis de clusterización K-means mostró un solapamiento parcial entre el clúster 1 (basal) y el clúster 2 (basal KRT14 Alto) puesto de manifiesto en el dendrograma circular de la agrupación (Figura 26A).

Tras la clusterización, se generó un análisis de árbol de decisión y regresión (CART) basado en el establecimiento observacional interpretativo mediante tres anticuerpos IHC: KRT14, KRT5 y GATA3. La KRT14 ha demostrado ser el anticuerpo más discriminante, seguido de KRT5 y GATA3 respectivamente para la determinación de los clústeres. (Figura 26C). Para explorar la relación entre el resto de las variables inmunohistoquímicas, se emplearon diagramas de correlación en base al coeficiente de Pearson. Los principales hallazgos fueron:

- Buena correlación positiva entre KRT20 y GATA3 ($R=0.50$) en el clúster luminal.
- Correlación positiva entre FOXA1 y GATA3 ($R=0.58$) en el clúster basal KRT14 Alto.
- Correlación negativa significativa entre KRT5 y KRT20 ($R=-0.49$) en el subtipo basal.
- En el clúster mixto, no se identificó una correlación específica entre marcadores inmunohistoquímicos.

Estos resultados fueron consistentes con los datos transcriptómicos previos, lo que respalda la fiabilidad de la clasificación tumoral basada en técnicas inmunohistoquímicas (Figura 27).

Tabla 33. Distribución de las características clínico patológicas según el subtipo molecular.

Variables clínico morfológica y clusterización							
Características		TOTAL	SUBTIPOS MOLECULARES BASADOS EN IHC				p Value
			BASAL	BASAL KRT14 ALTA	LUMINAL	MIXTO	
		N=139	N=53	N=30	N=15	N= 41	
Edad			67.39±10.85	65.87±10.39	69.38±9.09	68.71±8.96	0.60
Sexo	Masculino	122 (87.8%)	45 (36.9%)	25 (20.5%)	14 (11.5%)	38 (31.1%)	0.51
	Femenino	17 (12.2%)	8 (47.1%)	5 (29.4%)	1 (5.9%)	3 (17.6%)	
Fumador	No	22 (15.8%)	10 (45.5%)	6 (27.3%)	1 (4.5%)	5 (22.7%)	0.55
	Si	117 (84.2%)	43 (36.8%)	24 (20.5%)	14 (12.0%)	36 (30.8%)	
Morfología	Urotelial	113 (81.3%)	45 (39.8%)	20 (17.7%)	12 (10.6%)	36 (31.9%)	0.03
	Diferenciación escamosa	20 (14.4%)	8 (40.0%)	8 (40.0%)	2 (10.0%)	2 (10.0%)	
	Subtipo Micropapilar	2 (1.4%)	0 (0.0%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0 (0.0%)	
	Subtipo Sarcomatoide	1 (0.7%)	0 (0.0%)	1 (100%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
	Subtipo Nested	3 (2.2%)	0	0	0	3 (100%)	
Grado	Bajo	2 (1.4%)	1 (50.0%)	1 (50.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.64
	Alto	137 (98.6%)	52 (38.0%)	29 (21.2%)	15 (10.9%)	41 (29.9%)	
Invasión Linfovascular	No	110 (79.1%)	41 (37.3%)	25 (22.7%)	10 (9.1%)	34 (30.9%)	0.53
	Si	29 (20.9%)	12 (41.4%)	5 (17.2%)	5 (17.2%)	7 (24.1%)	
NAC	No	74 (53.2%)	31 (41.9%)	11 (14.9%)	9 (12.2%)	23 (31.1%)	0.23
	Si	65 (46.8%)	22 (33.9%)	19 (29.2%)	6 (9.2%)	18 (27.7%)	
Tratamiento NAC	Gemcitabina-cisplatino	60 (92.3%)	20 (33.3%)	18 (30.0%)	5 (8.3%)	17 (28.4%)	0.35
	MVAC	1 (1.5%)	0 (0.0%)	1 (100%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	
	Otros	4 (6.2%)	2 (50.0%)	0 (0.0%)	1 (25.0%)	1 (25.0%)	
Respuesta a NAC	pCR	14 (21.5%)	3 (21.4%)	4 (28.6%)	2 (14.3%)	5 (35.7%)	0.14
	Respuesta parcial	23 (35.4%)	4 (17.4%)	9 (39.1%)	3 (13.1%)	7 (30.4%)	
	No respuesta	28 (43.1%)	15 (53.6%)	6 (21.4%)	1 (3.6%)	6 (21.4%)	
cTNM	T1	20 (14.4%)	9 (45.0%)	3 (15.0%)	2 (10.0%)	6 (30.0%)	0.06
	T2	90 (64.7%)	30 (33.4%)	21 (23.3%)	10 (11.1%)	29 (32.2%)	
	T3/T4	29 (20.9%)	14 (48.3%)	6 (20.7%)	3 (10.3%)	6 (20.7%)	
Metástasis ganglio linfático	No	108 (77.7%)	40 (37.0%)	23 (21.3%)	12 (11.1%)	33 (30.6%)	0.94
	Si	31 (22.3%)	13 (41.9%)	7 (22.6%)	3 (9.7%)	8 (25.8%)	
Metástasis cisceral	No	69 (49.6%)	23 (33.3%)	18 (26.1%)	10 (13.0%)	19 (27.5%)	0.40
	Si	70 (50.4%)	30 (42.8%)	12 (17.1%)	6 (8.6%)	22 (31.4%)	

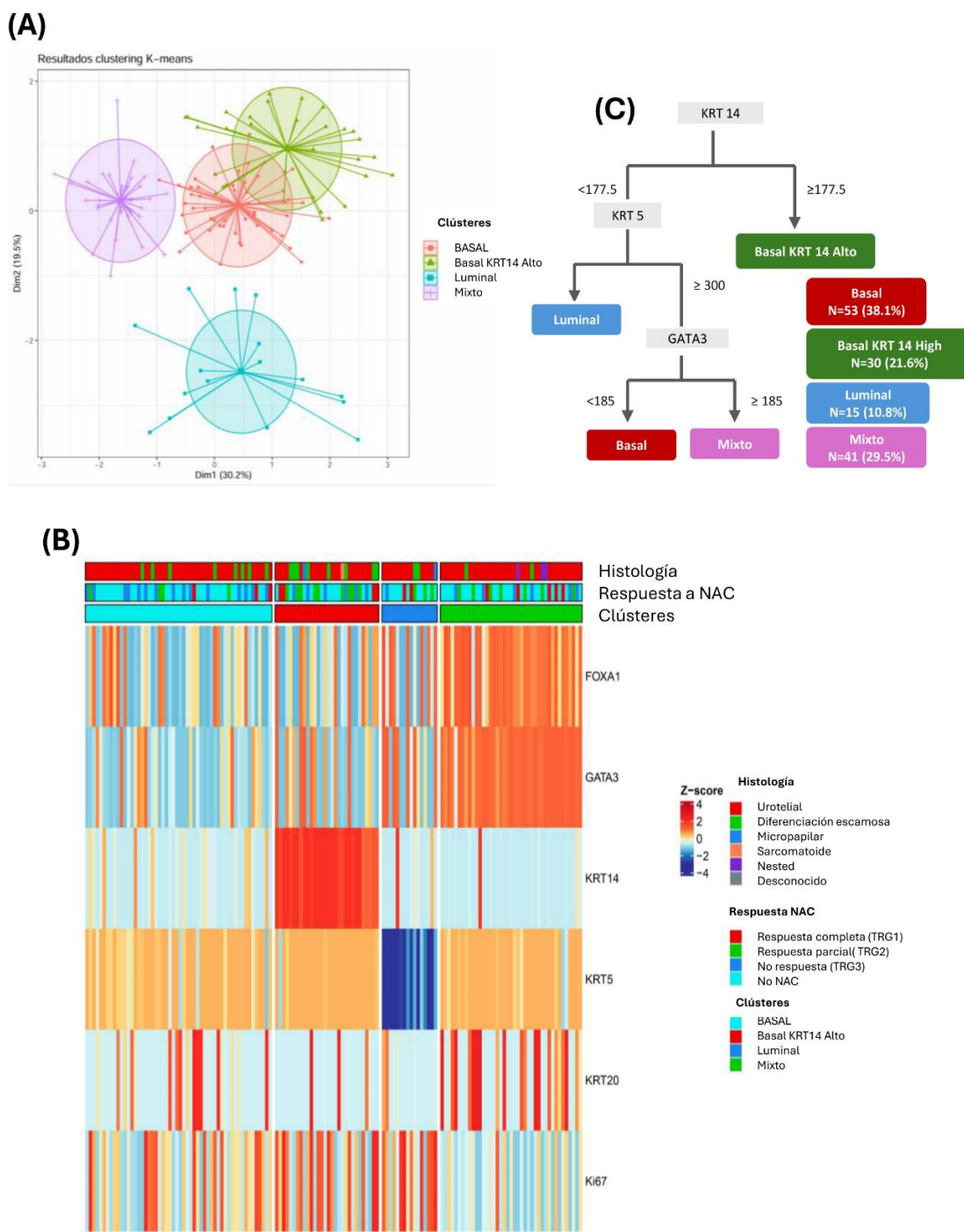


Figura 32. Análisis de clusterización K-means: superposición entre el clúster basal y el clúster KRT14 Alto en dendrograma circular(A). Mapa de calor que muestra la expresión de FOXA1, GATA3, KRT5/6, KRT14, Ki67, y su asociación con la histología y la respuesta a NAC en los diferentes clústeres (B). Algoritmo diagnóstico basado en un modelo de árbol de regresión e interpretación observacional con 3 niveles de IHC para predecir clústeres y el porcentaje de representación de cada clúster en la serie (C).

Tabla 14. Datos de subtipos moleculares y expresión de marcadores inmunohistoquímicos en los subtipos de cáncer de vejiga.

Marcadores IHC	SUBTIPOS MOLECULARES BASADOS EN IHC				p Value
	BASAL	BASAL KRT14 ALTO	LUMINAL	MIXTO	
GATA3	70.72±83.12	107.75±120.71	149.84±135.26	273.29±37.12	9.30
KRT14	23.08±39.74	279±31.91	31.56±77.74	11.1±47.17	1.44
KRT5	281.67±30.81	294.17±21.62	48.98±62.38	289.39±24.73	3.72
KRT20	44.12±81.46	24.58±75.36	17.97±41.73	98.84±118.61	p<0.01
Ki67	27.23±22.62	37.08±29.4	43.44±28.39	13.74±12.88	p<0.01

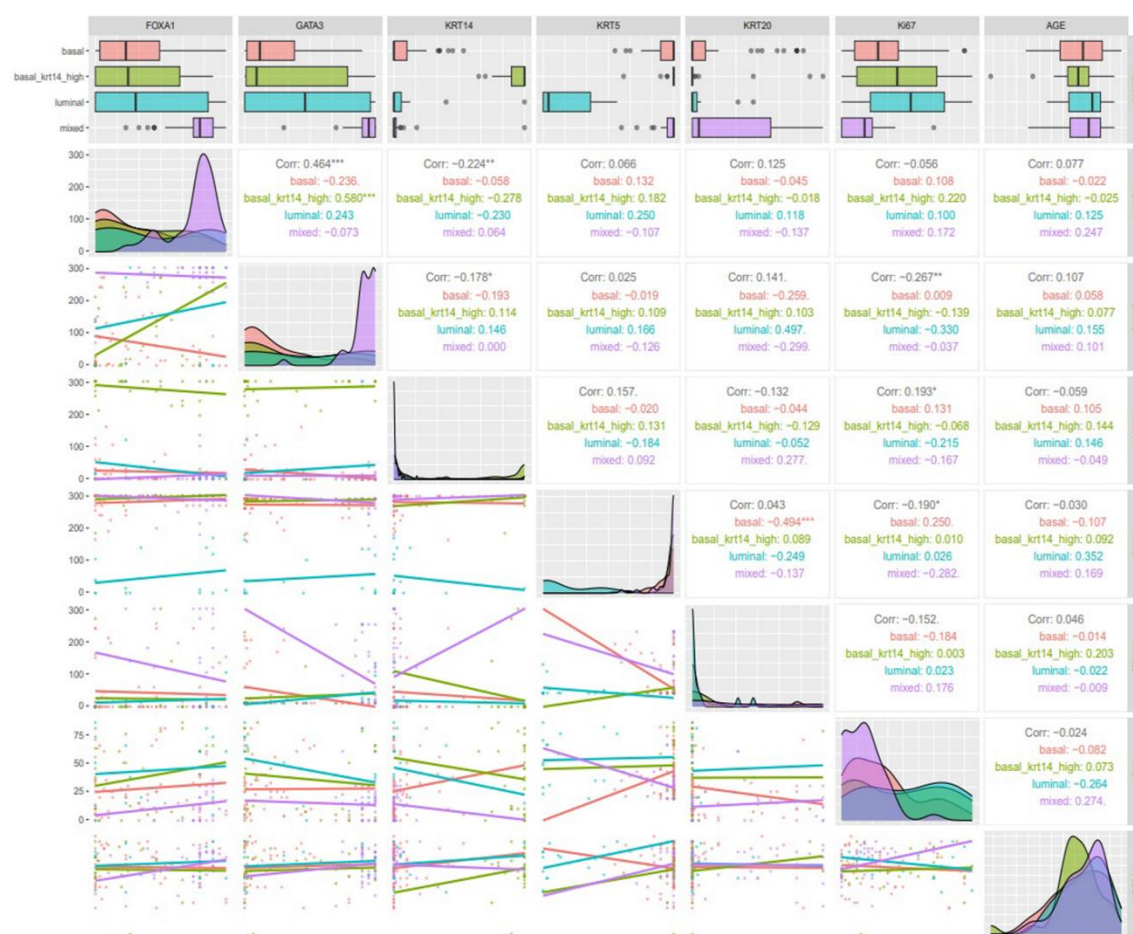


Figura 33. Diagrama de correlación (CorPlot) que representa la correlación positiva o negativa entre las variables inmunohistoquímicas (GATA3, FOXA1, KRT5, KRT14, KRT20, Ki67) en los clústeres luminal, basal, KRT14 Alto y mixto. La sección superior de la figura muestra un diagrama de densidad de los subtipos y su correlación con FOXA1, GATA3, KRT14, KRT5, KRT20, Ki67 y la edad.

3. Características clinicopatológicas en los clústeres

Los clústeres basal y basal KRT14 Alto fueron más prevalentes en mujeres y fumadores (p=0.51, p=0.55) y estuvieron significativamente asociados con la diferenciación escamosa (p=0.03). Presentaron una tendencia hacia la significancia estadística, lo que

indica una posible asociación con estadios más avanzados ($\geq T3/T4$) ($p=0.06$). El subtipo sarcomatoide fue exclusivo del clúster KRT14 Alto (Figura 28 A, B).

El clúster luminal presento principalmente morfología urotelial. El clúster mixto fue el más tendente a la presencia de metástasis visceral sin alcanzar la significación ($p=0.4$). El clúster luminal representó un bajo porcentaje (10.3%) en estadios avanzados (T3/T4). El factor LV mostró una distribución homogénea entre los clústeres sin significancia estadística. Las características clínicas fueron similares entre los respondedores y los no respondedores al tratamiento (Tabla 13).

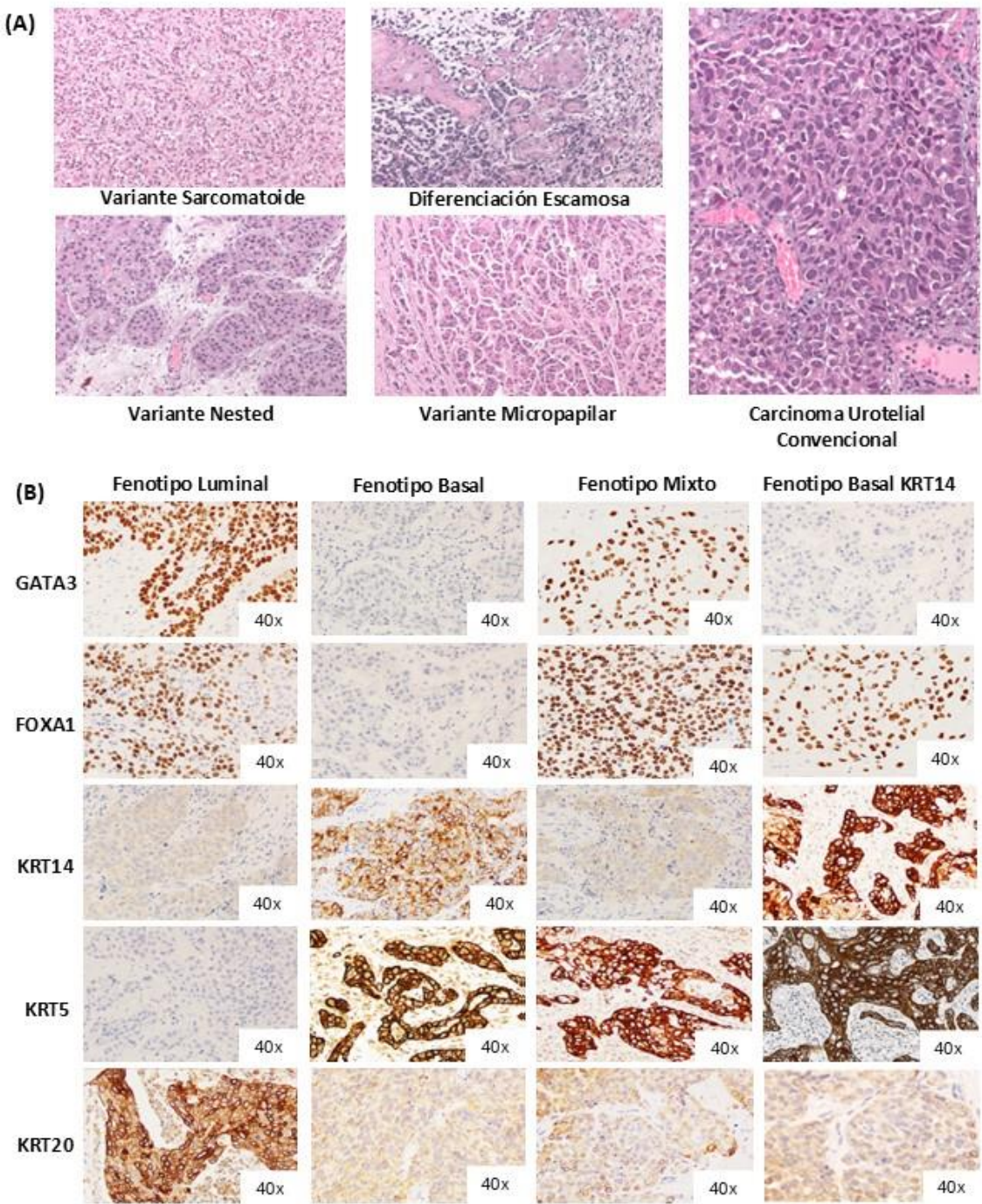


Figura 34. Tinción inmunohistoquímica representativa para GATA3, FOXA1, KRT14, KRT5 y KRT20 (A), y su correlación con los subtipos basados en IHC (B).

