



# CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL CARCINOMA UROTELIAL MÚSCULO INVASIVO DE VEJIGA. ESTUDIO PILOTO

## *Molecular Characterization of Muscle-Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. Pilot Study*

Rudy Cavaniel L.<sup>1\*</sup>, Carlos Sucre M.<sup>\*\*</sup>, María Rojas <sup>\*\*\*</sup>, Guillermo Borga H. <sup>2\*\*\*\*</sup>

Recibido:03/05/26 Aprobado: 09/06/26

### RESUMEN

**Palabras clave:**  
Cáncer de vejiga, carcinoma urotelial, músculo invasivo, subtipo molecular, inmunohistoquímica, citoqueratina 5/6, GATA 3

**Antecedentes:** El perfil molecular de tumores músculo invasivos de vejiga ha impulsado su clasificación en subtipos moleculares, los cuales exhiben distintas asociaciones con la respuesta al tratamiento y la supervivencia del paciente. **Objetivo:** Caracterizar el carcinoma urotelial músculo invasivo de vejiga en subtipos moleculares mediante estudio inmunohistoquímico. **Materiales y métodos:** Se utilizó un panel de marcadores inmunohistoquímicos compuestos por 5 anticuerpos: CK 5/6, GATA 3, p53, Cerb2/neu, EGFR. Los casos se clasificaron en subtipo luminal (CK5/6 positivo y GATA3 negativo) o basal (CK5/6 negativo y GATA3 positivo), el subtipo p53, Cerb2/neu y EGFR de los casos se asignó según el patrón de inmunotinción. **Resultados:** De los 14 pacientes evaluados, el 79% (11) presentaron tumores subtipo luminal y el 21% (3) tumores subtipo basal, carcinoma urotelial subtipo convencional en el 58%, expresión positiva (3+) de Cerb2/neu en el 21%, EGFR positivo en el 50%, 57% con p53 mutado. En relación a los tumores luminales, el 14% fueron subtipo histológico glandular, el 18% Cerb2/neu positivo, 45% EGFR positivo y 55% p53 mutado; en contraste, los tumores basales mostraron subtipo de células claras en el 66,66% de los casos, 33% Cerb2/neu positivo, 67% EGFR positivo y 67% p53 mutado. **Conclusiones:** La clasificación molecular mediante marcadores inmunohistoquímicos es viable y útil, permitiendo una mejor selección de pacientes candidatos a quimioterapia neoadyuvante, considerando las mayores tasas de respuesta en tumores basales. Los tumores luminales y basales presentan expresión positiva de Cerb-2-neu (HER2/NEU) y EGFR; siendo estos marcadores útiles para dirigir la terapéutica en futuras investigaciones.

### ABSTRACT

**Keywords:**  
Bladder tumors, urothelial carcinoma, muscle invasive, molecular subtypes, immunohistochemical, cytokeratin 5/6, GATA 3

**Background:** The molecular profile of muscle-invasive bladder tumors has prompted their classification into molecular subtypes, which exhibit different associations with treatment response and patient survival. **Objective:** To characterize muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder into molecular subtypes by immunohistochemical study. **Materials and methods:** A panel of immunohistochemical markers composed of 5 antibodies was used: CK 5/6, GATA 3, p53, Cerb2/neu, EGFR. Cases were classified into luminal (CK5/6 positive and GATA3 negative) or basal (CK5/6 negative and GATA3 positive) subtype; the p53, Cerb2/neu and EGFR subtype of the cases was assigned according to the immunostaining pattern. **Results:** Of the 14 patients evaluated, 79% (11) had luminal subtype tumors and 21% (3) basal subtype tumors, 58% conventional subtype urothelial carcinoma, positive expression (3+) of Cerb2/neu in 21%, positive EGFR in 50%, 57% with mutated p53. Regarding the luminal tumors, 14% were glandular histological subtype, 18% Cerb2/neu positive, 45% EGFR positive and 55% p53 mutated; in contrast, basal tumors showed clear cell subtype in 66.66% of cases, 33% Cerb2/neu positive, 67% EGFR positive and 67% p53 mutated. **Conclusions:** Molecular classification using immunohistochemical markers is feasible and useful, allowing for a better selection of patients who are candidates for neoadjuvant chemotherapy, considering the higher response rates in basal-like tumors. Luminal and basal-like tumors present positive expression of Cerb-2-neu (HER2/NEU) and EGFR; these markers are useful for directing therapeutics in future research.

\*Medicina Oncológica. Fellowship de Urología Oncológica ARSUVE S.C CMDLT \*\*Jefe de Servicio del Servicio de Oncología ARSUVE S.C.\*\*\*Adjunto del Servicio de Anatomía Patológica, CMDLT.\*\*\*\*Medicina Oncológica. Adjunto del Servicio de Oncología ARSUVE S.C. Coordinador docente del Postgrado de Medicina Interna del Hospital Dr. Miguel Pérez Carreño, UCV, Caracas-Venezuela. Correo-e: rudycavaniel@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

Los tumores que surgen del urotelio se denominan carcinomas uroteliales (CU). La mayoría de los CU (90%) se localizan en la vejiga, seguidas de la pelvis renal (8%), el uréter y la uretra (2%)<sup>1</sup>. El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIIC) publicó recientemente la actualización de GLOBOCAN 2022, la cual refleja que el cáncer de vejiga ha pasado del 10° al 9° cáncer más diagnosticado en todo el mundo, con aumento tanto de las tasas de incidencia, así como también, de mortalidad. Los nuevos datos muestran que en el año 2022 se diagnosticaron 614298 casos de cáncer de vejiga en el mundo, lo que supone un aumento del 7,1 % respecto a los datos comunicados en 2020. Las nuevas estimaciones de prevalencia a 5 años revelan que 1.950.315 personas (de ambos géneros) viven con cáncer de vejiga en los cinco años posteriores al diagnóstico.<sup>2</sup>

Según los últimos datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) publicados en 2020, las muertes causadas por cáncer de vejiga en Venezuela han llegado a 365 (0,23% de todas las muertes). La tasa de mortalidad por edad es de 1,35 por 100,000 habitantes. Venezuela ocupa el lugar número 138 en el mundo.<sup>3</sup>

La relación incidencia hombre-mujer es de 6:1.4. En general, el 90% de los CU vesicales son tumores localizados en el momento del diagnóstico, el 75% confinado a la mucosa o submucosa como cáncer vesical no infiltrante o no músculo-invasivo (CVNMI), mientras que el 25% infiltra el músculo detrusor, clasificándose como tumores músculo-invasivos (CVMI).

Los tumores papilares de bajo grado contienen mutaciones activadoras de FGFR3, mientras que los de alto grado a menudo

contienen mutaciones inactivadoras en p53 y/o CDKN2A. Los datos del Proyecto Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) identificaron a CVMI como uno de los tipos de tumores con mayor nivel de aberraciones genómicas por muestra.<sup>1</sup>

El paradigma actual del tratamiento del CVMI incluye quimioterapia neoadyuvante basada en cisplatino (NAC) seguida de cistectomía radical (CR) para pacientes que son elegibles para ambos tratamientos.<sup>5,6</sup> Sin embargo, la NAC ofrece un beneficio absoluto en supervivencia general (SG) es <10%.<sup>7,8</sup>; en tal sentido, su utilización global sigue siendo baja. Aunque la NAC mejora la reducción del estadio patológico y la supervivencia del paciente, sólo aproximadamente el 40% de los pacientes experimentan una respuesta, definida como ausencia de enfermedad músculo-invasiva y metástasis en los ganglios linfáticos (<pT2 y pN0)<sup>9</sup>. Es poco probable que los pacientes que no responden obtengan un beneficio clínico, en contraste, están expuestos a una toxicidad sustancial y experimentan retraso en la terapia local definitiva. La identificación de marcadores que puedan predecir el porcentaje de respuesta a la terapia es esencial para una mejor selección de los pacientes y un plan terapéutico ideal que implique mayor beneficio asociado a un menor grado de toxicidad.