4. Asociación de los clústeres y su respuesta a neoadyuvancia

De los 65 pacientes MIBC tratados con NAC de nuestra serie, el 63.1% fueron clasificados como subtipo basal (33.8% en el clúster basal, 29.2% en el clúster basal KRT14 Alto), seguidos por los subtipos mixto (27.7%) y luminal (9.2%) (Tabla 13). Solo 14 pacientes (21.5%) lograron una pRC, mientras que 28 (44.7%) no respondieron, y 23 (35.4%) presentaron una respuesta parcial, mostrándose una tendencia entre la falta de respuesta y el clúster basal ($p=0.14$). Las características clínicas fueron similares entre los respondedores y los no respondedores.

5. Relación entre clústeres y supervivencia

Las curvas de Kaplan-Meier (con un período máximo de seguimiento de 120 meses) mostraron disparidades de supervivencia global entre los diferentes clústeres. Agrupando a los 139 pacientes, el clúster basal mostró la tasa de supervivencia más baja, con un 60.5% (IC 95%: 44.13-76.91%), seguido por el clúster mixto con un 63.5% (IC 95%: 46.16-80.91%). En contraste, los tumores luminales exhibieron una tasa de supervivencia del 79.4% (IC 95%: 48.29-110.57%), mientras que el clúster basal KRT14Alto mostró la tasa más alta, con un 92.2% (IC 95%: 71.94-112.50%). El estadístico de Breslow no mostró diferencias significativas entre las curvas de supervivencia ($p>0.05$). Al categorizar a los pacientes en tres grupos en lugar de cuatro (subtipos basal, luminal y mixto), se reveló que el subtipo luminal tenía la mejor supervivencia, seguido del basal, mientras que el grupo mixto tenía el peor pronóstico (Figura 29C, D). Se observó una distribución de supervivencia similar tanto en pacientes NMIBC como MIBC.

La probabilidad de supervivencia por sexos mostró tasas más altas en hombres (74.12%, IC 95%: 63.17-85.07%) en comparación con las mujeres (50.06%, IC 95%: 25.91-74.20%), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Log Rank $p=0.131$, Breslow $p=0.26$) (Figura 29B). Al analizar las diferencias de supervivencia, de los tres subtipos moleculares (basal, luminal y mixto), no fueron significativas entre pacientes tratados con NAC y los no tratados. Los pacientes luminales presentaron tendencias de supervivencia similares, independientemente del tratamiento con NAC, mientras que los subtipos basal y mixto mostraron una mejor supervivencia en pacientes sometidos a NAC ($p=0.51$) (Figura 29E, F). Al agrupar en 4 clústeres y observar la supervivencia en pacientes sin NAC, observamos una caída de supervivencia global del grupo basal KRTAlto en comparación con los luminales, que presentaron una mejor supervivencia, mientras que la de los basales KRT14Alto era ligeramente más alta que la de los basales, aunque siguieron sin ser significativas (Log Rank= 0.22, Breslow $p=1.14$). Los pacientes que lograron pRC al tratamiento con NAC mostraron una mayor supervivencia media, seguidos por los respondedores parciales, mientras que los no respondedores tuvieron la supervivencia más baja ($p=0.01$). Los pacientes del clúster basal demostraron una mejora en la supervivencia con NAC, especialmente los del clúster basal KRT14Alto, quienes mostraron los resultados de supervivencia más favorables tanto en los

respondedores completos como en los respondedores parciales, mientras que la supervivencia del clúster luminal fue comparable entre respondedores y no respondedores. Los pacientes del clúster mixto respondieron de manera similar a los subtipos basales, con tasas de supervivencia más altas en los respondedores completos al NAC. Mientras tanto, el grupo basal KRT14Alto muestra los mejores resultados de supervivencia tanto en los respondedores completos como en los parciales (Figura 29G, H, I, J).

Se ha realizado un análisis multivariante utilizando el modelo de regresión de Cox, donde el predictor basal KRT14 Alto demostró un efecto protector contra la mortalidad. Por otro lado, el sexo, el hábito de fumar, la histología y el estadio (pT) estuvieron asociados con un mayor riesgo de mortalidad. Estos resultados sugieren que, si bien el grupo basal con sobreexpresión de KRT14 puede estar vinculado a un mejor pronóstico, factores como el sexo, ser fumador, la clasificación histológica y el estadio continúan desempeñando un papel significativo en el aumento del riesgo de mortalidad en esta cohorte (Tablas 15,16).

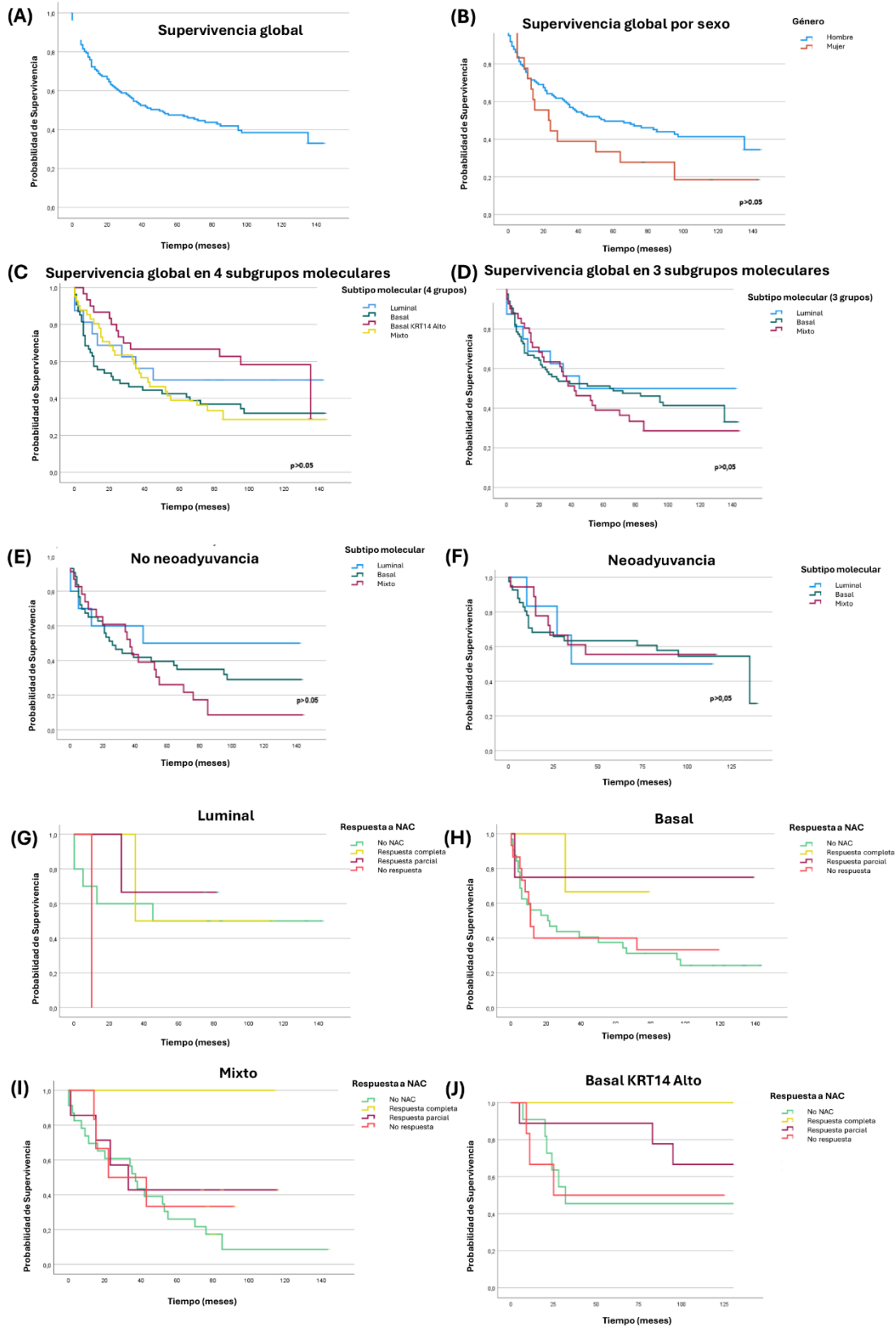


Figura 35. Curvas de Kaplan-Meier que muestran el seguimiento de 120 meses, estratificado por subtipos moleculares basados en IHC. Supervivencia global (A). Supervivencia global por género (B). Supervivencia con cuatro subtipos agrupados (C). Supervivencia con tres subtipos agrupados (D). Supervivencia de pacientes sin NAC (E). Supervivencia de pacientes con NAC (F). Supervivencia del grupo luminal en respuesta a NAC (G). Supervivencia del grupo basal

KRT14 Alto en respuesta a NAC (H). Supervivencia del grupo mixto en respuesta a NAC (I). Supervivencia del grupo basal en respuesta a NAC (J).

Tabla 15. Los resultados de un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox multivariante. Se enumeran los coeficientes (coef), hazard ratio (exp(coef)), error estándar (se(coef)), estadísticas z (z) y los valores p correspondientes ($Pr(>|z|)$) para cada variable. Las variables estadísticamente significativas están indicadas con los siguientes códigos de significancia: $p < 0.001$, $p < 0.01$, $p < 0.05$ y $p < 0.1$.

Análisis de Regresión de Cox Multivariante de Predictores de Supervivencia					
Variables	coef	exp (coef)	se (coef)	z	Pr (> z)
Predictor Basal KRT14	´-0.84870	0.42797	0.38053	´-2.230	0.02573 *
Predictor Luminal	´-0.32808	0.72030	0.42219	´-0.777	0.43710
Predictor Mixto	´-0.20642	0.81349	0.28784	´-0.717	0.47328
Edad	0.03513	´1.03575	0.01284	´2.737	0.00620 **
Fumador	0.76863	´2.15681	0.33307	´2.308	0.02102 *
Morfología RTU 1	0.32353	´1.38200	0.31228	´1.036	0.30019
Morfología RTU 2	´2.02424	´7.57037	0.79170	´2.557	0.01056 *
Morfología RTU 3	´3.08632	´21.89685	´1.21384	´2.543	0.01100 *
Morfología RTU 4	0.20032	´1.22179	´1.06146	0.189	0.85031
T1	´1.17534	´3.23924	0.66841	´1.758	0.07868 .
T2	´1.06061	´2.88814	0.64459	´1.645	0.09988 .
T3	´1.96405	´7.12817	0.63844	´3.076	0.00210 **
T4	´2.32866	´10.26420	0.64088	´3.634	0.00028 ***
T5	0.96379	´2.62161	0.82588	´1.167	0.24321
Significance codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 '.'1					

Tabla 16. Representación del Hazard ratio y (exp(coef)) y el Hazard ratio inverso (exp(-coef)) derivados del modelo multivariante de Cox, junto a los intervalos de confianza (IC) del 95% correspondientes para cada variable. Además, se incluyen las métricas de rendimiento del modelo, como la concordancia y los resultados de las principales pruebas estadísticas (prueba de razón de verosimilitud, prueba de Wald y prueba de puntuación/logrank). Las asociaciones estadísticamente significativas están indicadas por los valores p, con diferentes niveles de significancia destacados.

Ratios de Riesgo e Intervalos de Confianza de la Regresión de Cox Multivariante				
Variables	exp (coef)	exp (-coef)	lower .95	upper .95
Predictor Basal KRT14	0.4280	´2.33661	0.2030	0.9022
Predictor Luminal	0.7203	´1.38830	0.3149	´1.6477
Predictor Mixto	0.8135	´1.22927	0.4627	´1.4301
Edad	´1.0358	0.96548	´1.0100	´1.0621
Fumador	´2.1568	0.46365	´1.1228	´4.1431
Morfología RTU 1	´1.3820	0.72359	0.7494	´2.5487
Morfología RTU 2	´7.5704	0.13209	´1.6041	´35.7282
Morfología RTU 3	´21.8969	0.04567	´2.0284	´236.3746
Morfología RTU 4	´1.2218	0.81847	0.1526	´9.7839
T1	´3.2392	0.30871	0.8740	´12.0059
T2	´2.8881	0.34624	0.8165	´10.2162
T3	´7.1282	0.14029	´2.0396	´24.9125
T4	´10.2642	0.09743	´2.9229	´36.0449
T5	´2.6216	0.38144	0.5159	´13.2299
Concordance= 0.766	(se=0.023)			
Likelihood ratio test=	68.12	on 14df	p=4e-09	
Wald test	62.94	on 14df	p=4e-08	
Score (logrank) test=	74.67	on 14df	p=3e-10	

V. DISCUSIÓN

Las recomendaciones actuales de tratamiento del CV se basan en directrices clínicas y patológicas. Sin embargo, estas han demostrado no ser completamente fiables para anticipar con precisión la efectividad de los tratamientos ni el pronóstico posterior [201]. En este contexto, analizar las alteraciones moleculares involucradas en la carcinogénesis de la vejiga podría representar una herramienta crucial para clasificar grupos de riesgos y desarrollar terapias específicas.

Numerosos equipos de investigación han contribuido al desarrollo de distintas clasificaciones moleculares del CV, proponiendo subgrupos variados y enriqueciendo nuestro entendimiento sobre la biología de esta enfermedad. La relevancia clínica de estos subgrupos radica en su capacidad para distinguir respuestas diferentes a tratamientos como la quimioterapia e inmunoterapia, subrayando la necesidad de implementar una clasificación molecular en la práctica clínica rutinaria.

En respuesta a esta necesidad, surgió un consenso internacional en 2020 para orientar dicha implementación [81]. Este consenso amplió la última clasificación propuesta por el grupo de Robertson et al [77] describiendo cinco grupos ya identificados previamente y añadiendo un sexto grupo centrado en alteraciones genéticas del sistema inmunológico y enriquecido en fibroblastos. Estos grupos, denominados LumP, LumNS, LumU, rico en estroma, Ba/Sq y NE-like, se basan en un esquema de subtipificación mediante ARNm. Los tumores Ba/Sq y LumP resultaron ser los más frecuentes, representando el 35% y el 24% de todos los casos de CVMI, respectivamente. Cada grupo de tumores se representaba por tener características únicas, incluyendo las mutaciones genéticas, diferentes patrones histológicos, el comportamiento clínico y su respuesta a la quimioterapia [81].

A pesar de la clasificación consenso, su aplicación práctica sigue siendo limitada, principalmente debido a la dependencia de tecnologías complejas y costosas que a menudo no están disponibles en el ámbito clínico habitual [47,95]. Además, factores como la heterogeneidad intratumoral y las variantes histológicas representan desafíos adicionales que dificultan una estratificación óptima del CV, y parámetros patológicos convencionales, como el estadio y el grado tumoral, a menudo no logran reflejar el comportamiento heterogéneo del CV, especialmente en casos con estadios y grados similares [202, 203].

La baja reproductibilidad asociada al alto coste y la disponibilidad limitadas en centros de rutina diagnóstica para el análisis molecular del CV limita el empleo de las clasificaciones moleculares en la práctica clínica rutinaria [47,95, 154].

A raíz de la propuesta de clasificación consenso surge el debate de como poder implementar esta clasificación, el uso de la IHC como marcador subrogado de subtipos moleculares, fundamentalmente de los dos subtipos principales reconocidos, el luminal y el basal, conocidos por presentar comportamientos clínicos distintos y sensibilidades variables a la quimioterapia [39]. Diversos estudios han intentado validar estos subtipos en diferentes cohortes clínicas e identificar marcadores IHC característicos que permitan simplificar y optimizar esta categorización, explorando la IHC como una alternativa

fiable, más económica, rápida y accesible en comparación con las tecnologías de alta complejidad [204].

El estudio IHC se reconoce como una herramienta fundamental en el diagnóstico de las neoplasias vesicales, que complementa la evaluación morfológica del tumor junto con los datos clínicos del paciente [155]. Este enfoque se basa en el conocimiento de la estructura del urotelio y sus distintas capas: la capa basal, caracterizada por la expresión de KRT5/6, KRT14 y CD44; la capa intermedia, con diferenciación moderada y expresión de KRT18; y la capa superficial, que muestra expresión de KRT20 y uroplaquinas. Estas características respaldan el diagnóstico y la subtipificación molecular del CV, integrando los hallazgos clínicos con un enfoque inmunohistoquímico que simplifica y optimiza la categorización subrogada de los subtipos moleculares [43].

En este contexto, diversos estudios han empleado marcadores inmunohistoquímicos basados en citoqueratinas para subtipificar tumores en las categorías basal y luminal, dada la correlación entre la expresión de estas proteínas en la carcinogénesis urotelial y la diferenciación celular [205]. Un ejemplo destacado es el estudio pionero de Choi et al. [71], que utilizó los marcadores KRT5/6 y KRT20 para diferenciar los subtipos moleculares. Según sus hallazgos, la expresión KRT5/6+ y KRT20- se asoció predominantemente con los subtipos basales, mientras que KRT20+ y KRT5/6- se relacionaron con los subtipos luminales [71]. Este estudio también destacó que los tumores basales con expresión de KRT5/6, p63 y KRT14 mostraron una mejor respuesta a la quimioterapia, mientras que los tumores luminales con activación de PPAR y mutaciones en FGFR3 presentaron expresión de KRT20, FOXA1 y GATA3, subrayando la importancia clínica de estas diferencias moleculares.

No sólo se ha empleado el estudio de citoqueratinas como marcador subrogado. Diversos estudios basados en análisis transcriptómicos han intentado validar estos subtipos en diferentes cohortes clínicas e identificar marcadores IHC característicos que permitan simplificar y optimizar esta categorización sobre todo en pacientes CVMI. Los marcadores conocidos de células uroteliales basales y células madre/progenitoras incluyen citoqueratinas de alto peso molecular KRT 5, KRT5/6 y KRT14, además de P40, P63 y CD44, los cuales se utilizan para identificar tumores de tipo basal. Por otro lado, los tumores luminales expresan marcadores de diferenciación urotelial, como KRT20, GATA3, FOXA1 y uroplaquinas [205, 206]. Uno de los principales estudios sobre los que se asientan estas bases, es un metaanálisis que emplea solo dos marcadores inmunohistoquímicos, luminal (GATA3) y basal (KRT5/6), los cuales fueron suficientes para identificar subtipos moleculares con una precisión superior al 90% en combinación con análisis transcriptómicos [152]. Los tumores luminales mostraron un patrón de expresión similar a las capas intermedias y superficiales del urotelio, con activación frecuente de genes diana de PPAR y una mayor incidencia de mutaciones en FGFR3, ELF3, CDKN1A y TSC1, además de la sobreexpresión de proteínas como E-cadherina, HER2 y HER3. Por el contrario, los tumores basales presentaron una firma de expresión semejante a la capa basal del urotelio, con mutaciones en TP53, RB1, y sobreexpresión de CD49, Ciclinas B1 y EGFR. Los análisis de supervivencia revelaron que los tumores

basales invasivos musculares mostraron un comportamiento más agresivo en comparación con los tumores luminales. Este estudio implementó una clasificación molecular basada en el análisis del transcriptoma de ARNm junto con el análisis de IHC para corroborar la clasificación molecular [154].