La estratificación del riesgo del paciente para determinar la indicación de NAC se basa actualmente en un examen histopatológico limitado del tejido de la resección transuretral del tumor de vejiga (TURBT) y la estadificación radiológica.<sup>10</sup>

La subtipificación molecular ha surgido como una herramienta potencial para refinar la selección de pacientes para NAC. El perfil molecular de muestras de grandes cohortes de carcinoma de vejiga ha impulsado

su clasificación en subtipos moleculares que muestran características genómicas y transcriptómicas específicas, como las informadas en el cáncer de mama. Estos subtipos pueden exhibir distintas asociaciones con la respuesta al tratamiento y la supervivencia del paciente.<sup>11-13</sup>

Seiler y colaboradores desarrollaron un clasificador de subtipificación genómica (GSC) con 4 subtipos (luminal, basal, claudin low y luminal infiltrado); los tumores GSC-Basal parecían beneficiarse más de la NAC, mientras que los pacientes con tumores GSC-Luminal no mostraron diferencias en la supervivencia de aquellos pacientes que recibían NAC versus los pacientes que no recibían terapia neoadyuvante.<sup>13-16</sup>

Hay un número cada vez mayor de sistemas de subtipos moleculares del CVMI, incluido el sistema de dos subtipos de la UNC (Universidad de Carolina del Norte) descrito por Damrauer y colaboradores, clasificándolos en subtipos luminal y basal, y el subtipo basal también contiene un subtipo "bajo en claudina". Las tasas de supervivencia general y específica de la enfermedad del subtipo luminal son significativamente más altas que las del subtipo basal ( $p= 0,019$  y  $0,008$  respectivamente), también se describe el genoma de este subtipo está enriquecido en mutaciones FGFR3 (receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos) y TSC1 (esclerosis tuberculosa 1), así como cambios en la vía RB1, incluidas mutaciones por delección de RB1 y la amplificación de CCND1 (ciclina D1), E2F3 (factor de transcripción E2F 3) y CCNE1 (ciclina E1).<sup>17</sup>

El sistema de tres subtipos de la MDA (MD Anderson): subtipo luminal, similar a p53 y basal. El subtipo luminal está enriquecido con marcadores epiteliales, PPAR- $\gamma$  activado, receptor de estrógeno, mutaciones de FGFR3

y alta expresión de FGFR3, lo que sugiere una posible sensibilidad a los bloqueadores de FGFR. El subtipo similar a p53 expresa resistencia a los fármacos de quimioterapia neoadyuvante, lo que sugiere que el gen p53 puede desempeñar un papel importante en la predicción de la respuesta a la quimioterapia. Los tumores basales presentan marcadores de diferenciación de células escamosas y p63, lo cual les confiere mayor capacidad invasiva y se asocian con peor pronóstico en comparación con otros subtipos, así como también TP53 (61%) o RB1 (25%) representan dos de los genes más comúnmente alterados en el subtipo Ba/Sq.<sup>11</sup>

El sistema de subtipos del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA). La base de datos TCGA contiene una serie de datos genómicos y transcriptómicos, obteniéndose 5 subtipos según su firma genética: luminal, infiltrado luminal, basal-escamoso, neural y luminal-papilar. Los pacientes con tumores neuroendocrinos o neurales se asociaron con el peor pronóstico, mientras que los pacientes con subtipo papilar luminal mostraron mejor supervivencia general. Los subtipos luminal, infiltrado luminal y luminal-papilar expresan en gran medida genes marcadores luminales (KTT20, GATA3, UPK1A, UPK2, FGFR3, etc.), y el subtipo infiltrado luminal expresa en gran medida genes de ECM (matriz extracelular) y del músculo liso. El subtipo luminal-papilar es principalmente un fenotipo patológico papilar. Los genes marcadores basales (KRT5, KRT6A, CD44, etc.), los genes similares al epitelio escamoso (GSDMC, TGM1, etc.) y los genes marcadores inmunes (CXCL11, L1CAM, etc.) se expresan altamente en las células escamosas basales, por su parte, el subtipo neural expresa en gran medida genes de diferenciación neural.<sup>18</sup>

En un estudio reciente realizado por Sjödaahl y colaboradores, los tumores asignados

a los subtipos de Lund genómicamente inestable (GU) y de tipo urotelial (UroC) tuvieron proporciones más altas de respuesta patológica completa (pCR) y se asociaron con una mejor supervivencia específica del cáncer.<sup>19</sup>

El clasificador de Consenso, descrito por Kamoun y colaboradores, define 6 subtipos moleculares: luminal papilar, luminal no especificado, luminal inestable, rico en estroma, basal/escamoso y de tipo neuroendocrino. Se observó que los tumores luminales inestables sobreexpresan *Cerb2/neu* en el 39%.<sup>20</sup>

El 75% de los pacientes *Cerb2/neu* (3+) fueron de tipo luminal. El 25% restante fueron del subtipo basal. El 100% de los tumores basales expresaron EGFR, 22% en los luminales y 18,2% en subtipo p53 no mutado.<sup>21</sup> Otros análisis recientes sugieren que mutaciones específicas, especialmente en ERCC2, ERBB2 y genes de reparación del ADN, pueden predecir la respuesta a la NAC.<sup>22-25</sup>

El beneficio de determinar cuáles son los pacientes que responderán mejor a la terapia neoadyuvante radica en la asociación de la respuesta patológica con la supervivencia general. Flaig y colaboradores, mostraron los resultados del estudio SWOG S2324 (COXEN trial), se evaluaron 192 pacientes con carcinoma urotelial invasor de vejiga, sometidos a cistectomía radical tratados previamente con quimioterapia neoadyuvante; el 30,8% presentó respuesta patológica completa con tasas de supervivencia general a los 5 años del 90%, 89% en pacientes con <pT2, en comparación con 52% para los pacientes no respondedores.

Los hallazgos anteriormente descritos resultan de estudios de secuenciación

genómica, sin embargo, utilizar marcadores inmunohistoquímicos se considera una alternativa para su uso en entornos clínicos. A pesar de la superposición significativa entre los subtipos encontrada en varios estudios, un pequeño panel de marcadores inmunohistoquímicos, incluidos: CK5/6, CK14, GATA3 y la citoqueratina 20 (CK20) para los tumores luminales, reveló patrones de expresión diferenciales significativos.<sup>26</sup>

## PROBLEMA A ESTUDIAR

Los tumores de vejiga músculo invasivos (MIBC) son tumores muy heterogéneos, con diferencias intratumorales intrínsecas, las cuales determinan que cada tumor exprese biología y comportamientos clínicos distintos, exhibiendo tasas de supervivencia y respuestas al tratamiento diversas.

El perfil molecular de un gran número de muestras de carcinomas uroteliales de vejiga ha impulsado su clasificación en subtipos moleculares que muestran características genómicas y transcriptómicas específicas. La quimioterapia neoadyuvante confiere un beneficio absoluto del 5-10% en supervivencia general con un HR: 0,43, p=0,02, lo cual se traduce en una reducción del riesgo de muerte del 67% para pacientes con enfermedad músculo invasiva que reciben quimioterapia neoadyuvante vs cirugía sola, sin embargo, los esquemas terapéuticos utilizados implican un grado de toxicidad significativo, sumado a que más de un tercio de los pacientes no son elegibles para recibir terapias basadas en cisplatino.<sup>27</sup>

Con el rápido desarrollo de la secuenciación, la espectrometría de masas y otras técnicas, los estudios basados en la genómica y el transcriptoma, la epigenética, la proteómica,

entre otras, proporcionan una nueva dirección para el diagnóstico preciso y tratamiento del cáncer de vejiga.

Identificar a los pacientes que expresan mayor sensibilidad y tasas de respuesta a la quimioterapia neoadyuvante mediante la clasificación de subtipos moleculares parece ser una estrategia prometedora para mejorar la supervivencia y prevenir la toxicidad indeseable. Sin embargo, en la práctica clínica rutinaria el acceso a una firma genética con un perfil de transcriptoma completo implica costos elevados, lo cual limita en gran medida la tipificación molecular de estos pacientes, así como también, mayor tiempo de espera para el procesamiento de resultados.

Actualmente no existe en el país un sistema de clasificación molecular del carcinoma urotelial musculo invasivo de vejiga, que se realice de manera habitual y estandarizado, que sea de fácil acceso y bajo costo, lo cual permita predecir el pronóstico y guiar el tratamiento.

## IMPORTANCIA

La subtipificación molecular es beneficiosa para seleccionar pacientes con subtipos específicos sensibles a la quimioterapia neoadyuvante, lo que podría ayudar a evitar la toxicidad de la quimioterapia innecesaria y optimizar la estrategia terapéutica. En vista de los altos costos y limitaciones para el acceso a firmas genéticas, resulta necesario tipificar el cáncer urotelial musculo invasivo de vejiga a través de marcadores inmunohistoquímicos, lo cual se considera una alternativa para su uso en entornos clínicos, ya que la inmunohistoquímica (IHC) es una técnica económica en comparación con el estudio genómico, fácilmente accesible y

confiable, aportando información que podría ayudar al clínico a orientar el plan de trabajo, seleccionar la terapia ideal y generar mayor beneficio con menor perfil de toxicidad.

En tal sentido, considerando que la respuesta patológica completa se asocia con supervivencias más prolongadas determina la necesidad de predecir los pacientes que presentarían mayor respuesta al tratamiento neoadyuvante y de esta manera la selección adecuada de las terapias con un impacto positivo en términos de supervivencia y pronóstico.

La tipificación de estos pacientes a través de marcadores inmunohistoquímicos podría establecer además un sistema de clasificación molecular de rutina para los pacientes con carcinoma urotelial músculo invasivo de vejiga, integrando la importancia del reporte del anatomopatólogo como parte del manejo multi e interdisciplinario de estos pacientes, reconociendo sus implicaciones pronósticas y predictivas, lo que podría generar nuevas líneas de investigación.