Este trabajo parte de la premisa de conseguir taxonomizar fundamentalmente los dos grandes subgrupos establecidos, luminales y basales, en correlación con parámetros clínico-patológicos mediante la identificación de marcadores IHC rutinarios que permitan validar una implementación de la clasificación molecular CV en centros primarios simplificando el coste-efectividad tanto en pacientes CVMI como CVNMI.

La caracterización molecular de los CVNMI sigue estando poco explorada, dado que la mayor parte de los estudios de subtipificación molecular de CV se han realizado en CVMI. Aproximadamente el 75% de los pacientes con CV son diagnosticados con CVNMI, caracterizados por su heterogeneidad, en la que una subcategorización práctica basada en IHC para distinguir entre los fenotipos luminal y basal no ha demostrado ser exitosa en la predicción de resultados [91]. Se necesitan más estudios para determinar si estos subtipos moleculares pueden clasificarse de manera efectiva mediante IHC y si tienen valor pronóstico en NMIBC. El grupo del MD Anderson ha sido una institución líder en la clasificación molecular del CV, demostrando que los subtipos basal y luminal pueden identificarse mediante IHC utilizando los marcadores KRT5/6 y KRT20. Siguiendo este planteamiento, se llevaron a cabo estudios para validar el uso de KRT20 y KRT5/6 en la identificación de los subtipos luminal y basal, respectivamente, lo que condujo al desarrollo de un sistema de clasificación molecular por grados para NMIBC [156]. Estos hallazgos fueron respaldados por otro estudio que reportó una alta expresión de ARNm de KRT20 y una baja expresión de KRT5 en los subtipos luminales [157], donde el fenotipo luminal mostró una peor supervivencia libre de progresión y libre de recurrencia. El estudio concluyó que la clasificación luminal-basal mediante IHC es válida y que la técnica de RT-PCR permite una clasificación aún más precisa. Además, se identificaron dos nuevas categorías basadas en IHC y RT-PCR, la categoría DP (KRT20+, KRT5/6+) y la categoría DN (KRT20-, KRT5/6-). A pesar de que Breyer et al. demostraron que la clasificación basada en RT-PCR supera el uso exclusivo de IHC, proporcionando mayor precisión para el pronóstico en NMIBC [157], sigue siendo necesaria una implementación rutinaria con técnica asequibles en centros de rutina diagnóstica y no tan costosas, dada la relevancia clínica de la definición de estas categorías en CVNMI aún no son completamente claras [156].

Rodríguez Pena et al. evaluaron en NMIBC marcadores luminales (GATA3, HER2) y basales (KRT5/6, CD44), encontrando que KRT5/6 podría ser un marcador pronóstico de progresión y CD44 de recurrencia, aunque la heterogeneidad de la cohorte limitó las conclusiones [158].

El grupo de Lund empleó un algoritmo simplificado basado en GATA3, KRT5 y p16 en CVNMI, clasificando los tumores en cuatro subtipos (Basal, GU, URO y URO-KRT5+). Este enfoque permitió estratificar el riesgo de recurrencia y progresión, demostrando utilidad en la práctica clínica, especialmente para los subtipos basales, que mostraron

peor pronóstico con progresión acelerada [207]. Este estudio destaca la importancia de incluir otros marcadores además de citoqueratinas para reflejar la heterogeneidad tumoral de manera más completa.

Basándonos en los hallazgos y metodologías de estudios previos, incorporamos al estudio tanto pacientes CVMI como CVNMI para darle un enfoque más integral, diferente a otros trabajos que se han centrado exclusivamente en la subtipificación de CVMI.

Mediante la evaluación de cuatro marcadores inmunohistoquímicos de rutina (GATA3, KRT20, KRT5 y KRT14), logramos una precisión del 94.33% en la identificación de subtipos moleculares en CVMI y CVNMI. Este nivel de precisión es comparable al obtenido en un estudio que utilizó los mismos marcadores en TMA [208] y superior al reportado en otro estudio que empleó los mismos marcadores en secciones completas [209]. Cabe destacar que ninguno de estos estudios, incluido el nuestro, estuvo respaldado por análisis transcriptómicos. Sin embargo, el trabajo de Terlevic et al. donde emplearon IHC basada en tres marcadores (GATA3, KRT5/6 y p16) alcanzó una precisión ligeramente superior respaldada por análisis transcriptómicos en ARNm [210].

La clasificación de los subtipos se realizó utilizando el histoscore, una metodología también adoptada por Font et al. [159]. La interpretación de los anticuerpos empleados para IHC representa una considerable variabilidad metodológica entre los estudios, tanto en los puntos de corte como en la consideración de intensidad y porcentaje de tinción. Esta variabilidad refleja la necesidad de consenso en la valoración de marcadores clave para la clasificación molecular.

En el caso de los marcadores citoplasmáticos como KRT14 y KRT20, los criterios para determinar la positividad difieren significativamente. Bejrananda et al. [208] consideran positivo un mínimo del 10% de células teñidas, sin diferenciar entre intensidades, mientras que tanto Terlevic et al. [210] como Jangir et al. [209] establecen un umbral del 20%, enfatizando la tinción moderada a fuerte como criterio adicional. Por otro lado, Font et al. [159] emplean un enfoque basado en histoscore, que combina el porcentaje de células teñidas con la intensidad, proporcionando un análisis más cuantitativo.

Para los marcadores nucleares como GATA3, la metodología también varía. Bejrananda et al. [208] adoptan un enfoque dicotómico, considerando positivo cualquier tinción nuclear que abarque más del 10% de las células tumorales, mientras que Jangir et al. [209] aplican un punto de corte del 20%, alineándose con los criterios para los marcadores citoplasmáticos. Por su parte, Font et al. [159] aplican nuevamente el histoscore, integrando la intensidad y el porcentaje de tinción para determinar la positividad.

En las interpretaciones de la KRT5, los estudios son discordantes en función del patrón de tinción, algunos estudios utilizan un enfoque cualitativo basado en la positividad o negatividad de la tinción [71,208, 209] y otros consideran el patrón de tinción basal típico de marcación luminal frente a la difusa típica de los basales como ya describían el grupo de Lund [72,78]. Estas discrepancias influyen en la precisión de obtener

subtipos moleculares por IHC, subrayando la importancia de estandarizar los criterios de interpretación IHC para garantizar la comparabilidad entre estudios y facilitar la implementación clínica de los resultados.

En este estudio, se ha pretendido replicar y ampliar el trabajo de Font et al. [159], quienes clasificaron los tumores de CV en tres clústeres principales basados en análisis IHC (basal, luminal y mixto). Esta clasificación permitió correlacionar los patrones definidos con la respuesta a NAC y la supervivencia global. Sin embargo, al aplicar esta metodología en nuestra cohorte reproduciendo la misma clasificación en tres grupos, identificamos una notable heterogeneidad en el clúster mixto, lo que sugirió la necesidad de un análisis más detallado para comprender mejor las características IHC y clínico-patológicas de estos tumores y su impacto clínico.

Para abordar esta limitación, empleamos la técnica de clusterización k-means, utilizando los histoscores de los marcadores IHC (KRT5/6, KRT14, GATA3 y FOXA1), los mismos utilizados por Font et al. Inicialmente, replicamos la clasificación en tres clústeres (luminal, basal y mixto), obteniendo resultados consistentes con los descritos por ellos. Sin embargo, al analizar el clúster mixto, observamos que este incluía tumores con características clínicas y patrones de expresión inmunohistoquímica que se solapaban parcialmente con el clúster basal. En particular, identificamos un grupo dentro del mixto con sobreexpresión significativa de KRT14 y características clínico-patológicas similares al clúster basal, lo que dificultaba su correcta clasificación y análisis.

Con el fin de capturar esta complejidad, ampliamos el análisis a cuatro clústeres mediante k-means. Esta nueva clasificación permitió identificar un subgrupo adicional dentro del clúster mixto, que denominamos Basal KRT14 Alto, el cual mostró una marcada sobreexpresión de KRT14 y un perfil inmunohistoquímico más específico. Este subgrupo representaba una fracción significativa de los tumores previamente asignados al grupo mixto. Según el análisis del dendrograma circular, el Basal KRT14Alto compartía marcadores basales (KRT5/6) y características clínico-patológicas propias del clúster basal, justificando su separación en un clúster independiente.

En un primer momento, de los 139 pacientes analizados, 71 fueron asignados al grupo mixto. Con esta nueva clasificación en cuatro clústeres, logramos dividir este grupo en 41 tumores mixtos y 30 pertenecientes al subgrupo Basal KRT14Alto. Esta subclasificación no solo permitió una caracterización más precisa de los tumores, sino que también resaltó la importancia de diferenciar el grupo mixto para mejorar la correlación con la respuesta terapéutica y los resultados clínicos. Estos hallazgos subrayan la relevancia de refinar las clasificaciones moleculares para capturar con mayor precisión la heterogeneidad biológica del CV, contribuyendo al diseño de estrategias terapéuticas más efectivas y personalizadas.

El clúster basal fue el más predominante de nuestra serie con una representación del 38.1% y una inmunoexpresión elevada de KRT5 y KRT14, y baja o negativa de GATA3. Encontramos otro clúster con características similares al subtipo basal, que además de caracterizarse por expresión elevada de KRT5, variabilidad en la expresión de GATA3,

presentaba de forma característica una sobreexpresión de KRT14 mostrando un perfil de marcadores basales y características clínicopatológicas similares al clúster basal, que denominamos clúster basal KRT14Alto, representado el 21.6% de la serie. Ambos subgrupos presentaron expresión de KRT14 y KRT5/6 mostrando características más agresivas, correlacionándose con estadios más elevados, y aumento de diferenciación escamosa, concordante con la literatura [81]. La mayoría de los casos femeninos de nuestra cohorte, así como los fumadores, pertenecieron al grupo basal agrupado (basal y/o basal KRT14Alto). Curiosamente, el subgrupo basal con alta KRT14 mostró mejor supervivencia global. Tanto el grupo basal como el basal KRT14Alto presentan tasas de supervivencia más altas en pacientes que logran respuesta completa en comparación con respondedores parciales.

El segundo grupo más frecuente, representando el 29.5 % de los casos, fue el mixto, caracterizado por una alta expresión de GATA3, FOXA1 y KRT5, y una baja expresión de KRT14. Estos pacientes mostraron la peor supervivencia y una mayor asociación con metástasis viscerales. La combinación de positividad para KRT5, un marcador basal, y GATA3, un marcador luminal, refleja la dualidad fenotípica de este grupo, lo que dificulta su clasificación como exclusivamente basal o luminal. Este fenómeno, ya destacado por el grupo de Lund en su clasificación molecular de tumores ba/sq, subraya la complejidad de subtipos con características mixtas, donde los marcadores histológicos no permiten una categorización precisa, complicando tanto el diagnóstico como la predicción de respuesta terapéutica [78,211].

El grupo luminal fue el menos común de nuestra serie, mostrando niveles reducidos de KRT5 y KRT14, con un ligero incremento en los niveles GATA3 y fueron los que mejor supervivencia global, estadios más bajos y mayor diferenciación urotelial [75,72,78,83]. Existió una correlación positiva entre GATA3 y FOXA1 en los subtipos luminales. La pérdida de GATA3 se asocia con peor supervivencia, estrechamente vinculada con FOXA1, cuya pérdida también indica un peor pronóstico en MIBC [209].

Al igual que en nuestra cohorte, la mayoría de las series publicadas sobre CV muestran un predominio del subtipo basal en hombres en comparación con mujeres, con una edad media de diagnóstico cercana a los 69-71 años. Los tumores basales suelen asociarse con estadios más avanzados (T3-T4), alta tasa de invasión linfovascular, y una histología frecuente de diferenciación escamosa, lo que refleja un comportamiento clínico más agresivo. Por otro lado, los tumores luminales, tanto en nuestra cohorte como en otras series, tienden a presentarse en estadios más tempranos (T2), con menor tasa de invasión linfovascular y una histología predominantemente papilar, lo que se asocia con una mejor supervivencia global. Estas características clínicas y patológicas han sido consistentemente reportadas en las cohortes analizadas en los artículos revisados, confirmando la tendencia general observada en nuestra serie [71, 72, 81, 126,159-162].

La KRT20 es otro de los marcadores utilizado para distinguir el subtipo luminal. En nuestro estudio, encontramos una asociación entre KRT20 y GATA3, pero esta no resultó significativa. Esto podría sugerir que la expresión de KRT20 en CVMI podría representar una diferenciación terminal, lo que reduce su relevancia como marcador en la

clusterización [78, 154, 209]. Este hallazgo es consistente con estudios previos que han descrito la "pseudo-diferenciación" de KRT20 en tumores avanzados, que no es más que la corrupción del programa normal de diferenciación a lo largo de la progresión tumoral, donde su expresión tiende a localizarse en capas intermedias de las células tumorales, reflejando un programa de diferenciación aberrante en lugar de uno característico del subtipo luminal [78, 212]. Además, su asociación con características histológicas de diferenciación terminal podría explicar su menor especificidad en la identificación de subtipos luminales en comparación con otros marcadores como GATA3 o FOXA1.

Por tanto, estos resultados subrayan las limitaciones de utilizar KRT20 como único marcador para definir subtipos luminales en CVMI. En lugar de ello, su inclusión debería complementarse con un panel de biomarcadores más amplio o métodos de clasificación transcriptómica, como lo sugieren estudios recientes, para capturar de manera más precisa la heterogeneidad molecular y funcional de los tumores luminales que incluyen tumores con diversas características moleculares y pronósticos inherentes [91, 94, 212].

La expresión de KRT5/6 se ha asociado con el subtipo basal en CV, estableciéndose como un marcador inmunohistoquímico clave para identificar este subtipo. Además, su expresión se ha correlacionado con características agresivas como invasión muscular y perineural, así como con una peor supervivencia en diversos estudios, consolidando su relevancia clínica [213,214]. En nuestra investigación, utilizamos KRT5/6 como parte de nuestra estrategia para categorizar los subtipos basales fundamentalmente. Este enfoque, además de ser respaldado por estudios previos que combinan KRT5/6 con otros marcadores como FOXA1, para identificar el subtipo basal con alta sensibilidad y especificidad [83], coincide con los criterios establecidos en la reunión de consenso de 2015 organizada por el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, en la que se definió la combinación de KRT5/6+ y KRT14+ con la ausencia de FOXA1 y GATA3 como criterio inmunohistoquímico estándar para la identificación del subtipo basal escamoso [215]. Además, estudios recientes han destacado que la tinción de KRT5 suele ser más intensa y detectable en comparación con otros marcadores basales, como CD44, lo que refuerza su utilidad práctica en entornos clínicos [216]. Sin embargo, como hemos mencionado anteriormente, existen diferencias en la metodología de subtipificación por IHC, particularmente en la expresión de KRT5 entre diferentes autores. El grupo Lund [78] sugiere un patrón de expresión más débil de KRT5 de los nidos tumorales en los subtipos luminales y una expresión difusa y uniforme en los subtipos basales, una metodología seguida por otros estudios [210]. En contraste, otros autores emplean un enfoque más directo y simplificado, utilizando KRT5 como un marcador binario, positivo para subtipos basales y negativo para luminales [156, 158, 208, 209], o aplicando un histoscore [159], como en nuestro estudio, sin considerar estos patrones de expresión más detallados, resultando en una clasificación más sencilla de tumores basales y luminales. En nuestra serie, la expresión de KRT5 no se limitó a los subtipos basal y basal KRT14 Alto, ya que también se observó en el subtipo mixto.

El uso de KRT14 como marcador clasificador en la diferenciación luminal y basal en el CV ha sido ampliamente respaldado por su papel como marcador de células madre basales

menos diferenciadas del urotelio normal. Su expresión precede a la de KRT5 y KRT20, asociadas a células intermedias y superficiales respectivamente, consolidándose como un indicador clave del subtipo basal en CVMI [217-219]. Según el grupo Lund, KRT14 presenta mayor expresión en el subtipo basal escamoso, con niveles más altos en tumores UroB comparados con UroA, mientras que los tumores GU exhiben una tinción ausente o parcheada [74, 78]. Estudios adicionales han identificado que aproximadamente la mitad de los carcinomas uroteliales expresan KRT14, correlacionándose esta expresión con características agresivas, como resistencia a la quimioterapia y peor supervivencia global [218, 220, 221].

En nuestro estudio, el subtipo basal KRT14 Alto mostró una supervivencia global superior al subtipo basal sin sobreexpresión de KRT14, un hallazgo que contradice la asociación previamente descrita entre la sobreexpresión de KRT14 y el mal pronóstico [218]. No obstante, hay que indicar que en el estudio de supervivencia global se incluyeron tanto pacientes que no habían recibido NAC como los si la habían recibido. Al analizar la probabilidad de supervivencia, en los pacientes sin NAC, observamos que aquellos con sobreexpresión KRT14 esta es menor en comparación con los luminales y se equipara ligeramente con la de los basales sin sobreexpresión de KRT14. En contraste, al valorar la supervivencia en función de la respuesta a NAC, se evidencia que los pacientes con expresión elevada de KRT14 habían respondido mejor al tratamiento y mostraban mejores tasas de supervivencia. Este hecho, podría explicar la superior supervivencia global observada en la serie cuando se evalúa de manera conjunta ambas subpoblaciones. Este hallazgo resalta la importancia de considerar el impacto de la NAC en la dinámica de los subtipos moleculares y su influencia en los resultados a largo plazo. Además, es posible que existan factores moduladores adicionales que influyen en la dinámica de los tumores KRT14Alto, destacando la importancia de considerar las características moleculares y clínicas del tumor en la interpretación de los biomarcadores. Warrick et al. destacaron que las líneas celulares de CV pueden clasificarse en subtipos luminales y basales, demostrando que FOXA1, GATA3 y PPAR γ desempeñan un papel crucial en la promoción de la transdiferenciación de células basales hacia un fenotipo luminal, un proceso conocido como plasticidad fenotípica [222]. En este sentido, la coexpresión de KRT14 y GATA3 en ciertos tumores podría reflejar un estado intermedio donde las células tumorales exhiben características tanto basales como luminales. Este hallazgo coincide con estudios que sugieren que KRT14 no solo actúa como un marcador basal estricto, sino también como un marcador de diferenciación escamosa, particularmente en tumores con características mixtas [223]. Este mismo grupo analizó variantes histológicas de carcinomas uroteliales y encontraron que la expresión de FOXA1 y KRT14 puede delimitar subtipos basales y luminales, con una coexpresión ocasional en ciertos casos. Esto resalta la coexistencia de patrones de diferenciación que, lejos de ser excluyentes, podrían contribuir a la heterogeneidad tumoral observada en tumores KRT14Alto [223]. En nuestro estudio, observamos que la expresión de GATA3 en el subtipo basal KRT14Alto fue mayor que en los basales sin sobreexpresión de KRT14, pero menor que en los subtipos luminales. Este patrón podría reflejar una diferenciación escamosa en lugar de una basal estricta, lo que podría

modular el comportamiento clínico de estos tumores. Además, el impacto clínico de esta plasticidad fenotípica podría ser relevante en el contexto de las características clínicas y moleculares del tumor. En particular, Wang et al. señalaron que la expresión de GATA3 en tumores luminales se asocia con un menor índice de proliferación, lo que podría influir en las tasas de supervivencia observadas en el subtipo KRT14Alto [224]. Por lo tanto, la coexistencia de marcadores de diferenciación mixtos podría estar relacionada con una menor agresividad relativa en este subtipo.

Es importante destacar que nuestro seguimiento prolongado de hasta 120 meses permitió observar tendencias a largo plazo que probablemente no se evidencian en estudios con períodos de observación más cortos. Este hallazgo resalta la necesidad de realizar análisis temporalizados en estudios de supervivencia, considerando el impacto a largo plazo de KRT14 en el contexto clínico [209, 225].

Finalmente, la variabilidad en los impactos de KRT14 observada en otros cánceres, como el de mama, subraya la influencia del microambiente tumoral y el perfil genético del paciente en la funcionalidad de este marcador. En el cáncer de mama, un estudio mostró que la sobreexpresión de KRT14 se asocia con un mejor pronóstico en pacientes sin enfermedad metastásica, destacando su posible papel en la modulación de vías de diferenciación tumoral o su interacción específica con el microambiente [226]. Estos hallazgos refuerzan la necesidad de investigaciones futuras con cohortes más amplias y enfoques integrados, combinando técnicas de inmunohistoquímica, transcriptómica y análisis clínico para descifrar completamente el papel de KRT14 en la heterogeneidad del CU.

Nuestros hallazgos subrayan la complejidad inherente a la subtipificación molecular en el CV. El comportamiento inesperado de los tumores KRT14Alto destaca la necesidad de explorar los mecanismos moleculares subyacentes y de redefinir los paradigmas actuales, avanzando hacia estrategias de estratificación y tratamientos personalizados más precisos.

La falta de estandarización en los algoritmos de interpretación y la variabilidad en los métodos y anticuerpos empleados entre estudios representan barreras significativas para la implementación práctica de la IHC como marcador subrogado en el manejo del CV. Estas diferencias no solo afectan los paneles de marcadores utilizados, sino también los puntos de corte, las metodologías de cuantificación y la interpretación de los resultados, limitando la comparabilidad entre estudios y reduciendo la robustez de las conclusiones.

En este contexto, Font et al. propusieron una clasificación basada en IHC que utiliza cuatro marcadores principales: KRT5/6, KRT14, GATA3 y FOXA1, para subtipificar los tumores en categorías BASQ-like, luminales y mixtos. Los tumores BASQ-like se caracterizaron por una alta expresión de KRT5/6 y KRT14 y una baja expresión de GATA3 y FOXA1, mientras que los tumores luminales presentaron el patrón opuesto, y los mixtos tenían características intermedias. Para simplificar este proceso, Font et al. implementaron un modelo de clasificación basado en CART que utiliza únicamente

KRT14 como marcador inicial, seguido de KRT5/6, para discriminar eficazmente entre los subtipos. Este modelo demuestra que dos marcadores clave pueden ser suficientes para una clasificación precisa, especialmente para identificar los tumores BASQ-like [159]. Este enfoque es particularmente relevante porque reduce la complejidad del proceso de subtipificación, manteniendo una alta precisión diagnóstica, lo que facilita su implementación en entornos clínicos.

Inspirados en este modelo, hemos adoptado el enfoque de clasificación CART, empleando un algoritmo que también inicia con KRT14 como marcador principal, seguido de KRT5 y GATA3, con el objetivo de simplificar y optimizar la subtipificación, asegurando tanto la reproducibilidad como la aplicabilidad en diferentes cohortes. Aunque este enfoque es prometedor, subraya la necesidad de iniciativas colaborativas para armonizar la clasificación molecular y validar la aplicabilidad y reproducibilidad de estos algoritmos en diferentes poblaciones.

Por ejemplo, el grupo de Lund ha explorado metodologías más complejas para la subtipificación del cáncer de vejiga, integrando un algoritmo IHC con marcadores como GATA3 y KRT5 en un primer nivel, seguidos de p16 y EpCAM, y otros marcadores adicionales en niveles posteriores [161]. Sin embargo, esta complejidad ha limitado su adopción clínica, ya que no todos los marcadores son de aplicabilidad rutinaria, y el modelo resulta menos sencillo debido al mayor número de anticuerpos empleados.

En un esfuerzo por simplificar y optimizar la subtipificación, Hardy et al. evaluaron la precisión de modelos de CART basados en la taxonomía de Lund para clasificar los principales subtipos moleculares en CVMI. A pesar de la disponibilidad generalizada de anticuerpos, se encontró un equilibrio entre precisión y simplicidad. El modelo multiclase, que incluía la expresión de ocho proteínas, alcanzó una precisión del 82% al 86%, comparable a los modelos basados únicamente en GATA3 y KRT5 o en KRT14 y RB1, pero con una mayor complejidad [127].

En cambio, los modelos simplificados basados CART, como los de Font et al., muestran que un panel más reducido de marcadores clave, como KRT14 y KRT5, puede lograr un equilibrio óptimo entre precisión y simplicidad, maximizando la viabilidad clínica [159]. Actualmente, no existe consenso sobre el número óptimo ni la selección ideal de anticuerpos para la subtipificación del CVMI, y menos aún para el CVNMI, lo que resalta la necesidad de desarrollar enfoques estandarizados y prácticos.

La clasificación propuesta por Font et al. se encuentra respaldada en el estudio de Warrick et al., que evaluó la expresión de FOXA1 y KRT14 como marcadores para diferenciar subtipos luminales y basales en CVMI, incluyendo CU convencional y sus variantes histológicas. Según este estudio, los subtipos basales se caracterizaron por una alta expresión de KRT14 y una baja expresión de FOXA1, mientras que los subtipos luminales presentaron el patrón inverso, baja expresión de KRT14 y alta de FOXA1. Además, clasificaron variantes específicas como los carcinomas micropapilares, nested y plasmocitoides dentro del subtipo luminal, destacando la utilidad de estos marcadores en la subtipificación de variantes histológicas del cáncer de vejiga [223]

En nuestra serie, incluimos dos casos de carcinomas micropapilares, de los cuales uno se correlacionó con el subtipo luminal y el otro con el subtipo basal, reflejando la heterogeneidad biológica de estas variantes. Los tres casos de carcinoma nested se agruparon dentro del subtipo mixto, y el único caso de carcinoma sarcomatoide se identificó como basal. Estos hallazgos refuerzan la relevancia de utilizar marcadores como FOXA1 y KRT14 no solo para discriminar entre los subtipos luminal y basal, sino también para abordar la clasificación taxonómica de variantes histológicas que presentan patrones fenotípicos únicos.

El presente estudio contribuye a comprender como los subtipos moleculares determinados con IHC se relacionan con la respuesta a NAC. Los primeros trabajos establecieron que los subtipos tumorales responden de manera diferencial a la NAC, consolidándose la noción de que los tumores basales, caracterizados por su alta proliferación y agresividad, presentan una mayor probabilidad de respuesta a esta terapia. Un trabajo clave en esta área fue el de Seiler et al., que evaluó el impacto de los subtipos moleculares en CVMI para predecir la respuesta y la supervivencia tras la NAC. Este estudio, realizado en una cohorte de 343 pacientes, confirmó que los tumores basales mostraron mejores resultados de supervivencia tras recibir NAC en comparación con otros subtipos moleculares [79].

En nuestra cohorte, 65 pacientes recibieron NAC. De estos, el 63,1% correspondieron al subgrupo basal (33,9% clúster basal, 29,2% clúster basal KRT14Alto), seguidos de los mixtos (27,7%) y, en menor proporción, los luminales (9,2%). Los pacientes del clúster basal demostraron una mejora en la supervivencia con NAC, especialmente los del clúster basal KRT14Alto, quienes mostraron los resultados de supervivencia más favorables tanto en los respondedores completos como en los respondedores parciales, parciales. En el caso de los subtipos luminales, no se encontraron diferencias significativas entre los respondedores y los no respondedores, lo que refuerza la evidencia de que los subtipos luminales tienen un mejor pronóstico independientemente del uso de NAC y podrían no beneficiarse significativamente de este tratamiento. Por otro lado, los pacientes con subtipos mixtos mostraron una supervivencia comparable a la de los subtipos basales, tanto en respondedores como en no respondedores, en contraste con los que no recibieron NAC. Aunque la tasa de pRC fue menor en los mixtos que en los basales, su supervivencia global fue similar, destacando la importancia de este subgrupo como candidatos potenciales para NAC.

Estos datos concuerdan con estudios previos que correlacionan los subtipos moleculares, basados en IHC, en CVMI con la respuesta a NAC. Helal et al., en un estudio con 60 pacientes, encontraron que el subtipo basal, identificado por marcadores como KRT5/6 y KRT14, mostró una mejor respuesta a NAC, reflejada en una reducción significativa de la carga tumoral. Este subtipo se asocia con mutaciones en TP53 y alteraciones en vías de reparación del ADN, lo que podría explicar su sensibilidad al cisplatino. En contraste, los tumores con estado p53-WT mostraron resistencia a la quimioterapia, destacando la importancia de biomarcadores predictivos en la selección de pacientes para NAC [162]

De manera similar, Font et al. evaluaron 126 pacientes y reportaron que los tumores basales tenían 4 veces más probabilidad de alcanzar pCR en comparación con los tumores luminales. Estos hallazgos subrayan el valor de la estratificación molecular mediante IHC para optimizar los beneficios clínicos de la NAC, especialmente en pacientes con subtipos basales, como ocurre en nuestra serie de casos [159]. Aunque no se observaron diferencias significativas en la supervivencia global, se evidenció una mejora en la supervivencia específica por grupos según su respuesta a NAC.

En contraste, aunque existen estudios en CVNMI como los de Lu J et al. y Wang T et al., que han analizado la respuesta a la quimioterapia intravesical o intraarterial en tumores basales, estas investigaciones no son comparables directamente con nuestro enfoque en CVMI y NAC. En dichos estudios, los tumores basales en estadios tempranos mostraron respuestas favorables a estrategias específicas, como la quimioterapia con gemcitabina [172, 227]. Sin embargo, en nuestro trabajo, nos centramos exclusivamente en CVMI y confirmamos que los tumores basales tienen una mejor respuesta y pronóstico con NAC, en comparación con los subtipos luminales y mixtos.

Finalmente, la revisión de López-Beltrán et al. refuerza la importancia de la clasificación molecular en la personalización de las terapias. Los subtipos luminales y basales presentan diferencias clínico-pronósticas claras, siendo los tumores basales más sensibles a NAC basada en cisplatino, mientras que los luminales podrían beneficiarse de terapias dirigidas o inmunoterapias [203]. Estos hallazgos respaldan nuestras observaciones y subrayan la relevancia de la clasificación molecular como herramienta fundamental en la toma de decisiones terapéuticas en CVMI.

Este estudio presenta varias limitaciones. En primer lugar, la naturaleza retrospectiva del diseño puede introducir sesgos en la selección de casos y limitar la generalización de los resultados. Además, el tamaño de muestra es reducido, especialmente en el subgrupo de pacientes que recibieron tratamiento neoadyuvante, lo que afecta la robustez estadística. Otra limitación es la falta de análisis transcriptómicos para confirmar los subtipos moleculares, debido a restricciones económicas, lo que reduce la precisión en la identificación molecular. Es importante destacar que las muestras analizadas en TMA pueden no representar adecuadamente la totalidad del tumor. Esto resalta la heterogeneidad tumoral como un desafío crucial tanto para el tratamiento con NAC como para la taxonomización inmunohistoquímica. Asimismo, se debe considerar la variabilidad interobservador en la interpretación de los resultados de los anticuerpos, particularmente en la evaluación de KRT5, dada la discrepancia en los patrones de tinción reportados entre estudios, lo que puede influir en la reproducibilidad. Finalmente, la ausencia de validación externa en cohortes independientes limita la aplicabilidad de los hallazgos en otros contextos clínicos.

VI. CONCLUSIONES

1ª) Este estudio confirma el valor de la IHC como una herramienta útil para la clasificación molecular subrogada del CV, permitiendo con la evaluación de cuatro marcadores inmunohistoquímicos de rutina, con una precisión mayor del 90%, la identificación de los subtipos moleculares basal, luminal y mixto tanto en CVMI como en CVNMI, siendo los anticuerpos que mostraron mayor capacidad para discriminar subtipos: KRT14, KRT5, GATA3 y KRT20.

2ª) Mediante análisis de clusterización k-means, se diferencia un subclúster, previamente incluido en el tipo mixto y con características similares al subtipo basal, que además de expresión elevada de KRT5, y expresión variable de GATA3, presenta una manifiesta sobreexpresión de KRT14, al que hemos denominado clúster basal KRT14Alto.

3ª) Mediante el uso de tres marcadores luminales (FOXA1, GATA3, KRT20) y dos basales (KRT5 y KRT14), se han diferenciado cuatro grupos: basal, caracterizado por aumento en la expresión de KRT5, variabilidad en la expresión de KRT14, y baja o negativa expresión de FOXA1, GATA3 y KRT20; basal-KRT14-Alta, con altos niveles de KRT5 y KRT14 y expresión variable de GATA3 y FOXA1; luminal, caracterizado por aumento de FOXA1 y GATA3, bajos niveles de KRT14 y niveles muy bajos de KRT5 y mixto, con variabilidad en la expresión de marcadores tanto basales como luminales.

4ª) En cuanto a las características clínico-patológicas de los subtipos de nuestra serie, los CV basales fueron los más frecuentes y los más prevalentes en mujeres y fumadores, estuvieron significativamente asociados con la diferenciación escamosa y con tendencia a asociación con estadios más avanzados; el tipo mixto es el segundo en frecuencia y el más tendente a la presencia de metástasis viscerales. El tipo luminal ha sido el menos común, presentando principalmente morfología urotelial y muy bajo porcentaje de estadios avanzados (T3/T4). Se confirma así una correlación directa entre los subtipos histológicos y la taxonomía molecular, reflejando una distribución similar a la descrita en otras series publicadas.

5ª) Respecto al valor predictivo de respuesta a NAC, encontramos que los tumores basales tienen mejor respuesta, especialmente los del clúster basal KRT14Alto. En el caso del tipo luminal, no se encontraron diferencias significativas entre recibir o no NAC, teniendo un mejor pronóstico independientemente de su uso y, por tanto, podrían no beneficiarse de este tratamiento. Aunque la tasa de pRC fue menor en los mixtos que en los basales, su supervivencia global tras NAC fue similar, señalando a este subgrupo

como potenciales candidatos para NAC. Estos hallazgos subrayan el valor de la estratificación molecular mediante IHC para optimizar los beneficios clínicos de este tratamiento.

6ª) La supervivencia global, al categorizar a los pacientes en tres subtipos, es mejor en el tipo luminal, seguido por el basal, teniendo el grupo mixto el peor pronóstico. Al analizar las diferencias de supervivencia tras NAC, los pacientes luminales presentan supervivencia similares, independientemente del tratamiento y tasa de respuesta, mientras que los subtipos basales mostraron una mejor supervivencia con NAC, especialmente los del clúster basal-KRT14-Alta, tanto en pRC como en pRP. Los pacientes del grupo mixto mostraron tasas de supervivencia más altas en los respondedores completos a NAC. Este hallazgo resalta la importancia de considerar el impacto de la NAC en la dinámica de estos tumores en función de los subtipos moleculares.

7ª) La medición o interpretación de resultados de los anticuerpos empleados representa una importante variabilidad metodológica que dificulta la comparación entre los estudios. Para abordar esta limitación, empleamos los histoscores para la medición de la expresión de los marcadores IHC, que, al combinar el porcentaje de células teñidas con la intensidad, proporciona un análisis semicuantitativo más objetivo, con buena reproducibilidad interobservador en nuestra serie.

8ª) El algoritmo K-means empleado en nuestro estudio para definir los subtipos moleculares subrogados, ha seleccionado la KRT14 como marcador inicial, seguido de KRT5/6 y GATA3, discriminando eficazmente entre los grupos. Este modelo demuestra que tres marcadores claves pueden ser suficientes para una clasificación precisa, especialmente para identificar los tumores BASAL-like, lo que reduce la complejidad del proceso de subtipificación, manteniendo una alta precisión diagnóstica, lo cual facilita su implementación y uso en entornos clínicos básicos.

Finalizar diciendo que, este estudio presenta limitaciones que impiden la generalización de los resultados, como son: la naturaleza retrospectiva del diseño, el tamaño de la muestra, la falta de análisis transcriptómicos para confirmar los subtipos moleculares, el análisis IHQ realizado en TMA y no cortes completos, así como la ausencia de validación externa en cohortes independientes.

No obstante, los resultados obtenidos apoyan la utilidad de la IHC como marcador subrogado de la clasificación molecular del CV, ayudando a diferenciar subtipos moleculares con diferencias pronósticas y predictivas de respuesta a NAC. Para validar estos hallazgos, son necesarios estudios prospectivos en cohortes con mayor tamaño muestral, así como establecer criterios diagnósticos estandarizados y consensuados para la implementación clínica de la IHC como marcador subrogado en la clasificación molecular del cáncer vesical.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Moore, K. L., & Persaud, T. V. N. Embriología Clínica. 10 ed. Wolters Kluwer; 2019.
2. Sadler TW. Langman's Medical Embryology. 14th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins; 2019.
3. Standring, S. Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice. 41st ed. Philadelphia: Elsevier; 2016.
4. Mills SE. Histology for Pathologists. 3rd ed. LWW; 2019.
5. Klutts, J. S., & Pfeifer, J. D. Washington Manual of Surgical Pathology. 3rd ed. Wolters Kluwer; 2021.
6. National Center for Biotechnology Information. (2021). Bookshelf ID: NBK540963. [Internet].
7. Drumm BT, Koh SD, Andersson KE, Ward SM. Calcium signalling in Cajal-like interstitial cells of the lower urinary tract. Nat Rev Urol. 2014;11(10):555-64. <https://doi.org/10.1038/nruol.2014.241>
8. Lester SC, Cornell LD. Dr. Lester's Manual of Surgical Pathology. 3rd ed. Philadelphia: Elsevier; 2020.
9. Rosai J. Principles and Techniques of Surgical Pathology. Menlo Park, CA: Addison-Wesley Publishing Co.; 1983; 525
10. Mazzucchelli R. Bladder Cancer Sample Handling and Reporting: Pathologist's Point of View. Analytical Cellular Pathology. 2018; 2018:7520763. <http://doi.org/10.3389/fsurg.2021.754741>
11. Hansel DE, Miller JS, Cookson MS, Chang SS. Challenges in the pathology of non-muscle-invasive bladder cancer: a dialogue between the urologic surgeon and the pathologist. Urology. 2013; 81(5):1123-30. <http://doi.org/10.1016/j.urology.2013.01.027>

12. Zhu CZ, Ting HN, Ng KH, Ong TA. A review on the accuracy of bladder cancer detection methods. *J Cancer Res Ther.* 2018; 14(3):458-463. <http://doi.org/10.7150/jca.28989>

13. Richterstetter M, Wullich B, Amann K, Haeberle L, Engehausen DG, Goebell PJ, et al. The value of extended transurethral resection of bladder tumour (TURBT) in the treatment of bladder cancer. *BJU Int.* 2012;110: E76-9. <http://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2011.10904.x>

14. College of American Pathologists. Protocol for the examination of specimens from patients with carcinoma of the urinary bladder. Version 4.1.0.0 [Internet]. 2020 [cited 2023 May 8]. Available from: https://documents.cap.org/protocols/Bladder_4.1.0.0.REL_CAPCP.pdf.