## ANTECEDENTES

Helal y colaboradores, realizaron estudios de inmunohistoquímica en muestras de resección transuretral del tumor de vejiga con GATA3, CK5/6, p53 y *Cerb2/neu* además de PCR de transcripción inversa cuantitativa para la detección del gen EGFR. Del total de casos, el 45% fueron luminales, 36,7% basales y 18,3% p53 subtipo no mutado. El análisis univariante mostró que la supervivencia general (SG) y la supervivencia libre de progresión de la enfermedad (SLE) fueron significativamente más prolongadas para los pacientes con tumores luminales. En el análisis multivariado, el subtipo molecular

y el estado de *Cerb2/neu* fueron factores pronósticos independientes para la SLE y la SG. El subtipo basal mostró una respuesta significativamente mejor a la NAC.<sup>26</sup>

Naves y colaboradores, utilizaron dos combinaciones de marcadores inmunohistoquímicos, es decir, CK5 con CK20 y CK5 con GATA3. El subtipo inmunohistoquímico basal (CK5 positivo y CK20 negativo, o CK5 positivo y GATA3 negativo) se asoció con la variante escamosa. El subtipo inmunohistoquímico luminal (CK5 negativo y CK20 positivo, o CK5 negativo y GATA3 positivo) se asoció con variantes micropapilares y plasmocitoides. Este estudio demuestra que estos tres marcadores inmunohistoquímicos utilizados habitualmente podrían usarse para estratificar los carcinomas uroteliales de vejiga en subtipos basales y luminales, que se asocian con varias diferencias en las características clínico-patológicas.<sup>28</sup>

Hesswani y colaboradores, clasificaron molecularmente los tumores uroteliales de vejiga según la expresión de KRT5, GATA3 y p16, en tumores de subtipo basal o uno de dos subtipos luminales: inestable o de tipo urotelial. La clasificación fue factible en el 89% de los pacientes. El subtipo basal se determinó el 23,6%, luminal inestable en 14,0% y luminal de tipo urotelial en el 31,2%, el 31,2% restante fueron tipificados como no clasificados, estos resultados no mostraron diferencias en la asociación del subtipo con la respuesta o la supervivencia.<sup>29</sup>

Bejrananda y colaboradores, evaluaron subtipos moleculares basados en marcadores inmunohistoquímicos tales como, GATA3, CK20, CK5/6 y CK14, clasificándolos en tumores basales (GATA3- CK5/6+), luminales (GATA3+ CK5/6-) y mixtos (GATA3+ CK5/6+). Sólo GATA3 y CK5/6 se asociaron significativamente con el resultado de supervivencia ( $p = 0,004$

y 0,02). El subtipo mixto presentó mejor pronóstico en cuanto a SG a 5 años (42,8%), mientras que el subtipo basal tuvo el peor pronóstico (SG a 5 años: 7,14%). Los tumores basales presentaron un índice de riesgo de 3,29 (IC del 95%: 1,71–6,32). Concluyeron que la subtipificación utilizando GATA3 y CK5/6 fue aplicable y los pacientes con el subtipo basal tenían el mayor riesgo y pueden requerir una terapia más intensa.<sup>30</sup>

Kamoun y colaboradores, intentaron asociar variantes histológicas del carcinoma urotelial con cada una de las clases moleculares anteriores. Concluyeron que los tumores luminales exhibían una configuración predominantemente papilar en el 59% de los casos. La variante neuroendocrina del carcinoma urotelial se observó principalmente en la clase de tumores tipo NE, y el 72% de los casos exhibió diferenciación neuroendocrina. De manera similar, los tumores Ba/Sq revelaron características de diferenciación escamosa en una proporción significativa de los casos (79%), confirmando su fenotipo molecular.<sup>31</sup>

Recientemente, Groeneveld y colaboradores, publicaron el estudio post hoc que analizó 300 pacientes tratados con quimioterapia neoadyuvante incluidos en el ensayo GETUG/AFU VESPER, con tejido parafinado fijado con formalina para diagnóstico transuretral que se sometió a revisión patológica antes de ser secuenciado. El subtipo “mixto” se definió para tumores que mostraban al menos dos subtipos moleculares de consenso diferentes en regiones separadas. En este estudio se observó que los pacientes con tumores Basal/Escamoso (puros o mixtos) tuvieron un mayor cociente de riesgo (HR) de supervivencia libre de progresión [HR 2,0, intervalo de confianza (IC) del 95% 1,36-3,0]. Los tumores mixtos se asociaron con una actividad metabólica reducida que podría explicar la quimiorresistencia.<sup>32</sup>

## DELIMITACIÓN

La investigación se realizó en el servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, en el período comprendido desde el 1 de enero de 2013 hasta el 31 de diciembre de 2022.

## HIPÓTESIS

La clasificación del carcinoma urotelial de vejiga músculo invasivo en subtipos moleculares implica comportamientos biológicos, pronósticos y respuestas a tratamiento distintas, de modo que, podríamos inferir que cada subtipo molecular se comporta como una enfermedad diferente en cada caso. La necesidad de poder predecir cuales son los pacientes que se beneficiarían en gran medida de la terapia neoadyuvante permitiría adaptar de forma individualizada los planes terapéuticos implicando la disminución de toxicidad indeseable e impactar de forma positiva en el manejo de los pacientes, adicionalmente, tomando en cuenta la asociación de respuesta patológica completa con supervivencia general más prolongada denota la necesidad de dirigir el enfoque terapéutico actual hacia la selección de pacientes cuya biología molecular del tumor implique mayor sensibilidad a la terapia con mayor probabilidad de respuesta.

## OBJETIVOS

**General:** Caracterizar el carcinoma urotelial músculo invasivo de vejiga en subtipos moleculares mediante estudio inmunohistoquímico.

### Específicos:

- Evaluar la frecuencia de los diferentes subtipos moleculares del

carcinoma urotelial músculo invasivo de vejiga, mediante marcadores inmunohistoquímicos.

- Describir los subtipos histológicos asociados a los diferentes grupos moleculares.
- Determinar la asociación de los grupos moleculares con la expresión de C-erb-B2 (HER2/NEU), EGFR y p53.
- Describir la respuesta clínica y supervivencia de los subtipos moleculares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Tipo de estudio

Se planteó la realización de un ensayo piloto: estudio de corte transversal retrospectivo, descriptivo, observacional y asociativo.

### Población y muestra

La población estuvo conformada por 15 pacientes con diagnóstico de carcinoma urotelial músculo invasivo de vejiga que contaban con bloques y láminas en el servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, en Caracas, Venezuela. El tamaño mínimo de la muestra que representa la población se obtuvo utilizando el programa netquest, considerando una población de 11.000 pacientes que realizan cistoscopia en el servicio de urología durante 10 años, para una prevalencia de 0,5% y un margen de error de 5%, nivel de confianza de 95%, requiriendo una muestra mínima de 8 pacientes. Se realizó revisión de 15 muestras, 1 de los pacientes no cumplía con los criterios de inclusión excluyéndose del estudio. La muestra estuvo constituida

por 14 pacientes con diagnóstico histológico de carcinoma urotelial músculo invasivo de vejiga en el periodo comprendido desde el 01 de enero de 2013 hasta el 31 de diciembre de 2022 luego de haber aplicado criterios de inclusión y exclusión.

#### **Criterios de inclusión:**

- Pacientes con diagnóstico histológico de carcinoma urotelial músculo invasivo de vejiga.
- Muestras histológicas que cuenten con bloques de parafina.

#### **Criterios de exclusión:**

- Carcinoma urotelial no músculo invasivo.
- Bloques de parafina con tejido insuficiente o necrótico.
- Pacientes con subtipo molecular mixto (CK 5/6 positivo y GATA 3 positivo).

#### **TRATAMIENTO ESTADÍSTICO PROPUESTO**

Se construyó una base de datos en Excel con la información recogida durante el período de estudio. Se utilizaron tablas de distribución de frecuencias para estimar la frecuencia de las variables. Se determinó la relación entre las variables de subtipo molecular y expresión de C-erb-B2 (HER2/NEU), EGFR y p53; utilizando tablas de contingencia de Pearson, con corrección de Yates, obteniéndose la distribución chi cuadrado, registrando el valor p de significancia estadística.

#### **Procedimiento Clínico**

Todos los bloques de parafina de muestras con confirmación histológica

de carcinoma urotelial de vejiga músculo invasivo del banco de muestras del servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad fueron evaluados por un anatomopatólogo especialista en uropatología del servicio de anatomía patológica del mismo Centro. Se realizó evaluación histopatológica de láminas teñidas con hematoxilina y eosina para confirmar el diagnóstico de carcinoma urotelial músculo invasivo de vejiga con microscopio NIKON ECLIPSE E200. Los tumores se clasificaron según el sistema de clasificación de la OMS, 5<sup>ta</sup> edición, volumen 8, año 2022.