15. Chandra A, Griffiths D, McWilliam LJ. Best practice: gross examination and sampling of surgical specimens from the urinary bladder. *J Clin Pathol.* 2017 Jan;70(1):8-19. <http://doi.org/10.1136/jcp.2009.071191>

16. IARC. Bladder Cancer Fact Sheet. Globocan 2020. International Agency for Research on Cancer. [Internet]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/30-Bladder-fact-sheet.pdf>

17. Moch H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE. (eds.) *TNM Classification of Malignant Tumours*, 5th edition, Volume 8: Urinary Bladder. Geneva: World Health Organization; 2020.

18. SEOM. Las cifras del cáncer en España 2025. Sociedad Española de Oncología Médica; 2025. Disponible en: https://seom.org/images/LAS_CIFRAS_DMC2025.pdf

19. Instituto Nacional de Estadística (INE). Defunciones según la causa de muerte. Disponible en: <https://www.ine.es/jaxiT3/Tabla.htm?t=6609>

20. Zozaya N, García-Altés A, Márquez S, et al. Economic burden of bladder cancer in Spain from 2015 to 2018: an incidence-based cost-of-illness study. *BMC Health Serv Res.* 2021;21(1):100. <http://doi.org/10.1186/s12913-021-06080-0>

21. Koshiairis C, Aveyard P, Oke J, Ryan R, Szatkowski L, Stevens R, Farley A. Smoking cessation and survival in lung, upper aero-digestive tract and bladder cancer: cohort study. *BMJ*. 2017; 117:1224-1232. <http://doi.org/10.1038/bjc.2017.179>
22. Khan MS, Thornhill JA, Gaffney E, Loftus B, Butler MR. Risk factors for bladder cancer: a case-control study. *BJU*. 2002;90(6):650-6.
23. Tang H, Shi W, Fu S, Wang T, Zhai S, Song Y, Han J. Pioglitazone and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Med*. 2018;7(4):1070-1080. <http://doi.org/10.1002/cam4.1354>
24. Filipova E, Uzunova K, Kalinov K, Vekov T. Pioglitazone and the Risk of Bladder Cancer: A Meta-Analysis. *Diabetes Ther*. 2017;8(4):705-726. <http://doi.org/10.1007/s13300-017-0273-4>
25. Vermeulen SH, Hanum N, Grotenhuis AJ, Castaño-Vinyals G, van der Heijden AG, Aben KK, Mysorekar IU, Kiemeney LA. Recurrent urinary tract infection and risk of bladder cancer in the Nijmegen bladder cancer study. *BJC*. 2015;113(2):372-6. <http://doi.org/10.1038/bjc.2014.601>
26. El Amir A. Evaluation of Schistosoma haematobium 27–29kDa antigen for immunodiagnosis of schistosomiasis haematobium. *J Egypt Soc Parasitol*. 2008;38(2):435–51
27. Cumberbatch MGK, Cox A, Teare D, Catto JWF. Contemporary Occupational Carcinogen Exposure and Bladder Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2021;7(7):1047-1053. <http://doi.org/10.1001/jamaoncol.2021.0282>
28. Karagas MR, Park S, FOXA1, GATA3 and PPAR γ Cooperate to Drive Luminal Subtype in Bladder Cancer. *Hamilton J, Nelson HH, Mott LA, Kelsey KT*. Gender, smoking, glutathione-S-transferase variants and bladder cancer incidence: a population-based study. *Cancer Lett*. 2005;217(1):63-72
29. Li P, Chen J, Miyamoto H. Androgen receptor signaling in bladder cancer. *Cancers*. 2017;9(2):20. <http://doi.org/10.3390/cancers9020020>
30. Burger M, Catto JWF, Dalbagni G, Grossman HB, Herr H, Karakiewicz P, Kassouf W, Kiemeney LA, La Vecchia C, Shariat SF, Lotan Y. Epidemiology and risk factors of

urothelial bladder cancer. Eur Urol. 2013;63(2):234-41.
<http://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.07.033>

31. Büchner FL, Bueno-de-Mesquita HB, Ros MM, et al. Variety in vegetable and fruit consumption and risk of bladder cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Cancer*. 2011; 128:2971–9. <http://doi.org/10.1002/ijc.25636>

32. Choi JB, Lee EJ, Han KD, Hong SH, Ha US. Estimating the impact of body mass index on bladder cancer risk: Stratification by smoking status. *Investig Clin Urol*. 2018;59(3):162-168. <http://doi.org/10.1038/s41598-018-19531-7>

33. García-Closas, M., Malats, N., Silverman, et al. NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet*. 2005; 366(9486):649-659. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67137-1](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67137-1)

34. Akanksha M, Sandhya S. Role of FGFR3 in Urothelial Carcinoma. *Iran J Pathol*. 2019;14(2):148-155. <http://doi.org/10.30699/IJP.14.2.148>

35. Van der Post RS, Kiemeny LA, Ligtenberg MJ et al. Risk of urothelial bladder cancer in Lynch syndrome is increased, in particular among MSH2 mutation carriers. *J Med Genet*. 2010; 47:464-470. <http://doi.org/10.1136/jmg.2010.076992>

36. Riegert-Johnson DL, Gleeson FC, Roberts M, Tholen K, Youngborg L, Bullock M, Boardman LA. Cancer and Lhermitte-Duclos disease are common in Cowden syndrome patients. *Hered Cancer Clin Pract*. 2010; 8:6. <http://doi.org/10.1186/1897-4287-8-6>

37. Muto S., Horie S., Takahashi S., Tomita K., Kitamura T. Genetic and epigenetic alterations in normal bladder epithelium in patients with metachronous bladder cancer. *Cancer Research*. 2000;60(15):4021–4025.

38. Sidransky D, Frost P, Von Eschenbach A, Oyasu R, Preisinger AC, Vogelstein B. Clonal origin of bladder cancer. *N Engl J Med*. 1992 Mar 12;326(11):737-740.
<http://doi.org/10.1056/NEJM199203123261104>

39. Knowles MA, Hurst CD Molecular biology of bladder cancer: new insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer*. 2014; 15 (1):25–41.
<http://doi.org/10.1038/nrc3817>

40. He X, Marchionni L, Hansel DE, et al. Differentiation of a highly tumorigenic basal cell compartment in urothelial carcinoma. *Stem Cells*. 2009; 27(7):1487–1495. <http://doi.org/10.1038/nrc3817>

41. Kurzrock EA, Lieu DK, Degraffenried LA, Chan CW, Isseroff RR. Label-retaining cells of the bladder: candidate urothelial stem cells. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2008;294(6):1415–1421. <http://doi.org/10.1152/ajprenal.00533.2007>

42. Becereniak K, Kaminska B, Kotarska K, et al. Bladder Cancer in the Genomic Era. *Cancers*. 2018; 1:12. <http://doi.org/10.5858/arpa.2018-0329-RA>

43. Cano Barbadilla T, Álvarez Pérez M, Prieto Cuadra JD, Dawid de Vera MT, Alberca-del Arco F, García Muñoz I, Santos-Pérez de la Blanca R, Herrera-Imbroda B, Matas-Rico E, Hierro Martín MI. The role of immunohistochemistry as a surrogate marker in molecular subtyping and classification of bladder cancer. *Diagnostics*. 2024;14(22):2501. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14222501>

44. Wu XR. Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(9):713-25. <http://doi.org/10.1038/nrc1697>

45. Hartmann A, Schlake G, Zaak D et al. Occurrence of chromosome 9 and p53 alterations in multifocal dysplasia and carcinoma in situ of human urinary bladder. *Cancer Res*. 2002; 62:809–18

46. Mitra AP, Cote RJ. Molecular pathogenesis and diagnostics of bladder cancer. *Annu. Rev. Pathol Mech Dis*. 2009.4:251-285. <http://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092230>

47. Lopez-Beltran, A., Cimadamore, A., Montironi, R., & Cheng, L. Molecular pathology of urothelial carcinoma. *Human Pathology*. 2021; 113, 67-83. <http://doi.org/10.1016/j.humpath.2021.04.001>

48. Saal LH, Johansson P, Holm K, et al. Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(18): 7564–7569. <http://doi.org/10.1073/pnas.0702507104>

49. Ching CB, Hansel DE. Expanding therapeutic targets in bladder cancer: the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Lab Invest.* 2010;90(10):1406–1414. <http://doi.org/10.1038/labinvest.2010.133>

50. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets.* 2012;16(1): 103–119. <http://doi.org/10.1517/14728222.2011.645805>

51. Ahmad I. The role of WNT signalling in urothelial cell carcinoma. *Ann R Coll Surg Engl.* 2015;97(7): 481-486. <http://doi.org/10.1308/rcsann.2015.0008>

52. Ahmad I, Patel R, Liu Y, Singh LB, Taketo MM, Wu X-R, Leung HY, Sansom OJ. Ras mutation cooperates with b-catenin activation to drive bladder tumourigenesis. *Cell Death Dis.* 2011; 2:124. <http://doi.org/10.1038/cddis.2011.7>

53. Rampias T, Vgenopoulou P, Avgeris M, et al. A new tumor suppressor role for the Notch pathway in bladder cancer. *Nat Med.* 2014;20(10):1199–1205. <http://doi.org/10.1038/nm.3678>

54. Maraver A, Fernandez-Marcos PJ, Cash TP, et al. NOTCH pathway inactivation promotes bladder cancer progression. *J Clin Invest.* 2015;125(2):824–830. <http://doi.org/10.1172/JCI78185>

55. Chesnut C, Subramanian D, Dandawate SJ, et al. Targeting Major Signaling Pathways of Bladder Cancer with Phytochemicals: A Review. *Nutr Cancer.* 2019; 73(11–12): 2249–2271. <http://doi.org/10.1080/01635581.2020.1856895>

56. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2013; 110:6021-6026. <http://doi.org/10.1073/pnas.1303607110>

57. Kinde, I., Munari, E., Faraj, S. F., et al. TERT promoter mutations occur early in urothelial neoplasia and are biomarkers of early disease and disease recurrence in urine. *Cancer Research.* 2013; 73(24), 7162-7167. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2498>

58. Inamura, K. Bladder cancer: New insights into its molecular pathology. *Cancers*. 2018; 10(4). <http://doi.org/10.3390/cancers10040100>

59. Mitra AP, Datar RH, Cote RJ. 2006. Molecular pathways in invasive bladder cancer: new insights into mechanisms, progression, and target identification. *J Clin Oncol*. 24:5552-64. <http://doi.org/10.1200/JCO.2006.08.2073>

60. Chatterjee SJ, George B, Goebell PJ, Alavi-Tafreshi M, Shi SR, et al. Hyperphosphorylation of pRb: a mechanism for RB tumour suppressor pathway inactivation in bladder cancer. *J Pathol*. 2004; 203:762-70. <http://doi.org/10.1002/path.1567>

61. Kamai T, Takagi K, Asami H, Ito Y, Oshima H, Yoshida KI. Decreasing of p27Kip1 and cyclin E protein levels is associated with progression from superficial into invasive bladder cancer. *Br J Cancer*. 2001; 84:1242-51. <http://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1736>

62. Grossman HB, Liebert M, Antelo M, Dinney CP, Hu SX, et al. p53 and RB expression predict progression in T1 bladder cancer. *Clin Cancer Res*. 1998; 4:829-34.

63. Chatterjee SJ, Datar R, Youssefzadeh D, George B, Goebell PJ, et al. Combined effects of p53, p21, and pRb expression in the progression of bladder transitional cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2004; 22:1007-13. <http://doi.org/10.1200/JCO.2004.05.174>

64. Guo CC, Czerniak B. Bladder Cancer in the Genomic Era. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143(6):695-704. <http://doi.org/10.5858/arpa.2018-0329-RA>

65. Pietzak EJ, Bagrodia A, Cha EK, et al. Next-generation Sequencing of Nonmuscle Invasive Bladder Cancer Reveals Potential Biomarkers and Rational Therapeutic Targets. *Eur Urol*. 2017;72(6):952-959. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.05.032>

66. Knollman H, Godwin JL, Jain R, Wong YN, Plimack ER, and Geynisman M. Muscle Invasive urothelial bladder cancer: an update on systemic therapy. *Ther Adv urol*. 2015;7(6): 312-330. <https://doi.org/10.1177/1756287215607418>

67. Dyrskjøl L, Thykjaer T, Kruhøffer M, Jensen JL, Marcussen N, Hamilton-Dutoit S, Wolf H, Ørntoft TF. Identifying distinct classes of bladder carcinoma using microarrays. *Nat Genet*. 2003;33(1):90-6. <https://doi.org/10.1038/ng1061>

68. Blaveri E, Simko JP, Korkola JE, Brewer JL, Baehner F, Mehta K, DeVries S, Koppie T, Pejavar S, Carroll P. Bladder cancer outcome and subtype classification by gene expression. *Clin Cancer Res.* 2005;11(11):4044-4055. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2409>

69. Chan KS, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, Gill H, Presti J Jr, Chang HY, van de Rijn M, Shortliffe L, Weissman IL. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(33):14016-21. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906549106>

70. Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, Yeh JJ, Milowsky MI, Iyer G, Parker JS, Kim WY. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(8):3110-5. <https://doi.org/10.1073/pnas.1318376111>

71. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, Roth B, Cheng T, Tran M, Lee IL, Melquist J, Bondaruk J, Majewski T, Zhang S, Pretzsch S, Baggerly K, Siefker-Radtke A, Czerniak B, Dinney CP, McConkey DJ. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 2014;25(2):152-65. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.009>

72. Sjö Dahl G, Lauss M, Lövgren K, Chebil G, Gudjonsson S, Veerla S, Patschan O, Aine M, Fernö M, Ringnér M, Månsson W, Liedberg F, Lindgren D, Höglund M. A molecular taxonomy for urothelial carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18(12):3377-3386. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-0077-T>

73. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma. *Nature.* 2014; 507: 315-322. <https://doi.org/10.1038/nature12965>

74. Von der Maase, H. et al. Long-term survival results of a randomized trial comparing gemcitabine plus cisplatin, with methotrexate, vinblastine, doxorubicin, plus cisplatin in patients with bladder cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 4602-4608. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.07.757>

75. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012; 490: 61-70. <https://doi.org/10.1038/nature11412>

76. Nguyen, D. P., & Thalmann, G. N. Contemporary update on neoadjuvant therapy for bladder cancer. *Nat Rev Urol.* 2017; 14(6), 348-358. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.30>

77. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, Hinoue T, Laird PW, Hoadley KA, Akbani R, Castro MAA, Gibb EA, Kanchi RS, Gordenin DA, Shukla SA, Sanchez-Vega F, Hansel DE, Czerniak BA, Reuter VE, Su X, Lerner SP, et al. Comprehensive Molecular Characterization of Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cell.* 2017. 10;171(3):540-556. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.007>

78. Sjö Dahl G, Eriksson P, Liedberg F, Höglund M. Molecular classification of urothelial carcinoma: global mRNA classification versus tumour-cell phenotype classification. *J Pathol.* 2017;242(1):113-125. <https://doi.org/10.1002/path.4886>

79. Seiler R, Ashab HAD, Erho N, van Rhijn BWG, Winters B, Douglas J, Van Kessel KE, Fransen van de Putte EE, Sommerlad M, Wang NQ, Choeurng V, Gibb EA, Palmer-Aronsten B, Lam LL, Buerki C, Davicioni E, Sjö Dahl G, Kardos J, Hoadley KA, Black PC. Impact of Molecular Subtypes in Muscle-invasive Bladder Cancer on Predicting Response and Survival after Neoadjuvant Chemotherapy. *Eur Urol.* 2017;72(4):544-554. <http://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.03.030>

80. Tan TZ, Rouanne M, Tan KT et al. Molecular Subtypes of Urothelial Bladder Cancer: Results from a Meta-cohort Analysis of 2411 Tumors. *Eur Urol.* 2019; 75: 423-432. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.08.027>

81. Kamoun A, de Reynies A, Allory Y et al. A Consensus Molecular Classification of Muscle-invasive Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2020; 77: 420-433. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.09.006>

82. Mo Q, Nikolos F, Chen F, Tramel Z, Lee Y-C, Hayashi K, Xiao J, Shen J, Chan KS. Prognostic Power of a Tumor Differentiation Gene Signature for Bladder Urothelial Carcinomas. *JNCI.* 2018; 110(5):448-459. <https://doi.org/10.1093/jnci/djx243>

83. Rebouissou, S., Bernard-Pierrot, I., De Reyniès, A., et al. EGFR as a potential therapeutic target for a subset of muscle-invasive bladder cancers presenting a basal-like phenotype. *Sci Transl Med.* 2014; 6:244. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008970>

84. Hurst CD, Alder O, Platt FM, Droop A, Stead LF, Burns JE, Burghel GJ, Jain S, Klimczak LJ, Lindsay H, et al. Genomic subtypes of non-invasive bladder cancer with distinct metabolic profile and female gender bias in KDM6A mutation frequency. *Cancer Cell*. 2017;32(5):701-715. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.08.005>
85. Fong MHY, Feng M, McConkey DJ, Choi W. Update on bladder cancer molecular subtypes. *Transl Androl Urol*. 2020;9(6):2881-2889. <https://doi.org/10.21037/tau-2019-mibc-12>
86. Guo CC, Bondaruk J, Yao H, Wang Z, Zhang L, Lee S, Lee JG, Cogdell D, Zhang M, Yang G, et al. Assessment of luminal and basal phenotypes in bladder cancer. *Sci Rep*. 2020;10:9743. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66747-7>
87. Magers MJ, Lopez-Beltran A, Montironi R, Williamson SR, Kaimakliotis HZ, Cheng L. Staging of bladder cancer. *Histopathology*. 2019;74(1):112-34. <https://doi.org/10.1111/his.13734>
88. Van der Kwast T, Liedberg F, Black PC, Kamat A, van Rhijn B, Algaba F, Berman DM, Hartmann A, Lopez-Beltran A, Samaratunga H, et al. International Society of Urological Pathology Expert Opinion on Grading of Urothelial Carcinoma. *Eur Urol*. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2021.03.017>
89. Van den Bosch S, Witjes JA. Long-term cancer-specific survival in patients with high-risk, non-muscle-invasive bladder cancer and tumour progression: a systematic review. *Eur Urol*. 2011; 60:493-500. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2011.05.045>
90. Meeks JJ, Carneiro BA, Pai SG, Oberlin DT, Rademaker A, Fedorchak K, Balasubramanian S, Elvin J, Beaubier N, Giles FJ. Genomic characterization of high-risk non-muscle invasive bladder cancer. *Oncotarget*. 2016;7(46):75176-75185. <http://doi.org/10.18632/oncotarget.12661>
91. Hedegaard J, Lamy P, Nordentoft I, et al. Comprehensive transcriptional analysis of early-stage urothelial carcinoma. *Cancer Cell*. 2016; 30:27-42. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.05.004>

92. Schwarzova L, Varchulova Z, Lubos N, Stanislav D. Molecular classification of urothelial bladder carcinoma. *Mol Biol Rep.* 2023;0123456789. <https://doi.org/10.1007/s11033-023-08689-7>
93. Robertson AG, Groeneveld CS, Jordan B, Lin X, McLaughlin KA, Das A, Fall LA, Fantini D, Taxter TJ, Mogil LS, Lindsborg SV, Dyrskjød L, McConkey DJ, Svatek RS, de Reyniès A, Castro MAA, Meeks JJ. Identification of Differential Tumor Subtypes of T1 Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2020;78(4):533-537. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2020.06.048>
94. Bellmunt J, Kim J, Reardon B et al. Genomic predictors of good outcome, recurrence, or progression in high-grade T1 non-muscle-invasive bladder cancer. *Cancer Res* 2020; 80: 4476- 4486. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0977>
95. McConkey DJ, Choi W, Shen Y, Lee IL, Porten S, Matin SF, Kamat AM, Corn P, Millikan RE, Dinney C, et al. A prognostic gene expression signature in the molecular classification of chemotherapy-naïve urothelial cancer is predictive of clinical outcomes from neoadjuvant chemotherapy: A phase 2 trial of dose-dense methotrexate, vinblastine, doxorubicin, and cisplatin. *Eur Urol.* 2016;69(5):855-62. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.08.034>
96. Warrick JI, Al-Ahmadie H, Berman DM, Black PC, Flaig TW, Höglund M, Bubendorf L, van der Kwast TH, Cheng L; Members of the ISUP Bladder Tumor Consensus Panel. International Society of Urological Pathology Consensus Conference on Current Issues in Bladder Cancer. Working Group 4: Molecular Subtypes of Bladder Cancer-Principles of Classification and Emerging Clinical Utility. *Am J Surg Pathol.* 2024 Jan 1;48(1):e32-e42. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000002053>
97. Kardos J, Rose TL, Manocha U, Wobker SE, Damrauer JS, Bivalacqua TJ, Kates M, Moore KJ, Parker JS, Kim WY. Development and validation of a NanoString BASE47 bladder cancer gene classifier. *PLoS One.* 2020 Dec 17;15(12):e0243935. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0243935>
98. López-Beltrán A, Blanca A, Cimadamore A, Gogna R, Montironi R, Cheng L. Molecular Classification of Bladder Urothelial Carcinoma Using NanoString-Based Gene Expression Analysis. *Cancers.* 2021;1-15. <https://doi.org/10.3390/cancers13215500>

99. Olkhov-Mitsel E, Yu Y, Lajkosz K, Liu SK, Vesprini D, Sherman CG, Downes MR. Development of a clinically applicable NanoString-based molecular stratification. *Cancers (Basel)*. 2022;14(19):4911. <https://doi.org/10.3390/cancers14194911>
100. Guo CC, Bondaruk J, Yao H, Wang Z, Zhang L, Lee S, Lee JG, Cogdell D, Zhang M, Yang G, Dadhania V, Choi W, Wei P, Gao J, Theodorescu D, Logothetis C, Dinney C, Kimmel M, Weinstein JN, McConkey DJ, Czerniak B. Assessment of Luminal and Basal Phenotypes in Bladder Cancer. *Sci Rep*. 2020 Jun 16;10(1):9743. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66747-7>
101. Koll FJ, Schwarz A, Köllermann J, Banek S, Kluth L, Wittler C, Bankov K, Döring C, Becker N, Chun FKH, Wild PJ, Reis H. CK5/6 and GATA3 Defined Phenotypes of Muscle-Invasive Bladder Cancer: Impact in Adjuvant Chemotherapy and Molecular Subtyping of Negative Cases. *Front Med (Lausanne)*. 2022 Jun 16;9:875142. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.875142>
102. Jalanko T, de Jong JJ, Gibb EA, Seiler R, Black PC. Genomic Subtyping in Bladder Cancer. *Curr Urol Rep*. 2020; 21:9. <https://doi.org/10.1007/s11934-020-0960-y>
103. Paner GP, Kamat A, Netto GJ, Samaratunga H, Varma M, Bubendorf L, van der Kwast TH, Cheng L; Members of the ISUP Bladder Tumor Consensus Panel. International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Current Issues in Bladder Cancer. Working Group 2: Grading of Mixed Grade, Invasive Urothelial Carcinoma Including Histologic Subtypes and Divergent Differentiations, and Non-Urothelial Carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2023 Jun 29. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000002066>
104. Amin MB, Trpkov K, Lopez-Beltran A, Grignon D; Members of the ISUP Immunohistochemistry in Diagnostic Urologic Pathology Group. Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in bladder lesions: report from the International Society of Urologic Pathology consensus conference. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(8):20-34. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000240>
105. Lopez-Beltran A, Cheng L. Histologic variants of urothelial carcinoma: differential diagnosis and clinical implications. *Hum Pathol*. 2006;37(11):1371-1388. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2006.05.009>

106. Lobo N, Shariat SF, Guo CC, Fernandez MI, Kassouf W, Choudhury A, Gao J, Williams SB, Galsky MD, Taylor JA, Roupret M, Kamat AM. What Is the Significance of Variant Histology in Urothelial Carcinoma?. *Eur Urol Focus*. 2020;6(4):653-663. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2019.09.003>
107. Takahara T, Murase Y, Tsuzuki T. Urothelial carcinoma: variant histology, molecular subtyping, and immunophenotyping significant for treatment outcomes. *Pathology*. 2021;53(1):56-66. <https://doi.org/10.1016/j.pathol.2020.09.004>
108. Minato A, Noguchi H, Tomisaki I, Fukuda A, Kubo T, Nakayama T, Fujimoto N. Clinical Significance of Squamous Differentiation in Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Bladder Cancer*. 2018; 25:1-8. <https://doi.org/10.1177/1073274818800269>
109. Vail E, Zheng X, Zhou M, et al. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in glandular lesions of the urinary bladder. *Ann Diagn Pathol*. 2015; 19:301-305. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2015.06.007>
110. Monn MF, Jaqua KR, Bihle R, Cheng L. Primary Choriocarcinoma of the Bladder: A Case Report and Review of Literature. *Clin Genitourin Cancer*. 2017;15(2):188-191. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2016.08.027>
111. Przybycin CG, McKenney JK, Nguyen JK, Shah RB, Umar SA, Harik L, Shih IM, Cox RM. Urothelial Carcinomas with Trophoblastic Differentiation, Including Choriocarcinoma: Clinicopathologic Series of 16 Cases. *Am J Surg Pathol*. 2020;44(10):1322-1330. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001532>
112. Sangoi AR, Beck AH, Amin MB, Cheng L, Epstein JI, Hansel DE, et al. Interobserver reproducibility in the diagnosis of invasive micropapillary carcinoma of the urinary tract among urologic pathologists. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(9):1367-76. <http://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181e5e4d0>
113. Kamat AM, Gee JR, Dinney CP, Grossman HB, Swanson DA, Millikan RE, Detry MA, Robinson TL, Pisters LL. The case for early cystectomy in the treatment of nonmuscle invasive micropapillary bladder carcinoma. *J Urol*. 2006 Mar;175(3 Pt 1):881-5. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)00423-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)00423-4)

114. Schneider SA, Sukov WR, Frank I, Boorjian SA, Costello BA, Tarrell RF, Thapa P, Houston Thompson R, Tollefson MK, Jeffrey Karnes R, Cheville JC. Outcome of patients with micropapillary urothelial carcinoma following radical cystectomy: ERBB2 (HER2) amplification identifies patients with poor outcome. *Mod Pathol*. 2014;27(5):758-764. <https://doi.org/10.1007/s00345-017-2087-4>
115. Volmar KE, Chan TY, De Marzo AM, Epstein JI. Florid von Brunn nests mimicking urothelial carcinoma: a morphologic and immunohistochemical comparison to the nested variant of urothelial carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(9):1243-1252. <https://doi.org/10.1097/00000478-200309000-00008>
116. Zhong M, Tian W, Zhuge J, Zheng X, Huang T, Cai D, Zhang D, Yang XJ, Argani P, Fallon JT, Epstein JI. Distinguishing nested variants of urothelial carcinoma from benign mimickers by TERT promoter mutation. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(1):127-131. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000305>
117. Gandhi J, Chen J, Al-ahmadie H. Urothelial Carcinoma: Divergent Differentiation and Morphologic Subtypes. *Pathology*. 2022;15(4):641-659. <https://doi.org/10.1016/j.path.2022.07.003>
118. Lopez-Beltran A, Henriques V, Montironi R, Cimadamore A, Raspollini MR, Cheng L. Variants and new entities of bladder cancer. *Histopathology*. 2019;74(1):77-96. <https://doi.org/10.1111/his.13752>
119. Lopez-Beltran A, Requena MJ, Montironi R, Blanca A, Cheng L. Plasmacytoid urothelial carcinoma of the bladder. *Hum Pathol*. 2009; 40:1023-1028. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.01.001>
120. Al-Ahmadie HA, Iyer G, Lee BH et al. Frequent somatic CDH1 loss-of-function mutations in plasmacytoid variant bladder cancer. *Nat Genet*. 2016; 48; 356-358. <https://doi.org/10.1038/ng.3503>
121. Liu S, Yao Y, Wang ZK, Sun LJ, Zhang GM. Prognostic value of the sarcomatoid component in bladder cancer: A propensity score matching study. *Oncology Letters*. 2023; 25:103. <https://doi.org/10.3892/ol.2023.13690>

122. Lopez-Beltran A, Pacelli A, Rothenberg HJ et al. Carcinosarcoma and sarcomatoid carcinoma of the bladder: clínico-pathological study of 41 cases. *J Urol*. 1998; 159: 1497-1503. <https://doi.org/10.1097/00005392-199805000-00023>
123. Williamson SR, Zhang S, Lopez-Beltran A, Shah RB, Montironi R, Tan PH, Wang M, Baldrige LA, MacLennan GT, Cheng L. Lymphoepithelioma-like carcinoma of the urinary bladder: clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features. *Am J Surg Pathol*. 2011; 35(4):474-483. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e31820f709e>
124. Gulley ML, Amin MB, Nicholls JM et al. Epstein-Barr virus is detected in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma but not in lymphoepithelioma-like carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol*. 1995; 26; 1207-1214. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(95\)90195-7](https://doi.org/10.1016/0046-8177(95)90195-7)
125. Lopez-Beltran A, Amin MB, Oliveira PS, Montironi R, Algaba F, McKenney JK, de Torres I, Mazerolles C, Wang M, Cheng L. Urothelial carcinoma of the bladder, lipid cell variant: clinicopathologic findings and LOH analysis. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(3):371-6. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181cd385b>
126. Lopez-Beltran A, Blanca A, Montironi R, Cheng L, Regueiro JC. Pleomorphic giant cell carcinoma of the urinary bladder. *Hum Pathol*. 2009;40(10):1461-1466. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2009.02.016>
127. Hardy CSC, Ghaedi H, Slotman A, Sjö Dahl G, Gooding RJ, Berman DM, Jackson CL. Immunohistochemical Assays for Bladder Cancer Molecular Subtyping: Optimizing Parsimony and Performance of Lund Taxonomy Classifiers. *J Med Res*. 2022;70(5). <https://doi.org/10.1369/00221554221095530>
128. Park S, Reuter VE, Hansel DE. Non-urothelial carcinomas of the bladder. *Histopathology*. 2019;74(1):97-111. <https://doi.org/10.1111/his.13719>
129. Rogers CG, Palapattu GS, Shariat SF, Karakiewicz PI, Bastian PJ, Lotan Y, Gupta A, Vazina A, Gilad A, Sagalowsky AI, Lerner SP, Schoenberg MP. Clinical outcomes following radical cystectomy for primary nontransitional cell carcinoma of the bladder compared to transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol*. 2006; 175:2048-2053. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(06\)00317-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(06)00317-X)

130. Necchi A, Madison R, Raggi D, Jacob JM, Bratslavsky G, Shapiro O, Elvin JA, Vergilio JA, Killian JK, Ngo N, Ramkissoon S, Severson E, Hemmerich AC, Huang R, Ali SM, Chung JH, Reddy P, Miller VA, Schrock AB, Gay LM, Ross JS. Comprehensive Assessment of Immuno-oncology Biomarkers in Adenocarcinoma, Urothelial Carcinoma, and Squamous-cell Carcinoma of the Bladder. *Eur Urol*. 2020;77(4):548-556. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2020.01.003>
131. Conde M, Frew IJ. Therapeutic significance of ARID1A mutation in bladder cancer. *Neoplasia*. 2022; 31:100814. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2022.100814>
132. Hoffman-Censits J, Choi W, Pal S, Trabulsi E, Kelly WK, Hahn NM, McConkey D, Comperat E, Matoso A, Cussenot O, Cancel-Tassin G, Fong MHY, Ross J, Madison R, Ali S. Urothelial Cancers with Small Cell Variant Histology Have Confirmed High Tumor Mutational Burden, Frequent TP53 and RB Mutations, and a Unique Gene Expression Profile. *Eur Urol Oncol*. 2021;4(2):297-300. <https://doi.org/10.1016/j.euo.2019.12.002>
133. Linder BJ, Boorjian SA, Cheville JC, Sukov WR, Thapa P, Tarrell RF, Frank I. The impact of histological reclassification during pathology re-review--evidence of a Will Rogers effect in bladder cancer?. *J Urol*. 2013; 190(5):1692-6. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.05.040>
134. Flaig TW, Spiess PE, Abern M, Agarwal N, Bangs R, Boorjian SA, Buyyounouski MK, Chan K, Chang S, Friedlander T, Greenberg RE, Guru KA, Herr HW, Hoffman-Censits J, Kishan A, Kundu S, Lele SM, Mamtani R, Margulis V, Mian OY, Gurski LA. NCCN Guidelines® Insights: Bladder Cancer, Version 2.2022. *J Natl Compr Canc Netw*. 2022;20(8):866-878. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2022.0041>
135. Shah RB, Montgomery JS, Montie JE, Kunju LP. Variant (divergent) histologic differentiation in urothelial carcinoma is under-recognized in community practice: impact of mandatory central pathology review at a large referral hospital. *Urol Oncol*. 2013; 31:1650-5. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2012.04.009>
136. Processali T, Diminutto A, Cerruto MA, Antonelli A. The impact of histological variants on bladder cancer outcomes. *AME Med J*. 2020;5(2). <https://doi.org/10.21037/amj.2020.02.02>

137. Al-Ahmadie H, Iyer G. Updates on the Genetics and Molecular Subtypes of Urothelial Carcinoma and Select Variants. *Surg Pathol Clin.* 2018;11(4):713-723. <https://doi.org/10.1016/j.path.2018.07.011>
138. Al-Ahmadie H, Netto GJ. Molecular Pathology of Urothelial Carcinoma. *Surg Pathol Clin.* 2021;14(3):403-414. <https://doi.org/10.1016/j.path.2021.05.005>
139. Warrick JI, Sjö Dahl G, Kaag M, Raman JD, Merrill S, Shuman L, Chen G, Walter V, DeGraff DJ. Intratumoral Heterogeneity of Bladder Cancer by Molecular Subtypes and Histologic Variants. *Eur Urol.* 2019;75(1):18-22. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.09.003>
140. Hovelson DH, Udager AM, McDaniel AS, Grivas P, Palmbos P, Tamura S, Lazo de la Vega L, Palapattu G, Veeneman B, El-Sawy L, Sadis SE, Morgan TM, Montgomery JS, Weizer AZ, Day KC, Neamati N, Liebert M, Keller ET, Day ML, Mehra R, Tomlins SA. Targeted DNA and RNA Sequencing of Paired Urothelial and Squamous Bladder Cancers Reveals Discordant Genomic and Transcriptomic Events and Unique Therapeutic Implications. *Eur Urol.* 2018 Dec;74(6):741-753. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2018.06.047>
141. Maurer A, Ortiz-Bruechle N, Guricova K, Rose M, Morsch R, Garczyk S, Stöhr R, Bertz S, Golz R, Reis H, Bremmer F, Zimpfer A, Siegert S, Kristiansen G, Schwamborn K, Gassler N, Knuechel R, Gaisa NT. Comparative genomic profiling of glandular bladder tumours. *Virchows Arch.* 2020;477(3):445-454. <https://doi.org/10.1007/s00428-020-02787-8>
142. Guo CC, Dadhania V, Zhang L, Majewski T, Bondaruk J, Sykulski M, Wronowska W, Gambin A, Wang Y, Zhang S, Fuentes-Mattei E, Kamat AM, Dinney C, Siefker-Radtke A, Choi W, Baggerly KA, McConkey D, Weinstein JN, Czerniak B. Gene Expression Profile of the Clinically Aggressive Micropapillary Variant of Bladder Cancer. *Eur Urol.* 2016;70(4):611-620. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2016.02.056>
143. Schneider SA, Sukov WR, Frank I, Boorjian SA, Costello BA, Tarrell RF, Thapa P, Houston Thompson R, Tollefson MK, Jeffrey Karnes R, Cheville JC. Outcome of patients with micropapillary urothelial carcinoma following radical cystectomy: ERBB2 (HER2) amplification identifies patients with poor outcome. *Mod Pathol.* 2014; 27: 758-764. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.201>

144. Isharwal S, Huang H, Nanjangud G, Audenet F, Chen YB, Gopalan A, Fine SW, Tickoo SK, Lee BH, Iyer G, Chadalavada K, Rosenberg JE, Bajorin DF, Herr HW, Donat SM, Dalbagni G, Bochner BH, Solit DB, Reuter VE, Al-Ahmadie HA. Intratumoral heterogeneity of ERBB2 amplification and HER2 expression in micropapillary urothelial carcinoma. *Hum Pathol.* 2018; 77: 63-69. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.03.015>
145. Jordan, B., & Meeks, J. J. T1 bladder cancer: current considerations for diagnosis and management. *Nat Rev Urol.* 2019 Jan;16(1):23-34. <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0105-y>
146. Miyake M, Nishimura N, Iida K, Fujii T, Nishikawa R, Teraoka S, Takenaka A, Kikuchi H, Abe T, Shinohara N, Okajima E, Shimizu T, Hori S, Tsuchiya N, Owari T, Murakami Y, Taoka R, Kobayashi T, Kojima T, Nishiyama N, Kitamura H, Nishiyama H, Fujimoto K. Intravesical Bacillus Calmette-Guérin Treatment for T1 High-Grade Non-Muscle Invasive Bladder Cancer with Divergent Differentiation or Variant Morphologies. *Cancers.* 2021. 26;13(11):2615. <https://doi.org/10.3390/cancers13112615>
147. Chang, S. S., Boorjian, S. A., Chou, R., Clark, P. E., Daneshmand, S., Konety, B. R., Pruthi, R., Quale, D. Z., Ritch, C. R., Seigne, J. D., Skinner, E. C., Smith, N. D., & McKiernan, J. M. (2016). Diagnosis and Treatment of Non-Muscle Invasive Bladder Cancer: AUA/SUO Guideline. *J Urol.* 2016;196(4):1021-1029. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2016.06.049>
148. Lopez-Beltran A, Blanca A, Cimadamore A, Montironi R, Luque RJ, Volavšek M, Cheng L. T1 bladder carcinoma with variant histology: pathological features and clinical significance. *Virchows Arch.* 2022;480(5):989-998. <https://doi.org/10.1007/s00428-021-03264-6>
149. Lavallee E, Sfakianos JP, Mulholland DJ. Tumor heterogeneity and consequences for bladder cancer treatment. *Cancers.* 2021;13(21):1-4. <https://doi.org/10.3390/cancers13215297>
150. Raja R, Pandey A, Kumar P. Epithelial to mesenchymal plasticity: role in cancer progression. *Front Biosci.* 2020; 25:838-73. <https://doi.org/10.2741/4837>