Se utilizó un panel de marcadores inmunohistoquímicos compuestos por 5 anticuerpos: CK 5/6, GATA 3, p53, C-erb-B2 (HER2/NEU), EGFR, con los siguientes clones: GATA 3 (Clon: L50-823 Bio SB), p53 (Clon: D0-7 Bio SB), C-erb-B2 (HER2/NEU) (Clon: SP3 Diagnostic BioSystems), EGFR (Clon EP22 Zeta), CK 5/6 (Clon: D5/16B4 DAKO-Agilent). La positividad nuclear de GATA3 se evaluó con una puntuación semicuantitativa, según lo definido por Remmele y Stegner, multiplicando la puntuación de intensidad de tinción de las células positivas (0 = negativas, 1 = débil, 2 = moderada, 3 = fuerte) por el porcentaje de células positivas (0: 0%, 1: < 10%, 2: 10-50%, 3: 51-80%, 4: >80%) El tejido tumoral se considera positivo cuando la puntuación de Remmele es de 3 a 12.<sup>33</sup> Para CK5/6, se registró el porcentaje de células con tinción de membrana citoplasmática positiva y las muestras se consideraron positivas si >50% de las células mostraban tinción de membrana citoplasmática positiva.<sup>34</sup>

El fenotipo mutado de p53 se basó en una expresión difusa o ausencia completa de tinción nuclear de p53 en las células tumorales. El fenotipo no mutado de p53 se determinó mediante expresión nuclear en células tumorales dispersas y estos casos

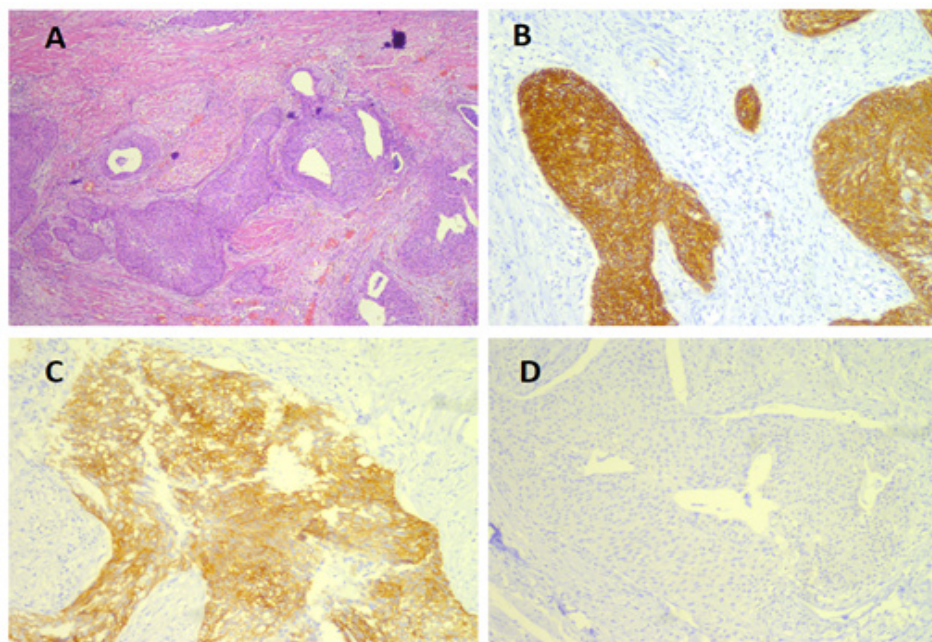
se asignaron como subtipo p53 no mutado independientemente de su resultado de tinción con GATA3 y CK5/6.<sup>35</sup> La expresión de C-erb-B2 (HER2/NEU) se calificó (0, +1, +2, +3) utilizando las pautas del Colegio Americano de Patólogos (CAP), donde las muestras de tejido positivas muestran una expresión de membrana citoplasmática fuerte (3+) y homogénea en >10% de las células tumorales; de lo contrario, se consideraron negativos (0+, 1+, 2+).<sup>36</sup>

Los casos se clasificaron según el perfil de inmunotinción en subtipo luminal (Figura 1) o basal (Figura 2), siguiendo el método de estratificación descrito por Choi y colaboradores.<sup>37</sup> Los tumores positivos para CK5/6 y negativos para GATA3 se consideraron basales; los tumores negativos para CK5/6 y positivos para GATA3 se consideraron luminales.<sup>38</sup> El subtipo p53, C-erb-B2 (HER2/NEU) y EGFR se asignó según el patrón de inmunotinción (Figura 3).

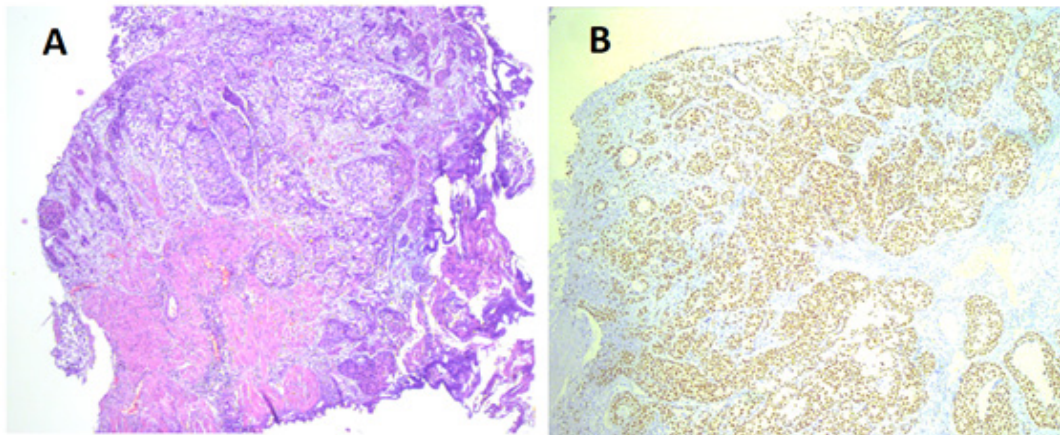
La supervivencia global (SG) comprende el tiempo transcurrido desde la fecha del diagnóstico hasta la muerte del paciente. Supervivencia libre de progresión (SLP) se refiere al tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la aparición de progresión de enfermedad. Supervivencia libre de enfermedad (SLE) es el período de tiempo sin evidencia de enfermedad detectable después de culminado el tratamiento definitivo.<sup>39</sup>

La estadificación clínica se basó en los criterios imagenológicos mediante tomografía computarizada de tórax, abdomen y pelvis, así como también en los reportes anatomopatológicos y cistoscópicos al momento del diagnóstico. La respuesta clínica (respuesta completa o respuesta parcial, según RE

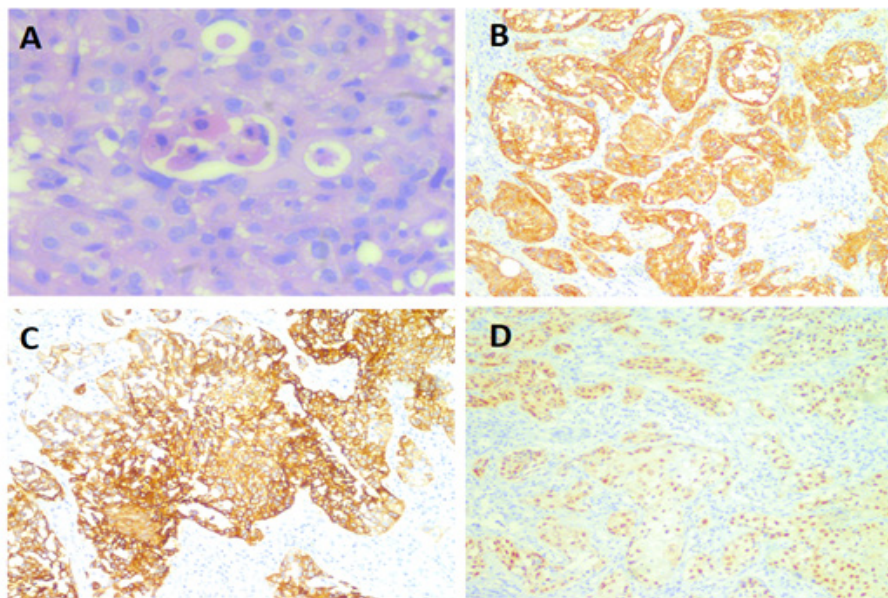
CIST, versión 1.1)<sup>40</sup> se determinó mediante estudios tomográficos, cistoscopia y biopsia vesical posterior al tratamiento recibido.