151. Kang HW, Kim WJ, Yun SJ. The role of the tumor microenvironment in bladder cancer development and progression. *Transl Cancer Res.* 2017;744-S58. <http://dx.doi.org/10.21037/tcr.2017.06.48>
152. Kang HW, Kim WJ, Choi W, Yun SJ. Tumor heterogeneity in muscle-invasive bladder cancer. *Translational Andrology and Urology.* 2020;9(6):2866-2880. <https://doi.org/10.21037/tau.2020.03.13>
153. Meeks JJ, Al-Ahmadie H, Faltas BM et al. Genomic heterogeneity in bladder cancer: challenges and possible solutions to improve outcomes. *Nat Rev Urol.* 2020; 17: 259-270. <https://doi.org/10.1038/s41585-020-0304-1>
154. Dadhania V, Zhang M, Zhang L, Bondaruk J, Majewski T, Siefker-Radtke A, Guo CC, Dinney C, Cogdell DE, Zhang S, Lee S, Lee JG, Weinstein JN, Baggerly K, McConkey D, Czerniak B. Meta-Analysis of the Luminal and Basal Subtypes of Bladder Cancer and the Identification of Signature Immunohistochemical Markers for Clinical Use. *EBioMedicine.* 2016; 12:105-117. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.08.036>
155. Akgul M, MacLennan GT, Cheng L. The applicability and utility of immunohistochemical biomarkers in bladder pathology. *Hum Pathol.* 2020; 98:32-55. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2020.01.004>
156. Rebola J, Aguiar P, Blanca A, Montironi R, Cimadamore A, Cheng L, Henriques V, Lobato-Faria P, Lopez-Beltran A. Predicting outcomes in non-muscle invasive (Ta/T1) bladder cancer: the role of molecular grade based on luminal/basal phenotype. *Virchows Arch.* 2019; 475: 445-455. <https://doi.org/10.1007/s00428-019-02593-x>
157. Breyer J, Wirtz RM, Otto W, Erben P, Kriegmair MC, Stoehr R, Eckstein M, Eidt S, Denzinger S, Burger M, Hartmann A; BRIDGE Consortium. In stage pT1 nonmuscle-invasive bladder cancer (NMIBC), high KRT20 and low KRT5 mRNA expression identify the luminal subtype and predict recurrence and survival. *Virchows Arch.* 2017; 470:267-274. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2064-8>
158. Rodriguez Pena MDC, Chaux A, Eich ML, Tregnago AC, Taheri D, Borhan W, Sharma R, Rezaei MK, Netto GJ. Immunohistochemical assessment of basal and luminal markers in non-muscle invasive urothelial carcinoma of bladder. *Virchows Arch.* 2019; 475: 349-356. <https://doi.org/10.1007/s00428-019-02618-5>

159. Font A, Domènech M, Benítez R, Rava M, Marqués M, Ramírez JL, Pineda S, Domínguez-Rodríguez S, Gago JL, Badal J, Carrato C, López H, Quer A, Castellano D, Malats N, Real FX. Immunohistochemistry-Based Taxonomical Classification of Bladder Cancer Predicts Response to Neoadjuvant Chemotherapy. *Cancers*. 2020; 12. <https://doi.org/10.3390/cancers12071784>
160. Warrick JI, Kaag M, Raman JD, Chan W, Tran T, Kunchala S, Shuman L, DeGraff D, Chen G. FOXA1 and CK14 as markers of luminal and basal subtypes in histologic variants of bladder cancer and their associated conventional urothelial carcinoma. *Virchows Arch*. 2017; 471: 337-345. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2190-3>
161. Sjö Dahl G, Jackson CL, Bartlett JM, Siemens DR, Berman DM. Molecular profiling in muscle-invasive bladder cancer: more than the sum of its parts. *J Pathol* 2019; 247: 563-573. <https://doi.org/10.1002/path.5230>
162. Helal DS, Darwish SA, Awad RA, Ali DA, El-Guindy DM. Immunohistochemical based molecular subtypes of muscle-invasive bladder cancer: association with HER2 and EGFR alterations, neoadjuvant chemotherapy response and survival. *Diagn Pathol*. 2023;18(1):1-13. <https://doi.org/10.1186/s13000-023-01295-y>
163. Jackson CL, Chen L, Hardy CS, Ren KY, Visram K, Bratti VF, Johnstone J, Sjö Dahl G, Siemens DR, Gooding RJ, Berman DM. Diagnostic and prognostic implications of a three-antibody molecular subtyping algorithm for non-muscle invasive bladder cancer. *J Pathol Clin Res*. 2022;8(2):143-154. <https://doi:10.1002/cjp2.245>
164. Mulwijk T, Akand M, Van der Aa F, De Coninck V, Claessens M, Hente R, Eckstein M, Allory Y, Libbrecht L, Joniau S, Gevaert T. Cytokeratin 5 and cytokeratin 20 inversely correlate with tumour grading in Ta non-muscle-invasive bladder cancer. *J Cell Mol Med*. 2021;25(18):7890-7900. <http://doi:10.1111/jcmm.16785>.
165. Sikic D, Keck B, Wach S, Taubert H, Wullich B, Goebell PJ, Kahlmeyer A, Olbert P, Isfort P, Nimphius W, Hartmann A, Giedl J; Bridge Consortium. Immunohistochemical subtyping using CK20 and CK5 can identify urothelial carcinomas of the upper urinary tract with a poor prognosis. *PLoS One*. 2017;12. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0179602>.

166. Jung M, Kim B, Moon KC. Immunohistochemistry of cytokeratin (CK) 5/6, CD44 and CK20 as prognostic biomarkers of non-muscle-invasive papillary upper tract urothelial carcinoma. *Histopathology*. 2019;74(3):483-493. <http://doi.org/10.1111/his.13766>
167. Mai KT, Ball CG, Belanger EC. Noninvasive Papillary Basal-like Urothelial Carcinoma: A Subgroup of Urothelial Carcinomas with Immunohistochemical Features of Basal Urothelial Cells Associated with a High Rate of Recurrence and Progression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016;24(8):575-582. <http://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000265>
168. Bertz S, Otto W, Denzinger S, Wieland WF, Burger M, Stöhr R, Link S, Hofstädter F, Hartmann A. Combination of CK20 and Ki-67 immunostaining analysis predicts recurrence, progression, and cancer-specific survival in pT1 urothelial bladder cancer. *Eur Urol*. 2014;65(2):218-226. <http://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.12.056>
169. Patschan O, Sjö Dahl G, Chebil G, Lövgren K, Lauss M, Gudjonsson S, Kollberg P, Eriksson P, Aine M, Månsson W, et al. A Molecular Pathologic Framework for Risk Stratification of Stage T1 Urothelial Carcinoma. *Eur Urol*. 2015;68(5):824-832. <http://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.07.039>
170. Garczyk S, Bischoff F, Schneider U, Golz R, von Rundstedt FC, Knüchel R, Degener S. Intratumoural heterogeneity of surrogate molecular subtypes in urothelial carcinoma in situ of the urinary bladder: Implications for prognostic stratification of high-risk non-muscle-invasive bladder cancer. *Virchows Arch*. 2021;479(2):325-335. <http://doi.org/10.1007/s00428-021-03049-5>
171. Barth I, Schneider U, Grimm T, Karl A, Horst D, Gaisa NT, Knüchel R, Garczyk S. Progression of urothelial carcinoma in situ of the urinary bladder: A switch from luminal to basal phenotype and related therapeutic implications. *Virchows Arch*. 2018;472(5):749-758. <http://doi.org/10.1007/s00428-018-2323-8>
172. Lu J, Zhang Y, Wu C, Chu C, Liu Z, Cao Y. Impact of immunohistochemistry-based molecular subtype on predicting chemotherapy response and survival in patients with T1 stage bladder cancer after bladder-preserving treatment. *Jpn J Clin Oncol*. 2021;51(3):424-433. <https://doi.org/10.1093/jjco/hyaa219>

173. Ottley EC, Pell R, Brazier B, Hollidge J, Kartsonaki C, Browning L, O'Neill E, Kiltie AE. Greater utility of molecular subtype rather than epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) markers for prognosis in high-risk non-muscle-invasive (HGT1) bladder cancer. *J Pathol Clin Res.* 2020;6(4):238-251. <http://doi.org/10.1002/cjp2.180>
174. Stein JP, Skinner DG. Radical cystectomy for invasive bladder cancer: long-term results of a standard procedure. *World J Urol.* 2006;24(3):296-304. <https://doi.org/10.1007/s00345-006-0061-7>
175. Witjes JA, Bruins HM, Cathomas R, Comp  rat EM, Cowan NC, Gakis G, Hernández V, Linares Espin  s E, Lorch A, Neuzillet Y, Rouanne M, Thalmann GN, Veskim  e E, Rib  l MJ, van der Heijden AG. European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2020 Guidelines. *Eur Urol.* 2021;79(1):82-104. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2020.03.055>
176. Milowsky MI, Bryan Rumble R, Booth CM, Gilligan T, Eapen LJ, Hauke RJ, Boumansour P, Lee CT. Guideline on muscle-invasive and metastatic bladder cancer (European Association of Urology guideline): American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline endorsement. *J Clin Oncol.* 2016;34(16):1945-1952. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.65.9797>
177. Valderrama BP, González-del-Alba A, Morales-Barrera R, Pel  ez Fernández I, Vázquez S, Caballero Díaz C, Dom  nech M, Fernández Calvo O, G  mez de Lia  o Lista A, Arranz Arija J  . SEOM-SOGUG clinical guideline for localized muscle invasive and advanced bladder cancer (2021). *Clin Transl Oncol.* 2022;24(4):613-624. <https://doi.org/10.1007/s12094-022-02815-w>
178. Grossman HB, Natale RB, Tangen CM, Speights VO, Vogelzang NJ, Trump DL, deVere White RW, Sarosdy MF, Wood DP Jr, Raghavan D, Crawford ED. Neoadjuvant chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N Engl J Med.* 2003;349(9):859-866. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa022148>
179. Zargar H, Espiritu PN, Fairey AS, et al. Multicenter assessment of neoadjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol.* 2015;67(2):241-9. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.09.007>

180. Hamid ARAH, Ridwan FR, Parikesit D, et al. Meta-analysis of neoadjuvant chemotherapy compared to radical cystectomy alone in improving overall survival of muscle-invasive bladder cancer patients. BMC Urol. 2020; 20:158. <https://doi.org/10.1186/s12894-020-00733-z>
181. Advanced Bladder Cancer (ABC) Meta-analysis Collaboration. Neoadjuvant chemotherapy in invasive bladder cancer: update of a systematic review and meta-analysis of individual patient data advanced bladder cancer (ABC) meta-analysis collaboration. Eur Urol. 2005;48(2):202-206. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2005.04.006>
182. Winkquist E, Kirchner TS, Segal R, Chin J, Lukka H, Genitourinary Cancer Disease Site Group, Cancer Care Ontario Program in Evidence-based Care Practice Guidelines Initiative. Neoadjuvant chemotherapy for transitional cell carcinoma of the bladder: a systematic review and meta-analysis. J Urol. 2004;171(2 Pt 1):561-569. <https://doi.org/10.1097/01.ju.0000090967.08622.33>
183. Yin M, Joshi M, Meijer RP, Glantz M, Holder S, Harvey HA, Kaag M, Fransen van de Putte EE, Horenblas S, Drabick JJ. Neoadjuvant Chemotherapy for Muscle-Invasive Bladder Cancer: A Systematic Review and Two-Step Meta-Analysis. Oncologist. 2016;21(6):708-715. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2015-0440>
184. Sánchez-Ortiz, RF, Huang WC, Mick R, Van Arsdalen KN, Wein AJ, Malkowicz SB. An interval longer than 12 weeks between the diagnosis of muscle invasion and cystectomy is associated with worse outcome in bladder carcinoma J Urol. 2003; 169:110-115. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)64047-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)64047-5)
185. Lee CT, Madii R, Daignault S, Dunn RL, Zhang Y, Montie JE, Wood DP. Cystectomy delay more than 3 months from initial bladder cancer diagnosis results in decreased disease specific and overall survival. J Urol. 2006; 175: 1262-1267. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)00644-0](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)00644-0)
186. Bhindi B, Frank I, Mason RJ, et al. Oncologic outcomes for patients with residual cancer at cystectomy following neoadjuvant chemotherapy: A pathologic stage-matched analysis. Eur Urol. 2017;72(5):660-664. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.05.016>

187. Motterle G, Andrews JR, Morlacco A, Karnes RJ. Predicting Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Bladder Cancer. *Eur Urol Focus*. 2020;6(4):642-649. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2019.10.016>
188. Miyagi H, Kwenda E, Ramnaraigh BH, Chatzkel JA, Brisbane WG, O'Malley P, Crispen PL. Predicting Complete Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Muscle-Invasive Bladder Cancer. *Cancers*. 2022 Dec 28;15(1):168. <https://doi.org/10.3390/cancers15010168>
189. Sjö Dahl G, Abrahamsson J, Holmsten K, Bernardo C, Chebil G, Eriksson P, Johansson I, Kollberg P, Lindh C, Lövgren K, Marzouka N al D, Olsson H, Höglund M, Ullén A, Liedberg F. Different Responses to Neoadjuvant Chemotherapy in Urothelial Carcinoma Molecular Subtypes. *Eur Urol*. 2022;81(5):523-532. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2021.10.035>
190. Eckstein M, Cimadamore A, Hartmann A, Lopez-beltran A, Cheng L, Scarpelli M, Montironi R, Gevaert T. PD-L1 assessment in urothelial carcinoma: a practical approach. *Ann Transl Med*. 2019;7(22). <https://doi.org/10.21037/atm.2019.10.24>
191. Powles T, Bellmunt J, Comperat E, Santis M De, Huddart R, Loriot Y, Necchi A, Valderrama B P, Ravaud A, Shariat S F, Szabados B, Heijden M S Van Der, Gillessen S, Committee E G. Bladder cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2022;33(3):244-258. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2021.11.012>
192. Gomez de Liano Lista A, van Dijk N, de Velasco Oria de Rueda G et al. Clinical outcome after progressing to frontline and second-line Anti-PD-1/PD-L1 in advanced urothelial cancer. *Eur Urol*. 2020; 77: 269-276. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.10.004>
193. Li H, Zhang Q, Shuman L et al. Evaluation of PD-L1 and other immune markers in bladder urothelial carcinoma stratified by histologic variants and molecular subtypes. *Sci Rep* 2020; 10: 1439. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58351-6>
194. Sotelo M, Alonso-Gordoa T, Gajate P, Gallardo E, Morales-Barrera R, Pérez-Gracia JL, Puente J, Sánchez P, Castellano D, Durán I. Atezolizumab in locally advanced or metastatic urothelial cancer: a pooled analysis from the Spanish patients of the IMvigora

210 cohort 2 and 211 studies. Clin Transl Oncol. 2021;23(4):882-891.
<https://doi.org/10.1007/s12094-020-02482-9>

195. Sharma P, Retz M, Siefker-Radtke A, Baron A, Necchi A, Bedke J, Plimack ER, Vaena D, Grimm MO, Bracarda S, Arranz JÁ, Pal S, Ohyama C, Saci A, Qu X, Lambert A, Krishnan S, Azrilevich A, Galsky MD. Nivolumab in metastatic urothelial carcinoma after platinum therapy (CheckMate 275): a multicentre, single-arm, phase 2 trial. Lancet Oncol. 2017;18(3):312-322. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30065-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30065-7)

196. Necchi A, Raggi D, Gallina A, Madison R, Colecchia M, Lucianò R, Montironi R, Giannatempo P, Farè E, Pederzoli F, Bandini M, Bianchi M, Colombo R, Gandaglia G, Fossati N, Marandino L, Capitanio U, Dehò F, Ali SM, Chung JH, Montorsi F. Updated Results of PURE-01 with Preliminary Activity of Neoadjuvant Pembrolizumab in Patients with Muscle-invasive Bladder Carcinoma with Variant Histologies. Eur Urol. 2020;77(4):439-446. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2019.10.026>

197. Loriot Y, Necchi A, Park SH et al. Erdafitinib in Locally Advanced or Metastatic Urothelial Carcinoma. N Engl J Med. 2019; 381: 338-348.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1817323>

198. Iyer G, Al-Ahmadie H, Schultz N et al. Prevalence and co-occurrence of actionable genomic alterations in high-grade bladder cancer. J Clin Oncol. 2013; 31: 3133-3140.
<https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.5740>

199. Powles T, Rosenberg JE, Sonpavde GP et al. Enfortumab Vedotin in Previously Treated Advanced Urothelial Carcinoma. N Engl J Med. 2021.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035807>

200. Font A, Ramirez JL, Ben R, Porras R De, Marque M, Gago L, Carrato C, Sant F. Predictive signature of response to neoadjuvant chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer integrating mRNA expression, taxonomic subtypes, and clinicopathological features. Front Oncol. 2023; August:1-9.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2023.1155244>

201. Culp SH, Dickstein RJ, Grossman HB, Pretzsch SM, Porten S, Daneshmand S, Cai J, Groshen S, Siefker-Radtke A, Millikan RE, et al. Refining patient selection for

neoadjuvant chemotherapy before radical cystectomy. *J. Urol.* 2014, 191, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.juro.2013.07.091>

202. Thomsen MBH, Nordentoft I, Lamy P, Vang S, Reinert L, Mapendano CK, Høyer S, Ørntoft TF, Jensen JB, Dyrskjøt L. Comprehensive multiregional analysis of molecular heterogeneity in bladder cancer. *Sci. Rep.* 2017, 7, 11702. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12010-1>

203. López-Beltrán A, Cookson MS, Guercio BJ, Cheng L. Advances in diagnosis and treatment of bladder cancer. *BMJ* 2024, 384, 438–446. <https://doi.org/10.1136/bmj-2023-076743>

204. Razzaghdoust A, Ghajari M, Basiri A, Torbati PM, Jafari A, Fattahi MR, Salahi M, Mofid B. Association of immunohistochemical markers of tumor subtype with response to neoadjuvant chemotherapy and survival in patients with muscle-invasive bladder cancer. *Investig. Clin. Urol.* 2021, 62, 274–281. <https://doi.org/10.4111/icu.20200425>