**Figura 1.** Carcinoma urotelial músculo invasor de vejiga de subtipo basal, tipo histológico convencional, EGFR positivo, C-erb-2-neu (HER2/NEU) negativo (1883-15). **A:** tipo histológico convencional teñido con hematoxilina y eosina (40X) **B:** inmunotinción positiva de CK 5/6 (100X) **C:** inmunotinción positiva (fuerte y difusa) de EGFR (40X). **D:** Inmunotinción negativa (0+) de C-erb-2-neu (HER2/NEU) (100X). Fuente: propiedad del autor



**Figura 2.** Carcinoma urotelial músculo invasor de vejiga de subtipo luminal tipo histológico convencional (472-15) **A:** tipo histológico convencional teñido con hematoxilina y eosina (40X) **B:** inmunotinción positiva de GATA 3 (Remmele 12) (40X). Fuente: propiedad del autor



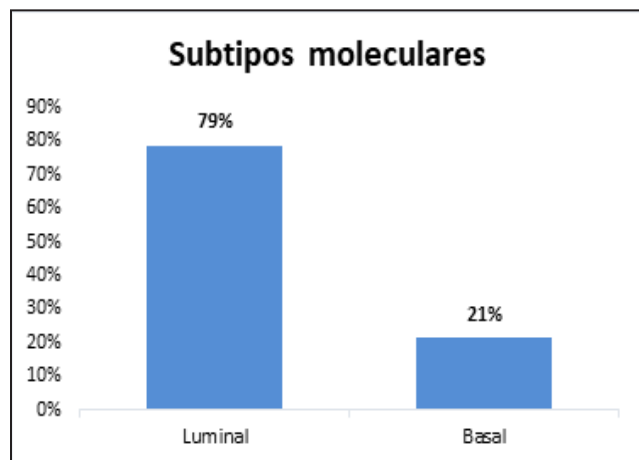
**Figura 3.** Carcinoma urotelial músculo invasor de vejiga de subtipo luminal con diferenciación escamosa, EGFR positivo, Cerb-2-neu (HER2/NEU) positivo, p53 mutado (4467-14) **A:** diferenciación escamosa teñido con hematoxilina y eosina (40X) **B:** inmunotinción positiva de EGFR (intenso y difuso) (40X) **C:** Cerb-2-neu (HER2/NEU) positivo (3+) **D:** p53 mutado (citoplasmático aberrante) Fuente: propiedad del autor

Los resultados se registraron en una hoja de recolección de datos en conjunto con otras características clínicas-patológicas obtenidas de la revisión de las historias clínicas de aquellos pacientes que contaban con historial en el servicio de oncología médica, ARSUYE,

sede en Centro Medico Docente La Trinidad. Para el procesamiento de las muestras contamos con el financiamiento por parte de laboratorios extrainstitucionales, AMBIOS y ROCHE, cada IHQ estuvo valorizada en un costo de 100 USD\$ por cada paciente.

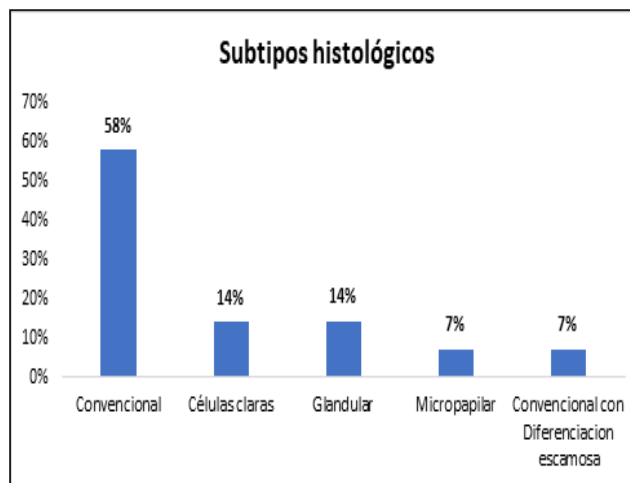
## RESULTADOS

En Gráfica 1, se presentan las frecuencias de subtipos moleculares de los pacientes que acudieron al servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, desde enero de 2013 hasta diciembre de 2022. De acuerdo a lo observado, de los 14 pacientes evaluados, el 79% (11) presentaron tumores subtipo luminal y el 21% (3) tumores subtipo basal.



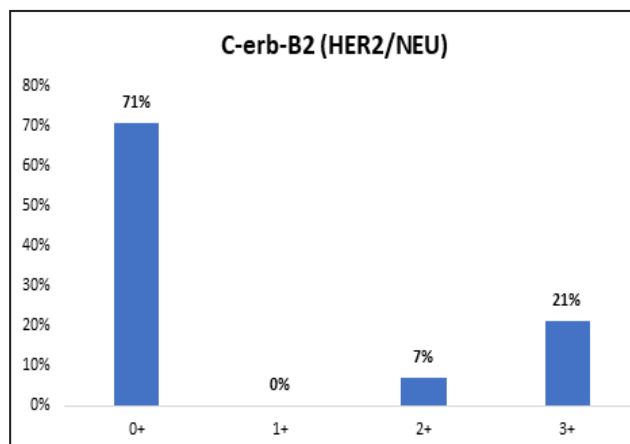
**Gráfica 1.** Frecuencia de subtipos moleculares de pacientes del servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, desde enero de 2013 hasta de diciembre de 2022

Las frecuencias de subtipos histológicos de pacientes del servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, desde enero de 2013 hasta diciembre de 2022, se muestran en la Gráfica 2. De las 14 muestras analizadas, el 58% (8) presentaron carcinoma urotelial subtipo convencional, 14% (2) subtipo de células claras, 14% (2) glandular, 7% (1) micropapilar y 7% (1) subtipo convencional con diferenciación escamosa. De los 11 pacientes con subtipo luminal, 2 (14%) presentaron subtipo histológico glandular, 1 (7%) presentó diferenciación escamosa, 1 (7%) subtipo micropapilar. En contraste, de los 3 pacientes con tumores basales, 2 (67%) mostraron subtipo de células claras.

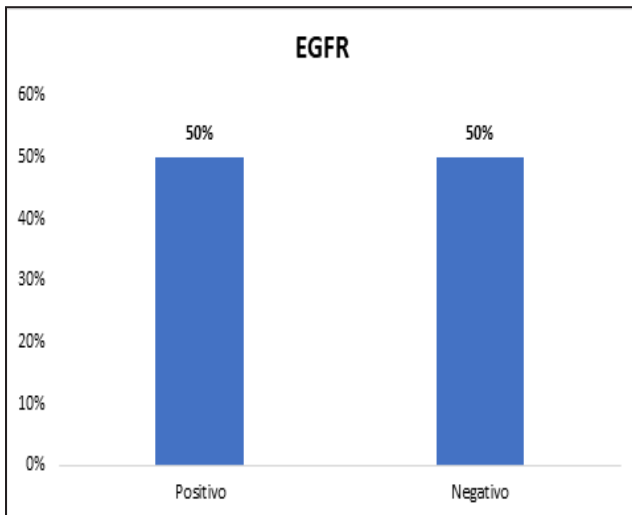


**Gráfica 2.** Frecuencia de subtipos histológicos de pacientes del servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, desde enero de 2013 hasta de diciembre de 2022

La frecuencia de expresión de C-erb-B2 (HER2/NEU) de pacientes del servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, desde enero de 2013 hasta diciembre de 2022, se presenta en Gráfica 3. Del total de muestras estudiadas, el 71% (10) presentaron expresión negativa de C-erb-B2/neu, el 21% (3) expresión positiva y el 7% (1) equívoco. Mientras que en Gráfica 4, se presentan la Frecuencia de expresión de



**Gráfica 3.** Frecuencia de expresión de C-erb-B2 (HER2/NEU) de pacientes del servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, desde enero de 2013 hasta diciembre de 2022

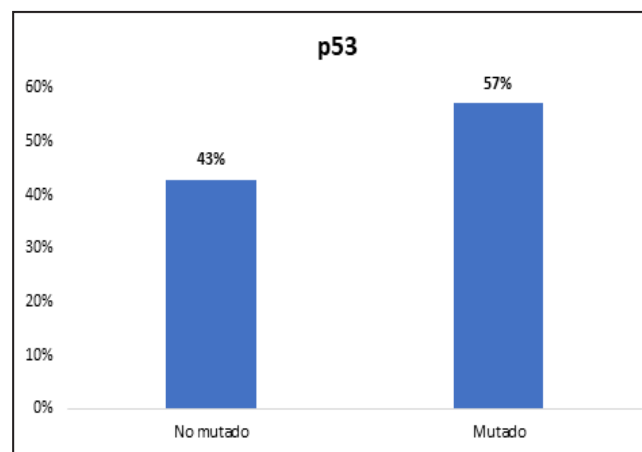


**Gráfica 4.** Frecuencia de expresión de EGFR de pacientes del servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, desde enero de 2013 hasta de diciembre de 2022

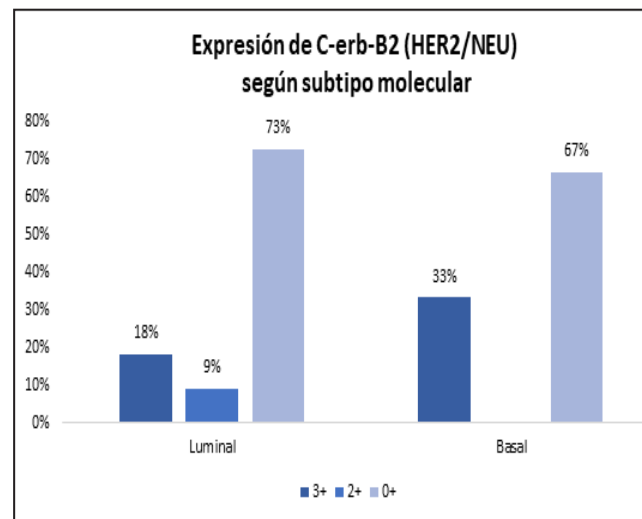
EGFR de pacientes del servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, desde enero de 2013 hasta diciembre de 2022. Estos resultados evidenciaron que, de los 14 pacientes evaluados, el 50% (7) mostraron expresión positiva de EGFR y el 50% (7) negativa.

En Gráfica 5 se presentan la distribución de frecuencia de mutación de p53 de pacientes del servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, desde enero de 2013 hasta diciembre de 2022. En relación a la mutación del p53, observamos que, de las 14 muestras evaluadas, el 57% (8) presentaron mutación del p53 y el 43% (6) fueron no mutados.

La Gráfica 6 se muestra la distribución de frecuencia de la expresión de C-erb-B2 (HER2/NEU) según subtipo molecular de pacientes del servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, en el período comprendido desde enero de 2013 hasta diciembre de 2022. En tal



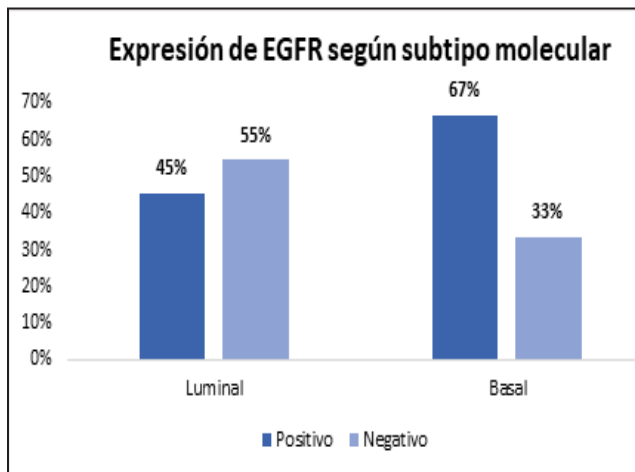
**Gráfica 5.** Frecuencia de mutación de p53 de pacientes del servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, desde enero de 2013 hasta de diciembre de 2022



**Gráfica 6.** Expresión de C-erb-B2 (HER2/NEU) según subtipo molecular de pacientes del servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, desde enero de 2013 hasta diciembre de 2022

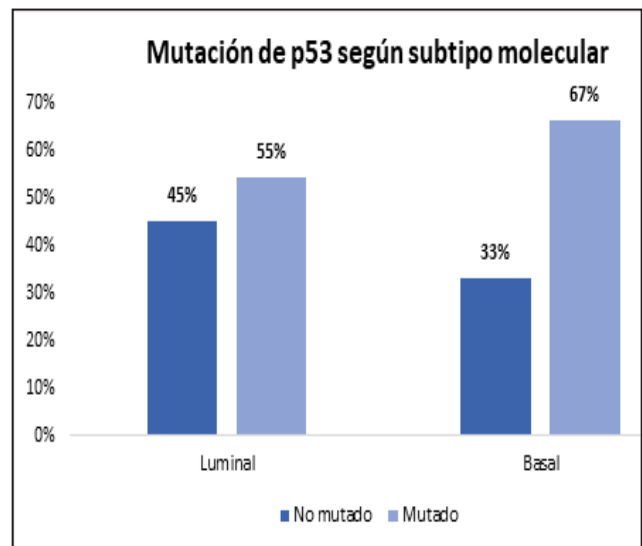
sentido, se apareció que, de los 11 pacientes con tumores luminales, el 18% (2) tuvieron expresión positiva de C-erb2/neu, 73% (8) negativa y 9% equívoco. En relación a los tumores basales (3), el 67% (2) presentaron expresión negativa y el 33% (1) positiva, con un valor  $p=0,22$ .

Se presenta en la Gráfica 7 la distribución de la expresión de EGFR según subtipo molecular de pacientes del servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, en el período comprendido desde enero de 2013 hasta diciembre de 2022. En relación a la expresión de EGFR según el subtipo molecular se observa que del total de las muestras evaluadas (14), 11 tumores de tipo luminal (14) el 55% (6) eran EGFR negativos y el 45% (5) EGFR positivo. De los 3 tumores basales, el 67% (2) fueron EGFR positivos y el 33% (1) EGFR negativo con un valor de  $p=0,36$ .



**Gráfica 7.** Expresión de EGFR según subtipo molecular de pacientes del servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, desde enero de 2013 hasta de diciembre de 2022

La Gráfica 8 reporta las distribuciones de la mutación de p53 según subtipo molecular de pacientes del servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, desde enero de 2013 hasta diciembre de 2022. De acuerdo a lo observado, el 55% (6) de los tumores luminales presentaron p53 mutado y el 45% (5) no mutado. El 67% de los tumores basales (2) mostraron mutación del p53 y el 33% (1) no mutado con un valor de  $p=0,36$ .



**Gráfica 8.** Mutación de p53 según subtipo molecular de pacientes del servicio de anatomía patológica del Centro Médico Docente La Trinidad, Caracas, Venezuela, desde enero de 2013 hasta diciembre de 2022

De las 14 muestras evaluadas, 5 pacientes contaban con historias clínicas en el servicio de oncología médica ARSUVE en su sede Centro Medico Docente La Trinidad, de las cuales se pudo observar que de los 3 pacientes con carcinoma urotelial de subtipo basal 2 presentaban estadificación clínica ST II (cT2N0M0) al momento del diagnóstico, 1 de ellos fue tratado con carboplatino concurrente con radioterapia obteniendo respuesta clínica completa con un intervalo libre de enfermedad de 2 años + 8 meses, segundo paciente recibió quimioterapia basada en platino (Carboplatino + Docetaxel) con una respuesta parcial mayor (>60%) post tratamiento.

En contraste, de los 11 pacientes con subtipo luminal, 2 mostraron tumores con estadificación clínica ST II (cT2N0M0) al momento del diagnóstico 1 de ellos se negó a recibir tratamiento y se mantuvo en observación con un intervalo libre de progresión de 2 años; el segundo paciente fue tratado con carboplatino concurrente con radioterapia, sin evidencia de respuesta

clínica post tratamiento con una supervivencia global de 10 meses, este paciente mostró mutación del p53. Un tercer paciente con tumor luminal ST III (cT4N2M0) recibió 3 ciclos de gemcitabina más carboplatino obteniendo respuesta parcial (<50%) con una supervivencia global de 4 meses.

## DISCUSIÓN

La caracterización molecular del carcinoma urotelial de vejiga ha permitido su clasificación en subtipos que se asocian con características clínico-patológicas distintas. Éste se ha clasificado en dos subtipos principales: luminal y basal, de una forma similar a los tipos intrínsecos del carcinoma de mama. La utilidad de esta clasificación en el cáncer de mama demostró un valor pronóstico y terapéutico para los pacientes.

En el presente estudio se observó que los tumores luminales constituyeron la mayoría de las muestras evaluadas con el 79% (11) de los pacientes, éstos resultados fueron consistentes con la cohorte MDA 11 y el grupo Lund 19, los cuales registraron frecuencias de 70 y 82,5% respectivamente, estos estudios antes mencionados tuvieron un número mayor de casos que incluyeron tumores de vejiga, tanto invasivos como no músculo invasivo. Por su parte en el estudio de Helal y colaboradores<sup>26</sup>, que sólo incluyó tumores músculo invasivos, se documentaron tumores luminales en un 45%, por su parte Hesswani y colaboradores<sup>29</sup>, observaron en su estudio tumores luminales en un 45%.

El subtipo basal constituyó el 21% de nuestros casos, similar a los resultados de la cohorte MDA 11, Lund, 19 Hesswani y colaboradores<sup>29</sup> (26, 13,3 y 24% respectivamente) y discretamente menor

que los datos publicados por Helal y colaboradores<sup>26</sup> con el 36,7% de los pacientes evaluados.

En relación al subtipo histológico observamos que el 58% (8) presentaron carcinoma urotelial subtipo convencional, 14% (2) subtipo de células claras, 14% (2) glandular, 7% (1) micropapilar y 7% (1) subtipo convencional con diferenciación escamosa. De los 11 pacientes con subtipo luminal, 2 (14%) presentaron subtipo histológico glandular, 1 (7%) presentó diferenciación escamosa, 1 (7%) subtipo micropapilar y de los 3 pacientes con tumores basales, 2 (67%) mostraron subtipo de células claras. Estos resultados coinciden con los publicados en el estudio de Naves-Ravanini y colaboradores<sup>28</sup>, en el cual el subtipo luminal se asoció con tumores con diferenciación micropapilar ( $p=0,001$ ) y glandular ( $p=0,02$ ), confiriendo peor pronóstico en los pacientes con lesiones luminales y diferenciación micropapilar; en contraste en dicha investigación los tumores basales se asociaron con presencia de diferenciación escamosa a diferencia de nuestros resultados en los cuales el 67% de los tumores basales mostraron subtipo de células claras.