205. Gil da Costa RM, Oliveira PA, Vasconcelos-Nóbrega C, et al. Altered expression of CKs 14/20 is an early event in a rat model of multistep bladder carcinogenesis. *Int J Exp Pathol.* 2015; 96:319–325. <https://doi.org/10.1111/iep.12147>

206. Sanguedolce F, Zanelli M, Palicelli A, Ascani S, Zizzo M, Cocco G, Björnebo L, Lantz A, Landriscina M, Conteduca V, Falagario UG, Cormio L, Carrieri G. Are We Ready to Implement Molecular Subtyping of Bladder Cancer in Clinical Practice? Part 2: Subtypes and Divergent Differentiation. *Int J Mol Sci.* 2022, 23(14), 7844. <https://doi.org/10.3390/ijms23147844>

207. Jackson CL, Chen L, Hardy CS, Ren KY, Visram K, Bratti VF, Johnstone J, Sjö Dahl, G, Siemens DR, Gooding RJ, et al. Diagnostic and prognostic implications of a three-antibody molecular subtyping algorithm for non-muscle invasive bladder cancer. *J. Pathol. Clin. Res.* 2022, 8, 143–154. <https://doi.org/10.1002/cjp2.245>

208. Bejrananda T, Kanjanapradit K, Saetang J, Sangkhathat S. Impact of immunohistochemistry-based subtyping of GATA3, CK20, CK5/6, and CK14 expression on survival after radical cystectomy for muscle-invasive bladder cancer. *Sci. Rep.* 2021, 11, 21186. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-00628-5>

209. Jangir H, Nambirajan A, Seth A, Sahoo RK, Dinda AK, Nayak B, Kaushal S. Prognostic stratification of muscle invasive urothelial carcinomas using limited immunohistochemical panel of Gata3 and cytokeratins 5/6, 14 and 20. *Ann. Diagn. Pathol.* 2019, 43, 151397. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2019.08.001>
210. Terlević R, Ulamec M, Štimac G, Murgić J, Krušlin B. Molecular classification of muscle-invasive bladder cancer based on a simplified immunohistochemical panel using GATA3, CK5/6 and p16. *Biomol. Biomed.* 2023, 23, 968–975. <https://doi.org/10.17305/bb.2023.9242>
211. Marzouka NA, Eriksson P, Rovira C, Liedberg F, Sjö Dahl G, Höglund M. A validation and extended description of the Lund taxonomy for urothelial carcinoma using the TCGA cohort. *Sci Rep.* 2018;8(1):3737. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22126-x>
212. Eckstein M, Wirtz RM, Gross-Weege M, Breyer J, Otto W, Stoehr R, Sikic D, Keck B, Eidt S, Burger M, et al. mRNA Expression of KRT5 and KRT20 Defines Distinct Prognostic Subgroups of Muscle-Invasive Urothelial Bladder Cancer Correlating with Histological Variants. *Int J Mol Sci.* 2018;19(11):3396. <http://doi.org/10.3390/ijms19113396>
213. Serag Eldien MM, Abdou AG, Elghrabawy GRA, Alhanafy AM, Mahmoud SF. Stratification of urothelial bladder carcinoma depending on immunohistochemical expression of GATA3 and CK5/6. *J Immunoass Immunochem.* 2021;42(6):662–678. <http://doi.org/10.1080/15321819.2021.1941689>.
214. Calvete J, Larrinaga G, Errarte P, Martin AM, Dotor A, Esquinas C, Nunes-Xavier CE, Pulido R, Lopez JI, Angulo JC. The coexpression of fibroblast activation protein (FAP) and basal-type markers (CK 5/6 and CD44) predicts prognosis in high-grade invasive urothelial carcinoma of the bladder. *Hum Pathol.* 2019; 91:61–68. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2019.05.002>.
215. Lerner SP, McConkey DJ, Hoadley KA, Chan KS, Kim WY, Radvanyi F, Höglund M, Real FX. Bladder Cancer Molecular Taxonomy: Summary from a Consensus Meeting. *Bladder Cancer* 2016, 2, 37–47. <https://doi.org/10.3233/BLC-150037>
216. Mai KT, Ball CG, Belanger EC. Noninvasive papillary basal-like urothelial carcinoma: A subgroup of urothelial carcinomas with immunohistochemical features of basal urothelial cells associated with a high rate of recurrence and progression. *Appl*

Immunohistochem Mol Morphol. 2016;24(8):575–582.
<http://doi.org/10.1097/PAI.0000000000000224>

217. Sanguedolce F, Zanelli M, Palicelli A, Ascani S, Zizzo M, Cocco G, Björnebo L, Lantz A, Falagario UG, Cormio L, Carrieri G. Are We Ready to Implement Molecular Subtyping of Bladder Cancer in Clinical Practice? Part 1: General Issues and Marker Expression. *Int J Mol Sci*. 2022 Jul 15;23(14):7819. <http://doi.org/10.3390/ijms23147819>

218. Volkmer JP, Sahoo D, Chin RK, Ho PL, Tang C, Kurtova AV, Willingham SB, Pazhanisamy SK, Contreras-Trujillo H, Storm TA, et al. Three differentiation states risk-stratify bladder cancer into distinct subtypes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(6):2078–2083. Available from: <http://doi.org/10.1073/pnas.1120605109>

219. Ho PL, Kurtova A, Chan KS. Normal and neoplastic urothelial stem cells: Getting to the root of the problem. *Nat Rev Urol*. 2012;9(10):583–594. <http://doi.org/10.1038/nrurol.2012.180>

220. Jung M, Jang I, Kim K, Moon KC. CK14 Expression Identifies a Basal/Squamous-Like Type of Papillary Non-Muscle-Invasive Upper Tract Urothelial Carcinoma. *Front Oncol*. 2020; 10:623. <http://doi.org/10.3389/fonc.2020.00623>

221. Al-Sharaky DR, Abdelwahed M, Asaad N, Foda A, Abdou AG. Stratification of urinary bladder carcinoma based on immunohistochemical expression of CK5, CK14 and CK20. *J Immunoass Immunochem*. 2021;42(3):236–251. <http://doi.org/10.1080/15321819.2021.1892757>.

222. Warrick JI, Walter V, Yamashita H, et al. FOXA1, GATA3 and PPAR γ Cooperate to Drive Luminal Subtype in Bladder Cancer: A Molecular Analysis of Established Human Cell Lines. *Sci Rep*. 2016; 6:38531. <https://doi.org/10.1038/srep38531>

223. Warrick JI, Kaag M, Raman JD, et al. FOXA1 and CK14 as markers of luminal and basal subtypes in histologic variants of bladder cancer and their associated conventional urothelial carcinoma. *Virchows Arch*. 2017;471(3):337–345. <https://doi.org/10.1007/s00428-017-2190-3>

224. Wang CC, Tsai YC, Jeng YM. Biological significance of GATA3, cytokeratin 20, cytokeratin 5/6 and p53 expression in muscle-invasive bladder cancer. PLoS One. 2019 Aug 30;14(8):e0221785. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0221785>.
225. Pérez Montiel D, Olivares Mundo A, Jiménez Ríos MA. Influence of luminal and basal subtype in prognosis of high-grade non muscle invasive urothelial carcinoma. Ann Diagn Pathol. 2023; 63:152081. <https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2022.152081>
226. Padmanaban V, Tsehay Y, Cheung KJ, Ewald AJ, Bader JS. Between-tumor and within-tumor heterogeneity in invasive potential. PLoS Comput Biol. 2020;16(1):e1007464. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1007464>
227. Wang T, Niu X, Zhong B. Molecular classification of patients with NMIBC predicts the efficacy of intravesical chemotherapy with pirarubicin, pharmorubicin, and gemcitabine—Immunohistochemistry-based classification. Jpn J Clin Oncol. 2022;52(6):642–8. <https://doi.org/10.1093/ijco/hyac038>

1. Publicaciones que avalan la tesis

Cano Barbadilla T, Álvarez Pérez M, Prieto Cuadra JD, Dawid de Vera MT, Alberca-del Arco F, García Muñoz I, Santos-Pérez de la Blanca R, Herrera-Imbroda B, Matas-Rico E, Hierro Martín MI. The role of immunohistochemistry as a surrogate marker in molecular subtyping and classification of bladder cancer. *Diagnostics*. 2024;14(22):2501.

<https://doi.org/10.3390/diagnostics14222501>



diagnostics

an Open Access Journal by MDPI



CERTIFICATE OF ACCEPTANCE

The certificate of acceptance for the manuscript (**diagnostics-3281320**) titled:
The role of immunohistochemistry as a surrogate marker in molecular subtyping and classification of
bladder Cancer

Authored by:

TATIANA CANO BARBADILLA; MARTINA ÁLVAREZ PÉREZ; DANIEL PRIETO CUADRA; TERESA DAWID DE VERA;
FERNANDO ALBERCA DEL ARCO; ISABEL GARCÍA MUÑOZ;
ROCÍO SANTOS-PÉREZ DE LA BLANCA; Bernardo Herrera-Imbroda; Elisa Matas-Rico; ISABEL HIERRO
MARTÍN

was accepted in *Diagnostics* (ISSN 2075-4418) on 05 November 2024



Basel, November 2024

Prof. Dr. Andreas Kjaer
Editor-in-Chief

Review

The Role of Immunohistochemistry as a Surrogate Marker in Molecular Subtyping and Classification of Bladder Cancer

Tatiana Cano Barbadilla ^{1,2}, Martina Álvarez Pérez ^{2,3,4,*}, Juan Daniel Prieto Cuadra ^{2,3,5}, M^a Teresa Dawid de Vera ^{2,3,5}, Fernando Alberca-del Arco ^{3,6,7}, Isabel García Muñoz ^{2,3,5}, Rocío Santos-Pérez de la Blanca ^{3,6,7}, Bernardo Herrera-Imbroda ^{3,6,7,8}, Elisa Matas-Rico ^{3,6,7,9} and M^a Isabel Hierro Martín ^{2,3,5,†}

- ¹ Pathology Department, Juan Ramón Jiménez University Hospital (HJRJ), 21005 Huelva, Spain; tcbarbadilla@gmail.com
- ² Department of Human Physiology, Human Histology, Pathology, and Sports Physical Education, University of Malaga (UMA), 29071 Málaga, Spain; danielpriet@gmail.com (J.D.P.C.); tdawiddevera@gmail.com (M.T.D.V.); mir06isa@gmail.com (I.G.M.); misabel.hierro.sspa@juntadeandalucia.es (M.I.H.M.)
- ³ Institute of Biomedical Research in Malaga (IBIMA-Plataforma BIONAND), 29590 Málaga, Spain; alberca.urologia@gmail.com (F.A.-d.A.); rsantospdb@gmail.com (R.S.-P.d.I.B.); ber.urologia@gmail.com (B.H.-I.); ematas@uma.es (E.M.-R.)
- ⁴ Laboratory of Molecular Biology of Cancer (LBMC), Centre for Medical and Health Research, University of Malaga (UMA), 29010 Málaga, Spain
- ⁵ Pathology Department, Hospital Universitario Virgen de la Victoria (HUVV), 29010 Málaga, Spain
- ⁶ Urology Department, Hospital Universitario Virgen de la Victoria (HUVV), 29010 Málaga, Spain
- ⁷ Genitourinary Alliance for Research and Development (GUARD Consortium), 29071 Málaga, Spain
- ⁸ Department of Surgical Specialties, Biochemistry, and Immunology, University of Malaga (UMA), 29071 Málaga, Spain
- ⁹ Department of Cell Biology, Genetics, and Physiology, University of Malaga (UMA), 29071 Málaga, Spain
- * Correspondence: martina@uma.es
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Cano Barbadilla, T.; Álvarez Pérez, M.; Prieto Cuadra, J.D.; Dawid de Vera, M.T.; Alberca-del Arco, F.; García Muñoz, I.; Santos-Pérez de la Blanca, R.; Herrera-Imbroda, B.; Matas-Rico, E.; Hierro Martín, M.I. The Role of Immunohistochemistry as a Surrogate Marker in Molecular Subtyping and Classification of Bladder Cancer. *Diagnostics* **2024**, *14*, 2501. <https://doi.org/10.3390/diagnostics14222501>

Academic Editors: Roberto Contieri and Giovanni Lughezzani

Received: 11 October 2024

Revised: 1 November 2024

Accepted: 5 November 2024

Published: 8 November 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Background/Objectives: Bladder cancer (BC) is a highly heterogeneous disease, presenting clinical challenges, particularly in predicting patient outcomes and selecting effective treatments. Molecular subtyping has emerged as an essential tool for understanding the biological diversity of BC; however, its implementation in clinical practice remains limited due to the high costs and complexity of genomic techniques. This review examines the role of immunohistochemistry (IHC) as a surrogate marker for molecular subtyping in BC, highlighting its potential to bridge the gap between advanced molecular classifications and routine clinical application; Methods: We explore the evolution of taxonomic classification in BC, with a particular focus on cytokeratin (KRT) expression patterns in normal urothelium, which are key to identifying basal and luminal subtypes. Furthermore, we emphasise the need for consensus on IHC markers to reliably define these subtypes, facilitating wider and standardised clinical use. The review also analyses the application of IHC in both muscle-invasive (MIBC) and non-muscle-invasive bladder cancer (NMIBC), with particular attention to the less extensively studied NMIBC cases. We discuss the practical advantages of IHC for subtyping, including its cost effectiveness and feasibility in standard pathology laboratories, alongside ongoing challenges such as the requirement for standardised protocols and external validation across diverse clinical settings; Conclusions: While IHC has limitations, it offers a viable alternative for laboratories lacking access to advanced molecular techniques. Further research is required to determine the optimal combination of markers, establish a consensus diagnostic algorithm, and validate IHC through large-scale trials. This will ultimately enhance diagnostic accuracy, guide treatment decisions, and improve patient outcomes.

Keywords: bladder cancer; immunohistochemistry; molecular subtypes; molecular classification



36th European Congress of Pathology

Multidimensional Pathology –
Cornerstone of modern diagnostics

7–11 September 2024, Fortezza da Basso, Florence, Italy



PRESENTATION CERTIFICATE

The abstract

A transcriptomic approach through immunohistochemistry in non-muscle invasive and invasive bladder cancer: clinicopathological characterization and neoadjuvant predictivity in bladder cancer

has been presented as *E-Poster*

by

Tatiana Cano Barbadilla, Spain

during the

36th European Congress of Pathology

Co-Authors:

Martina Álvarez Pérez

Elisa Matas Rico

Juan Daniel Prieto Cuadra

Guillermo Paz Lopez

2. Declaración de aceptación de renuncia de los coautores de la publicación.

Declaración de que se **ACEPTA** que las publicaciones recogidas sean presentadas como aval de la tesis doctoral titulada **“CARACTERIZACIÓN PATOBIOLÓGICA Y PREDICCIÓN DE RESPUESTA A NEOADYUVANCIA EN EL CÁNCER VESICAL UTILIZANDO LA INMUNOHISTOQUÍMICA COMO MARCADOR SUBROGADO DE SUBTIPOS MOLECULARES”** presentada por la doctoranda **TATIANA CANO BARBADILLA**, y que se **RENUNCIA** a presentarlas como publicaciones aval de otras tesis en la Universidad de Málaga y otras universidades, así como que las publicaciones aval de la tesis **NO** han sido **PRESENTADAS PREVIAMENTE** como aval en ninguna otra tesis previamente ni en la Universidad de Málaga ni en otras universidades.

En relación con la siguiente publicación:

Cano Barbadilla T, Álvarez Pérez M, Prieto Cuadra JD, Dawid de Vera MT, Alberca-del Arco F, García Muñoz I, Santos-Pérez de la Blanca R, Herrera-Imbroda B, Matas-Rico E, Hierro Martín MI. The role of immunohistochemistry as a surrogate marker in molecular subtyping and classification of bladder cancer. Diagnostics. 2024;14(22):2501.
<https://doi.org/10.3390/diagnostics14222501>

No han sido presentadas ni serán presentadas como publicaciones aval o parte de otras

tesis doctorales en la Universidad de Málaga ni en ninguna otra Universidad.

Y para que conste, firmo la presente en Málaga a 9 de enero de 2025.

Nombre	DNI	Firma
Martina Álvarez Pérez		
Juan Daniel Prieto Cuadra		
M ^a Teresa Dawid de Vera		
Fernando Alberca del Arco		

Isabel García Muñoz		
Rocío Santos-Pérez de la Blanca		
Bernardo Herrera Imbroda		
Elisa Matas Rico		
M ^a Isabel Hierro Martín		

3. Certificación del comité ético



Servicio Andaluz de Salud
CONSEJERÍA DE IGUALDAD, SALUD Y POLÍTICAS SOCIALES

Comité de Ética de la Investigación Provincial de Málaga

Dra. Dña. Gloria Luque Fernández, Secretaria del CEI Provincial de Málaga

CERTIFICA:

Que en la sesión de CEI de fecha: 27/09/2016 ha evaluado la propuesta de D/Dña.: Bernardo Herrera Imbroda, referido al Proyecto de Investigación: "BLADDER-ATLAS-II. Determinación de marcadores de recurrencia, progresión y respuesta terapéutica sobre tejido tumoral y biopsia líquida para la implementación de un programa de medicina personalizada en cáncer vesical basado en una nueva taxonomía tumoral".

Este Comité lo considera ético y metodológicamente correcto.

Los datos de los pacientes deberán estar debidamente disociados.

La composición del CEI en esta sesión es la siguiente:

Dra. Ana Alonso Torres (UGC Neurociencias)	Dr. Antonio López Téllez (Médico de Familia)
Dr. Miguel Angel Berciano Guerrero (UGC Oncología Clínica)	Dra. M ^a Mercedes Márquez Castilla (Médico Familia)
Dr. José L. Guerrero Orriach (UGC Anestesia y Reanimación)	Dr. Fermín Mayoral Cieries (UGC Salud Mental)
Dra. Paloma Campo Mozo (UGC Alegia)	Dra. Cristobalina Mayorga Mayorga (Laboratorio)
Dra. M ^a Angeles Gertrudis Díez (Médico Familia)	Dr. Victor Navas López (UGC Pediatría)
Dr. Antonio E. Guzmán Guzmán (UGC Farmacia Hospitalaria)	Dr. Guillermo Ojeda Burgos (UGC M. Interna)
Dr. José C. Fernández García (UGC Endocrinología y Nutrición)	
Dra. Gloria Luque Fernández (Investigación)	
Dr. Manuel Herrera Gutiérrez (UGC UCI)	
Dr. Francisco J. Mérida de la Torre (Laboratorio)	
Dra. Eva Mingot Castellanos (UGC Hematología)	
Dra. M ^a Angeles Rosado Souvirón (UGC Farmacia)	
Dr. Antonio Pérez Rielo (UGC UCI)	
D. Ramón Porras Sánchez (RRHH-Abogado)	
Dra. M ^a Victoria de la Torre Prados (UGC UMI)	
Dra. Leonor Ruiz Sicilia (UGC Salud Mental)	
Dña. Virginia Salinas Pérez (UGC Neurociencias-Enfermera)	
Dr. Benito Soriano Fernández (Médico Familia)	

Lo que firmo en Málaga, a 6 de Octubre de 2016

Fdo.: Dra. Gloria Luque Fernández
Secretaría del CEI