En cuanto a la positividad de C-erb-B2 (HER2/NEU) en las muestras evaluadas se pudo determinar 71% de expresión negativa y 21% positivo. A su vez se evidenció que el 18% de tumores luminales tuvieron expresión positiva (3+) de C-erb-B2 (HER2/NEU) y 73% negativa, por otra parte, el 33% de los tumores basales tuvieron expresión positiva (3+)  $p=0,22$ . Helal y colaboradores<sup>26</sup> documentaron que el 75% de los casos positivos fueron de subtipo luminal. Estos resultados a su vez son cónsonos con Yorozu y colaboradores<sup>42</sup> quienes informaron que la sobreexpresión de la proteína C-erbB2/neu y la amplificación

genética se detectaron en el subtipo luminal de carcinoma urotelial, lo que sugiere que estos pacientes pueden beneficiarse de terapias dirigidas anti HER2, tomando en cuenta que el subtipo luminal se considera resistente a la quimioterapia. También Kiss y colaboradores<sup>43</sup> estudiaron las alteraciones de C-erb-B2 (HER2/NEU) en CVMI y concluyeron que eran mayores en el subtipo luminal en comparación con el basal. Por lo tanto, adaptar la terapia dirigida anti HER2 en el contexto de los subtipos moleculares podría ser una estrategia prometedora principalmente en el subtipo luminal. Es de hacer notar que en nuestro estudio los tumores basales tuvieron expresión positiva en el 33%.

La activación de la vía EGFR promueve múltiples vías de señalización posteriores que conducen a una mayor proliferación, invasión y supervivencia celular.<sup>44</sup> En este estudio el 50% de la muestra tenía expresión positiva de EGFR y 50% negativa, según el subtipo molecular se determinó que el 45% de los tumores de tipo luminal fueron EGFR positivos y de los tumores basales, el 67% fueron EGFR positivos  $p=0,36$ . Al igual que lo observado por Helal y colaboradores<sup>26</sup>, la positividad de EGFR fue significativamente mayor en los tumores basales que en los subtipos luminales y ( $p < 0,001$ ), a pesar que en nuestra investigación no se alcanzó significancia estadística en la asociación entre las variables, probablemente debido al tamaño de la muestra. Cabe destacar que, considerando estos hallazgos la vía del EGFR podría considerarse una diana terapéutica a evaluar en tumores basales en futuras investigaciones.

Dado que EGFR y C-erb-B2 (HER2/NEU) se expresan predominantemente en los subtipos basal y luminal de cáncer de vejiga, respectivamente, la combinación de ambos objetivos proporciona una forma única

y altamente selectiva de atacar los cánceres de vejiga que tienen una expresión moderada de ambos.<sup>45</sup>

De acuerdo a lo observado por Helal y colaboradores<sup>26</sup>, registraron 18,3% de tumores p53 no mutado; con mayor número de pacientes no respondedores a la quimioterapia neoadyuvante (90%), éstos a su vez mostraron menor supervivencia libre de eventos, resultados compatibles con otros estudios en los que el subtipo p53 no mutado tuvo la peor supervivencia después del tratamiento. La quimiorresistencia intrínseca de p53 no mutado hace que estos tumores no respondan a la quimioterapia neoadyuvante convencional. Además, una característica importante fue la mala respuesta a la quimioterapia neoadyuvante basada en cisplatino<sup>46</sup>. En la presente investigación se obtuvo un mayor número de muestras con mutación del p53 en el 57% y una menor frecuencia de tumores p53 no mutado en el 43% de los casos evaluados.

Helal y colaboradores<sup>26</sup> también observaron que los pacientes del ~~grupo basal~~ tuvieron una respuesta significativamente mejor a tratamiento (45%) que los grupos p53 no mutado y luminal ( $p=0,045$ ). Esto fue similar con los datos de Raz-zaghdoust y colaboradores<sup>47</sup>, que estudiaron la asociación del subtipo molecular mediante inmunohistoquímica y la respuesta a la quimioterapia neoadyuvante y concluyeron que el subtipo basal estaba asociado con mejores tasas de respuesta completa. Los resultados confirman además que los pacientes con tumores basales identificados mediante IHQ tienen mayor posibilidad de lograr respuestas completas post neoadyuvancia.<sup>48</sup> Tal como se menciona, en nuestro estudio, pudimos observar que de los 3 pacientes con carcinoma urotelial de subtipo basal, 2 pacientes (66,6%) presentaron respuesta clínica al tratamiento; 1 presentó respuesta completa al tratamiento con

quimioterapia concurrente con radioterapia, 1 paciente con respuesta parcial >50% con quimioterapia basada en platino; en contraste 1 paciente con subtipo luminal tratado con quimioterapia neoadyuvante no presentó respuesta al tratamiento.

## CONCLUSIONES

- La clasificación molecular del carcinoma músculo invasivo de vejiga mediante marcadores inmunohistoquímicos tales como CK 5/6 y GATA 3, es viable en el entorno clínico de nuestro país.
- El carcinoma urotelial músculo invasivo de vejiga subtipo luminal, fue el más frecuente.
- Los tumores luminales presentaron histologías micropapilares y glandulares, mientras que la variante basal muestra subtipo histológico de células claras.
- Las variedades luminal y basal, presentan expresión positiva de Cerb-2-neu (HER2/NEU) y EGFR; éstos hallazgos podrían ser útiles para dirigir la terapéutica en futuras investigaciones.
- En vista que la variedad basal está relacionada con mejores tasas de respuesta a tratamiento, pudiese permitir una mejor selección de la muestra para pacientes candidatos a quimioterapia neoadyuvante.

## RECOMENDACIONES

- Clasificar molecularmente los tumores uroteliales músculo invasivos de vejiga

mediante estudio inmunohistoquímico de forma habitual en la práctica clínica.

- Incluir los marcadores inmunohistoquímicos CK 5/6, GATA3 como modelo de referencia para la tipificación molecular en tumores basales y luminales, así como también la determinación de expresión de C-erb-B2 (HER2/NEU), EGFR y p53.
- Guiar la selección de opciones terapéuticas basada en la clasificación molecular del tumor.
- Continuar la línea de investigación con el fin de aumentar el número de la muestra actual.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Begoña P. Valderrama, Aranzazu Gonzalez, *et al.* SEOM-SOGUG clinical guideline for localized muscle invasive and advanced bladder cancer (2021). Volume 24, pages 613–624, (2022).
2. GLOBOCAN 2022: El cáncer de vejiga es el 9º más diagnosticado en el mundo. <https://worldbladdercancer.org/es/novedades-eventos/globocan-2022-el-cancer-de-vejiga-es-el-9o-mas-diagnosticado-en-el-mundo/>
3. Venezuela: cáncer de vejiga: <https://www.worldlifeexpectancy.com/es/venezuela-bladder-cancer>.
4. Zhu S, Yu W, Yang X, Wu C, Cheng F. Traditional Classification and Novel+ Subtyping Systems for Bladder Cancer. *Front Oncol.* 2020 Feb 7; 10:102. doi: 10.3389/fonc.2020.00102. PMID: 32117752; PMCID: PMC7025453.
5. Witjes JA, Bruins HM, Cathomas R, Comperat EM, Cowan NC, Gakis G, *et al.* European Association of Urology Guidelines on Muscle-invasive and Metastatic Bladder Cancer: Summary of the 2020 Guidelines. *Eur Urol* 2021;79(1):82-104.
6. Chang SS, Bochner BH, Chou R, Dreicer R, Kamat AM, Lerner SP, *et al.* Treatment of non-metastatic muscle-invasive bladder cancer: AUA/ASCO/ASTRO/SUO guideline. *J Urol* 2017; 198(3):552-9.
7. Grossman HB, Natale RB, Tangen CM, Speights VO, Vogelzang NJ, Trump DL, *et al.* Neoadjuvant

- chemotherapy plus cystectomy compared with cystectomy alone for locally advanced bladder cancer. *N Engl J Med* 2003; 349(9):859-66.
8. Advanced Bladder Cancer Meta-analysis C. 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):202–5: discussion 5-6.
  9. Zargar H, Espiritu PN, Fairey AS, *et al.* Multicenter assessment of neoadjuvant chemotherapy for muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2015; 67:241-9.
  10. Lotan Y, Boorjian SA, Zhang J, Bivalacqua TJ, Porten SP, Wheeler T, *et al.* Molecular subtyping of clinically localized urothelial carcinoma reveals lower rates of pathological upstaging at radical cystectomy among luminal tumors. *Eur Urol* 2019; 76(2):200-6.
  11. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, *et al.* 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.
  12. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, *et al.* Comprehensive molecular characterization of muscle-invasive bladder cancer. *Cell* 2017; 171(3):540-56 e25.
  13. Seiler R, Ashab HAD, Erho N, van Rhijn BWG, Winters B, Douglas J, *et al.* Impact of Molecular Subtypes in Muscle-invasive Bladder Cancer on Predicting Response and Survival after Neoadjuvant Chemotherapy. *Eur Urol* 2017; 72(4):544–54.
  14. Sjö Dahl G, Abrahamsson J, Holmsten K, Bernardo C, Chebil G, Eriksson P, *et al.* Different responses to neoadjuvant chemotherapy in urothelial carcinoma molecular subtypes. *Eur Urol* 2022; 81(5):523-32.
  15. Lotan Y, de Jong JJ, Liu VYT, Bismar TA, Boorjian SA, Huang HC, *et al.* Patients with muscle-invasive bladder cancer with nonluminal subtype derive greatest benefit from platinum based neoadjuvant chemotherapy. *J Urol* 2021; 207(3):541-50.
  16. Kamoun A, de Reynies A, Allory Y, Sjö Dahl G, Robertson AG, Seiler R, *et al.* A consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2020;77(4):420-33.
  17. Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, *et al.* Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci USA.* (2014) a111: 3110–5. doi: 10.1073/pnas.1318376111.
  18. Robertson AG, Kim J, Al-Ahmadie H, Bellmunt J, Guo G, Cherniack AD, *et al.* Comprehensive molecular characterization of Muscle-Invasive bladder cancer. *Cell.* (2018) 174:1033. doi: 10.1016/j.cell.2018.07.036
  19. Sjö Dahl G, Abrahamsson J, Holmsten K, Bernardo C, Chebil G, Eriksson P, *et al.* Different responses to neoadjuvant chemotherapy in urothelial carcinoma molecular subtypes. *Eur Urol* 2022;81(5):523–32.
  20. Kamoun A, de Reynies A, Allory Y, Sjö Dahl G, Robertson AG, Seiler R, Hoadley KA, Groeneveld CS, Al-Ahmadie H, *et al.*; Bladder Cancer Molecular Taxonomy Group: A consensus molecular classification of muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 77(4): 420-433, 2020. PMID: 31563503. DOI: 10.1016/j.eururo.2019.09.006.
  21. Dimitrios Goutas., Andrianos Tzortzis., *et al.* Contemporary Molecular Classification of Urinary Bladder Cancer. *In vivo* 35: 75-80 (2021)
  22. Groenendijk FH, de Jong J, Fransen van de Putte EE, *et al.* ERBB2 mutations characterize a subgroup of muscle-invasive bladder cancers with excellent response to neoadjuvant chemotherapy. *Eur Urol* 2016; 69:384-8.
  23. Liu D, Plimack ER, Hoffman-Censits J, *et al.* Clinical validation of chemotherapy response biomarker ERCC2 in muscle-invasive urothelial bladder carcinoma. *JAMA Oncol* 2016; 2:1094-6.
  24. Van Allen EM, Mouw KW, Kim P, *et al.* Somatic ERCC2 mutations correlate with cisplatin sensitivity in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Cancer Discov* 2014;4:1140–53.
  25. Plimack ER, Dunbrack RL, Brennan TA, *et al.* Defects in DNA repair genes predict response to neoadjuvant cisplatin-based chemotherapy in muscle-invasive bladder cancer. *Eur Urol* 2015;68:959-67.
  26. 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 Feb 3;18(1):11. doi: 10.1186/s13000-023-01295-y. PMID: 36737799; PMCID: PMC9896690.
  27. Leow JJ, Martin-Doyle W, *et al.* Adjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer: a 2013 updated systematic review and meta-analysis of randomized trials. *Eur Urol.* 2014 Jul ;66(1):42-54. doi: 10.1016/j.eururo.2013.08.033. Epub 2013 Aug 28. PMID: 24018020.
  28. Ravanini JN, Assato AK, Wakamatsu A, Alves VAF. Combined use of immunohistochemical markers of

- basal and luminal subtypes in urothelial carcinoma of the bladder: Association with clinicopathological features and outcomes. *Clinics (Sao Paulo)*. 2021 Apr 26;76:e2587. doi: 10.6061/clinics/2021/e2587. PMID: 33909826; PMCID: PMC8050602.
29. Hesswani C, Jackson CL, Marcq G, Hardy C, Kool R, Mansure JJ, Brimo F, Berman DM, Kassouf W. Feasibility and Impact of Immunohistochemistry-based Molecular Subtyping for Muscle-invasive Bladder Cancer in Patients Treated with Radiation-based Therapy. *Eur Urol Open Sci*. 2023 Sep 26;57:22-29. doi: 10.1016/j.euros.2023.09.003. PMID: 38020525; PMCID: PMC10658408.
  30. 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 Oct 27;11(1):21186. doi: 10.1038/s41598-021-00628-5. PMID: 34707176; PMCID: PMC8551252.
  31. Goutas D, Tzortzis A, Gakiopoulou H, Vlachodimitropoulos D, Giannopoulou I, Lazaris AC. Contemporary Molecular Classification of Urinary Bladder Cancer. *In Vivo*. 2021 Jan-Feb;35(1):75-80. doi: 10.21873/invivo.12234. PMID: 33402452; PMCID: PMC7880791.
  32. Groeneveld CS, Pfister C, Culine S, Harter V, Krucker C, Fontugne J, Dixon V, Sirab N, Bernard-Pierrot I, de Reyniès A, Radvanyi F, Allory Y; VESPER trial investigators. Basal/squamous and mixed subtype bladder cancers present poor outcomes after neoadjuvant chemotherapy in the VESPER trial. *Ann Oncol*. 2024 Sep 17:S0923-7534(24)04016-X. doi: 10.1016/j.annonc.2024.09.008. Epub ahead of print. PMID: 39299443.
  33. Remmele W, Stegner HE. Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue. *Pathologe [Internet]*. 1987;8:138-40 Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3303008>.
  34. Barth I, Schneider U, Grimm T, Karl A, Horst D, Gaisa NT, *et al*. Progression of urothelial carcinoma in situ of the urinary bladder: a switch from luminal to basal phenotype and related therapeutic implications. *Virchows Arch Virchows Archiv*. 2018;472:749-58.
  35. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, Lu D, Marks MA, Shih IM, *et al*. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: an immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Mod Pathol Mod Pathol*. 2011;24:1248-53
  36. Wolf AC, Elizabeth Hale Hammond M, Allison KH, Harvey BE, Mangu PB, Bartlett JMS, *et al*. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American society of clinical oncology/ college of American pathologists clinical practice guideline focused update. *J Clin Oncol*. 36:2105-22 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29846122/>
  37. Choi W, Porten S, Kim S, Willis D, Plimack ER, Hofman-Censits J, *et al*. Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder Cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell [Internet]*. 2014;25:152-65 Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610814000348>.
  38. Yorozu T, Sato S, Kimura T, Iwatani K, Onuma H, Yanagisawa T, *et al*. HER2 status in molecular subtypes of Urothelial carcinoma of the renal pelvis and ureter. In: *Clin Genitourin Cancer*, vol. 18: Elsevier Inc.; 2020. p. e443-9.
  39. Instituto Nacional Del Cancer. <https://www.cancer.gov/espanol>.
  40. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, *et al*. Nuevos criterios de evaluación de la respuesta en tumores sólidos: guía RECIST revisada (versión 1.1). *Eur J Cáncer* 2009;45(2):248-260.
  41. Knowles MA, Hurst CD. Molecular biology of bladder cancer: New insights into pathogenesis and clinical diversity. *Nat Rev Cancer*. 2015;15:25-41 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25533674/>.
  42. Yorozu T, Sato S, Kimura T, Iwatani K, Onuma H, Yanagisawa T, *et al*. HER2 status in molecular subtypes of Urothelial carcinoma of the renal pelvis and ureter. In: *Clin Genitourin Cancer*, vol. 18: Elsevier Inc.; 2020. p. e443-9.
  43. Kiss B, Wyatt AW, Douglas J, Skuginna V, Mo F, Anderson S, *et al*. Her2 alterations in muscle-invasive bladder cancer: patient selection beyond protein expression for targeted therapy. *Sci Rep*. 2017;7:1-10.
  44. Kim J, Kim WJ. Will the 40 -gene expression classifier predict responders to EGFR targeted chemotherapy for the invasive bladder cancer patients? *Ann Transl Med*. 2015;3:3-5.
  45. Siddiqui MR, Railkar R, Sanford T, Crooks DR, Eckhaus MA, Haines D, *et al*. Targeting epidermal growth factor receptor (EGFR) and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) expressing bladder Cancer using combination Photoimmunotherapy (PIT). *Sci Rep*. 2019;9:1-14.

46. Meeks JJ, Sjö Dahl G, Lerner SP, Das A, McConkey DJ, Black PC. Tumor subtyping: making sense of heterogeneity with a goal toward treatment. *Bl Cancer*. 2021;7:1-11.
47. Razzaghdoust A, Jafari A. 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(3):274.
48. Font A, Benítez R, Rava M, Marqués M. Immunohistochemistry-Based Taxonomical Classification of Bladder Cancer Predicts Response to Neoadjuvant Chemotherapy. *Cancers (Basel)*. 2020;12:1-13.